

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 340**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04817014 .6**  
96 Fecha de presentación: **06.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1696945**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2006**

54 Título: **Anfífilos peptídicos auto-ensamblantes y métodos relacionados para la administración de factores de crecimiento**

30 Prioridad:  
**05.12.2003 US 527504 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.05.2012**

73 Titular/es:  
**NORTHWESTERN UNIVERSITY  
633 CLARK STREET  
EVANSTON ILLINOIS 60208, US**

72 Inventor/es:  
**STUPP, Samuel, I.;  
DONNERS, Jack, J. J. M.;  
SILVA, Gabriel, A.;  
BEHANNA, Heather, A. y  
ANTHONY, Shawn, G.**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 380 340 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

Anfifilos peptídicos auto-ensamblantes y métodos relacionados para la administración de factores de crecimiento.

Fundamento de la invención.

5 Los factores de crecimiento desempeñan un papel importante en la especialización celular y son factores promotores para controlar la diferenciación de las células madre o desactivar *in vivo* los procesos biológicos latentes, ambos de los cuales pueden conducir a la regeneración de tejidos no funcionales. Los factores de crecimiento se degradan rápidamente y se difunden velozmente fuera del sitio o lesión celular. Por consiguiente, sería útil un armazón o andamio que retuviera el factor de crecimiento en dicho sitio para la liberación a las células circundantes de un modo controlado.

10 En la medicina avanzada están teniendo cada vez más interés los materiales diseñados molecularmente para regeneración de tejidos. Se han estudiado armazones de polímeros sintéticos, incluyendo polímeros basados en ácido L-láctico o glicólico, y biopolímeros que incluyen colágeno, fibrina o alginato. Los factores de crecimiento han sido atrapados físicamente en hidrogeles como tales polímeros, enlazados covalentemente o unidos electrostáticamente a polímeros aniónicos o estructuras, tales como la heparina. Los inconvenientes de estos sistemas y otros relacionados están asociados a la no especificidad de los factores de crecimiento unidos o la degradación requerida de los enlaces covalentes para conseguir el efecto deseado. Más recientemente, se han modificado tanto armazones naturales como sintéticos para que contengan los péptidos encontrados en las proteínas extracelulares que promueven interacciones basadas en el receptor con células y se han usado para promover la adhesión o la diferenciación celular.

20 Los avances en el auto-ensamblaje ofrecen nuevas oportunidades en el diseño molecular de biomateriales. Bloques de construcciones moleculares anfifílicas pueden ser ensamblados en ambientes acuosos para formar armazones con estructuras químicas diversas y bien definidas. En la bibliografía se han descrito diversas clases de anfifilos basados en péptidos, incluyendo péptidos anfifílicos y péptidos funcionalizados con componentes hidrófobos (por ejemplo, colas de alquilo) en uno o ambos extremos. Los péptidos anfifílicos han demostrado formar una variedad de estructuras supramoleculares como nanocintas, cintas, fibras, y cintas retorcidas. Estas estructuras se originan a partir de la formación de láminas  $\beta$  entre moléculas anfifílicas. Un caso especial es el de copolímeros de bloques peptídicos anfifílicos que forman geles con propiedades fuertemente dependientes de la estructura secundaria de los bloques peptídicos individuales. Ejemplos de anfifilos peptídicos con colas de alquilo en uno de sus extremos incluyen anfifilos derivados de restos de péptidos encontrados en el colágeno que dan como resultado la formación de unidades helicoidales triples que forman estructuras micelares esféricas o en forma de disco dependiendo de la longitud de la cola y del número de colas. Otra clase tiene dos colas, una en cada extremo. Esta clase de anfifilos presenta un comportamiento similar a los amiloides porque, al aumentar su concentración, experimentan una transición desde un arrollamiento aleatorio hasta una conformación de tipo lámina  $\beta$  que conduce a las estructuras fibrilares. Existen estudios de nano-estructuras puramente peptídicas con disposiciones antiparalelas, y un estudio de anfifilos peptídicos modificados que se agregan en una disposición antiparalela causada por una sal de amonio cuaternario alquilada no natural.

40 Una clase de anfifilos peptídicos (abreviadamente en lo sucesivo PA por la expresión inglesa *peptide amphiphiles*) está descrita en una o en ambas de las dos solicitudes de patentes en tramitación (WO 03/070749 y WO 03/054146) que comprende una cola hidrófoba lineal acoplada a un bloque peptídico que incluye segmentos formadores de láminas  $\beta$ , residuos cargados para solubilidad y epítopos biológicos. La cola de alquilo está unida al extremo N del péptido, y el segmento epitópico está colocado en el extremo C. Por aplicación de un agente desencadenante, tal como un cambio de pH o de las concentraciones de iones, estas moléculas de PA pueden auto-ensamblarse en un medio acuoso formando nanofibras. Las cadenas de alquilo están en el núcleo de las fibras, con los epítopos expuestos en la periferia para la interacción celular. Los epítopos que se han incorporado a las moléculas de PA mimetizan las proteínas de la matriz extracelular y promueven la adhesión o diferenciación celular a través de la señalización celular. También se ha mostrado que dos moléculas de PA diferentes con epítopos diferentes y carga complementaria pueden co-ensamblarse en la misma nanofibra.

50 Sin embargo, dichos compuestos PA se preparan típicamente mediante síntesis en fase sólida con el componente peptídico generado desde el extremo C hasta el extremo N. Acoplado un componente hidrófobo al extremo N se proporciona un compuesto PA con un grupo ácido o amida libre en la periferia del ensamblaje de las nanofibras micelares resultante puesto que diversas secuencias epitópicas o peptídicas requieren frecuentemente un extremo N libre para bioactividad, dichos compuestos PA serían ineficaces para la interacción con los factores de crecimiento.

Sumario de la invención

55 A la luz de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos peptídicos anfifílicos, composiciones ensambladas de los mismos y/o métodos relacionados para su uso para afectar a la biodisponibilidad de una gama de factores de crecimiento, superando con ello diversas deficiencias e inconvenientes de la técnica anterior, incluyendo los reseñados anteriormente. Los expertos en la técnica entenderán que uno o más aspectos de esta invención pueden cumplir ciertos objetivos, mientras que uno o más de otros aspectos pueden cumplir otros

ciertos objetivos. Cada objetivo no puede aplicarse de igual modo, en todos sus sentidos, a cada aspecto de esta invención. Como tales, los siguientes objetos pueden ser considerados en alternativas con respecto a uno cualquiera de los aspectos de esta invención.

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos peptídicos anfifílicos que comprenden componentes peptídicos acoplados en su extremo N a uno o más de una gama de secuencias de epítomos capaces de interacción no covalente con uno o más factores de crecimiento, pudiendo dichos epítomos comprender y ser derivados del producto de reconocimiento de un proceso de presentación de fagos.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende un ensamblaje de uno o más de los compuestos peptídicos anfifílicos antes mencionados para la presentación de la(s) secuencia(s) epitópicas de unión acoplada(s) a ellos, pudiendo dichas composiciones comprender otros compuestos peptídicos anfifílicos ausentes, tales como una secuencia de epítomos.

También puede ser un objeto de esta invención proporcionar una o más de las composiciones antes mencionadas que comprenden uno o más factores de crecimiento correspondientes a una secuencia de epítomos acoplada, siendo dichas composiciones capaces de auto-ensamblaje para la administración y liberación de factores de crecimiento.

15 También es un objeto de la presente invención proporcionar uno o más ensamblajes de composiciones de los compuestos peptídicos anfifílicos antes mencionados y su uso para afectar a la biodisponibilidad de los factores de crecimiento y/o a la diferenciación de las células madre.

20 Otros objetos, características, beneficios y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de este sumario y las siguientes descripciones de ciertas realizaciones, y será evidente para los expertos en la técnica disponer de composiciones peptídicas y armazones o arquitecturas para la administración de factores de crecimiento. Dichos objetos, características, beneficios y ventajas serán evidentes de lo anterior tomado junto con los ejemplos, datos, figuras que se acompañan y todas las inferencias razonables que puedas deducirse de los mismos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto peptídico anfifílico que comprende:

25 un componente peptídico que comprende un producto de reconocimiento de factores de crecimiento de un proceso de presentación de fagos en su extremo N, teniendo dicho producto de reconocimiento una longitud de 1-13 aminoácidos y siendo capaz de interactuar con un factor de crecimiento a través de una interacción no covalente que no compite con la unión del factor de crecimiento a receptores extracelulares, y

un componente hidrófobo que comprende un resto alquilo que varía de C<sub>6</sub> a C<sub>22</sub> acoplado a dicho componente peptídico en su extremo C.

30 Dicho producto de reconocimiento se puede seleccionar de secuencias de epítomos que proporcionan una o más interacciones de unión con un factor de crecimiento, incluyendo dichos productos/secuencias y los factores de crecimiento correspondientes, pero sin limitación, los descritos más completamente más adelante. Los compuestos de esta invención y/o sus componentes peptídicos pueden ser sustancialmente lineales o ramificados, siendo dichas configuraciones ramificadas y su preparación como las descritas en la solicitud de patente en tramitación WO 2005/056576 titulada "*Branch Peptide Amphiphiles, Related Epitope Compounds and Self-Assembled Structures Thereof*".

40 El producto de reconocimiento se puede seleccionar de secuencias de epítomos que proporcionan interacciones de unión con los factores de crecimiento BMP-2, TGF-β1, VEGF, FGF-2, NT-3 y laminina-5. En particular, la secuencia del epítomo de unión puede comprender YPVHPST, que puede estar en una interacción de unión no covalente con el factor de crecimiento BMP-2. Alternativamente, la secuencia del epítomo de unión puede comprender LPLGNSH, que puede estar en interacción de unión no covalente con el factor de crecimiento TGF-β1.

El componente peptídico del compuesto peptídico anfifílico de la presente invención puede tener una carga neta a un pH fisiológico. Dicho componente peptídico puede comprender residuos seleccionados de alanina, glicina, leucina, cisteína, valina y serina.

45 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición peptídica que comprende una pluralidad de primeros compuestos peptídicos anfifílicos del primer aspecto, en donde el componente peptídico tiene una carga neta a pH fisiológico. Dichas composiciones pueden comprender además una pluralidad de segundos compuestos peptídicos anfifílicos, comprendiendo los segundos compuestos peptídicos un componente peptídico y un componente hidrófobo acoplado al componente peptídico, que tiene una carga neta complementaria a un pH fisiológico, y estando ausente un producto de reconocimiento de factores de crecimiento. La secuencia de aminoácidos de los segundos compuestos peptídicos puede tener una longitud más corta que la longitud de la secuencia de aminoácidos del primer péptido. La composición del segundo aspecto puede comprender un ensamblaje micelar en un medio acuoso. Dichos ensamblajes proporcionan una presentación potenciada de uno o más productos de reconocimiento, que se extiende más allá de la periferia general del ensamblaje micelar. Dicha presentación potenciada se puede usar para

50

55 afectar y/o controlar la biodisponibilidad de uno o más factores de crecimiento. En este sentido, diversas composi-

ciones de esta invención y métodos relacionados con ellas se pueden usar en un ambiente de células madre para interacción o unión no covalente con uno o más factores de crecimiento, tanto si el factor de crecimiento es producido por la célula madre como si es administrado al ambiente celular junto con una o más de las composiciones antes mencionadas.

- 5 La composición del segundo aspecto puede comprender al menos un factor de crecimiento, por ejemplo seleccionado de BMP-2, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF-2, NT-3, laminina-5 y sus combinaciones, que interacciona no covalentemente con ella.

Independientemente del uso o aplicación como composición, los anfililos peptídicos de esta invención pueden comprender un componente peptídico de longitud o secuencia variada dependiendo de la flexibilidad deseada, la carga y/o la capacidad de interacción o unión intermolecular. El componente hidrófobo de dichos compuestos también puede ser variado (por ejemplo, el resto alquilo puede ser saturado o insaturado, etc.), estando limitados dichos componentes solamente por el carácter anfifílico resultante y el efecto sobre las composiciones o ensamblajes de dichos compuestos.

- 10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para usar un compuesto peptídico anfifílico para afectar a la biodisponibilidad de un factor de crecimiento, comprendiendo dicho método:

proporcionar un ensamblaje micelar que comprende una composición del segundo aspecto en la cual la secuencia de aminoácidos del componente peptídico del segundo compuesto tiene una longitud más corta que la longitud de la secuencia de aminoácidos del primer compuesto peptídico; y

poner en contacto una célula madre con dicho ensamblaje.

- 20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un ensamblaje micelar que comprende una composición del segundo aspecto en la cual la secuencia de aminoácidos del componente peptídico del segundo compuesto tiene una longitud más corta que la longitud de la secuencia de aminoácidos del primer compuesto peptídico para uso en medicina. Dicho ensamblaje se puede usar para regenerar tejido, en donde una célula madre se pone en contacto con dicho ensamblaje.

- 25 **[0021]** El factor de crecimiento puede ser producido por la célula madre y puede seleccionarse de BMP- 2, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF-2, NT-3, laminina-5 y sus combinaciones. El producto de reconocimiento de la composición puede seleccionarse de secuencias de epítomos que proporcionan interacción no covalente con uno de los factores de crecimiento BMP-2 y TGF- $\beta$ 1. Una de dichas secuencias de epítomos comprende YPVHPST que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento BMP-2; otra comprende LPLGNSH que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1.

El contacto de la composición con una célula madre es preferiblemente suficiente para la diferenciación de células madre. El ensamblaje puede comprender el factor de crecimiento BMP-2 y el producto de reconocimiento puede comprender una secuencia de epítomos que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento. La célula madre puede ser una célula madre mesenquimatosas, que puede diferenciarse en células óseas.

- 35 Una realización de la presente invención es una composición que incluye una mezcla de anfililos peptídicos de la invención teniendo cada uno un epítomo de unión, y anfililos peptídicos de carga sin epítomo de unión. La mezcla es capaz de formar nanofibras u otras micelas auto-ensambladas que consisten en los anfililos peptídicos de carga y los anfililos peptídicos auto-ensamblados que tienen el epítomo de unión. Los anfililos peptídicos en la composición tienen una porción de la cola de alquilo, una porción de lámina beta y una porción cargada. Preferiblemente el epítomo en el anfililo peptídico de la invención es mayor que el del anfililo peptídico de carga.

Otra realización de la presente invención es una composición o sistema de nanofibras auto-ensambladas u otras micelas auto-ensambladas que incluyen anfililos peptídicos de la invención que tienen un epítomo de unión y anfililos peptídicos de carga. Los anfililos peptídicos con el epítomo de unión son preferiblemente más largos que los anfililos peptídicos de carga. En las estructuras auto-ensambladas, los anfililos peptídicos con el epítomo de unión preferiblemente sobresalen de la superficie de la nanofibra o micela auto-ensamblada. Preferiblemente el anfililo peptídico con el epítomo de unión es capaz de interaccionar con factores de crecimiento u otros péptidos, aminoácidos o ácidos nucleicos a través de una interacción no covalente, incluso más preferiblemente la interacción no covalente entre los factores de crecimiento y los epítomos no compiten con la unión de los factores de crecimiento a los receptores extracelulares.

- 50 Las composiciones de nanofibras o micelas auto-ensambladas pueden comprender hidrogeles que pueden incluir además un factor de crecimiento unido no covalentemente a anfililos peptídicos de la nanofibra que tiene el epítomo de unión. Dichos factores de crecimiento se pueden añadir *in vitro* o pueden ser los del sitio de una lesión de un paciente *in vivo*. Los factores de crecimiento que interaccionan con los anfililos peptídicos auto-ensamblados pueden incluir, pero sin limitación, proteínas morfogenéticas, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial vascular, neurotrofinas y factores mitógenos como FGF- 2, proteínas de erizo sónico y proteínas Wnt. La composición puede incluir células, tales como, pero sin limitación, células madre dentro de los hidrogeles de las

nanofibras. Preferiblemente, los factores de crecimiento que interactúan no covalentemente con los anfilos peptídicos auto-ensamblados son liberados al tejido o células circundantes a través de la interacción con los receptores extracelulares o por degradación de la matriz de nanofibras. Además de las células, se pueden unir o encapsular en el hidrogel otros compuestos terapéuticos. Estos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, anti-inflamatorios, compuestos quimioterapéuticos o sus combinaciones en el interior de los hidrogeles de las nanofibras. Preferiblemente, los factores de crecimiento que interactúan no covalentemente con los anfilos peptídicos auto-ensamblados se liberan al tejido o células circundantes a través de la interacción con los receptores extracelulares o por degradación de la matriz de las nanofibras.

En la presente memoria se describe un método para preparar nanofibras o micelas de anfilos peptídicos auto-ensamblados que incluye el auto-ensamblaje por mezclamiento o combinación de anfilos peptídicos que tienen un epítipo de unión con anfilos peptídicos de carga, en donde dichos anfilos peptídicos con epítipos de unión tienen una longitud mayor que dichos anfilos peptídicos de carga. Las nanofibras o micelas se pueden formar por adición de iones multivalentes, por adición de anfilos peptídicos cargados complementarios o por deshidratación o adición de un ácido o una base a los anfilos peptídicos. Cuando se forman hidrogeles, las micelas o nanofibras se forman preferiblemente por adición de iones multivalentes o iones ya presentes en medios celulares o fluidos corporales. Preferiblemente, el anfilo peptídico que tiene el epítipo de unión tiene una secuencia derivada de un proceso de presentación de fagos.

El tejido puede ser tratado administrando a un sitio de un paciente que necesite regenerar un tejido, nanofibras u otras micelas auto-ensambladas que incluyen anfilos peptídicos con epítipos para que se unan no covalentemente a factores de crecimiento. Las nanofibras y sus hidrogeles pueden incluir células, tales como, pero sin limitación, células madre. Además de células, pueden ser encapsulados en el hidrogel o unidos a dicho hidrogel otros compuestos terapéuticos. Estos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, compuestos anti-inflamatorios, quimioterapéuticos o sus combinaciones. Preferiblemente, los factores de crecimiento unidos no covalentemente a una estructura auto-ensamblada se liberan en el sitio por interacción con los receptores extracelulares o por degradación de la matriz. Preferiblemente, las micelas o nanofibras auto-ensambladas que contienen factores de crecimiento y/o células madre se administran a un sitio de un paciente que tiene lesiones, tales como, pero sin limitación, huesos, cartílagos, médula espinal, tejido cerebral, nervios dañados o una de sus combinaciones.

Otra realización de la presente invención es un anfilo peptídico que incluye una porción de cola de alquilo acoplada a un primer extremo de una porción peptídica formadora de lámina beta que también tiene un segundo extremo. Una porción peptídica epitópica del anfilo peptídico está acoplada al segundo extremo de la porción peptídica formadora de lámina beta, de tal modo que el epítipo está disponible para una interacción no covalente con otras moléculas o proteínas. El epítipo tiene una secuencia que se deriva mediante un proceso de presentación de fagos. El anfilo peptídico puede incluir alternativamente un péptido con una porción cargada que tiene dos extremos y está acoplado entre el segundo extremo de la porción formadora de lámina beta y la porción peptídica epitópica.

Un ensamblaje o sistema para liberar factores de crecimiento a células puede incluir un armazón preparado a partir de anfilos peptídicos auto-ensamblados, incluyendo al menos una porción de los anfilos peptídicos epítipos peptídicos para que se unan no covalentemente con factores de crecimiento, y en donde los epítipos de unión con los factores de crecimiento sobresalen por encima de la superficie de las nanofibras. La secuencia de aminoácidos del epítipo se deriva de un proceso de presentación de fagos. Dicho armazón, puede incluir también células madre y se puede usar en un método para hacer crecer tejido, regenerar tejido o soportar el trasplante de tejido en un paciente. Además de células, pueden ser encapsulados en el hidrogel del armazón o unidos en dicho hidrogel otros compuestos terapéuticos. Estos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, compuestos anti-inflamatorios, quimioterapéuticos o sus combinaciones. Un armazón puede ser insertado en el sitio de un paciente o ser formado *in vivo*.

El armazón incluye anfilos peptídicos auto-ensamblados que tienen epítipos peptídicos para unión no covalente con los factores de crecimiento y en donde los epítipos sobresalen por encima de la superficie de las nanofibras del armazón o son preparados por un proceso de presentación de fagos, y los factores de crecimiento se liberan desde el armazón a las células circundantes de dicho armazón.

Los hidrogeles que se unen a los factores de crecimiento descritos tienen varias aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa y de trasplantes. Las composiciones, los métodos de preparación y los métodos de su utilización pueden ser expandidos fácilmente a otros epítipos sobre los anfilos peptídicos para otros factores de crecimiento y por tanto a la regeneración de una amplia variedad de tejidos o soportes de tejidos trasplantados en un paciente. Por ejemplo, puesto que BMP-2 y TGF- $\beta$ 1 desempeñan un papel importante en la diferenciación osteoblástica y condrogénica de células madre mesenquimatosas, respectivamente, las micelas auto-ensambladas de la presente invención se pueden usar para la regeneración de hueso y cartílago. En segundo lugar, la BMP-2 también desempeña un papel importante en la formación del cerebro y la médula espinal dorsal. Por tanto, los geles se pueden usar también en combinación con células madre neurales para la regeneración de la médula espinal dañada y/o para reparar zonas dañadas del cerebro en caso de ictus.

Como se ha indicado antes, en ciertas realizaciones, esta invención utiliza una extensión de la propuesta de fibras

mixtas para incorporar un PA que sea capaz de unir factores de crecimiento por interacciones no covalentes selectivas. De este modo, la biodisponibilidad de los factores de crecimiento puede ser modulada ajustando la fuerza de unión y el número de sitios de unión. La concentración inicial del factor de crecimiento se aumentará o disminuirá dependiendo de si es más dominante el efecto localizador de la unión o si lo es el efecto de la unión que convierte en inactivos a los factores de crecimiento. En cualquier caso, la liberación de los factores de crecimiento puede ser mantenida durante un largo periodo. Para promover la unión del epítipo reconocido por un factor de crecimiento, se puede preparar un PA, de tal modo que el epítipo se extienda desde la superficie de la fibra. La secuencia de aminoácidos requerida del epítipo de unión se determina usando la presentación de fagos. Con fines de ilustración, los factores de crecimiento elegidos incluyen proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) y el factor del crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). La BMP-2 está, entre otros, implicada en la formación de los huesos y el desarrollo del cerebro y la médula espinal dorsal, mientras que el TGF- $\beta 1$  está implicado en la formación de cartílagos y en la diferenciación de las células de la musculatura lisa. Los geles correspondientes se usarán para controlar la diferenciación de células madre mesenquimatosas. Se ha demostrado que las células madre mesenquimatosas se diferencian *in vitro* e *in vivo* en una variedad de linajes, como hueso, cartílago, grasa, células musculares y miocardio. La diferenciación en el linaje óseo bajo la influencia de la BMP-2 se muestra más adelante.

Los geles son superiores en la adición de factores de crecimiento a medios para controlar la diferenciación de células madre mesenquimatosas en el linaje osteogénico esperado. Además, los geles de unión suprimen inicialmente la diferenciación en todos los otros linajes. Se cree que este comportamiento es el resultado de la biodisponibilidad reducida del factor de crecimiento o de una exposición más gradual de las células a estos factores de crecimiento en los geles de unión. Finalmente, también se encuentra algo de expresión del músculo liso  $\alpha$  en los geles de unión. Esto sugiere que la exposición prolongada a la BMP-2 o la ausencia de factores que dirigen la diferenciación hasta completarla deberían tener efectos negativos sobre la homogeneidad de la población. Finalmente, los niveles de la BMP-2 producida endógenamente parecen suficientes cuando está presente la secuencia de unión para moderar su biodisponibilidad.

El co-ensamblaje satisfactorio de los PA que se unen a factores de crecimiento con los PA de carga regulares permite la creación de hidrogeles que son capaces de unirse a factores de crecimiento, retenerlos en los geles y modular su biodisponibilidad. Las poblaciones más homogéneas de células especializadas se obtienen inicialmente cuando las células madre mesenquimatosas se diferencian en geles con los PA de unión en comparación con las diferenciadas en ausencia de los PA de unión. Se pueden desear otros PA de carga para variar las propiedades físicas de los geles, dependiendo de sus aplicaciones y pudieran desearse otras secuencias de unión para optimizar la fuerza de unión. Además, la propuesta demostrada por esta invención permite la incorporación de múltiples señales por simple mezclado de múltiples PA de unión con una carga. Más probablemente, se requerirán múltiples factores de crecimiento para optimizar más la diferenciación de células madre. Actualmente está siendo investigada la diferenciación de células madre mesenquimatosas expuestas a múltiples factores de crecimiento. Potencialmente la liberación temporal en los múltiples sistemas de factores de crecimiento se puede conseguir seleccionando agentes de unión con diferentes constantes de asociación para los factores de crecimiento. Además, se están realizando estudios *in vivo* de los sistemas descritos en la presente descripción. Finalmente, la metodología presentada aquí se puede extender fácilmente a cualquier factor de crecimiento o proteína implicado en el reclutamiento, la especialización o el mantenimiento de células, constituyendo por tanto una propuesta altamente prometedora para la medicina regenerativa.

#### Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 ilustra los PA representativos que comprenden secuencias de epítomos y los PA complementarios para usar en su ensamblaje.

#### Descripción detallada de ciertas realizaciones.

La invención describe un sistema basado en anfilos peptídicos (PA) auto-ensamblantes que es capaz de unir factores de crecimiento a través de interacciones no covalentes específicas. Los factores de crecimiento desempeñan un papel importante en la señalización celular y por tanto son factores prometedores para controlar la diferenciación de células madre, soportar la incorporación de tejido trasplantado y/o molecular o fisiológico específico, o re-activar procesos biológicos latentes *in vivo* que pueden conducir a la regeneración de tejidos no funcionales. Los factores de crecimiento se degradan rápidamente *in vivo* y se difunden rápidamente alejándose del sitio de la lesión. Por tanto, se necesita un almacén que retenga el factor de crecimiento en el sitio de la lesión y libere los factores de crecimiento a las células circundantes de un modo controlado. Los hidrogeles basados en anfilos peptídicos auto-ensamblados han demostrado ser capaces de cumplir ciertas funciones de una matriz extracelular (abreviadamente ECM por la expresión inglesa *extracellular matrix*), es decir, promover la adhesión celular y controlar la diferenciación. La presente invención se refiere a una modificación de estos sustitutos de la ECM con secuencias peptídicas que sean capaces de unirse de un modo específico a factores de crecimiento, que incluyen, pero sin limitación, proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2), factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), VEGF e IL-6. Estas secuencias peptídicas de factores de crecimiento se obtienen a través de técnicas de presentación de fagos, acopladas a anfilos peptídicos para formar anfilos peptídicos de unión. Los anfilos peptídicos de unión y los anfilos peptídicos de carga se pueden auto-ensamblar para formar un hidrogel que puede ser moldeado en una forma dada y

usado como un armazón para reparar tejidos. Alternativamente los anffilos peptídicos de unión y los anffilos peptídicos de carga se pueden introducir *in vivo* o *in vitro* en una muestra de células o tejido y auto-ensamblarse a un hidrogel en la muestra.

5 Como se ha indicado antes, los anffilos peptídicos de esta invención pueden comprender una cola de alquilo, una secuencia peptídica formadora de láminas $\beta$  y una secuencia peptídica bioactiva. Los dos primeros bloques dan como resultado la formación de fibras micelares, tales como, pero sin limitación, nanofibras, que bajo condiciones apropiadas (neutralización por adición de iones multivalentes) forman hidrogeles u otros geles húmedos cargados con disolvente. Preferiblemente, el epítipo bioactivo está cargado parcialmente para solubilidad, pero esta carga puede ser variada en una amplia gama de secuencias como secuencias de unión de integrinas, secuencias neuro-activas etc. Además, los anffilos peptídicos de carga complementaria se co-ensamblan formando fibras mixtas. Este principio se puede usar para preparar nanofibras que consisten en PA regulares y PA más largos con secuencias de epítipos de unión de factores de crecimiento, en los cuales las secuencias de unión se extienden desde la superficie de las fibras. Las secuencias de unión del factor de crecimiento deseadas se obtienen a través de presentación de fagos usando colecciones de péptidos aleatorias, lo que conduce a secuencias de unión fuerte usando procesos de selección combinatoria. La liberación de los factores de crecimiento será inducida por degradación de la matriz, unión a un receptor extracelular o una de sus combinaciones.

15 Las tecnologías existentes atrapan factores de crecimiento en hidrogeles, enlazándolos covalentemente con cadenas polímeras (documento WO 03/040336 y patente de EE.UU. publicación n° 0020007217) o uniéndolos electrostáticamente a polímeros aniónicos (documento WO 00/13710) o heparina (WO 00/64481). La desventaja del sistema de cadenas es la preparación compleja y la posibilidad de que los factores de crecimiento no puedan alcanzar los receptores extracelulares. Los factores de crecimiento atrapados y los factores de crecimiento complejados con el polímero aniónico se liberan de un modo relativamente rápido y el control sobre la liberación prolongada es deficiente. Por ejemplo, los factores de crecimiento unidos al polímero aniónico se liberan en 8 horas. El sistema de unión de heparina no es específico (por ejemplo, es posible la unión no deseada de factores presentes en el suero) y está limitado a un sub-conjunto de factores de crecimiento. Ventajosamente, la presente invención está diseñada del tal modo que solamente el factor de crecimiento deseado está complejado con una fuerza de unión que es suficientemente alta para retener el factor de crecimiento en un estado unido, pero es suficientemente débil como para no competir con la unión a los receptores extracelulares.

20 Un aspecto de la invención descrita en la presente memoria es que puede ser usada para la derivación de secuencias peptídicas que unen factores de crecimiento usando técnicas de presentación de fagos y la subsiguiente preparación de anffilos peptídicos que llevan estas secuencias de unión. Los factores de crecimiento preparados por la técnica de fagos pueden incluir las proteínas morfogenéticas óseas, el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$ , las neurotrofinas y los factores mitógenos FGF-2, las proteínas de erizo sónico y la proteína Wnt-3a. Estas proteínas factores de crecimiento se acoplan al anffilo peptídico más corto para formar anffilos peptídicos más largos que llevan el epítipo de factores de crecimiento. Estos PA que llevan epítipos de factores de crecimiento o anffilos peptídicos de unión, se ensamblan conjuntamente con PA de carga más cortos o complementarios para generar nanofibras con los epítipos de unión extendiéndose desde la superficie, que pueden subsiguientemente formar hidrogeles por adición de iones multivalentes o por un cambio en el pH. Los hidrogeles resultantes se pueden usar luego con células, tales como, pero sin limitación, células madre encapsuladas dentro del hidrogel o solamente como un vehículo de administración, para regeneración de tejidos *in vivo*. Además de las células, pueden ser encapsulados en el hidrogel o unidos a dicho hidrogel otros compuestos terapéuticos. Estos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, compuestos anti-inflamatorios, compuestos quimioterapéuticos o sus combinaciones.

30 La presentación de fagos puede usarse para generar sondas moleculares contra dianas específicas y para el análisis y manipulación de interacciones proteína-ligando. La presentación de fagos se usa para determinar las secuencias de aminoácidos, péptidos o proteínas que se unirán a las moléculas diana, tales como, pero sin limitación, aminoácidos, péptidos, factores de crecimiento, enzimas y diversos ácidos nucleicos. La presentación de fagos se puede realizar sobre moléculas diana, como factores de crecimiento sorbidos físicamente en placas de microtitulación con pocillos usando una genoteca comercial. Preferiblemente la genoteca consiste en fagos en los cuales el extremo N de la proteína de revestimiento G3 ha sido extendido con 1 a aproximadamente 13 o más aminoácidos aleatorios de tal modo que esté presente cada combinación posible de aminoácidos. La genoteca se expone a las moléculas diana de tal modo que los factores de crecimiento y subsiguientemente los fagos unidos no específicamente se eluyan con una solución detergente. Después de la recuperación de los fagos unidos, esta población se amplifica por ejemplo en *E. coli* y el proceso se repite dos veces más con condiciones de elución cada vez más rigurosas. La población final está muy enriquecida en fagos de unión y el DNA de varios de los clones puede ser secuenciado, permitiendo la identificación de la secuencia de aminoácidos mostrada en estos fagos. Subsiguientemente, se puede realizar un ensayo ELISA para estimar las fuerzas de unión relativas de los clones aislados. Se usa síntesis en estado sólido para obtener los péptidos para preparar anffilos peptídicos de unión usando las secuencias de aminoácidos identificadas.

45 Los componente peptídicos de los PA de carga y los anffilos peptídicos epitópicos de unión de la presente invención pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos artificiales. También se contempla la incorporación de aminoácidos artificiales, tales como beta- o gamma-aminoácidos y los que contienen cadenas laterales no naturales y/u

otros monómeros similares, tales como hidroxiaácidos, con el efecto a este respecto del componente correspondiente sea similar a los péptidos y se auto-ensamblen para formar micelas, tales como nanofibras

Diversos anfillos peptídicos de la presente invención pueden ser sintetizados usando técnicas preparatorias muy conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo las descritas en el documento WO 03/054146 y modificaciones de las originalmente descritas por Hartgerink, *et al.* (Véase, por ejemplo, J.D. Hartgerink, E. Beniash y S.I. Stupp, *Science* 294, 1683-1688, 2001). También se consideran en la práctica de esta invención anfillos peptídicos ramificados con los cuales pueden usarse los métodos de síntesis y los epítomos de la presente invención. El anfillo peptídico ramificado puede prepararse usando los métodos y composiciones como se han descrito en la solicitud de patente en tramitación antes mencionada WO 2005/056576. Dicho anfillo peptídico ramificado con un epítomo de unión podría ser auto-ensamblado en una nanofibra. El anfillo peptídico ramificado tendría una porción de cola de alquilo acoplada al primer extremo de una porción peptídica formadora de láminas beta y en un segundo extremo a una porción peptídica epitópica que incluye una o más ramificaciones peptídicas. El péptido incluye aminoácidos ramificados y una porción peptídica cargada. La porción peptídica epitópica ramificada puede estar acoplada a un segundo extremo de la porción peptídica formadora de láminas beta del anfillo peptídico. La secuencia de epítomos de unión para el péptido ramificado puede ser derivada de un proceso de presentación de fagos. A la presente invención se le pueden aplicar los esquemas de síntesis expuestos en estos documentos. Los anfillos peptídicos pueden estar en su forma totalmente protonada, su forma parcialmente protonada o como sales de adición ácidas o básicas. Generalmente, dichos anfillos peptídicos pueden ser preparados por química de péptidos en fase sólida estándar, como se describe en los documentos antes mencionados o citados en ellos. Pueden hacerse modificaciones de estos métodos de síntesis como las conocidas por los expertos en la técnica, usando métodos y técnicas de síntesis conocidos o modificaciones sencillas dependiendo de la composición anfífila o de la secuencia peptídica deseada.

Los péptidos de carga, de la clase mostrada en la Figura 1, tienen preferiblemente una longitud inferior a la de los anfillos peptídicos con los epítomos de unión de modo que las nanofibras auto-ensambladas a partir de una combinación de estos anfillos peptídicos den como resultado que sobresalga de la superficie de la nanofibra el epítomo de unión a los factores de crecimiento. Los anfillos peptídicos de carga complementarios tienen grupos laterales procedentes de los aminoácidos que interactúan con los del péptido de carga mediante una unión ácido-base u otro tipo de unión.

Las secuencias peptídicas derivadas del proceso de presentación de fagos se pueden usar como sitio o epítomo de unión sobre un anfillo peptídico para unión no covalente a los factores de crecimiento. Estos péptidos o epítomos de unión pueden ser acoplados al extremo libre del péptido formador de láminas beta, al extremo libre del péptido cargado o al extremo libre del péptido espaciador, con la condición que estén en el extremo N del componente peptídico.

Un diseño de anfillo peptídico puede comprender una cola hidrófoba sencilla que sirve para crear la porción delgada de la forma cónica de la molécula para el auto-ensamblaje de los anfillos peptídicos. La cola hidrófoba es una cadena de alquilo que tiene una longitud de 6 a 22 átomos de carbono. La cadena de alquilo puede estar unida covalentemente al segmento estructural formador de láminas beta del anfillo peptídico.

El segmento estructural peptídico formador de láminas beta se puede usar para unir covalentemente el grupo de cola al péptido del fago; o al péptido cargado, al péptido espaciador y al péptido del fago; o al péptido cargado y al péptido del fago. El segmento estructural del péptido formador de lámina beta puede ser unido covalentemente en un extremo a la cola y en el otro a una secuencia de aminoácidos de los diversos péptidos. Si se desea una reticulación, se puede usar el aminoácido cisteína en cualquiera de los segmentos, pero preferiblemente en el segmento estructural formador de láminas beta. Si no se desea una reticulación, se pueden usar en esta región otros aminoácidos hidrófobos, tales como, pero sin limitación, alanina, serina o leucina (por ejemplo, SLSL o AAAA como se ha descrito con más detalle en la presente memoria). Este sistema exento de cisteína puede ser más apropiado para aplicaciones biológicas *in vivo* para controlar la tasa de degradación de la matriz de nanofibras. Se puede esperar que la modificación SLSL para el sistema conduzca a un auto-ensamblaje más lento de las nanofibras que puede usarse para controlar *in vivo* el ensamblaje de los armazones. Sin desear vincularse a esta teoría, se cree que las cadenas laterales voluminosas de leucina pueden requerir más tiempo para empaquetarse en la fibra. Un auto-ensamblaje más lento puede tener también mayores aplicaciones en un ambiente funcional *in situ*, tal como en un quirófano, en donde puede ser ventajoso retrasar la formación de las nano-fibras. El segmento estructural formador de láminas beta puede incluir también un fragmento enlazador flexible compuesto de glicina u otros aminoácidos. Cuando el segmento estructural incluye aminoácidos hidrófobos, el mismo y la cola de alquilo pueden ser considerados un segmento hidrófobo. Cuando el segmento estructural incluye aminoácidos hidrófilos, el mismo y el grupo de cabeza hidrófilo pueden ser considerados un segmento hidrófilo.

La unidad formadora de lámina§ incluye preferiblemente los aminoácidos hidrófobos que pueden interactuar para formar láminas beta y que ayudan a producir la forma cónica global del anfillo peptídico. Para el anfillo peptídico que sobresale, se puede elegir el número de aminoácidos de esta unidad para proporcionar un anfillo peptídico que sea más largo que los anfillos peptídicos de carga usados para formar las nanofibras y proporcionar accesibilidad al péptido en el anfillo peptídico de unión. En este segmento puede haber de aproximadamente 4 a aproxima-

damente 10 aminoácidos y más preferiblemente aproximadamente 6 aminoácidos. Para un segmento formador de láminas  $\beta$  el aminoácido adecuado puede incluir, pero sin limitación, glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, y otros aminoácidos no naturales que se pueden usar de un modo químico y estructural similar en el anfitrión peptídico. En el anfitrión peptídico de unión está presente un segmento cargado que proporciona solubilidad del anfitrión peptídico en un ambiente acuoso, y preferiblemente en el sitio de un paciente. El segmento del péptido cargado puede incluir los aminoácidos y sus combinaciones que proporcionen esta solubilidad y permitan el auto-ensamblaje y no están limitados a aminoácidos polares, tal como E o K y sus combinaciones, para modificar la solubilidad del anfitrión peptídico. En este segmento puede haber de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 aminoácidos, y preferiblemente hay aproximadamente 3 ó 4 aminoácidos. Este segmento está unido en un primer extremo al péptido estructural y su segundo extremo se usa para unirse al péptido derivado del proceso de presentación de fagos. Un péptido con grupos espaciadores también puede ser incluido en el anfitrión peptídico. El grupo espaciador puede incluir aminoácidos, tales como, pero sin limitación, S y G, y el grupo espaciador puede incluir de 1 a aproximadamente 6 aminoácidos. Cuando los péptidos presentados en el fago tengan un extremo N libre, puede ser modificado el esquema de síntesis clásico para los anfitriones peptídicos para proporcionar un extremo N libre. Esto se puede conseguir sintetizando un derivado del ácido aspártico con el cual la cadena lateral pueda ser funcionalizada con dodecil-amina. El acoplamiento de este aminoácido a la resina Wang permitió completar la síntesis de PA por medio de química de Fmoc en fase sólida clásica sin más necesidad que funcionalizar el extremo N. El PA libre puede obtenerse por tratamiento con 95% de TFA/2,5% de agua/2,5% de triisopropilsilano. El TFA residual se puede eliminar disolviendo el PA en HCl 3 mM, equilibrando durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por liofilización. La síntesis satisfactoria de estas moléculas puede ser confirmada usando espectrometría de masas con electropulverización.

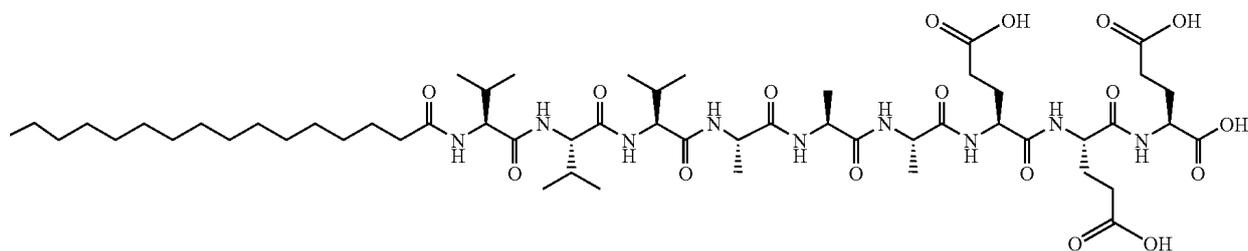
Los anfitriones peptídicos con los epítopos de factores de crecimiento pueden auto-ensamblarse en el sitio de un paciente *in vivo* usando los iones presentes en los fluidos corporales o iones/reactivos añadidos para promover el auto-ensamblaje. Alternativamente una composición de anfitriones peptídicos adecuados con epítopos de unión de factores de crecimiento se vierte en un molde y el auto-ensamblaje se usa para formar un armazón con la forma de un tejido o hueso que ha de ser reemplazado o regenerado. El armazón moldeado puede ser insertado en el paciente en el sitio que necesita el tratamiento de reparación o regenerativo. En el caso de trasplante de tejidos, los anfitriones peptídicos con los epítopos de unión de factores de crecimiento pueden ser conformados en un molde como una estructura de soporte o matriz y ser usados como un soporte en el paciente para el tejido trasplantado. Las nanofibras de anfitrión peptídico o sus armazones pueden incluir células, tales como, pero sin limitación, células madre. Otros compuestos terapéuticos pueden ser encapsulados en el hidrogel o unidos a dicho hidrogel. Estos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, compuestos anti-inflamatorios, quimioterapéuticos o sus combinaciones.

El co-ensamblaje de anfitriones peptídicos, que tienen epítopos de unión de factores de crecimiento, con los anfitriones peptídicos de carga terminados en ácido de péptidos cargados con péptidos estructurales formadores de láminas beta más cortos, puede ser usado para preparar nanofibras y armazones de la presente invención. Sin limitación se pueden usar uno o más anfitriones peptídicos con diferentes epítopos de unión de factores de crecimiento y una variedad de anfitriones peptídicos de carga se puede usar para preparar los armazones y nanofibras de la presente invención. La cantidad de anfitrión peptídico con epítopos de unión de factores de crecimiento comparada con la de los anfitriones peptídicos de carga puede variarse sin limitación en la preparación de los armazones y nanofibras de la presente invención. Las micelas y nanofibras auto-ensambladas pueden ser caracterizadas por espectroscopía con efecto *Overhauser* nuclear (NOE) y espectroscopía IR con transformada de Fourier (FT-IR), dicroísmo circular; las redes fibrosas de nanofibras pueden ser visualizadas usando microscopía electrónica de transmisión.

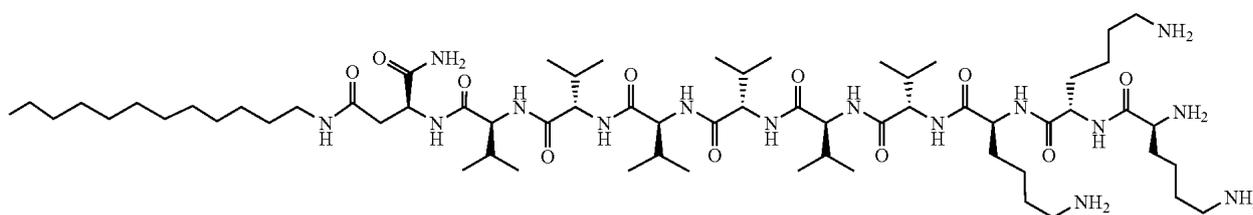
El anfitrión peptídico con el epítipo de unión puede ser preparado eligiendo una secuencia peptídica para el epítipo que sea capaz de interactuar con factores de crecimiento a través de interacción no covalente. El grado de interacción no covalente entre los factores de crecimiento y los anfitriones peptídicos con los epítopos de unión se elige de tal modo que el epítipo no compita con, o tenga menos afinidad de unión para, los factores de crecimiento u otros péptidos cuando se compara con los receptores extracelulares. Se pueden usar experimentos de liberación pasiva para caracterizar y subsiguientemente modificar la afinidad de diversas nanofibras que tiene epítopos de unión de factores de crecimiento. Esta caracterización se puede realizar en geles de nanofibras auto-ensambladas que contienen factores de crecimiento en placas de microtitulación pre-bloqueadas. Estos geles se pueden preparar mezclando primeramente soluciones al 2% de los PA en la relación apropiada, seguido por una dilución 1:1 con TBS. A continuación se pueden añadir los factores de crecimiento seguido por la adición de 2 equivalentes de iones multivalentes para inducir la gelificación y el auto-ensamblaje. El contenido de factor de crecimiento puede ser analizado en el líquido sobrenadante para determinar la capacidad de unión al factor de crecimiento de dichos geles.

Aunque para el crecimiento de tejidos y otros tratamientos es preferible que el epítipo de unión tenga menos afinidad por diversos péptidos que por los receptores extracelulares de células o tejidos próximos, se considera que puede ser deseable para el epítipo de unión del anfitrión peptídico que se una químicamente de un modo fuerte a los factores de crecimiento de un fluido o muestra de células. En este caso, los anfitriones peptídicos de unión con epítopos adecuados pueden auto-ensamblarse e inmovilizarse en las superficies formando revestimientos sensores o medios de eliminación. Los hidrogeles formados a partir del auto-ensamblaje de estos anfitriones peptídicos de unión fuerte podrían ser moldeados para inserción en un sitio de un paciente o para uso en un sistema de filtración. Los hidrogeles se podrían usar para eliminar péptidos diana como HGF o VEGF de un sitio, tal como una articulación o un tumor en un paciente, o de un fluido de un paciente.

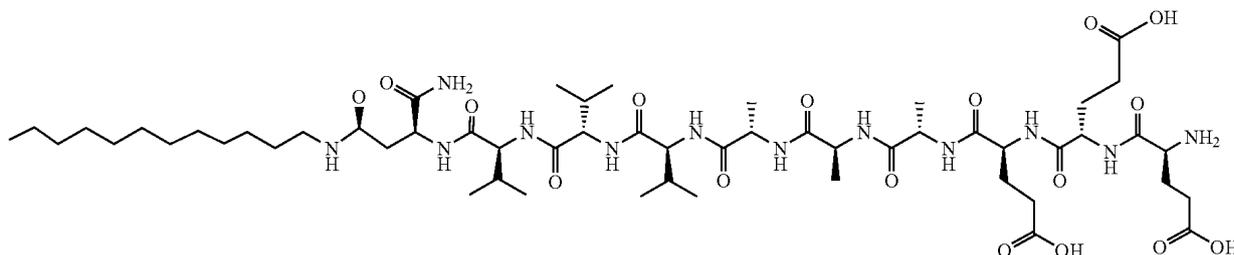




2



3



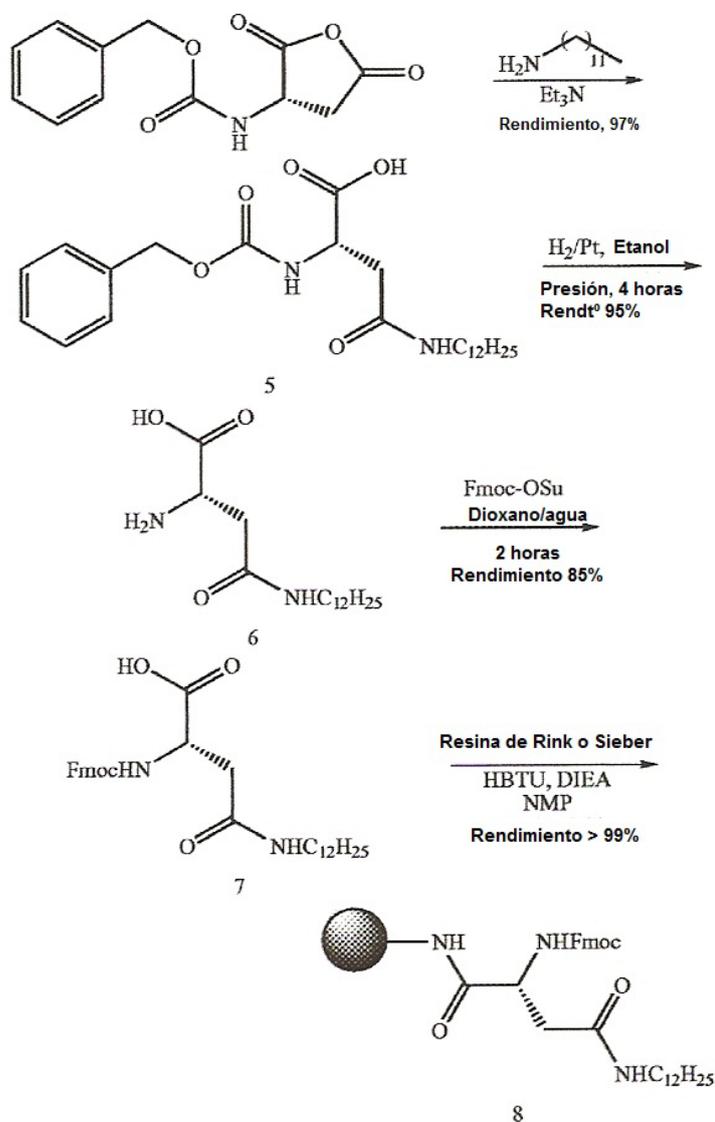
4

5

### Ejemplo 1

Se prepararon cuatro PA, dos con una secuencia triple de lisina (1, 3) y dos con una secuencia triple de ácido glutámico (2, 4) (Esquema 1). Los PA 1 y 2 se prepararon por técnicas estándares de síntesis de péptidos en fase sólida-Fmoc usando una resina de Wang pre-cargada seguido por alquilación con ácido palmítico con hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) como reactivo de acoplamiento. El anfífilo fue escindido de la resina con una mezcla de 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de agua y 2,5% de triisopropilsilano (TIS). Para las síntesis de los anfífilos peptídicos 3 y 4, el aminoácido 7 se sintetizó de acuerdo con el Esquema 2. Se hizo reaccionar el anhídrido N-carbobenciloxi-L-aspártico con dodecilamina, proporcionando el aminoácido graso 5. El grupo CBz se eliminó luego por hidrogenación catalítica para dar 6, seguido por protección con Fmoc de la amina. Esta síntesis transcurre fácilmente en una escala de 5 gramos. El producto 7 se acopló luego a una resina de Rink usando HBTU como agente de acoplamiento. Subsiguientemente, los aminoácidos restantes se añadieron al producto 8 usando técnicas estándares de síntesis de péptidos en fase sólida-Fmoc. Condiciones de escisión estándares proporcionaron los PA con estructura inversa como se ha descrito previamente. La  $^1\text{H}$  RMN y la espectrometría de masas con electropulverización son coherentes con las estructuras esperadas.

20

**Esquema 2. Síntesis de aminoácidos grasos****Ejemplo 1a**

- 5 Ácido N-dodecil-2-carbobenciloxiamino-succinámico (5). Se disolvió anhídrido N-carbobenciloxi-L-aspartico (1 mmol) en 50 mL de cloruro de metileno, seguido por la adición de 1,05 eq. de dodecilamina y 1,1 eq. de trietilamina. El recipiente de reacción se tapó para evitar la evaporación, y se agitó durante 12 horas. Cuando no pudieron detectarse trazas del material de partida por cromatografía en capa fina (TLC) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH al 5%), la reacción se detuvo bruscamente con 20 mL de ácido clorhídrico 1N seguido por extracción con cloroformo (5x). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, y se obtuvo el producto 7 en forma de un sólido blanco (rendimiento 97%).
- 10  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,8 (t,  $J=8,5\text{Hz}$ , 3H, cola de  $\text{CH}_3$ ), 1,18 (s, 18H, cola de  $\text{C}_9\text{H}_{18}$ ), 1,48 (s ancho, 2H,  $\text{CONHCH}_2$ ), 2,68 (s, 2H,  $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3,15 (s ancho, 2H, Asp  $\text{H}_\beta$ ), 4,49 (m, 1H, Asp  $\text{H}_\alpha$ ), 5,12 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7,28 (s, 5H, Ph),  $^{13}\text{C}$  ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  14,6, 22,8, 29,4, 29,6, 29,7, 32,0, 52,2, 56,7, 66,1, 128,4, 129,0, 137,7, 156,5, 171,1, 172,5, ESI-MS:  $m/z$ : 435,4 ( $\text{MH}^+$ ).

Ejemplo 1b

5 Ácido 2-amino-N-dodecil-succinámico (6). En 100 mL de etanol se disolvieron 100 mmol del producto 7 y se transfirieron a un recipiente de reacción que contenía Pd y C (10% en peso). El recipiente se colocó luego bajo hidrógeno (35 mm de Hg) durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite y se obtuvo el producto en forma de un sólido blanco después de evaporación hasta sequedad bajo presión reducida. Rendimiento 95%.

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  1,15 (m, 23H, cola alifática), 1,3 (m, 2H,  $\text{CONH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,37 (s ancho, 2H,  $\text{CONH}_2\text{CH}_2$ ), 3,55 (m, 3H, Asp  $\text{H}_\beta$ ), 4,6 (m, 1H, Asp  $\text{H}_\alpha$ ). ESI-MS:  $m/z$ : 301,2 ( $\text{MH}^+$ ).

Ejemplo 1c

10 Ácido N-dodecil-2-Fmoc-amino-succinámico (7). En 200 mL de una mezcla agua/dioxano (1:1 v:v) se disolvieron 6,6 mmol del producto 6 con 1,3 mL (1,5 eq.) de trietilamina seguido por 1 eq. de Fmoc-O-succinimida (Fmoc-O-Su). La reacción se monitorizó por TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH al 10%) y después de 2-3 horas, se consumió toda la Fmoc-O-Su. La reacción se detuvo bruscamente con ácido dando como resultado un precipitado blanco que se recogió por filtración. Rendimiento 85%.

15  $^1\text{H}$  RMN ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  0,84 (t,  $J=8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  alifático terminal), 1,19 (s, 18H,  $\text{CH}_2$  alifático), 1,34 (s, 2H,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,61 (s ancho, 2H,  $\text{CONHCH}_2$ ), 3,08 (s, 2H, Asp  $\text{H}_\beta$ ), 4,24 (m, 3H, Asp  $\text{H}_\alpha$  + Fmoc $\text{CH}_2\text{CONH}$  + Fmoc $\text{CH}$ ), 7,3 (t,  $J=9\text{Hz}$ , 1H, FmocH), 7,39 (t,  $J=9\text{Hz}$ , 1H, FmocH), 7,68 (d,  $J=8,5\text{Hz}$ , 1H, FmocH), 7,85 (d,  $J=9\text{Hz}$ , 1H, FmocH).  $^{13}\text{C}$  ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  14,6, 22,8, 29,4, 29,5, 29,7, 32,0, 46,1, 47,3, 52,2, 6,7, 120,8, 126,0, 127,7, 128,3, 141,5, 144,5, 156,5, 171,1, 172,5. ESI-MS:  $m/z$  524 ( $\text{MH}^+$ ).

Ejemplo 1d

20 Síntesis y purificación de los PA. Los PA 1-2 se prepararon como se describe en la referencia 3. Para los PA 3-6, la resina de Rink estándar se colocó en un recipiente de reacción y se desprotegió tres veces con piperidina al 30% en NMP, y luego se acopló a 2 eq. del producto 7 durante una noche. Se repitió el acoplamiento hasta que un ensayo con ninhidrina mostró resultados negativos. Esta resina modificada 8 se cargó luego en el sintetizador automático y la síntesis de péptidos transcurrió como para los PA 1-2. Cuando estaba completa la síntesis automática se escindió PA de la resina como se describe en la ref. 3.

25

Ejemplo 1e

$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{CONHVal-Val-Val-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-COOH}$  (1)

30  $^1\text{H}$  RMN ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  0,80-0,84 (m, 21H,  $\text{Val}_V$  + cola de  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (s ancho, 28H, cola alifática de  $\text{C}_{14}$ ), 1,36 (m, 6H, Ala  $\text{H}_\beta$ ), 1,51 (m, 11H, Lys  $\text{H}_\gamma$  + cola de  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 1,62 (m, 6H, Lys  $\text{H}_\beta$ ), 1,91 (m, 9H, Val  $\text{H}_\beta$  + Lys  $\text{H}_\delta$ ), 2,16 (m, 2H, cola de  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 2,73 (s, 6H, Lys  $\text{H}_\epsilon$ ), 4,10-4,23 (m, 9H,  $\text{H}_\alpha$ ), 7,6 - 8,1 (NH de amida), ESI-MS (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v:v):  $m/z$  = 1151 ( $\text{MH}^+$ ).

Ejemplo 1f

$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{CONHVal-Val-Val-Ala-Ala-Ala-Glu-Glu-Glu-COOH}$  (2)

35  $^1\text{H}$  RMN ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  0,81 (s ancho, 21H,  $\text{Val}_V$  + cola de  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (s ancho, 31H, cola alifática de  $\text{C}_{14}$ ), 1,45 (s, 2H, Ala  $\text{H}_\beta$ ), 1,75 (m, 6H Glu  $\text{H}_\beta$ ), 1,94 (m, 9H,  $\text{Val}_\beta$  + Glu  $\text{H}_\beta$ ), 2,24 (s, 6H, Glu  $\text{H}_\gamma$ ), 4,2 (s, 9H,  $\text{H}_\alpha$ ), 7,6-8,1 (NH de amida), ESI-MS (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v:v):  $m/z$  = 1177 ( $\text{MNa}^+$ ).

Ejemplo 1g

Asp( $\text{CONHC}_{12}$ )-Val-Val-Val-Val-Val-Val-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> (3)

40  $^1\text{H}$  RMN ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  0,82 (s ancho, 39H, Val  $\text{H}_\gamma$  + cola de  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (s ancho, 20H, cola alifática de  $\text{C}_{10}$ ), 1,34-1,53 (m, 6H, Lys  $\text{H}_\gamma$ ), 1,69 (m, 6H, Lys  $\text{H}_\beta$ ), 1,93 (m, 12H, Lys  $\text{H}_\delta$  + Val  $\text{H}_\beta$ ), 2,74 (m, 2H, cola de  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2,98 (s ancho, 6H, Lys  $\text{H}_\epsilon$ ), 4,09-4,44 (m, 9H,  $\text{H}_\alpha$ ), 7,02-8,25 (NH de amida), ESI-MS (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v:v):  $m/z$  = 1279 ( $\text{MH}^+$ ).

Ejemplo 1h

Asp( $\text{CONHC}_{12}$ )-Val-Val-Val-Ala-Ala-Ala-Glu-Glu-Glu-NH<sub>2</sub> (4)

45  $^1\text{H}$  RMN ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  0,82 (s ancho, 21H, Val  $\text{H}_\gamma$  + cola alifática de  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (s, 20H, cola de  $\text{C}_{10}$ ), 1,32 (m, 9H, Ala  $\text{H}_\beta$ ), 1,74 (m, 3H, Glu  $\text{H}_\beta$ ), 1,94 (m, 6H, Glu  $\text{H}_\beta$  + Val  $\text{H}_\beta$ ), 2,25 (m, 6H, Glu  $\text{H}_\gamma$ ), 2,97 (d,  $J=6\text{Hz}$ , 2H, cola de  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 4,10-4,44 (m, 9H,  $\text{H}_\alpha$ ), 7,23-8,2 (NH de amida), ESI-MS (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v:v):  $m/z$  = 1197 ( $\text{MH}^+$ ).

Ejemplo 2

Cuando se dispersaron en medios acuosos en presencia de estímulos adecuados, los PA se auto-ensamblaron

típicamente en nanofibras cilíndricas de alta relación de aspecto. Basándose en trabajos previos, se esperaría que las fibras que consistían en una molécula de PA o una mezcla de dos moléculas de PA mostraran estructuras secundarias con unión por hidrógeno similares a láminas  $\beta$ . Se anticipó que mezclando el producto 2 ó 4 cargado negativamente con el producto 1 ó 3 con carga opuesta, respectivamente, podría dar como resultado disposiciones de paralelas de unión por hidrógeno similares a láminas $\beta$ , mientras que mezclando el producto 1 ó 2 con el producto 4 ó 3 con cargas opuestas terminados en amina, respectivamente, podrían dar como resultado disposiciones antiparalelas.

#### Ejemplo 3

A una concentración de 0,1 mM, los espectros de CD de los productos 2-4 revelaron segmentos peptídicos con carácter de arrollamiento predominantemente aleatorio. Esto es el resultado más probable de la repulsión electrostática entre las moléculas altamente cargadas. Por un cambio de pH para neutralizar las cargas o por adición de iones de calcio, todos los PA exhibieron las características de las láminas $\beta$ . En contraste, el producto 1 exhibe una característica de láminas  $\beta$  a cualquier pH. El producto 1 puede estar menos cargado que los otros, puesto que el extremo ácido puede neutralizar la carga de uno de los residuos de lisina, dando a la molécula una carga neta formal de +2. Esta carga global inferior puede reducir la repulsión y permitir que tenga lugar la unión por hidrógeno en láminas  $\beta$  dentro de las fibras. Inversamente, el producto 4 tendría una carga neta formal de -2, puesto que el extremo amino neutralizaría la carga de uno de los residuos de ácido glutámico permitiendo que ocurran interacciones de láminas  $\beta$ . Sin embargo, el producto 4 todavía exhibía una característica desordenada de CD. Para resolver esta aparente contradicción se determinó el estado de carga real y el pKa aparente de los agregados a pH 7 para comprender mejor las fuerzas motrices para el auto-ensamblaje de estos diversos sistemas.

#### Ejemplo 4

Las valoraciones del pKa de agregados de las moléculas 1-4 se llevaron a cabo a una concentración de 3 mM. Todas las valoraciones se comenzaron a un pH en el que las moléculas estaban ya en su estado agregado, con el fin de evitar los efectos cinéticos debidos al auto-ensamblaje. Solamente la valoración del pKa del producto 3 mostró transiciones bruscas, correlacionando los dos pKa aparentes, uno atribuido a la desprotonación del extremo amino más accesible a los disolventes y el otro originado a partir de uno o más de los grupos -amina de la lisina. Los agregados de los PA 1, 2 y 4 muestran curvas complejas con transiciones que ocurren en amplios intervalos, lo que implica que la protonación/desprotonación de estos objetos supramoleculares ocurra lentamente, con variaciones de acidez debido a los microambientes locales dentro de las nanofibras. De estos resultados se deduce que la agregación cambia los pKa aparentes de los grupos ácido y amina, lo cual es coherente con informes recientes en la literatura científica.

#### Ejemplo 5

El co-ensamblaje de moléculas de PA de carga complementaria debe conducir a fibras que contienen una mezcla de los dos componentes con disposiciones de unión por hidrógeno en forma de láminas $\beta$ . Cuando el producto 2 se mezcla los anfífilos de triple 3 o 1 (abreviadamente 2/3 ó 2/1), el espectro de CD obtenido corresponde a una lámina  $\beta$  pura. El hecho de que característica observada de la lámina $\beta$  no sea simplemente una superposición de los espectros de CD individuales de los dos componentes sugiere sólidamente la formación de nanofibras mixtas en las cuales las dos moléculas forman una sola estructura de agregados. El PA 1 mezclado con los PA 4 ó 2 con triple ácido glutámico (1/4 o 1/2) exhibe un comportamiento similar. Cuando se mezclan dos PA de carga similar, la mezcla de lisina 1/3 muestra una lámina  $\beta$ , mientras que la mezcla de ácido glutámico 2/4 muestra una conformación desordenada, debido posiblemente a una mayor repulsión de cargas entre los residuos de ácido glutámico.

#### Ejemplo 6

Con el fin de demostrar adicionalmente el co-ensamblaje de las moléculas dentro de las fibras, se realizó una espectroscopía con efecto Overhauser nuclear (NOE) en un gel al 1,5% en peso hecho de los PA de carga complementaria. Una NOESY representativa de los productos 2 y 3 (2/3) muestra los estrechos contactos ( $< 3\text{\AA}$ ) observados entre los protones Glu-H $\beta$  del producto 2 y los protones Lys-H $\epsilon$  y Val-H $\gamma$  del producto 3, respectivamente. Se detectaron otros varios posibles contactos intermoleculares pero no pudieron ser atribuidos de modo inequívoco a los contactos 2/3. Estos resultados proporcionan una evidencia adicional de que las dos moléculas de PA están co-ensambladas dentro de la misma nanofibra.

#### Ejemplo 7

Una vez establecido el co-ensamblaje satisfactorio de los anfífilos, se investigó el comportamiento de gelificación de los sistemas tanto para un solo PA como para múltiples PA. Las soluciones al uno por ciento en peso de los productos 1-4 eran ligeramente opacas y podían ser gelificadas por la adición de ácido (1,3) o base (2,4), respectivamente. La microscopía electrónica de transmisión revela la formación de nanofibras con diámetros medios de 6,5 nm y longitudes medias de varios cientos de nanómetros, similares a las observadas previamente en otros PA.

Ejemplo 8

La presentación de fagos se usa típicamente para encontrar péptidos bloqueadores de receptores, es decir, secuencias con altas constantes de unión. Para transferir un factor de crecimiento desde un sitio de unión a un PA al receptor celular, no se requiere una constante de unión extremadamente alta e incluso podría ser desfavorable. Por tanto, se eligió la fagoteca comercial de 7 meros en vez de la de 13 meros, pretendiendo fuerzas de unión intermedias. Los factores de crecimiento fueron sorbidos físicamente en placas de 96 pocillos y expuestos subsiguientemente a la fagoteca. Después de incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, se eliminó el fago no unido por lavado con solución detergente. El fago unido se eluyó subsiguientemente por incubación con una solución de factor de crecimiento durante 60 minutos. Los fagos recuperados fueron amplificados durante 4 horas en *E. Coli* a 37°C y el proceso de escrutinio se repitió dos veces más. En subsiguientes rondas de escrutinio, se aumentaron las condiciones de rigurosidad elevando la concentración del detergente y reduciendo el tiempo de exposición a la fagoteca. La población final de fagos se cultivó en placas y se secuenciaron los DNA de 10 clones de colonias que contenían solamente un tipo de fago. A continuación, se usó un cribado por ELISA para analizar los falsos positivos y determinar las fuerzas de unión relativas de los clones seleccionados. Utilizando este protocolo, se encontró que el mejor epítipo de unión para el rh-BMP-2 era YPVHPST y para rh-TGF-β1 era LPLGNSH. (Véase la Tabla 1, más adelante).

Ejemplo 8a

La presentación de fagos se realizó con el kit Ph.D. 7 (New England Biosystems). Cincuenta microlitros de la fagoteca M13 diluidos (que contenían  $2 \times 10^9$  fagos y todas las posibles secuencias de 7 meros) se añadieron a placas de microtitulación de 96 pocillos, que habían sido expuestas a 50 µl de solución de 10 µg/ml de factor de crecimiento (Peprotech) durante 18 horas a 0°C. Las placas fueron bloqueadas durante 1 hora y luego incubadas a la temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación suave. El fago no unido se eliminó lavando con TBS/Tween-20 (Tween-20 al 0,1% v/v). El fago unido se eluyó subsiguientemente por incubación con 50 µl de solución de factor de crecimiento durante 60 minutos. La presencia del fago de unión se determinó por dilución en serie de los fagos y subsiguiente cultivo en placas de agar con *E. Coli*. El número de placas formadas puede ser relacionado con el número de fagos en la mezcla original. Los fagos se amplificaron subsiguientemente durante 4 horas en *E. Coli* a 37°C. En rondas de escrutinio subsiguientes, se elevó la concentración de Tween-20 hasta 0,5% y se disminuyeron y aumentaron los tiempos de unión y elución, respectivamente, para aumentar la rigurosidad del proceso de selección. Después de tres rondas de escrutinio, la mezcla de fagos recuperada se diluye y cultiva en placas de agar con bacterias. Subsiguientemente se aíslan las placas que contienen una sola secuencia de DNA. Después de purificación, se secuenciaron diez clones. A continuación, se usó un cribado por ELISA para eliminar los falsos positivos y determinar las fuerzas de unión relativas de los clones seleccionados. Cada clon se incubó durante 1 hora en placas de microtitulación revestidas de factores de crecimiento, luego se lavaron las placas con TBS/Tween-20 y subsiguientemente se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Biosciences). Después de la adición de ABTS, se midió la absorbancia a 450 nm después de 30 minutos para determinar las fuerzas de unión relativas de los clones aislados. Posteriormente el clon que más fuertemente unido.

Tabla 1: Secuencias de unión para BMP-2 y TGFβ1 obtenidas usando presentación de fagos

BMP-2:		TGF-β1	
YPVHPST (1)	LHYPFMT (3)	LPLGNSH (1)	RTTSPTA (3)
KVPPANT (3)	QQTQAQH (4)	LRNYSHS (3)	GKYPPTS (3)
KQALTQT (3)	PIQPDER (2)	VYRHLPT(2)	AWKSVTA (3)
WPALFTH (3)	PFDPPVR (2)	RVSTWDT (3)	LPSPIQK (2)
PGPTVQG (2)	DVSPAYH (3)	PAPRWIH (3)	

El código numérico ilustra las fuerzas de unión relativas de los clones seleccionados disminuyendo la fuerza de unión desde (1) la más alta hasta (4) la más baja. Todas las secuencias se unen significativamente.

Ejemplo 9

Puesto que las secuencias peptídicas presentadas en el fago tenían extremos N libres, no fue posible usar una ruta de síntesis típica para los PA. Por tanto, un ácido aspártico cuya cadena lateral fue modificada con dodecilamina se hizo reaccionar con una resina amídica de Rink. (Véase, el Esquema 2, anterior). Subsiguientemente, el resto del péptido pudo ser sintetizado usando técnicas regulares de síntesis de Fmoc-péptidos, que proporcionan un PA con polaridad inversa. Las secuencias peptídicas elegidas fueron  $V_6K_3SG_3YPVHPST$  (9) para BMP-2 y  $V_3A_3K_3SG_3LPLGNSH$  (10) para TGF-β1, respectivamente (Esquema 3). El segmento  $K_3$  se eligió para ser coensamblado con los grupos de cabeza  $E_3$  cargados del PA 2 de carga. La secuencia  $SG_3$  es una unidad espaciadora y es el mismo espaciador que estaba presente en el fago. Las constantes de unión de BMP-2 con, respectivamente, YPVHPST y KQALTOT fueron  $K_a=1,9 \pm 0,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  y  $2,1 \pm 0,85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  determinadas por despolarización de fluorescencia, lo que ilustra la capacidad de ajuste de la fuerza de unión.

**Ejemplo 9a**

Asp(CONHC<sub>12</sub>)-Val-Val-Val-Val-Val-Val-Lys-Lys-Ser-Gly-Gly-Tyr-Pro-Val-His-Pro-Ser-Thr (9).

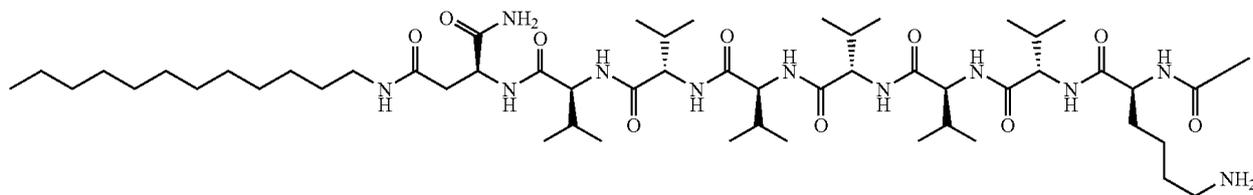
<sup>1</sup>H RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 0,82 (s ancho, 39H, Val H<sub>γ</sub> + cola de CH<sub>3</sub>), 1,22 (s ancho, 20H, cola alifática de C<sub>10</sub>), 1,53 (m, 6H, Lys H<sub>γ</sub>), 1,69 (m, 6H, Lys H<sub>β</sub>), 1,93 (m, 16H, Lys H<sub>δ</sub> + Val H<sub>β</sub> + Pro H<sub>γ</sub>), 2,37 (m, 4H, Pro H<sub>β</sub>), 2,74 (s ancho, 6H, Lys H<sub>ε</sub>), 2,98 (m, 2H, cola de CH<sub>2</sub>NH), 3,45 (m, 8H, Pro H<sub>δ</sub> + His H<sub>β</sub> + Tyr H<sub>β</sub>), 3,72 (m, 3H, Thr H<sub>α</sub> + Thr H<sub>β</sub>), 4,1-4,6 (m, 13H, H<sub>α</sub> + Ser H<sub>β</sub>), 6,81 (m, 5H, Tyr H<sub>s</sub> aromático + His H), 7,02-8,25 (NH de amida + His H). ESI-MS (H<sub>2</sub>O): 773,9 (M + 3H)<sup>+3</sup>.

**Ejemplo 9b**

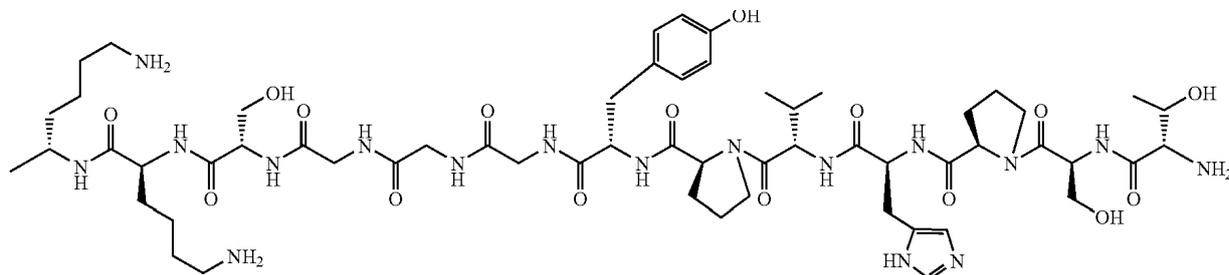
Asp(CONHC<sub>12</sub>)-Val-Val-Val-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Pro-Leu-Gly-Gln-Ser-His-NH<sub>2</sub> (10).

<sup>1</sup>H RMN (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 0,82 (s ancho, 21H, Val H<sub>γ</sub> + cola alifática CH<sub>3</sub>), 1,22 (s ancho, 20H, cola de C<sub>10</sub>), 1,32 (m, 9H, Ala H<sub>β</sub>), 1,53 (m, 6H, Lys H<sub>γ</sub>), 1,64 (m, 6H, Lys H<sub>β</sub>), 1,84 (m, 4H, Leu H<sub>β</sub>), 1,93 (m, 16H, Lys H<sub>δ</sub> + Val H<sub>β</sub> + Pro H<sub>γ</sub>), 2,37 (m, 2H, Pro H<sub>β</sub>), 2,74 (s ancho, 6H, Lys H<sub>ε</sub>), 2,97 (m, 2H, cola de CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 3,45 (m, 4H, Pro H<sub>δ</sub> + His H<sub>β</sub>), 3,72 (m, 3H, His H<sub>α</sub> + Ser H<sub>β</sub>), 4,10-4,61 (m, 9H, H<sub>α</sub>), 6,81 (m, 2H, His H), 7,02-8,25 (NH de amida + His H), ESI-MS (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 v:v): *m/z* = 1086,7 (M + H)<sup>+2</sup>.

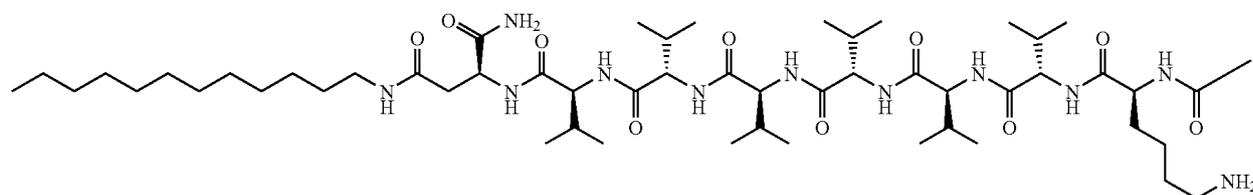
**15 Esquema 3:**



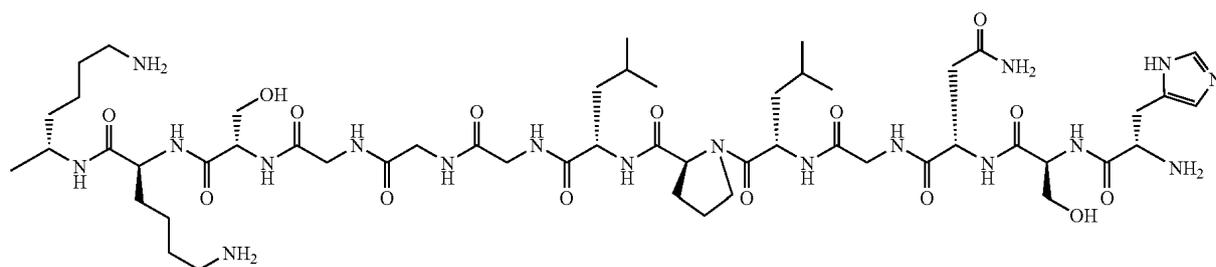
Fórmula (9), parte izquierda



Fórmula (9) (continuación), parte derecha



Fórmula (10) parte izquierda



Fórmula (10) continuación, parte derecha

20

Ejemplo 10

El co-ensamblaje de PA 9 con el PA 2 de carga pudo ser demostrado utilizando espectroscopía de difracción circular (CD). A una concentración de 0,13 mM, el espectro de CD de las nanofibras individuales de PA a esta concentración tiene un carácter de arrollamiento predominantemente aleatorio. Cuando se mezclan, sin embargo, el espectro de CD refleja una lámina  $\beta$  pura, lo que ilustra que los PA se co-ensamblan con una fibra en lugar de formar homofibras individuales que consisten solamente en una molécula de PA. El co-ensamblaje es favorecido energéticamente puesto que las repulsiones electrostáticas se reducen cuando las partes KKK y EEE forman un complejo. La evidencia adicional del co-ensamblaje se obtuvo usando espectroscopía con efecto Overhauser nuclear en soluciones al 1,5 % en peso. Se observaron contactos estrechos ( $< 3 \text{ \AA}$ ) entre los protones  $E_{\beta}$  y  $K_{\epsilon}$  y entre los protones  $E_{\beta}$  y  $V_{\delta}$  y esta distancia podría ser significativamente mayor entre las homo-fibras. No se podrían atribuir inequívocamente otros posibles contactos intermoleculares. Finalmente, la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier en muestras liofilizadas y en soluciones al 1 % en peso mostró la presencia del pico a  $1630 \text{ cm}^{-1}$  típico de láminas  $\beta$ . Se obtuvieron resultados similares para mezclas de los productos 10/2. La reasociación de las muestras durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  condujo a un aumento significativo en la fuerza del efecto del CD. Este aumento se atribuye a un aumento en el tamaño del dominio de los cromóforos perfectamente acoplados. Presumiblemente, la mezcla inicial conduce a un atrapamiento cinético de un sistema mixto no perfecto y la reasociación permite la reorganización subsiguiente de los anfilos hasta el estado termodinámicamente más estable. Incluso un calentamiento prolongado a  $80^{\circ}\text{C}$ , muy por encima de las temperaturas de fusión esperadas para el retículo de unión por puentes de hidrógeno y las colas alifáticas, no condujo a una pérdida apreciable de quiralidad supramolecular, lo que ilustra la estabilidad de las nanofibras.

Ejemplo 11

Con el fin de analizar el significado fisiológico de esta propuesta, se cultivaron células madre mesenquimatosas en geles que contenían diferentes niveles de factores de crecimiento. Para estos experimentos con células, los epítomos de unión se diluyeron a una relación 50:1 (carga:agente de unión) para asegurar el reconocimiento por la proteína. Se prepararon geles mezclando 50  $\mu\text{l}$  de PA pre-mezclado (2% en peso) que contenía la cantidad deseada de factor de crecimiento y 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de células madre mesenquimatosas (100.000 células) en portaobjetos de vidrio, seguido por la adición de 10  $\mu\text{l}$  de solución de 30 mg/ml de  $\text{CaCl}_2$ . Los geles se dejaron solidificar durante 1,5 horas tras lo cual se añadió 1 ml de medio de células madre mesenquimatosas. De este modo, se prepararon geles que consistían en productos 9/2 o el producto 2 solo y que contenían 0,1 o 50 ng/ml de BMP-2. Como un control adicional, se cultivaron en 10.000 células madre sobre porta-objetos de vidrio con BMP-2 añadido al medio en concentraciones idénticas. El medio fue renovado cada cuatro días y se aislaron muestras por triplicado los días 7 y 21 de cultivo. Subsiguientemente, se determinó por transferencia Western la expresión de las proteínas de marcadores específicos del linaje de osteocalcina (osteoblasto), adiponectina (adipocitos), colágeno II y agregano (condrocitos) y  $\alpha$ -actina del músculo liso y desmina (células del músculo liso).

Ejemplo 11a

Protocolo para experimentos con células: Células madre mesenquimatosas humanas (Cambrex Technologies) se cultivaron en placas a una densidad de 5.000 células/ $\text{cm}^2$  en cuatro matraces de cultivo T75 en 15 ml de medio de células madre mesenquimatosas (Cambrex Technologies) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de humedad. A una confluencia del 90%, las células se tripsinizaron con 2,5 ml de tripsina al 0,25%/EDTA durante 5 minutos. Subsiguientemente, se añadieron 8 ml de medio para detener bruscamente la actividad de proteasa. Las suspensiones de células se reunieron y centrifugaron a 850 rpm durante 8 minutos. El sedimento de células se volvió a poner en suspensión en 1 ml de medio y se usaron 10  $\mu\text{l}$  para el recuento de células. La suspensión de células se diluyó con el medio hasta una concentración de 2.000.000 de células/ml.

Los PA 1 y 3 se disolvieron a una concentración de 2 % en peso. Subsiguientemente, se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  del PA 1 con 1250  $\mu\text{l}$  del PA 3. La mezcla se dividió en 3 porciones de 410  $\mu\text{l}$  y además se prepararon 3 porciones de 410  $\mu\text{l}$  del PA 3 (al 2 % en peso). Luego se añadieron a una porción de los productos 1/3, 20  $\mu\text{l}$  una solución de 2  $\mu\text{g/ml}$  de BMP-2 (Peprotech) y al PA 1 a una concentración de 100 ng/ml de BMP-2. Similarmente, se añadieron 41  $\mu\text{l}$  de 20 ng/ml de BMP-2 hasta una concentración final de 2 ng/ml de BMP-2.

Se prepararon geles por triplicado mezclando 50  $\mu\text{l}$  de solución de PA con 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de células en un portaobjetos de vidrio para microscopio. Luego, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de una solución de 30 mg/ml de  $\text{CaCl}_2$  y los geles se dejaron solidificar a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de humedad durante 90 minutos. Las concentraciones resultantes son 1 % en peso de PA y 0,1 o 50 ng/ml en BMP-2. A continuación se añadió 1 ml de medio. Los controles con factor de crecimiento en solución se prepararon colocando 5  $\mu\text{l}$  de suspensión de células en un portaobjetos de vidrio seguido por la adición de 1 ml de medio. Luego, se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de solución de 2  $\mu\text{g/ml}$  de BMP-2 y 0,5  $\mu\text{l}$  de solución 2  $\mu\text{g/ml}$  de BMP-2 para obtener concentraciones de BMP-2 de 50 ng/ml y 1 ng/ml en solución, respectivamente. Cada cuatro días se repuso la mitad del medio.

Ejemplo 12

Ensayos sobre la viabilidad celular mostraron que la viabilidad de estas células fue  $>95\%$  en todos los geles después

de 3 semanas de cultivo. La expresión de endoglina no pudo ser detectada por transferencia Western en ningún momento, lo que indica que todas las células habían comenzado a diferenciarse. No se pudo detectar la expresión de adiponectina y agregano en ningún momento. La expresión de osteocalcina mostró una diferencia marcada entre los geles y los controles. Mientras que no pudo detectarse osteocalcina en los controles, todos los geles expresaron niveles significativos de osteocalcina en 7 días, bastante antes que las 2-3 semanas usuales (Figura 3a), pero no aumentó significativamente en 3 semanas (Figura 3b). Los niveles de expresión comparables en las semanas 1 y 3 implican entonces que los niveles de expresión de osteocalcina son constantes durante el periodo de cultivo. Sorprendentemente, la expresión parece ser independiente de las concentraciones de BMP-2 y la relación es 1:2 entre los geles que contienen PA de unión y los geles con PA sin unión. Además, los geles a los cuales no se añadió BMP-2 mostraron niveles similares. Aparentemente, los niveles de BMP-2 endógena producidos por las propias células son suficientes para estimular la diferenciación osteoblástica, pero la capacidad de los geles de unión para unir algo de la BMP-2 disminuye ligeramente la cantidad de osteocalcina expresada. La expresión de osteocalcina podría ser visualizada por inmunocitoquímica.

En contraste, no se detectó  $\alpha$ -actina del músculo liso en geles que contenían el producto 9, mientras que se expresó en los geles sin dicho agente de unión. Sin embargo, se expresó en cualquier caso después de 3 semanas (Figura 3b), pero la expresión en los geles de los productos 9/2 era todavía ligeramente menor que en los geles del producto 2 y significativamente menor que en los controles. Además, no pudo detectarse expresión de desmina, que es el marcador de las células del músculo terminalmente diferenciadas.

#### Ejemplo 12a

Protocolo de la transferencia Western: Después de la retirada del medio, los geles se lavaron con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato y subsiguientemente las células se lisaron en 200  $\mu$ l de dodecilsulfato de sodio al 2%, Tris 0,08 M y glicerol al 10%. Se reunieron los tres lisados y se midieron las concentraciones de proteína mezclando 10  $\mu$ l de lisado con 200  $\mu$ l de reactivo de ensayo de la proteína BCA (Pierce) y leyendo la absorbancia a 562 nm frente a una serie de patrones de BSA después de una incubación de 30 minutos a 37°C. Subsiguientemente, se mezclaron 10  $\mu$ g de proteína, 3  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, 3  $\mu$ l de azul de bromofenol y se añadió agua hasta un volumen total de 36  $\mu$ l. La mezcla se hirvió durante 5 minutos y se cargó en un gel de tris(glicina) Novex al 4 % (endoglina agregano o al 10-20% (osteocalcina,  $\alpha$ -actina del músculo liso, adiponectina, desmina) (Invitrogen). Los geles se hicieron correr durante 90 minutos en tampón de migración de tris(glicina) (Invitrogen) a un voltaje constante de 130 V. Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) a una corriente constante de 190 mA durante 90-120 minutos.

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en leche desnatada al 5% (Bio-Rad) y sondadas para los respectivos marcadores a una dilución 1:500 en leche al 1% durante 2 horas usando los anticuerpos monoclonales para osteocalcina (clon 190125, R&D Systems), endoglina (clon 166709, R&D Systems), adiponectina (clon 166126, R&D Systems),  $\alpha$ -actina del músculo liso (clon 1A4, R&D Systems) y el anticuerpo policlonal para agregano (AF1220, R&D Systems). Las membranas se lavaron 3 veces durante 15 minutos con solución salina de tampón Tris/Tween-200 al 0,1% (TTBS). Luego, los anticuerpos secundarios se equilibraron durante 1 hora a una dilución 1:3.000 en leche al 1% seguido por 3 etapas de lavado con TTBS. Las membranas se revelaron por equilibrado de 1 minuto con solución de análisis para transferencia Western ECL (Amersham Biosciences) y se expusieron a hiperpelícula de ECL (Amersham Biosciences).

#### Ejemplo 12b

Las células se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2%/cacodilato sódico 0,2 M a 4°C. Después de lavado con PBS (2x), las muestras se incubaron durante 5 minutos con Triton-X al 0,1% en PBS. Subsiguientemente, las muestras se lavaron con PBS (2x). A continuación se añadió el anticuerpo monoclonal para osteocalcina humana (R&D Systems, 1:200) en BSA al 1%/PBS y las muestras se incubaron a 4°C durante una noche. Después de un lavado triple con PBS, se añadió anticuerpo secundario conjugado con FITC en BSA al 1%/PBS y se incubó durante 2 horas. Las muestras después de un triple lavado con PBS se visualizaron en un microscopio Nikon Eclipse TE2000 de 10 aumentos.

#### Ejemplo 13

Se realizó una serie de experimentos como para los experimentos de unión del PA 10 con TGF- $\beta$ 1 y BMP-2, excepto que la concentración más alta de TGF- $\beta$ 1 era 20 ng/ml en lugar de 50 ng/ml. Las muestras se aislaron después de 10 días. El cultivo en presencia de TGF- $\beta$ 1 conduce a la diferenciación en los linajes del músculo liso y el cartílago. La expresión del colágeno II es superior para los geles de unión y parece aumentar con el aumento de TGF- $\beta$ 1. Sorprendentemente, se expresan la osteocalcina y el colágeno X, lo que indica que ocurre la maduración hasta la etapa de condrocitos hipertróficos, lo que es inesperado en este momento temprano. Similarmente, la expresión de  $\alpha$ -actina en el músculo liso aumenta con la concentración del TGF- $\beta$ 1, pero es superior en los geles de unión que en los geles que no son de unión. Es incluso superior en los controles, pero los niveles de expresión de desmina muestran que estos están principalmente en las células musculares inmaduras.

# ES 2 380 340 T3

## Ejemplo 14

Se determinaron numerosas secuencias de unión para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tanto con el kit de presentación de fagos de 7 meros como con el de 12 meros, factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), neurotrofina-3 (NT-3) y laminina-5; \*indica los agentes de unión más fuertes:

VEGF	
<i>7-meros</i>	<i>12-meros</i>
WPTWVNN	PTPI KVRI HSYN*
YYTVHHM	VSII STIPNSMT*
WHWSLNH	PI TPSAI IPIEF*
SWWAPFH	I POKNTIOYFKM
FTEPLAS	
THAERVM	
ASIESSN	
IIITVSSY	
IIPYPHYH	

### 5 FGF-2

PMHHHKH

AQVRSGD

KHPPTNW

AMLSHLS

10 DFIQPYQ

VYWSRIE

AMPQRPL

HSRHFHH

RMTQVPL

15 LSTPPLR

### NT-3

HTTEILH

PSNYQTS

SYFPSSA

20 EARQSYS

DEPQKAH

TLGLGLH

YMRRSLS

VVLYLPL

### 25 Laminina-5

SKLNTKS

PTYHHRH

LRHKSLH

RYHPHLH\*

30 GRYHHYLH

5 Como se ha ilustrado en los ejemplos precedentes, esta invención proporciona una estrategia de síntesis para moléculas anfífilas peptídicas con extremos N libres compatibles con la metodología estándar en fase sólida. Cuando se mezclan con los PA con extremos C libres, estas moléculas se auto-ensamblan en nanofibras que contienen estructuras de láminas  $\beta$  muy estables térmicamente que parecen ser más estables que los co-ensamblajes con los PA de idéntica polaridad. La nueva oportunidad de crear ensamblajes con los extremos N libres en sus superficies permite el diseño de nanofibras bioactivas no accesibles previamente con nanoestructuras que exponen el extremo C de la secuencia peptídica.

10 Aunque la presente invención se ha descrito con considerable detalle, con referencia a ciertas de sus realizaciones preferidas, son posibles otras versiones. Por ejemplo las secuencias de péptidos o proteínas derivadas de un proceso de presentación de fagos pueden usarse para formar anfífilos peptídicos de unión que se unen a proteínas distintas de factores de crecimiento y retienen dichas proteínas. Se podrían acoplar enzimas para formar anfífilos peptídicos de unión que pueden ser auto-ensamblados e inmovilizados sobre las superficies de hidrogeles de nanofibras. Dichos hidrogeles pueden ser usados como un revestimiento para aplicaciones de sensores. Alternativamente, la interacción de unión del péptido derivado por presentación de fagos acoplado al anfífilo peptídico podría ser seleccionada para unir fuertemente péptidos, tales como HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) o VEGF y tratar diversas enfermedades y estados eliminando dichos factores. Los hidrogeles formados por el auto-ensamblaje de estos anfífilos peptídicos de unión podrían ser moldeados para inserción en un sitio de un paciente o para uso en un sistema de filtración. Los hidrogeles podrían usarse eliminar péptidos diana como HGF o VEGF de un sitio tal como una articulación o un tumor de un paciente o de un fluido de un paciente.

20

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto peptídico anfifílico que comprende:
  - un componente peptídico que comprende un producto de reconocimiento de factores de crecimiento de un proceso de presentación de fagos en su extremo N, teniendo dicho producto de reconocimiento una longitud de 1-13 aminoácidos y siendo capaz de interactuar con un factor de crecimiento a través de una interacción no covalente que no compite con la unión del factor de crecimiento a receptores extracelulares, y
  - un componente hidrófobo que comprende un resto alquilo que varía de C<sub>6</sub> a C<sub>22</sub> acoplado a dicho componente peptídico en su extremo C.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho producto de reconocimiento se selecciona de secuencias de epítomos que proporcionan interacciones de unión con los factores de crecimiento BMP-2, TGF-β1, VEGF, FGF-2, NT-3 y laminina-5.
3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde dicha secuencia de epítomos de unión comprende YPVHPST.
4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde dicha secuencia está en una interacción de unión no covalente con el factor de crecimiento BMP- 2.
5. El compuesto de la reivindicación 2, en donde dicha secuencia de epítomos de unión comprende LPLGNSH.
6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde dicha secuencia está en una interacción de unión no covalente con el factor de crecimiento TGF-β1.
7. El compuesto de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho componente peptídico tiene una carga neta a un pH fisiológico.
8. El compuesto de la reivindicación 7, que comprende residuos seleccionados de alanina, glicina, leucina, cisteína, valina y serina.
9. El compuesto de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho resto alquilo está sustituido, saturado o no saturado.
10. El compuesto de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho componente peptídico es sustancialmente lineal.
11. Una composición peptídica que comprende una pluralidad de un primer compuesto peptídico anfifílico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho componente peptídico tiene una carga neta a un pH fisiológico.
12. La composición de la reivindicación 11, que comprende además una pluralidad de un segundo compuesto peptídico anfifílico, comprendiendo dicho segundo compuesto un componente peptídico y un componente hidrófobo acoplado a dicho componente peptídico, estando ausente un producto de reconocimiento de factores de crecimiento y teniendo una carga neta a un pH fisiológico complementaria de dicha carga neta de dicho primer compuesto.
13. La composición de la reivindicación 12, en donde la secuencia de aminoácidos del componente peptídico de dicho segundo compuesto tiene una longitud más corta que la longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho primer compuesto peptídico.
14. La composición de la reivindicación 13, que comprende un ensamblaje micelar en un medio acuoso.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende al menos un factor de crecimiento que interactúa no covalentemente con ella.
16. La composición de la reivindicación 15, en donde dicho factor de crecimiento se selecciona de BMP-2, TGF-β1, VEGF, FGF-2, NT-3, laminina-5 y sus combinaciones.
17. Un método *in vitro* que usa un compuesto peptídico anfifílico para afectar a la biodisponibilidad de un factor de crecimiento, comprendiendo dicho método:
  - proporcionar un ensamblaje micelar que comprende una composición según la reivindicación 13; y
  - poner en contacto una célula madre con dicho ensamblaje.
18. El método de la reivindicación 17, en donde dicho factor de crecimiento es producido por dicha célula madre.

19. El método de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en donde dicho factor de crecimiento se selecciona de BMP-2, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF-2, NT-3, laminina-5 y sus combinaciones.
20. El método de la reivindicación 19, en donde dicho producto de reconocimiento se selecciona de secuencias de epítomos que proporcionan interacción no covalente con uno de los factores de crecimiento BMP-2 y TGF- $\beta$ 1.
- 5 21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha secuencia de epítomos comprende YPVHPST que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento BMP-2.
22. El método de la reivindicación 20, en donde dicha secuencia de epítomos comprende LPLGNSH que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1.
- 10 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en donde dicho contacto es suficiente para la diferenciación de las células madre.
24. El método de la reivindicación 23, en donde dicho ensamblaje comprende el factor de crecimiento BMP-2 y dicho producto de reconocimiento comprende una secuencia de epítomos que interacciona no covalentemente con dicho factor de crecimiento.
25. El método de la reivindicación 24, en donde dicha célula madre es una célula madre mesenquimatosa.
- 15 26. El método de la reivindicación 25, en donde dicha célula madre se diferencia en células óseas.
27. Un ensamblaje micelar que comprende una composición según la reivindicación 13 para uso en medicina.
28. El ensamblaje de la reivindicación 27, que es para uso en regenerar tejidos, en donde una célula madre se pone en contacto con dicho ensamblaje.
29. El ensamblaje de la reivindicación 28, en donde dicho factor de crecimiento es producido por dicha célula madre.
- 20 30. El ensamblaje de la reivindicación 28 o la reivindicación 29, en donde dicho factor de crecimiento se selecciona de BMP- 2, TGF- $\beta$ 1, VEGF, FGF-2, NT-3, laminina-5 y sus combinaciones.
31. El ensamblaje de la reivindicación 30, en donde dicho producto de reconocimiento se selecciona de secuencias de epítomos que proporcionan interacción no covalente con uno de los factores de crecimiento BMP-2 y TGF- $\beta$ 1.
- 25 32. El ensamblaje de la reivindicación 31, en donde dicha secuencia de epítomos comprende YPVHPST que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento BMP-2.
33. El ensamblaje de la reivindicación 31, en donde dicha secuencia de epítomos comprende LPLGNSH que interacciona no covalentemente con el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1.
34. El ensamblaje de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, en donde dicho contacto es suficiente para la diferenciación de células madre.
- 30 35. El ensamblaje de la reivindicación 34, en donde dicho ensamblaje comprende el factor de crecimiento BMP-2 y dicho producto de reconocimiento comprende una secuencia de epítomos que interacciona no covalentemente con dicho factor de crecimiento.
36. El ensamblaje de la reivindicación 35, en donde dicha célula madre es una célula madre mesenquimatosa.
37. El ensamblaje de la reivindicación 36, en donde dicha célula madre se diferencia en células óseas.
- 35

