

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 724**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

C08G 73/00 (2006.01)

C08G 65/325 (2006.01)

C08G 65/333 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2014 PCT/EP2014/065233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2014 E 14741568 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 3021872**

54 Título: **Polímero adecuado para su uso en cultivo celular**

30 Prioridad:

18.07.2013 EP 13003621
05.02.2014 EP 14153952

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2017

73 Titular/es:

STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (100.0%)
Geert Grooteplein-Zuid 10
6525 GA Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

ROWAN, ALAN EDWARD;
EKSTEEN AKEROYD, ZASKIA HILLET;
WILSON, CHRISTOPHER;
GEUTJES, PETRUS JOHANNES;
FEITZ, WOUTER F.J. y
OOSTERWIJK, EGBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 637 724 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

Polímero adecuado para su uso en cultivo celular

5 La presente invención se refiere a un proceso de preparación de un polímero adecuado para su uso en un cultivo celular. La invención se refiere además a un uso del cultivo celular para fabricar un sistema prevascular.

Hasta la fecha, los materiales de gel de cultivo celular pueden aislarse de fuentes naturales o completamente sintéticas. Los geles tales como el colágeno, que producen estructuras inherentemente laminares, son incapaces de formar redes 3D complejas aisladas. Los geles tales como los derivados de células de sarcoma de ratón EHS se asemejan al ambiente extracelular que se encuentra en los tejidos mucho mejor que el colágeno puro, y también proporcionan un entorno tridimensional dentro del cual las células pueden crecer y ensamblarse en arquitecturas complejas. Los gelificantes derivados de manera natural son difíciles de caracterizar por completo, y requieren un análisis intensivo de lote a lote para lograr dicha caracterización. Los geles derivados biológicamente sufren de variabilidad inherente, riesgo de contaminación y transferencia de patógenos junto con primas económicas excesivas. Para muchos grupos de investigación, la contaminación por trazas adicional, tal como los factores de crecimiento no deseados inherentemente presentes en materiales obtenidos biológicamente, son interferencias experimentales inaceptables, y son inaceptables para su uso *in vivo*. En el otro extremo del espectro, los geles derivados sintéticamente tales como los derivados de copolímeros de poli(N-isopropilacrilamida) presentan una viabilidad celular y una capacidad de diferenciación celular bajas, lo que requiere mezclas adicionales de agentes bioactivos tales como glucocorticoides y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). El uso de gelificantes sintéticos elimina en gran medida la variación natural encontrada en los gelificantes biológicos, pero elimina concomitantemente la actividad biológica inherente de los geles naturales. La capacidad de eliminar la variabilidad biológica mientras se conserva la actividad biológica es un reto que todavía no se ha hecho del todo realidad.

25 La capacidad de cosechar sistemas biológicos complejos formados en estos geles también sigue siendo un desafío.

Tradicionalmente, las células deben ser liberadas de superficies biológicas mediante el uso de tripsina o para que el gel se disuelva mecánicamente o se elimine manualmente de la superficie de la estructura.

30 Las estructuras gelificables demostradas anteriormente no son de naturaleza universal, y no pueden aplicarse fácilmente de una manera mínimamente invasiva *in vivo*. Existen algunos ejemplos de materiales termosensibles que pueden aplicarse de una manera mínimamente invasiva a través de un catéter enfriado, tales como los desvelados en el documento US 2010/0215731 A1. Sin embargo, estos materiales padecen de los mismos inconvenientes que se han descrito anteriormente, generando una baja viabilidad celular.

Desde un punto de vista mecánico, las propiedades de todos los geles derivados biológicamente están dictadas por las interacciones no covalentes de las subunidades peptídicas. El resultado es que el tamaño de poro y la resistencia mecánica son relativamente fijos. Las propiedades mecánicas y la naturaleza de las reticulaciones son aún más fijas en el caso de los geles derivados sintéticamente.

El documento WO2011/007012 desvela un hidrogel que comprende poliisocianopéptidos con funcionalidad de oligo(alquilenglicol). Los poliisocianopéptidos se preparan funcionalizando un isocianopéptido con cadenas laterales de oligo(alquilenglicol) y polimerizando a continuación los isocianopéptidos con funcionalidad de oligoalquilenglicol.

45 El documento WO2011/007012 sugiere el uso de los hidrogeles para la ingeniería de tejidos o la regeneración de neuronas. Los polímeros de poliisocianopéptido también se describen en otras publicaciones. Por ejemplo, el documento EP2404618 A1 se refiere a polímeros de poliisocianopéptido helicoidal. Estos polímeros se usan como construcciones proteicas que se pueden administrar al cuerpo de un ser humano o de un animal. Además, en Kouwer *et al.*; "Responsive biomimetic networks from polyisocyanopeptide hydrogels"; *Nature*, Vol. 493, n.º 7434, pág. 651-655; y en Koepf *et al.*; "Preparation and characterization of non-linear polyethylene glycol analogs from oligoethylene glycol functionalized polyisocyanopeptides"; *European Polymer Journal*, Vol. 49, n.º 6, pág. 1510-1522, se describen poliisocianopéptidos injertados con cadenas laterales de oligo(etilenglicol). Estos poliisocianopéptidos pueden formar hidrogeles a bajas concentraciones. Las publicaciones que se refieren a materiales de gel para el cultivo celular son los documentos WO2012/158235 A2 y WO2010/064251 A1.

El documento WO2012/158235 A2 se refiere a un método de recubrimiento de la superficie de un artículo de cultivo celular con un polímero que tiene un polipéptido unido covalentemente. El polímero se puede unir a la superficie del artículo de cultivo celular sometiendo el polímero al calor o a radiación electromagnética. El documento WO2010/064251 A1 se refiere a una esponja de hidrogel macroporosa. La esponja de hidrogel puede funcionar como una construcción tisular tridimensional (3D).

Aunque los cultivos de células conocidos son satisfactorios para algunas aplicaciones, existe una necesidad creciente en la técnica de cultivos celulares que se puedan usar en una amplia variedad de situaciones. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un cultivo celular y un polímero para su uso en el cultivo celular, donde se cubran las necesidades mencionadas anteriormente y/o otras necesidades de la técnica. De acuerdo con un

aspecto, la presente invención proporciona un proceso de fabricación de un copoliisocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol), en el que el proceso comprende las etapas de:

i) copolimerizar:

- un primer comonomero de un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) injertado con un grupo enlazador y
- un segundo comonomero de un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) no injertado;

en el que la proporción molar entre el primer comonomero y el segundo comonomero es de 1:500 y 1:30; y
ii) añadir un reactante de una unidad espaciadora y un factor de adhesión celular al copolímero obtenido en la etapa i), en el que la unidad espaciadora se representa por la fórmula general A-L-B,

en el que el grupo enlazador y el grupo A se seleccionan para que reaccionen y formen un primer acoplamiento, y el factor de adhesión celular y el grupo B se seleccionan para que reaccionen y formen un segundo acoplamiento, en el que el primer acoplamiento y el segundo acoplamiento se seleccionan independientemente del grupo que consiste en acoplamiento de alquino-azida, acoplamiento de dibenzociclooctina-azida, acoplamiento de azida a base de oxanorbornadieno, acoplamiento de vinilsulfona-tiol, acoplamiento de maleimida-tiol, acoplamiento de metilmetacrilato-tiol, acoplamiento de éter, acoplamiento de tioéter, acoplamiento de biotina-estreptavidina, amina-ácido carboxílico que da lugar a enlaces amida, acoplamiento de alcohol-ácido carboxílico que da lugar a enlaces éster y acoplamiento de éster de NHS(éster de N-hidroxisuccinimida)-amina y en el que el grupo L es un segmento de cadena lineal que tiene de 10 a 60 enlaces entre los átomos seleccionados de C, N, O y S en la cadena principal.

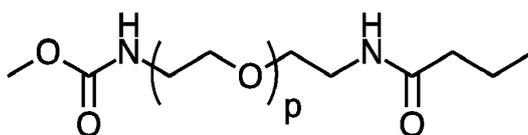
El grupo enlazador y el grupo A se seleccionan para que reaccionen y formen un primer acoplamiento que puede ser cualquier acoplamiento mencionado en la lista anterior. Por ejemplo, con el fin de obtener un acoplamiento de alquino-azida, el grupo enlazador puede ser alquino, y el grupo A puede ser azida, o el grupo enlazador puede ser azida, y el grupo A puede ser alquino. Los acoplamientos mencionados en la lista anterior son bien conocidos por el experto en la materia, y la formación de los acoplamientos se encuentra en los libros de texto. Por ejemplo, el acoplamiento de $\text{NH}_2\text{-COOH}$ se puede mediar a través de EDC.

Preferentemente, el primer acoplamiento es un acoplamiento de alquino-azida.

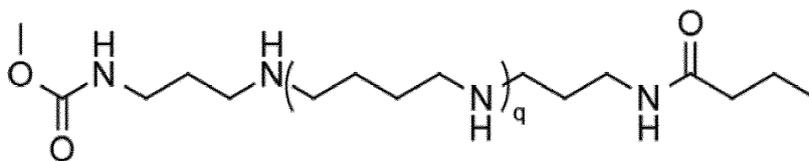
De igual forma, el factor de adhesión celular y el grupo B se seleccionan para que reaccionen y formen un segundo acoplamiento que puede ser cualquier acoplamiento mencionado en la lista anterior. Preferentemente, el segundo acoplamiento es acoplamiento de éster de NHS (éster de N-hidroxisuccinimida)-amina o acoplamiento de maleimida-tiol. Este puede ser un acoplamiento de éster de NHS en el extremo N-terminal de un factor de adhesión celular que sea un péptido o un acoplamiento de maleimida en un extremo tiol-terminal del factor de adhesión celular que sea un péptido.

El grupo L es un segmento que tiene una cadena lineal que conecta los grupos reactivos A y B. El segmento está formado por una secuencia de átomos seleccionados entre C, N, O y S. El número de enlaces entre los átomos de la cadena principal conectada a los grupos A y B es de al menos 10 y como máximo de 60. La expresión "cadena principal" significa la cadena que conecta los grupos A y B con la distancia más corta. El número de enlaces entre los átomos de la cadena principal conectada a los grupos terminales A y B es preferentemente de al menos 12, más preferentemente de al menos 15. El número de enlaces entre los átomos de la cadena principal conectada a los grupos terminales A y B es preferentemente de al menos 50, más preferentemente de al menos 40. Se encontró que se requiere una cierta distancia mínima entre la cadena principal del copolímero y el factor de adhesión celular para que las células unidas al factor de adhesión celular se cultiven. Se comprobó que se necesitaba la distancia dada por al menos 10 enlaces, que se proporciona por la presencia de la unidad espaciadora de acuerdo con la invención. Se encontró que la longitud por debajo de 10 enlaces no permitía un crecimiento celular suficiente.

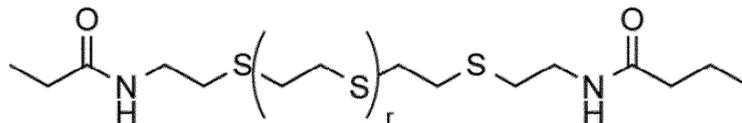
Los ejemplos preferidos del grupo L son los siguientes:



en el que p es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5,



en el que q es de 1 a 9, preferentemente de 2 a 5,



en el que r es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5.

Cuando la unidad espaciadora contiene estos tipos de grupo L, se garantiza un crecimiento celular particularmente estable independientemente del tipo y del tamaño de los grupos A y B, del grupo enlazador y del factor de adhesión celular.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona el copoliisocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) obtenible mediante el proceso de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un cultivo celular que comprende un hidrogel que comprende un copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol) a una concentración de 1,2 a 3,0 mg/ml, en el que el copoliisocianopéptido se fabrica mediante:

i) copolimerización de:

- un primer comonomero de un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) injertado con un grupo enlazador y
- un segundo comonomero de un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) no injertado;

en el que la proporción molar entre el primer comonomero y el segundo comonomero es de 1:500 y 1:30; e

ii) la adición de un reactante de una unidad espaciadora y un factor de adhesión celular al copolímero obtenido mediante la etapa i), en el que la unidad espaciadora se representa por la fórmula general A-L-B, en el que el grupo enlazador y el grupo A se seleccionan para que reaccionen y formen un primer acoplamiento, y el factor de adhesión celular y el grupo B se seleccionan para que reaccionen y formen un segundo acoplamiento, en el que el primer acoplamiento y el segundo acoplamiento se seleccionan independientemente del grupo que consiste en acoplamiento alquino-azida, acoplamiento de dibenzociclooctina-azida, acoplamientos de azida a base de oxanorbornadieno, acoplamiento de vinil-sulfona-tiol, acoplamiento maleimida-tiol, acoplamiento metilmetacrilato-tiol, acoplamiento éter, acoplamiento tioéter, acoplamiento biotina-estreptavidina, ácido aminocarboxílico dando como resultado enlaces amidas, acoplamiento alcohol-ácido carboxílico que da lugar a enlaces éster y acoplamiento de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS-éster)-amina y

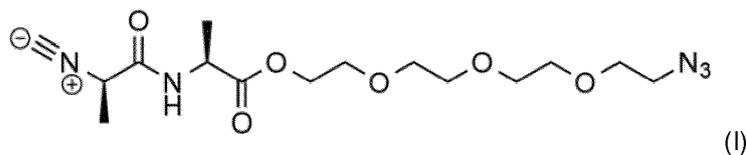
en el que el grupo L es un segmento de cadena lineal que tiene de 10 a 60 enlaces entre los átomos seleccionados de C, N, O y S en la cadena principal.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que se logra un crecimiento celular óptimo solo a concentraciones específicas de los factores de adhesión celular que están situados a cierta distancia de la cadena principal del polímero que construye la estructura tridimensional del hidrogel.

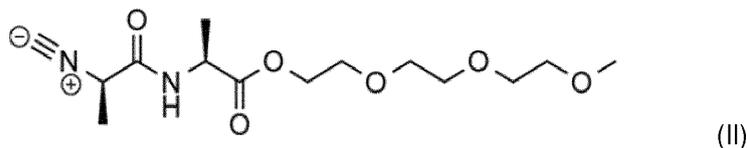
Si la concentración del factor de adhesión celular es demasiado baja, las células no se adhieren lo suficiente al hidrogel, lo que, a su vez, no permite que las células se cultiven. Si la concentración del factor de adhesión celular es demasiado alta, las células no crecen en el gel.

El primer comonomero es un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) injertado con un grupo enlazador. Los ejemplos preferidos del grupo enlazador incluyen azida (por ejemplo, azida de oxanorbornadieno), alquino (por ejemplo, dibenzociclooctina), tiol, vinilsulfona, maleimida, metacrilato de metilo, éter, biotina, estreptavidina, NH₂, COOH, OH, éster de NHS. En particular, se prefiere la azida.

En la Fórmula (I), se muestra un ejemplo del primer comonomero, en la que el grupo enlazador es una azida.

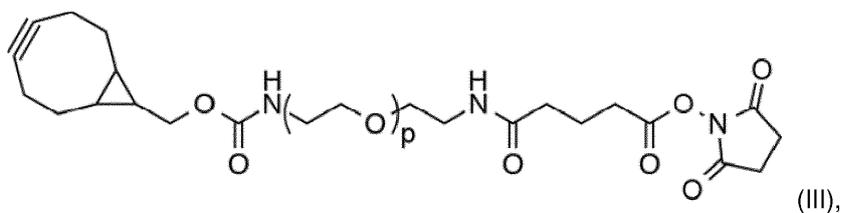


5 El segundo comonomero es un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) que no está injertado con un grupo enlazador ni otros grupos, es decir, la cadena lateral del isocianopéptido consiste en un oligo(alquilenglicol). Un ejemplo del segundo comonomero se muestra en la Fórmula (II):



10 El primer comonomero y el segundo comonomero se copolimerizan en la etapa (i). Se obtiene un copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol) que comprende grupos enlazadores a lo largo del polímero en la proporción del primer comonomero con respecto al segundo comonomero.

15 Un factor de adhesión celular se une al copolímero a través de una unidad espaciadora. En primer lugar, se prepara un reactante de una unidad espaciadora y un factor de adhesión celular. Un ejemplo de la unidad espaciadora se muestra en la Fórmula (III).

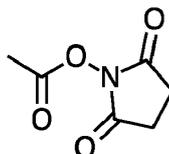


en la que p es de 1 a 10.

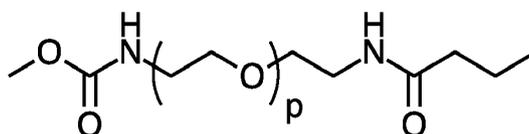
20 En el presente ejemplo, el grupo A es:



el grupo B es:

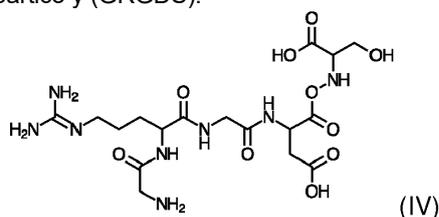


el grupo L es:



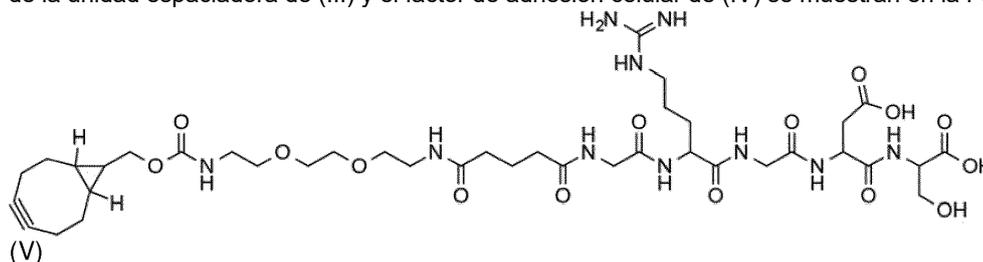
25

En la Fórmula (IV), se muestra un ejemplo del factor de adhesión celular, que es un pentapéptido compuesto de glicina, L-arginina, glicina, ácido L-aspártico y (GRGDS).

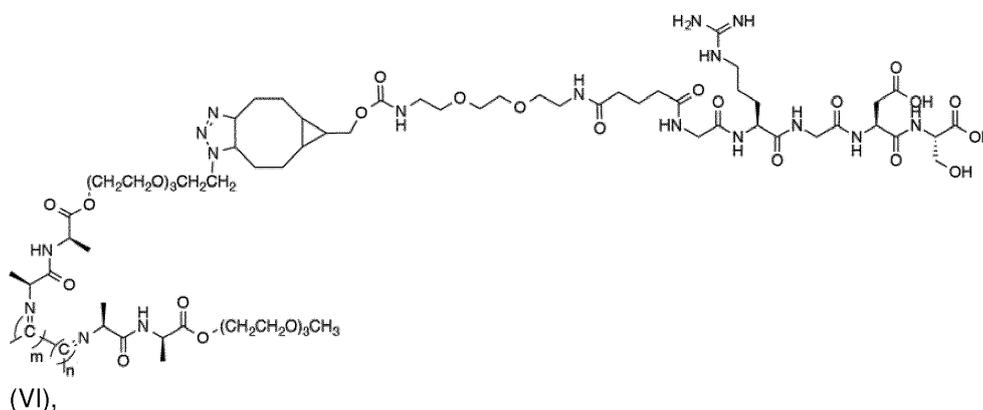


30

El reactante de la unidad espaciadora de (III) y el factor de adhesión celular de (IV) se muestran en la Fórmula (V).



5 En la etapa ii) de la invención, el reactante (por ejemplo, la fórmula (V)) de una unidad espaciadora y un factor de adhesión celular se hacen reaccionar con el copolímero obtenido en la etapa i). El grupo enlazador reacciona con la parte del reactante correspondiente a la unidad espaciadora. Por consiguiente, el copoliisocianopéptido final comprende unidades de adhesión celular a lo largo del polímero en la proporción del primer comonomero con respecto al segundo comonomero. Un ejemplo del copoliisocianopéptido final se representa por la fórmula (VI):



10 en la que m:n es la proporción del primer comonomero con respecto al segundo comonomero.

La unidad de adhesión celular se sitúa a una distancia de la cadena principal del polímero de isocianopéptido mediante el uso de la unidad espaciadora.

15 Se prepara un hidrogel a partir del copolímero obtenido por gelificación con un medio de cultivo celular adecuado. El hidrogel es un hidrogel tridimensional. La concentración de polímero en el hidrogel es 1,2-3,0 mg/ml. Si la concentración de polímero en el hidrogel es demasiado baja, las células no se adhieren al hidrogel. Si la concentración de polímero en el hidrogel es demasiado alta, el hidrogel se vuelve demasiado rígido para que las células se muevan y crezcan dentro del gel.

20 Preferentemente, el hidrogel tiene un módulo elástico en el intervalo de 10 a 5.000 Pa, preferentemente de 100 a 1.000 Pa a 35 °C como se determinó mediante experimentos de reología de placa-placa. Esto permite que las células se muevan y crezcan para formar redes celulares y estructuras 3D, como, por ejemplo, un sistema prevascular.

25 La presente invención proporciona un cultivo celular de un hidrogel que tiene una rigidez selectiva y respuesta a la temperatura, así como una distribución espacial controlada y una densidad de puntos de adhesión celular. La copolimerización da lugar a una distribución estadística del grupo de adhesión celular a lo largo del copolímero en la proporción del primer comonomero con respecto al segundo comonomero. Se puede ajustar la proporción del primer comonomero con respecto al segundo comonomero para controlar la distancia entre los factores de adhesión celular a lo largo de la cadena principal de polímero del poliisocianopéptido. La distancia media entre los factores de adhesión celular a lo largo de la cadena principal de polímero puede ser, por ejemplo, de 1,1 a 60 nm. Este intervalo de la distancia entre los factores de adhesión celular es adecuado para anclar las células que se van a cultivar en el cultivo celular. Más preferentemente, la distancia media entre los factores de adhesión celular es de 8 a 30 nm.

35 El hidrogel puede comprender una variedad de medios de cultivo celular, y se ha demostrado que el cultivo celular media la formación de un almacén biológico complejo.

40 El cultivo celular de acuerdo con la invención es sumamente ventajoso, porque la recogida de las células cultivadas es fácil. El hidrogel usado en el cultivo celular tiene un carácter termosensible, es decir, se convierte en líquido mediante su enfriamiento hasta una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación. Por lo tanto, la recogida de las células cultivadas se puede realizar solo mediante el enfriamiento del cultivo celular. Una vez que el hidrogel se ha convertido en líquido, se pueden recoger las células del líquido sin dañar las células cultivadas.

Se determinó que el factor de adhesión celular no se puede unir directamente a los isocianopéptidos con funcionalidad oligoalquilenglicol para conservar una unión suficiente. Esto se resolvió mediante el uso de un espaciador de acuerdo con la presente invención. La unidad espaciadora usada de acuerdo con la invención separa el factor de adhesión celular de la cadena principal polimérica de los isocianopéptidos para eliminar el bloqueo estérico. El espaciador desacopla los movimientos del factor de adhesión celular de la cadena principal polimérica, y el desacoplamiento de los movimientos permite que el factor de adhesión celular se acople eficazmente en el bolsillo de unión a la integrina. El espaciador debe ser polar, hidrosoluble, biocompatible y no unirse al sitio activo de la integrina, pero que pueda ayudar en la unión auxiliar. El primer monómero se puede preparar preparando primero un segundo monómero e injertándolo con un grupo enlazador. Como alternativa, el primer monómero y el segundo monómero pueden prepararse a través de diferentes rutas.

La proporción molar entre el primer comonómero y el segundo comonómero está entre 1:500 y 1:30. Preferentemente, la relación molar entre el primer comonómero y el segundo comonómero está entre 1:400-1:35, 1:300-1:40 o 1:200-1:45. Este intervalo de la relación entre el primer comonómero y el segundo comonómero da una distancia media de 8 a 30 nm entre las unidades de adhesión celular a lo largo de la cadena principal polimérica.

Preferentemente, el copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol) tiene una temperatura de gelificación de 18 a 40 °C. La temperatura de gelificación es independiente de la concentración de polímero en el hidrogel. Más bien, depende del número de unidades de oligoalquilenglicol de la cadena lateral del polímero.

A continuación, se dan detalles adicionales de la presente invención.

Comonómeros

Funcionalización del isocianopéptido con unidades de oligo(alquilenglicol)

Los monómeros se basan preferentemente en un motivo di-, tri-, tetra- o más -peptídico sustituido en el extremo C-terminal con las cadenas de oligo(alquilenglicol) deseadas. Las cadenas pueden estar basadas en oligo(alquilenóxido) lineal, ramificado o dendronizado. Preferentemente, la cadena es lineal y se compone de etilenglicol.

El segmento peptídico puede ser de diferentes composiciones determinadas por la secuencia de aminoácidos naturales o no naturales y expandidos o una mezcla de los mismos.

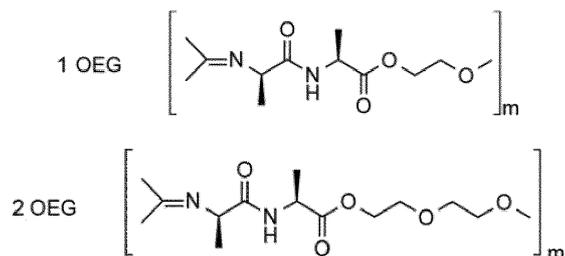
Los monómeros se derivan de fragmentos de oligo(alquilenglicol) adecuados. Se usa una estrategia de acoplamiento peptídico de múltiples etapas para introducir sucesivamente los aminoácidos deseados. Después de la introducción de la secuencia peptídica deseada, el extremo N-terminal del segmento peptídico se formila con un método de formilación adecuado. Esta formilación puede incluir el tratamiento del producto con sales de formilo, ácido fórmico u otros agentes formilantes.

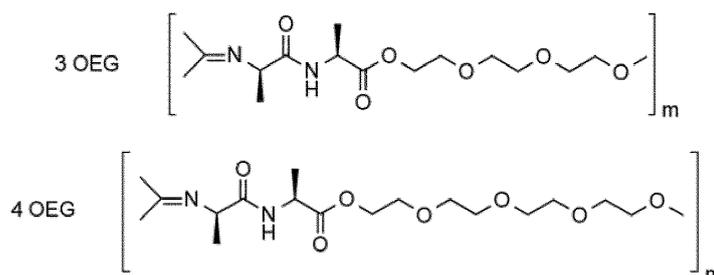
Algunos ejemplos de estrategias de formilación hacen uso de sales de formiato (tales como formiato de sodio o potasio), formiatos de alquilo (tales como formiato de metilo, etilo o propilo), ácido fórmico, cloral y derivados. El isocianuro se forma luego tratando la formamida con un agente de deshidratación apropiado: Un ejemplo de estrategia de deshidratación usa difosgeno. Varios ejemplos de agentes de deshidratación que también pueden usarse son fosgeno y derivados (di-, trifosgeno), carbodiimidias, cloruro de tosilo, oxacloruro de fósforo, trifenilfosfina/tetraclorocarbono, [M. B. Smith y J. March "March's advanced organic chemistry" 5ª edición, Wiley & Son eds., 2001, Nueva York, EE.UU., pág. 1350-1351 y referencias del presente documento].

Cadenas laterales (alquilenglicol)

Los ejemplos de alquilenglicoles adecuados son etilen-, propilen-, butilen- o pentilenglicol. Preferentemente, el alquilenglicol es etilenglicol.

A continuación, se representan las unidades de oligoetilenglicol ventajosas. En general, el término oligo se refiere a un número < 10.





5 Preferentemente, los isocianopéptidos están funcionalizados con al menos 3 unidades de etilenglicol para conducir a materiales hidrosolubles después de la polimerización.

El segundo comonomero de la presente invención es un isocianopéptido de oligo(alquilenglicol) como se ha descrito anteriormente, sin injerto adicional.

10 El primer comonomero puede consistir en un isocianopéptido que tenga el mismo número de unidades de alquilenglicol o puede ser una mezcla de isocianopéptidos que tengan un número diferente de unidades de alquilenglicol. De manera similar, el segundo comonomero puede consistir en un isocianopéptido que tenga el mismo número de unidades de alquilenglicol o puede ser una mezcla de isocianopéptidos que tengan diferente número de unidades de alquilenglicol.

15 El primer comonomero y el segundo comonomero son isocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol), es decir, el número de unidades de alquilenglicol en el isocianopéptido es de 1 a 10. Preferentemente, la media del número de unidades de alquilenglicol en el primer comonomero y el segundo comonomero es de al menos 3 y, como máximo, de 4.

20 La media de las unidades de alquilenglicol del primer comonomero y del segundo comonomero normalmente se ajusta usando una mezcla de isocianopéptidos que tienen números diferentes de unidades de alquilenglicol como el segundo comonomero. En realizaciones preferidas, el primer comonomero es un isocianopéptido que tiene tres unidades de alquilenglicol y el segundo comonomero es una mezcla de un isocianopéptido que tiene tres unidades de alquilenglicol y un isocianopéptido que tiene cuatro unidades de alquilenglicol.

La media del número de unidades de alquilenglicol del primer comonomero y el segundo comonomero puede ser 3.

30 Por lo general, se obtiene la temperatura de gelificación de 15-25 °C. La media del número de unidades de alquilenglicol en el primer y el segundo comonomero puede ser superior a 3 y, como máximo, de 3,5. Normalmente, se obtiene la temperatura de gelificación de 18 a 35 °C. La media del número de unidades de alquilenglicol en el primer comonomero y en el segundo comonomero puede ser superior a 3,5 y, como máximo, de 5. Por lo general, se obtiene la temperatura de gelificación de 25 a 50 °C.

35 Preferentemente, el copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol) tiene un módulo elástico de 10 a 5.000 Pa, preferentemente de 100 a 1.000 Pa a una temperatura de 35 °C como se determina mediante mediciones de reología. Cuando la media del número de unidades de alquilenglicol en el primer comonomero y el segundo comonomero es de al menos 3 y como máximo 5, el hidrogel tiene dicha rigidez.

40 Polimerización

El monómero de isocianopéptido de oligo(alquilenglicol) injertado con el monómero enlazador (primer comonomero) y los monómeros de isocianopéptido de oligo(alquilenglicol) no injertados con el grupo enlazador (segundo comonomero) se mezclan y, posteriormente, se copolimerizan.

45 La copolimerización se realiza preferentemente en presencia de un disolvente apolar. Los disolventes apolares adecuados se pueden seleccionar del grupo que consiste en disolventes de hidrocarburos saturados y disolventes de hidrocarburos aromáticos o mezclas de los mismos. Los ejemplos de disolventes apolares son pentano, hexano, heptano, 2-metilbutano, 2-metilhexano, ciclohexano y tolueno, bencenoxilenos o mezclas de los mismos.

50 Preferentemente, se usa tolueno en la polimerización. Preferentemente, el tolueno se selecciona para el proceso de polimerización de isocianopéptidos de oligo(etilenglicol) en los que la parte de oligo(etilenglicol) contiene al menos tres unidades de etilenglicol.

55 Preferentemente, la polimerización se lleva a cabo en presencia de un catalizador. El catalizador es preferentemente una sal de níquel (II). El ejemplo de sales de Ni (II) son haluros de níquel (II) (por ejemplo, cloruro de níquel (II), perclorato de níquel (II) o perclorato de tetraquis-(*terc*-butilsocianuro) de níquel (II)).

Se pueden usar otros complejos y sales de níquel siempre que sean solubles en el medio de polimerización o se disuelvan inicialmente en un disolvente adecuado que sea miscible en el medio de polimerización. Las referencias generales que describen algunos sistemas catalíticos que pueden usarse para polimerizar los isocianopéptidos de oligo(alquilenglicol) se encuentran en Suginome M.; Ito Y.; *Adv Polym Sci* 2004, 171, 77-136; Nolte R. J. M.; *Chem. Soc. Rev.* 1994, 23(1), 11-19].

Preferentemente, la concentración de monómero se selecciona por encima de 30 mmol/l y la proporción de catalizador/monómero se selecciona entre 1/100 y 1/10.000. La reducción de la cantidad de níquel (II) (proporción de catalizador/monómero por debajo de 1/1.000) permite la preparación de materiales que presentan un grado sustancial de polimerización [GP medio > 500], que se desea para la posterior aplicación de los polímeros como macrohidrogelificantes.

En un ejemplo representativo, se añade una solución milimolar de monómero en un disolvente orgánico no polar o una mezcla de disolventes a un catalizador de níquel (II) disuelto en un disolvente polar en una proporción molar de 1:50 a 1:100.000 del catalizador con respecto al monómero. En un ambiente cerrado herméticamente, se agita la mezcla vigorosamente durante 2 a 24 horas. Una vez completado, se evapora la mezcla de reacción y se disuelve el producto en bruto en disolventes orgánicos y se precipitan en éter dietílico o disolventes orgánicos no compatibles similares, dando el producto deseado.

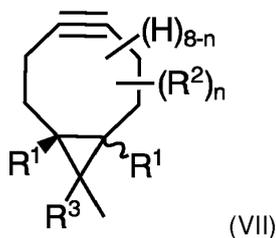
Injerto del reactante de la unidad espaciadora y el factor de adhesión celular a la unidad espaciadora del grupo enlazador

Los grupos terminales A y B se seleccionan preferentemente de manera que la síntesis del compuesto subsiguiente sea posible sin necesidad de etapas de desprotección o activación.

Los ejemplos preferidos del grupo A de la unidad espaciadora incluyen azida (por ejemplo, azida a base de oxanorbornadieno), alquino (por ejemplo, dibenzociclooctina), tiol, vinilsulfona, maleimida, metacrilato de metilo, éter, biotina, estreptavidina, NH₂, COOH, OH, éster de NHS. En particular, se prefiere el alquino.

Los ejemplos preferidos del grupo B de la unidad espaciadora incluyen azida (por ejemplo, azida a base de oxanorbornadieno), alquino (por ejemplo, dibenzociclooctina), tiol, vinilsulfona, maleimida, metacrilato de metilo, éter, biotina, estreptavidina, NH₂, COOH, OH, éster de NHS. En particular, se prefiere éster de NHS o maleimida.

Preferentemente, el grupo A de la unidad espaciadora está representado por la fórmula (VII):



en la que:

n es de 0 a 8;

R³ se selecciona del grupo que consiste en [(L)_p-Q], hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁-C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆-C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇-C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇-C₂₄, estando los grupos alquilo opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, en el que los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos alquenilo C₂-C₁₂, grupos alquinilo C₂-C₁₂, grupos cicloalquilo C₃-C₁₂, grupos alcoxi C₁-C₁₂, grupos alqueniloxi C₂-C₁₂, grupos alquiniloxi C₂-C₁₂, grupos cicloalquiloxi C₃-C₁₂, halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, en el que los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi están opcionalmente sustituidos; los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi están opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, estando los grupos sililo representados por la fórmula (R⁴)₃Si-, en la que R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos alquenilo C₂-C₁₂, grupos alquinilo C₂-C₁₂, grupos cicloalquilo C₃-C₁₂, grupos alcoxi C₁-C₁₂, grupos alqueniloxi C₂-C₁₂, grupos alquiniloxi C₂-C₁₂ y grupos cicloalquiloxi C₃-C₁₂, en el que los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi están opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi están opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S;

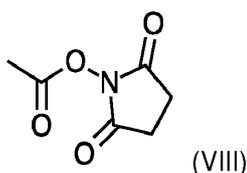
R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C₁-C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆-C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇-C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇-C₂₄; y R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, -OR⁶, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁶, grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos arilo C₁-C₁₂, grupos alquilarilo C₁-C₁₂ y grupos arilalquilo C₁-C₁₂, en los que R⁶ es como se ha definido anteriormente, y en los que los grupos alquilo, grupos arilo, grupos alquilarilo y grupos arilalquilo están opcionalmente sustituidos.

Preferentemente, n = 0.

Preferentemente, R₁ es hidrógeno.

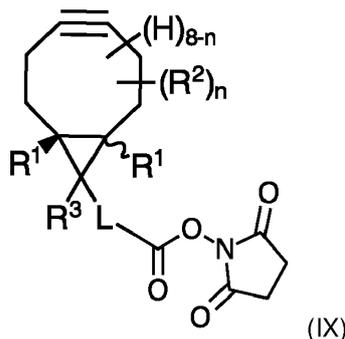
Preferentemente, R₃ es hidrógeno.

Preferentemente, el grupo B de la unidad espaciadora se representa por la fórmula (VIII):

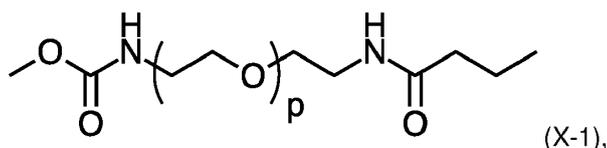


Preferentemente, la unidad espaciadora comprende el grupo A de fórmula (VII) y el grupo B de fórmula (VIII).

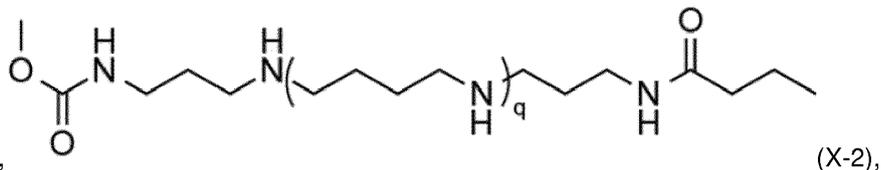
Los ejemplos de la unidad espaciadora adecuada incluyen los compuestos representados por la fórmula (IX):



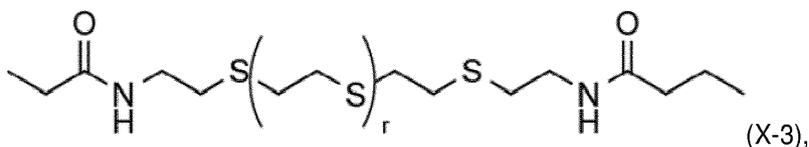
en la que R₁, R₂, R₃ y n son como se han definido anteriormente y L se selecciona preferentemente del grupo representado por la fórmula (X-1), (X-2), (X-3):



en la que p es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5,

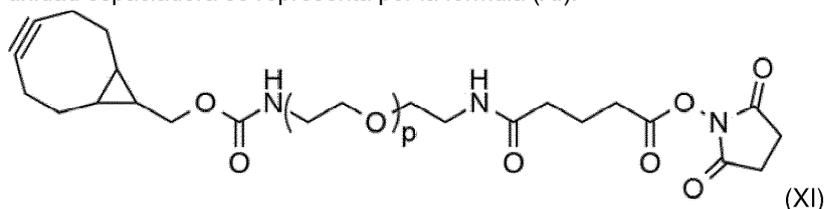


en la que q es de 1 a 9, preferentemente de 2 a 5.



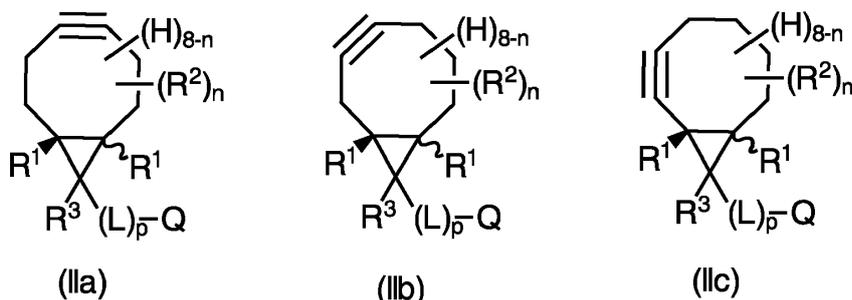
en la que r es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5.

Preferentemente, la unidad espaciadora se representa por la fórmula (XI).



en la que p es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5, más preferentemente 2.

- 5 Otros ejemplos de la unidad espaciadora adecuada incluyen compuestos de ciclooctilo fusionados descritos en el documento WO2011/136645, que se incorpora en el presente documento por referencia. Por consiguiente, una posible unidad espaciadora se selecciona del compuesto de Fórmula (IIa), (IIb) o (IIc):



10 en las que:

n es de 0 a 8;

p es 0 o 1;

15 R^3 se selecciona del grupo que consiste en $[(L)_p-Q]$, hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C_1-C_{24} , grupos (hetero)arilo C_6-C_{24} , grupos alquil(hetero)arilo C_7-C_{24} y grupos (hetero)arilalquilo C_7-C_{24} , estando los grupos alquilo opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, estando los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo C_1-C_{12} , grupos alquenoilo C_2-C_{12} , grupos alquinilo C_2-C_{12} , grupos cicloalquilo C_3-C_{12} , grupos alcoxi C_1-C_{12} , grupos alquenilo C_2-C_{12} , grupos alquinilo C_2-C_{12} , grupos cicloalquilo C_3-C_{12} , halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, en el que los grupos alquilo, grupos alquenoilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos alquinilo y grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, en el que los grupos sililo están representados por la fórmula $(R^4)_3Si-$, en la que R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo C_1-C_{12} , grupos alquenoilo C_2-C_{12} , grupos alquinilo C_2-C_{12} , grupos cicloalquilo C_3-C_{12} , grupos alcoxi C_1-C_{12} , grupos alquenilo C_2-C_{12} , grupos alquinilo C_2-C_{12} y grupos cicloalquilo C_3-C_{12} , en el que los grupos alquilo, grupos alquenoilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alquenilo, grupos alquinilo y grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalquilo están opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S;

20 L es un grupo enlazador seleccionado entre grupos lineales o ramificados alquenoilo C_1-C_{24} , grupos alquenoilo C_2-C_{24} , grupos alquinilo C_2-C_{24} , grupos cicloalquenoilo C_3-C_{24} , grupos cicloalquenoilo C_5-C_{24} , grupos cicloalquinilo C_8-C_{24} , grupos alquil (hetero)arileno C_7-C_{24} , grupos (hetero)arilalquenoilo C_7-C_{24} , grupos (hetero)arilalquenoilo C_8-C_{24} , grupos (hetero)arilalquinilo C_9-C_{24} , los grupos alquenoilo, grupos alquenoilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquenoilo, grupos cicloalquenoilo, grupos cicloalquinilo, grupos alquil(hetero)arileno, grupos (hetero)arilalquenoilo, grupos (hetero)arilalquenoilo y grupos (hetero)arilalquinilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo C_1-C_{12} , grupos alquenoilo C_2-C_{12} , grupos alquinilo C_2-C_{12} , grupos cicloalquilo C_3-C_{12} , grupos cicloalquenoilo C_5-C_{12} , grupos cicloalquinilo C_8-C_{12} , grupos alcoxi C_1-C_{12} , grupos alquenilo C_2-C_{12} , grupos alquinilo C_2-C_{12} , grupos cicloalquilo C_3-C_{12} , halógenos, grupos amino, oxo y grupos sililo, pudiendo estar los grupos sililo representados por la fórmula $(R^4)_3Si-$, en la que R_4 se ha definido anteriormente;

25 Q es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, R^6 , $-CH=C(R^6)_2$, $-C\equiv CR^6$, $-[C(R^6)_2C(R^6)_2O]_q-R^6$, en la que q está en el intervalo de 1 a 200, $-CN$, $-N_3$, $-NCX$, $-XCN$, $-XR^6$, $-N(R^6)_2$, $-N(R^6)_3$, $-C(X)N(R^6)_2$, $-C(R^6)_2XR^6$, $-C(X)R^6$, $-C(X)XR^6$, $-S(O)R^6$, $-S(O)_2R^6$, $-S(O)OR^6$, $-S(O)_2OR^6$, $-S(O)N(R^6)_2$, $-S(O)_2N(R^6)_2$, $-OS(O)R^6$, $-OS(O)_2R^6$, $-OS(O)OR^6$, $-OS(O)_2OR^6$, $-P(O)(R^6)(OR^6)$, $-P(O)(OR^6)_2$, $-OP(O)(OR^6)_2$, $-Si(R^6)_3$, $-XC(X)R^6$, $-XC(X)XR^6$, $-XC(X)N(R^6)_2$, $-N(R^6)C(X)R^6$, $-N(R^6)C(X)XR^6$ y $-N(R^6)C(X)N(R^6)_2$, en los que X es oxígeno o azufre, y en los que R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno,

45

halógeno, grupos alquilo C₁-C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆-C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇-C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇-C₂₄;

R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C₁-C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆-C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇-C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇-C₂₄; y

5 R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, -OR⁶, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁶, grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos arilo C₁-C₁₂, grupos alquilarilo C₁-C₁₂ y grupos arilalquilo C₁-C₁₂, en los que R⁶ es como se ha definido anteriormente, y en el que los grupos alquilo, grupos arilo, grupos alquilarilo y grupos arilalquilo están opcionalmente sustituidos.

10 Factor de adhesión celular

El factor de adhesión celular apoya la unión de las células al gel. El factor de adhesión celular es preferentemente una secuencia de aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos que se pueden usar ventajosamente en la presente invención son alanina N-protegida, arginina, asparaginas, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, 15 glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Las secuencias adecuadas de aminoácidos incluyen péptidos tales como RGD, GRGDS, IKVAV, KQAGDV y GRGDSP. El factor de adhesión celular también puede ser un factor de crecimiento tal como VGEF y BFGF. El factor de adhesión celular también puede ser glicoproteínas o mucinas.

20 Se hacen reaccionar la unidad espaciadora y el factor de adhesión celular. El reactante puede injertarse en el grupo enlazador del copolímero mediante una reacción de SPAAC libre de cobre.

Propiedades generales del polímero

25 Los poliisocianopéptidos usados en la presente invención presentan una estructura bien definida, tal como una estructura helicoidal de lámina beta recubierta de oligo(alquilenglicol) perfecta, de acuerdo con la Figura 1. Esta estructura comprende un núcleo de poli(imina) helicoidal en el que prácticamente cada nitrógeno está sustituido con un colgante peptídico. Debido a la simetría pseudo-helicoidal 4₁ de la cadena principal de poli(imina), cada uno de los colgantes injertados sobre el nitrógeno enésimo participa en un empaquetamiento de tipo lámina beta 30 intramolecular con el correspondiente colgante injertado sobre la posición n + 4. Los segmentos peptídicos se decoran adicionalmente con sustituyentes oligo(alquilenglicol) que forman la cubierta exterior de la estructura. La hidrosolubilidad de los materiales resultantes está directamente relacionada con la elección de sustituyentes adecuados de oligo(etilenglicol). Finalmente, el sentido helicoidal de la cadena polimérica está dictado por la quiralidad de los aminoácidos conectados a los grupos imina.

35 Los poliisocianopéptidos usados en la presente invención tienen defectos estructurales mínimos o nulos en los polímeros obtenidos. El término mínimo se debe interpretar como que más del 96 % de las cadenas laterales correctas están correctamente unidas a la cadena principal polimérica, tal como el 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o incluso 100 %.

40 En otras palabras, debido a la polimerización directa de los monómeros funcionalizados, la aparición de defectos estructurales con respecto a la densidad del injerto de las cadenas laterales es mínima en los materiales resultantes.

45 Los poliisocianopéptidos usados en la presente invención pueden ser polímeros helicoidales homogéneos, estables, hidrosolubles de alto grado de polimerización [GP] > 500 y un largo período de persistencia.

La invención proporciona hidrogeles homogéneos que comprenden los poliisocianopéptidos con funcionalidad oligoalquileño y también hidrogeles heterogéneos que comprenden mezclas de poliisocianopéptidos con funcionalidad oligoalquileño con un número diferente de unidades de etilenglicol.

50 Los poliisocianopéptidos con funcionalidad oligoalquileño obtenidos son capaces de formar hidrogeles termorreversibles fuertes con temperatura de gelificación ajustable. Para gelificar físicamente el agua, los isocianopéptidos de poli[oligo(etilenglicol)] de acuerdo con la invención tienen preferentemente un grado de polimerización [GP] > 500.

55 Se prepara un hidrogel a partir del copolímero obtenido por gelificación con un medio de cultivo celular adecuado. El hidrogel es un hidrogel tridimensional. La concentración de polímero en el hidrogel es 1,2-3,0 mg/ml. Si la concentración de polímero en el hidrogel es demasiado baja, el hidrogel es demasiado débil para apoyar el crecimiento de la red 3D celular. Si la concentración de polímero en el hidrogel es demasiado alta, el hidrogel se vuelve demasiado rígido para que las células se muevan y crezcan dentro del gel.

60 Preferentemente, el hidrogel tiene un módulo elástico de 10 a 5.000 Pa a 35 °C como se determinó mediante experimentos de reología. Esto permite que las células se muevan y crezcan para formar una estructura de células 3D como, por ejemplo, un sistema prevascular.

65

Los hidrogeles obtenidos a partir de los poliisocianopéptidos de oligo(alquilenglicol) usados en la invención difieren de la mayoría de los hidrogeles basados en polímeros anteriormente descritos en la naturaleza altamente estructurada de la red formada tras la gelificación. La red consiste en manojos retorcidos de cadenas poliméricas agregadas lateralmente. Esta disposición es similar a la estructura de las redes fibrilares que se forman sobre la gelificación de hidrogelificantes de bajo peso molecular. Se supone que este fenómeno está relacionado con el largo período de persistencia de los poliisocianopéptidos que favorecen un modo original de asociación. La asociación es desencadenada por la modulación inducida por la temperatura de la hidrofilia de las cadenas laterales de oligo(alquilenglicol), que es un fenómeno perfectamente reversible, dando como resultado una agregación/disolución completamente termorreversible de los poliisocianopéptidos con funcionalidad oligo(alquilenglicol).

La descripción clásica de hidrogeles poliméricos físicos comprende la formación de cadenas de una red de enmarañamiento en soluciones concentradas, la formación de una red de percolación debido a la separación espinodal, la formación de microcristales y la formación de redes de micelas o estructuras laminares que aparentemente difieren del modo de asociación postulado del poliisocianopéptido de oligo(alquilenglicol).

Los hidrogeles resultantes del poliisocianopéptido de oligo(alquilenglicol) resultan de la asociación lateral de fibras de polímeros de aproximadamente 5 nm de diámetro en manojos retorcidos de mayor tamaño que forman la base de la red polimérica de hidrogel. Esto da como resultado una estructura altamente porosa con un tamaño de poro que puede bajar a 50 nm de diámetro.

Debido al comportamiento termosensible de las cadenas laterales de etilenglicol, los polímeros usados en la presente invención presentan transiciones de LCST claras. Para un poliisocianopéptido de oligo(alquilenglicol) dado, esta temperatura se puede modificar variando la fuerza iónica de la solución (efecto de la sal) o, más generalmente, mediante la adición de cualquier compuesto capaz de modificar el estado general de solvatación de los polímeros.

La LCST de los materiales puede modularse adicionalmente actuando sobre la cadena principal de poli(isocianuro) y, en concreto, sobre su configuración, con el uso de ácidos o cualquier compuesto que pueda conducir a cambios configuracionales de la hélice de la cadena principal.

Otra forma de modular la LCST de los polímeros consiste en copolimerizar monómeros que porten diferentes cadenas laterales de oligo(alquilenglicol). Por ejemplo, se permite la polimerización de mezclas de isocianodialanina de tri- y tetra(etilenglicol) en diferentes proporciones para ajustar la temperatura de gelificación de los copolímeros resultantes entre 22 °C y 60 °C en agua mQ.

Se ha encontrado que la longitud de la cadena polimérica influye en la gelificación. Las cadenas con menor grado de polimerización tenían una fuerte tendencia a precipitar en lugar de formar geles. Se espera que este sea un efecto general para los polímeros rígidos o semiflexibles, cuya hidrofilia puede variarse sin modificar la estructura general de las cadenas (es decir, en las estructuras rígidas, la cadena no se derrumba, sino que se agrega lateralmente con otras cadenas para formar fibras extendidas).

Se ha observado una influencia adicional de la longitud de los polímeros en relación con las propiedades ópticas de los geles resultantes. Se encontró que los hidrogeles preparados a partir de cadenas con un menor grado de polimerización eran propensos a ser turbios u opacos. Aumentando el grado medio de polimerización se obtuvo una disminución de la opacidad de los hidrogeles que, finalmente, condujo a materiales completamente transparentes ópticamente.

La temperatura del gel se puede ajustar hasta cierto punto, con la posibilidad de formar geles estructurados estables a 25 °C, conduciendo, por lo tanto, a una nueva matriz biomimética que se puede usar para encapsular enzimas o células y preservar su actividad *in vitro*.

Los polímeros usados en la invención parecían tener algunas propiedades ventajosas e interesantes. Debido a la longitud y a la rigidez del polímero, los geles, en algunos casos, se componían del 99,00 al 99,98 % de agua. Esto significa que solo se requiere muy poco material para generar un gran volumen. Un único filamento del polímero parecía tener un diámetro de aproximadamente 4 nanómetros y un peso molecular de 2.500.000 Da. El índice de polidispersidad (PDI) fue de 1,6 y una longitud de cadena media varió entre 500 nm y 2 micrómetros. Los polímeros parecían ser bastante rígidos, con un período de persistencia de 70 a 90 nm. También fue posible obtener hélices de izquierda y derecha de acuerdo con la quiralidad del fragmento peptídico (materiales ópticamente activos). Los presentes inventores también fueron capaces de producir una red de fibrillas bien definida con un tamaño de poro controlado por la concentración de polímero, incluso a 100-250 nm. También fue posible introducir grupos laterales reactivos de forma eficaz en las cadenas. Por lo tanto, los polímeros pueden usarse como un almacén para biomoléculas. Se encontró que el tamaño de la porosidad está controlado por la concentración.

Los ejemplos de biomoléculas son: agentes biológicos, proteínas, glicoproteínas, péptidos, azúcares, hidratos de carbono, lipoproteínas, lípidos, glicolípidos, sílices, fármacos, ácidos nucleicos, ADN, ARN, vitaminas, nutrientes, hidrolizados, polisacáridos, monosacáridos, péptidos recombinantes, mucinas, compuestos bioorgánicos,

biomoléculas recombinantes, anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, receptores, agentes de contraste, citocinas, y fragmentos y modificaciones de los mismos.

Cultivo celular

5 El cultivo celular de acuerdo con la invención comprende el hidrogel como se ha descrito anteriormente. El cultivo celular es un armazón poroso tridimensional.

10 La invención proporciona además un proceso de preparación del cultivo celular de acuerdo con la presente invención, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar el copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol);
- b) mezclar el copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol) con un medio de cultivo celular para obtenerse el hidrogel.

15 En principio, el cultivo celular puede prepararse con cualquier tipo de medio de cultivo celular adecuado para el cultivo de células (animales). Los medios de cultivo celular adecuados apoyan el crecimiento y la diferenciación de las células usadas en el método de la invención.

20 Las directrices para la elección de un medio de cultivo celular y las condiciones de cultivo celular son bien conocidas y se proporcionan, por ejemplo, en los capítulos 8 y 9 de Freshney, R. I. "Culture of animal cells (a manual of basic techniques)", 4ª edición 2000, Wiley-Liss y en Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G. "Cell & Tissue culture: Laboratory Procedures", 1993, John Wiley & Sons. En general, un medio de cultivo celular para células (de mamífero) comprende sales, aminoácidos, vitaminas, lípidos, detergentes, tampones, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, oligoelementos, hidratos de carbono y otros nutrientes orgánicos disueltos en una solución salina fisiológica tamponada. Los ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo, sales de hierro de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, por ejemplo, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, sales de potasio, por ejemplo, KH_2PO_4 , KCl ; sales de sodio, por ejemplo, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y sales de calcio, por ejemplo, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Los ejemplos de aminoácidos son los 20 aminoácidos proteínogénicos conocidos, por ejemplo, histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Los ejemplos de vitaminas incluyen: ascorbato, biotina, colina. Cl , mio-inositol, D-pantotenato, riboflavina.

Los ejemplos de lípidos incluyen: ácidos grasos, por ejemplo, ácido linoleico y ácido oleico; peptona de soja y etanolamina. Los ejemplos de detergentes incluyen Tween 80 y Pluronic F68. Un ejemplo de un tampón es HEPES.

35 Los ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citocinas incluyen IGF, hidrocortisona e insulina (recombinante).

Los ejemplos de elementos traza son conocidos por el experto en la materia, e incluyen Zn, Mg y Se. Los ejemplos de hidratos de carbono incluyen glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa y piruvato.

40 El medio de cultivo puede complementarse con factores de crecimiento, metabolitos, etc.

Los ejemplos de medio de cultivo adecuado incluyen el medio de crecimiento endotelial (EGM-2, Lonza, Walkersville, EE.UU.), completamente suplementado con suero bovino fetal, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, hEGF de ácido ascórbico y GA-1000 y medio de células del músculo liso (SMCM, ScienCell, Carlsbad, EE.UU.) con los suplementos que incluyen suero bovino fetal, suplemento de crecimiento de células del músculo liso y penicilina/estreptomina.

50 Las condiciones óptimas en las que las células se cultivan pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la materia. Por ejemplo, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo celular no son, en principio, de importancia fundamental, y dependen del tipo de célula escogida.

Preferentemente, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad se seleccionan de manera que estas condiciones sean óptimas para el crecimiento y la productividad de las células. El experto en la materia sabe cómo encontrar el pH óptimo, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad.

55 Normalmente, el pH óptimo está entre 6,6 y 7,6, la temperatura óptima está entre 30 y 39 °C, por ejemplo, una temperatura de 36 a 38 °C, preferentemente una temperatura de aproximadamente 37 °C; la osmolaridad óptima está entre 260 y 400 mOsm/kg.

60 La invención proporciona además un proceso de cultivo de células, comprendiendo el proceso las etapas de:

- a) proporcionar el cultivo celular de acuerdo con la invención;
- b) añadir las células al cultivo celular a una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación del hidrogel;
- y
- c) cultivar las células.

65

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un cultivo celular que comprende un hidrogel que comprende el copoliisocianopéptido con funcionalidad oligo(alquilenglicol), y al menos una de células endoteliales y células del músculo liso. Las células son preferentemente células endoteliales cocultivadas y células del músculo liso. La concentración de las células puede ser, por ejemplo, de 2.000 células/ml a 1.000.000 células/ml. Se puede obtener de este modo una estructura tridimensional como, por ejemplo, un sistema vascular. La invención proporciona además el uso del cultivo celular de acuerdo con la invención para fabricar un sistema prevascular.

Se observa además que la invención se refiere a todas las posibles combinaciones de características descritas en el presente documento, prefiriéndose, en particular, aquellas combinaciones de características que están presentes en las reivindicaciones. Se observa además que la expresión "que comprende" no excluye la presencia de otros elementos. Sin embargo, también debe entenderse que una descripción de un producto que comprende ciertos componentes también desvela un producto que consiste en estos componentes. De forma similar, también debe entenderse que una descripción de un proceso que comprende ciertas etapas también desvela un proceso que consiste en estas etapas.

La Figura 1 ilustra una representación esquemática de los poliisocianopéptidos con funcionalidad oligoalquilo helicoidales basados en una unidad de dialano (centro superior). El plegamiento de la cadena principal se estabiliza mediante una red de unión al hidrógeno que se desarrolla dentro de la hélice, entre los límites amídicos apilados de las cadenas laterales (centro inferior). Esta estructura secundaria conduce a cadenas muy rígidas que se visualizan mediante AFM (derecha).

La Figura 2 es un esquema que muestra un ejemplo de la ruta de preparación de un ejemplo del primer monómero.

La Figura 3 es un esquema que muestra un ejemplo de la ruta de preparación de un ejemplo del segundo monómero.

Parte experimental

Materiales: Se destiló tolueno sobre sodio. El diclorometano se destiló sobre pentóxido de fósforo. La *N*-metilmorfolina se destiló nuevamente sobre sodio antes de su uso. El agua se purificó con un sistema MiliporeMiliQ, (agua mQ 18,2 MΩ). Todos los demás productos químicos se usaron como se recibieron. La cromatografía en columna se realizó usando gel de sílice (0,060-0,200 mm) proporcionado por Baker. Los análisis de cromatografía de capa fina (TLC) se llevaron a cabo sobre vidrio recubierto de sílice 60 F254 obtenido en Merck, y los compuestos se visualizaron usando ninhidrina o soluciones acuosas básicas de KMnO₄. Todos los cristales se remojaron en NaOH 0,5 M antes de su uso.

Ejemplo 1

(1) Preparación del copolímero

(1.1) Preparación del primer comonómero

El primer comonómero injertado con un grupo enlazador se sintetizó de acuerdo con el esquema de la Figura 2.

1.1.1. Síntesis de sulfonato de 2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil 4-metilbenceno (S1)

Se disolvió tetraetilenglicol (28,5 ml, 164,3 mmol) en 50 ml de piridina. Seguidamente, se enfrió la solución hasta 0 °C mientras se agitaba. Se burbujeó argón a través de la solución durante 15 minutos. Se añadió cloruro de tosilo (21,93 g, 115 mmol) en porciones a la solución en agitación. Se agitó la mezcla más a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con 50 ml de ácido cítrico al 10 %. Se extrajo la mezcla tres veces en 250 ml de cloroformo. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se purificó el aceite amarillo resultante usando cromatografía en columna (SiO₂, 0,060-0,200 mm; acetato de etilo como eluyente), proporcionando S1 en forma de un aceite amarillo pálido (11,69 g, 33,6 mmol, 29 %); R_f = 0,4 (acetato de etilo).

FT-IR (cm⁻¹, ATR) 3442 (O-H), 2870 (C-H), 1597 (N-H), 1453 (C-H), 1352 (S=O), 1175 (S=O), 1096 (C-O); ¹H RMN δ_H(300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 7,80 (dd, J = 7,81 Hz, 2H, -CH_A-), 7,33 (d, J = 7,35 Hz, 2H, -CH_A-S), 4,17 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-), 3,65 (m, 16H, -CH₂-), 2,45 (s, 3H, -CH₃); ¹³C RMN δ_C(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 21,16 (1C, [0099]C(CH₃)), 61,0 (1C, COH), 68,13(1C, COS), 69,0 (1C, OCH₂), 70,0, 70,1, 70,1, 70,2 (4C, OCH₂), 70,8, 72,0 (2C, OCH₂), 127,5 (2C, CHCCH), 129,5 (2C, CHCCH), 139,7 (1C, CCH₃), 144,5 (1C, CHCS).

1.1.2. Síntesis de (R)-2-(2-(2-(2-(tosiloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil-2-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoato (S2)

Se disolvieron el compuesto S1 (5,23 g, 15,01 mmol), *N*-Boc-(*L*)-alanina (2,86 g, 15,01 mmol) y DMAP (0,988 g, 1,65 mmol) en 25 ml de CH₂Cl₂ recién destilado y se enfrió hasta 0 °C mientras se agitaba. Se añadió DCC (3,12 g, 15,01 mmol) en porciones. La mezcla se volvió amarilla y se agitó durante 1 hora a 0 °C, y por tanto, se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Se retiró la diciclohexilurea precipitada por filtración y se lavó con acetato de etilo (3 x 20 ml).

Se concentró la capa orgánica al vacío. Se purificó el producto en bruto usando cromatografía en columna (SiO₂, 0,060-0,200 mm; MeOH al 1 %/CH₂Cl₂ como eluyente), proporcionando S2 en forma de un aceite naranja claro (5,49 g, 11,4 mmol, 76 %); R_f = 0,4 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂).

5 FT-IR (cm⁻¹, ATR) 2,924 (C-H), 1,745 (C=O éster), 1712 (C=O amida), 1,597 (N-H), 1,452 (C-H), 1,352 (S=O), 1,173 (S=O), 1,120 (C-O); ¹H RMN δ_H(300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 7,79 (d, J = 8,4 Hz, 2H, -CH_A-), 7,33 (d, J = 8,1 Hz, 2H, -CH_A-), 5,02 (s, 1 H, -NH-), 4,28 (m, 3H, -CH(CH₃)-, COOCH₂-), 4,15 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-), 3,69 (m, 14H, O-CH₂-CH₂-), 2,44 (s, 3H, -CH₃), 1,44 (s, 9H, -OC(CH₃)₃), 1,37 (d, J = 7,2 Hz, 3H, -CH(CH₃)-); ¹³C RMN δ_C(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 18,8 (1C, CHCH₃), 21,7 (1C, CCH₃), 28,4 (3C, C(CH₃)₃), 49,4 (1C, O(C=O)CHNH), 64,5 (1C, Boc-OCH₂), 68,9 (2C, OCH₂), 69,4 (1C, OCH₂), 70,7 (4C, OCH₂), 80,3 (1C, C(CH₃)₃), 128,2 (2C, CHCCH), 130,0 (2C, CHCCH), 145,0 (1C, CCH₃), 155,4 (1C, CHCS), 173,6 (1C, CH(C=O)NH), 176,7 (1C, CH(C=O)O); MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calc 542,2; obtenida 542,2.

1.1.3. Síntesis de (R)-2-(2-(2-(2-(tosiloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil-2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)propanamido)propanoato (S3)

15 Se disolvió el compuesto S2 (5,94 g, 1,14 mmol) en 60 ml de acetato de etilo saturado con HCl, y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente al vacío y se retiró el HCl en exceso añadiendo 30 ml de CH₂Cl₂ y 1 ml de n-BuOH seguido de la evaporación. Se retiró el n-BuOH residual mediante destilación azeotrópica con 3 x 30 ml de CH₂Cl₂. Se disolvieron la sal de HCl resultante de S2, N-Boc-(D)-alanina (2,14 g, 1,14 mmol) y monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (1,74 g, 1,14 mmol) en 40 ml de CH₂Cl₂ recién destilado. Se añadió gota a gota DIPEA (2 ml, 1,14 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que todo se disolvió. Se enfrió la solución hasta 0 °C y se añadió DCC (2,35 g, 11,4 mmol) en porciones. Se formó un precipitado blanco y la mezcla se agitó durante 1 h a 0 °C seguido de 3 h de agitación a temperatura ambiente. Se separó el precipitado por filtración, se lavó con acetato de etilo (3 x 30 ml) y se evaporó el disolvente al vacío. Se purificó el producto en bruto usando cromatografía en columna (SiO₂, 0,060-0,200 mm;

25 MeOH al 2 %/CH₂Cl₂ en forma de eluyente), proporcionando S3 en forma de un aceite amarillo pálido (3,37 g, 5,7 mmol, 52 %); R_f = 0,3 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂).

30 FT-IR (cm⁻¹, ATR) 2,876 (C-H), 1,740 (C=O éster), 1,718 (C=O amida), 1667 (N-H), 1522 (N-H), 1452 (C-H), 1365 (S=O), 1161 (S=O), 1105 (C-O); ¹H RMN δ_H(300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 7,80 (d, J = 8,4, 2H, -CH_A- C-S), 7,36 (d, J = 8,1, 2H, -CH_A-), 6,91 (s, 1 H, -NH), 5,00 (s, 1 H, -NH), 4,58 (m, 1 H, -NHCH(CH₃)-), 4,28 (m, 2H, -COOCH₂-), 4,14 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-), 3,61 (m, 12H, -C(O)OCH₂CH₂O(CH₂CH₂O)₃-), 2,45 (s, 3H, -CH₃), 1,45 (s, 9H, -OC(CH₃)₃), 1,40 (d, J = 7,2, 3H, -CH(CH₃)-), 1,35 (d, J = 7,2, 3H, -CH(CH₃)-); ¹³C RMN δ_C(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 18,2 (2C, CHCH₃), 21,7 (1C, CCH₃), 28,4 (3C, C(CH₃)₃), 47,2 (1C, NCH), 50,0 (1C, NCH), 64,5 (1C, Boc-OCH₂), 68,7 (2C, OCH₂), 69,3 (1C, OCH₂), 70,6 (4C, OCH₂), 80,2 (1C, C(CH₃)₃), 128,0 (2C, CHCCH), 129,9 (2C, CHCCH), 133,1 (1C CCH₃), 144,9 (1C, CHCS), 172,7 (2C, C=O); MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calc 613,2; obtenida 613,1.

1.1.4. Síntesis de (R)-2-(2-(2-(2-(tosiloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil-2-((S)-2-formamidopropanamido)propanoato (S4)

40 Se desprotegió el compuesto S3 (1,70 g, 2,85 mmol) siguiendo el mismo procedimiento descrito para el compuesto S2 y se usó sin purificación adicional. Se disolvió el producto en bruto en 25 ml de formiato de etilo. Se añadió formiato sódico (0,97 g, 14,25 mmol), y se calentó la mezcla durante 8 horas a 66 °C. Se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se separó el sólido por filtración. Se evaporó el disolvente al vacío. Se purificó el producto en bruto usando cromatografía en columna (SiO₂, 0,060-0,200 mm; MeOH al 4 %/CH₂Cl₂ como eluyente), proporcionando S4 en forma de un aceite amarillo claro (0,79 g, 1,52 mmol, 54 %); R_f = 0,3 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂).

45 FT-IR (cm⁻¹, ATR) 2873 (C-H), 1738 (C=O), 1653 (N-H), 1532 (N-H), 1452 (C-H), 1352 (S=O), 1174 (S=O), 1097 (C-O); ¹H RMN δ_H(300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 8,18 (s, 1 H, HC(O)NH-), 7,79 (d, J = 8,4, 2H, -CH_A- C-S), 7,35 (d, J = 8,7, 2H, -CH_A-), 6,78 (s, 1 H, -NH), 6,55 (s, 1 H, -NH), 4,55 (m, 2H, -NHCH(CH₃)-), 4,30 (m, 2H, -COOCH₂-), 4,13 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-), 3,61 (m, 12H, -(CH₂CH₂O)₃-), 2,44 (s, 3H, -CH₃), 1,42 (m, 6H, -CH(CH₃)-); ¹³C RMN δ_C(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 17,9 (1C, CHCH₃), 18,2 (1C, CHCH₃), 21,7 (1C, CCH₃), 47,2 (1C, O(C=O)HNCH), 48,1 (1C, HNHC(C=O)), 64,5 (1C, OCH₂), 68,7 (2C, OCH₂), 69,3 (1C, OCH₂), 70,6 (4C, OCH₂), 128,0 (2C, CHCCH), 129,9 (2C, CHCCH), 133,1 (1C, CCH₃), 144,9 (1C, CHCCH), 161,0 (1C, H(C=O)NH), 172,6 (1C, CH(C=O)NH), 173,2 (1C, CH(C=O)O); MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calc 541,2; obtenida 541,2.

1.1.5. Síntesis de (R)-2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil-2-((S)-2-formamido-propanamido)propanoato (S5)

55 Se disolvió el compuesto S4 (5,550 g, 1,06 mmol) en 40 ml de EtOH absoluto. Se añadió azida de sodio (0,38 g, 5,9 mmol), y se calentó la mezcla a reflujo durante la noche. Una vez enfriados hasta la temperatura ambiente, se separaron los sólidos por filtración y se secó el filtrado al vacío. Se purificó el producto en bruto usando cromatografía en columna (SiO₂, 0,060-0,200 mm; MeOH al 4 %/CH₂Cl₂ como eluyente), proporcionando S5 en forma de un aceite naranja pálido (0,32 g, 0,82 mmol, 78 %); R_f = 0,4 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂).

60 FT-IR (cm⁻¹, ATR) 3309 (N-H), 2875 (C-H), 2105 (N₃), 1737 (C=O), 1651 (N-H), 1529 (N-H), 1453 (C-H), 1133 (C-O); ¹H RMN δ_H(300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 8,20 (s, 1 H, HC(O)NH-), 6,84 (s, 1 H, -NH), 6,60 (s, 1 H, -NH), 4,60 (m, 2H, NHCH(CH₃)), 4,26 (m, 2H, -C(O)OCH₂-), 3,68 (m, 12H, -(CH₂CH₂O)₃-), 3,40 (m, 2H, N₃CH₂-), 1,42 (m, 6H, -CH(CH₃)-); ¹³C RMN δ_C(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 17,9 (1C, CH₃), 18,2 (1C, CH₃), 47,4 (1C, CH₂N₃), 48,4 (1C, H(C=O)HNCH), 50,7 (1C, HNCH(CH₃)C=O), 69,0 (1C, CH₂CH₂O), 70,1 (1C, OCH₂CH₂), 70,6 (2C, OCH₂), 70,7 (2C, OCH₂), 161,4 (1C, H(C=O)NH), 172,7 (1C, CH(C=O)NH), 172,9 (1C, CH(C=O)O); MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ calc 412,2; obtenida 412,2.

1.1.6. Síntesis de (R)-2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etil-2-((S)-2-isocyanopropanamido)propanoato (1)

Se disolvieron el compuesto S5 (221 mg, 0,57 mmol) y *N*-metilmorfolina (0,24 ml, 2,27 mmol) en 150 ml CH₂Cl₂ recién destilado y se enfrió hasta -40 °C (baño de acetona seco) bajo una atmósfera de argón. Se añadió una solución de difosgeno (0,048 ml, 0,398 mmol) en 10 ml de CH₂Cl₂ recién destilado gota a gota bajo argón durante 1 h. Mientras se añadía el difosgeno, la mezcla se agitó y se mantuvo estrictamente a -40 °C. Una vez que la mezcla comenzó a ponerse amarilla, se inactivó la reacción rápidamente con un exceso de bicarbonato de sodio (5 g). Se agitó la mezcla inactivada durante 5 minutos a -40 °C. Se pasó la mezcla de reacción a través de un lecho corto de columna de sílice (SiO₂, 0,060-0,200 mm). Se llenó el lecho corto con CH₂Cl₂, pero el compuesto deseado se eluyó con CH₂Cl₂/acetonitrilo (3:1), proporcionando 1 en forma de un aceite amarillo pálido (48,1 mg, 0,48 mmol, 27 %); R_f = 0,5 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂).

FT-IR (cm⁻¹, ATR) 3318 (N-H), 2875 (C-H), 2142 (C≡N), 2105 (N₃), 1744 (C=O), 1540 (N-H), 1453 (C-H), 1123 (C-O); ¹H RMN δ_H(300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 7,00 (bd, 1H, -NH-), 4,59 (m, 1 H, -NHCH(CH₃)C(O)O-), 4,32 (m, 3H, (-C(O)OCH₂CH₂O-), -C≡NCH(CH₃)C(O)NH-), 3,67 (m, 12H, -(OCH₂CH₂)₃), 3,39 (m, 2H, N₃CH₂-), 1,65 (d, J = 7,2, 3H, C≡NCH(CH₃)C(O)-), 1,48 (d, J = 7,2, 3H, C≡NCH(CH₃)C(O)-); ¹³C RMN δ_C(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 170,69 (1C, CH(CH₃)C(O)OCH₂), 165,72 (1C, CH(CH₃)C(O)NH), 70,69, 70,65, 70,61, 70,56, 70,02, 68,81 (1C, CH₂CH₂O), 50,66 (1C, CH₂N₃), 48,56 (C≡NCH), 19,66, 18,04 (1C, CH(CH₃)CO); MS (ESI) m/z [M+Na]⁺ (C₁₅H₂₅N₅O₆Na), calc 394,17; obtenida 394,1.

(2.1) Preparación del segundo comonomero

El segundo comonomero, que no está injertado con un grupo enlazador, se sintetizó de acuerdo con el esquema de la Figura 3.

2.1.1 Síntesis de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-2-aminopropanoato (S6)

Se añadieron trietilenglicolmetoxi (25 ml, 156,21 mmol), L-alanina (21,85 g, 245,25 mmol), ácido *p*-toluenosulfónico (32,69 g, 171,83 mmol) y 250 ml de tolueno en un matraz de fondo redondo. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo a 126 °C durante 4 h. Se separó por filtración un precipitado sólido y se evaporó el disolvente a presión reducida. A continuación, se disolvió el producto con 300 ml de cloroformo, y se extrajo la capa orgánica tres veces con NaHCO₃ (saturado). A continuación, se extrajo la capa acuosa dos veces con cloroformo. Se secaron las capas orgánicas con Na₂SO₄, y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose 22,69 g de S6 con un rendimiento del 62 %.

2.1.2 Síntesis de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-2-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoato (S7)

Se mezclaron entre sí Boc-D-Ala-OH (18,25 g, 96,44 mmol), DMAP (0,1 g, 0,8 mmol), DiPEA (1,7 ml, 9,64 mmol), HoBt (14,77 g, 96,44 mmol), DCC (21,89 g, 106,08 mmol), S6 (22,69 g, 96,44 mmol) y 250 ml de CH₂Cl₂, se enfrió en un baño de hielo hasta 0 °C y se agitó durante 3 horas. Tras ello, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. Se separó el sólido por filtración, se disolvió el producto con 200 ml de cloroformo y se extrajo la solución tres veces con ácido cítrico. Se lavó la capa de agua con cloroformo (1 x 200 ml). Se lavó la capa orgánica dos veces con solución saturada de NaHCO₃, y se extrajo la capa acuosa con cloroformo dos veces más. Se combinaron las capas orgánicas, se secaron con Na₂SO₄, y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se usó cromatografía en columna (MeOH al 2 % en CH₂Cl₂) para purificar el producto en bruto, obteniéndose 20,4 g de S7 con un rendimiento del 52 %. R_f = 0,53 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂) ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6,77 (s, 1 H, -NHCH-); 5,09 (s, 1H, -NHCH-); 4,60 (q, 1 H, -NHCH(CH₃)-); 4,31-4,28 (m, 3H, -C(O)OCH₂CH₂O-, -CH(CH₃)COO-); 3,70-3,56 (m, 10H, -C(O)OCH₂CH₂O(CH₂CH₂O)₂-); 3,38 (s, 1 H, -OCH₃); 1,46 (s, 9H, -OC(CH₃)₃); 1,41 (d, 3H, -NHCH(CH₃)-); 1,38 (d, 3H, -NHCH(CH₃)-)

Se disolvió S7 (13,15 g, 32,35 mmol) en 20 ml de acetato de etilo y se trató con 20 ml de HCl 4 M en dioxano. Se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras comprobar mediante TLC con el compuesto de partida, se añadieron otros 20 ml de HCl 4 M en dioxano, y se agitó adicionalmente la solución durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el *t*-BuOH residual mediante la adición de 20 ml de DCM y se eliminó a presión reducida. Este procedimiento se repitió tres veces.

2.1.3 Síntesis de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-2-formamidopropanoato (S8)

Se disolvieron la sal de HCl de S7 (13,15 g, 32,33 mmol) y formiato de sodio (8,76 g, 129,33 mmol) en 250 ml de Etilformiato. Se hirvió la mezcla de reacción durante 14 h a 66 °C. Se separó por filtración un precipitado y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se usó cromatografía en columna (MeOH al 4 % en CH₂Cl₂) para purificar el producto en bruto, obteniéndose 6,04 g de S8 con un rendimiento del 56 %.

R_f = 0,54 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂) ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8,23 (s, 1 H, HC(O)NH-); 6,94 (d, 1 H, -NHCH-); 6,79 (d, 1 H, -NHCH-); 4,57 (m, 2 H, NHCH(CH₃)-, -NHCH(CH₃)-); 4,26 (m, 2H, -C(O)OCH₂-); 3,67-3,54 (m, 10H, -C(O)OCH₂CH₂O(CH₂CH₂O)₃-); 3,43 (s, 3H, -OCH₃); 1,45 (t, 6H, -NHCH(CH₃)-, -NHCH(CH₃)-)

2.1.4 Síntesis de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil-2-isocianopropanoato (2)

Se desgasificó S8 (6,04 g, 18,06 mmol) durante 1 hora con N₂. A continuación, se disolvió NMM (5 ml, 45,15 mmol) con CH₂Cl₂ recién destilado (50 ml) y se añadió a la solución. Se enfrió la mezcla de reacción hasta -40 °C (hielo seco/isopropanol). Se añadió gota a gota durante 2 h una solución de difosgeno (1,52 ml, 12,64 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml). Se agitó la mezcla de reacción hasta que se volvió de color naranja amarillento, y se inactivó con NaHCO₃ (3 g). Se usó cromatografía en columna (ACN/CH₂Cl₂ 1:2) para purificar el producto en bruto, obteniéndose 3,34 g de 2 con un rendimiento del 51 %.

R_f = 0,50 (MeOH al 10 %/CH₂Cl₂). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7,00 (d, 1 H, -NH-); 4,58 (m, 1 H, C≡NCH(CH₃)C(O)NH-); 4,28 (m, 2H, -C(O)OCH₂CH₂O-); 4,26 (m, 1H, -NHCH(CH₃)C(O)O-); 3,74-3,53 (m, 10H, -OCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₃OCH₃); 3,41 (s, 3H, -OCH₃); 1,67 (d, 3H, C≡NCH(CH₃)C(O)-); 1,49 (d, 3H, -NHCH(CH₃)C(O)O-).

(3) Polimerización

Se disolvieron el Compuesto 2 (por ejemplo, 100 eq) y el Compuesto 1 (1 eq) en 2 ml de tolueno destilado. La solución madre del catalizador de 1 mM se preparó disolviendo 39 mg de Ni(Cl₂O₄)₂ · 6 H₂O en 10 ml de etanol absoluto y 90 ml de tolueno. Se pipeteó a los monómeros un volumen igual a un mol de monómero total x 10⁻⁴. La mezcla se diluyó con tolueno destilado, obteniéndose una concentración final de 25 mg/ml de monómero. Se agitó la mezcla durante 72 h a temperatura ambiente en un matraz dotado de un tubo de secado de CaCl₂. El polímero se aisló por precipitación en diisopropiléter. Se repitió este ciclo de precipitación tres veces, obteniéndose rendimientos que varían de un rendimiento del 44 al 92 %. Los polímeros se analizaron midiendo la viscosidad intrínseca, la reología (G') y el dicroísmo circular, y se visualizaron por precipitación gota a gota desde la solución sobre mica mediante AFM.

(4) Injerto de unidad espaciadora/unidad de adhesión celular en el copolímero

Se disolvió un péptido (GRGDS) en tampón de borato a pH 8,4 hasta una concentración final de 2 mg/ml. Se añadió una unidad espaciadora representada por la fórmula (III) (BCN-NHS) en una proporción molar de 1:1 a la solución de péptido y se mezcló a 300 rpm a 18 °C durante una hora antes de congelarse en alícuotas de 100 ul. Se obtuvo BCN-GRGDS representado por la fórmula (V). MS calc. [C₃₉H₆₂N₁₀O₁₅]: 910,4; obtenida: 911,5.

Se disolvió el poliisocianuro (PIC) obtenido en la etapa anterior en ACN a 2 mg/ml. A esta solución de PIC, se añadió el volumen apropiado de BCN-GRGDS basado en el equivalente molar de comonómero de azida en la cadena principal de poliisocianuro. Se dejó agitar la mezcla durante 72 horas a 4 °C. Se purificó el péptido PIC por precipitación en éter diisopropílico. Se decantó el precipitante y se volvió a disolver el péptido de poliisocianuro y precipitó de DCM en éter diisopropílico.

(5) Preparación del hidrogel del copolímero

A partir de este punto, se tomaron precauciones para garantizar que el poliisocianopéptido permaneciera estéril. Se pulverizó todo el equipo con etanol antes de su uso. Se pesó el conjugado de PIC-péptido directamente en un tubo de centrifugación estéril. Se esterilizaron más los tubos exponiéndolos a radiación UV durante un período de 5 minutos. Se cubrió el PIC-péptido con medio de cultivo celular estéril para obtener la dilución final del polímero en medio de 3,2 mg/ml y se dejó hinchar durante 24 horas a 4 °C. Después de 24 horas, se obtuvo una sustancia similar a un gel hinchado en la parte inferior del tubo de centrifugación. Se agitó el conjugado de PIC-péptido hinchado durante 72 horas a 4 °C, tras lo que se obtuvo una solución uniforme. La solución mostró una transición nítida en la viscosidad por encima de la temperatura crítica.

Los conjugados de PIC-péptido en medio permanecieron estables hasta 20 meses a 4-7 °C o durante períodos más largos cuando se congelaron.

Para la preparación de construcciones de prevascularización de rigidez y concentración apropiadas, se diluyó la solución madre de gel a 3,2 mg/ml con una cantidad apropiada de medio para alcanzar la concentración final deseada de polímero, que fue de 2,0 mg/ml.

(6) Preparación del hidrogel que comprende las células

(6-1) Preparación del medio celular que comprende las células

Se expandieron HUVEC (ACTT, PCS-100-010, EE.UU.) en medio de crecimiento endotelial (EGM-2, Lonza, Walkersville, EE.UU.), completamente suplementado con suero bovino fetal, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, hEGF de ácido ascórbico y GA-1000. Se expandieron HbSMC (ScienCell, 4310, Carlsbad, EE.UU.) en medio de células del músculo liso (SMCM, ScienCell, Carlsbad, EE.UU.) con los suplementos incluyendo suero bovino fetal, suplemento de crecimiento de células del músculo liso y penicilina/estreptomicina. Estos dos tipos de células se expandieron en matraz T75 (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) en CO₂ al 5 % a 37 °C. El medio se cambió

tres veces a la semana y las células se cosecharon con tratamiento con tripsina. Se usaron las HbSMC del paso 8 y las HUVEC del paso 9 en todos los experimentos.

(6-2) Mezcla del hidrogel y del medio celular que comprende las células

Para la producción de las construcciones de prevascularización, se bajó la temperatura de la solución del conjugado de PIC-péptido termorreactivado obtenido en la etapa (b) a 0 °C para inducir una transición de gel a líquido. Posteriormente, se mezcló una alícuota del gel licuado con la suspensión de células que contenía HUVEC y HbSMC como se obtuvo en la etapa (6-1) para crear la concentración deseada de células de 500.000 células/ml. Seguidamente, se transmitieron alícuotas de 200 µl de estas suspensiones de células de gel a inserciones de 24 pocillos (tamaño de poro de la membrana de 0,2 µm) y se colocaron durante 30 minutos a 37 °C para garantizar la solidificación del gel.

(7) Cultivo de las células para formar un sistema prevascular

Se observó que las células se unieron al hidrogel en el plazo de 3 días y se observó la vascularización en el plazo de 7 días.

Se cultivaron las construcciones de prevascularización producidas en una mezcla adecuada de medio en CO₂ al 5 % a 37 °C durante 14 días. Se siguió el progreso de las construcciones de vascularización.

Experimento comparativo 2 (baja concentración de polímero)

Se repitió el Ejemplo 1 a excepción de que la concentración de polímero en la etapa (5) fue de 1,0 mg/ml en lugar de 2,0 mg/ml.

En la etapa (7), tras la solidificación del gel, se hundieron las células gradualmente hasta el fondo de las inserciones de 24 pocillos. Se observaron algunas agrupaciones de brotes de las células; sin embargo, las estructuras formadas eran de mala calidad. Los experimentos se terminaron después de 3 días. No se formó ningún sistema prevascular.

Experimento comparativo 3 (alta concentración de polímero)

Se repitió el Ejemplo 1 a excepción de que la concentración de polímero en la etapa (5) fue de 3,2 mg/ml en lugar de 2,0 mg/ml.

En la etapa (7), se observó el progreso de las construcciones de vascularización, aunque muy lentamente. Las células permanecieron suspendidas en las inserciones de 24 pocillos. Las células permanecían de forma esférica desde el día 1 al 7 tras lo que se observó el inicio del brote. El experimento se terminó después de 14 días. Las estructuras celulares formadas parecían ser de mala calidad y no se formó ningún sistema prevascular. Parecía que el hidrogel era demasiado rígido para que estas células en particular se movieran/crecieran dentro del gel de manera eficaz.

A partir de la comparación del Ejemplo 1 y los experimentos comparativos 2 y 3, se puede concluir que la concentración del copolímero en el hidrogel es importante para la formación de las construcciones de vascularización. Un intervalo de concentración adecuado es de 1,2-3,0 mg/ml.

Experimento comparativo 4 (demasiado poco GRGDS)

Se repitió el Ejemplo 1 excepto que la proporción entre el compuesto 1 y el compuesto 2 y en la etapa (3) fue de 1:550 en lugar de 1:100.

En la etapa (7), tras la solidificación del gel, las células permanecieron esféricas durante un período prolongado, se observó un brote limitado y la prevascularización no se completó después de 21 días. No se formó ningún sistema prevascular.

Experimento comparativo 5 (demasiado GRGDS)

Se repitió el Ejemplo 1 excepto que la proporción entre el compuesto 2 y el compuesto 1 y en la etapa (3) fue de 1:25 en lugar de 1:100.

En la etapa (7), tras la solidificación del gel, se observó un crecimiento celular no controlado y no dirigido, y las estructuras formadas no representaron un sistema prevascular.

Experimento comparativo 6 (demasiado GRGDS)

Se repitió el Ejemplo 1 excepto que la proporción entre el compuesto 2 y el compuesto 1 en la etapa (3) fue de 1:10 en lugar de 1:100.

En la etapa (5), tras cubrirse el PIC-péptido con medio de cultivo celular estéril, no se obtuvo ninguna sustancia similar a un gel, y se terminó el experimento. A partir de la comparación del Ejemplo 1 y los experimentos comparativos 4 y 5, puede concluirse que la proporción del comonomero injertado con GRGDS es importante para la formación de las construcciones de vascularización. La proporción adecuada es de 1:550-1:50.

Experimento 7

Se midió el módulo elástico del hidrogel obtenido en la etapa 5 del Ejemplo 1 de la siguiente manera:

Parte instrumental: Las mediciones reológicas se realizaron usando un reómetro Ares G2 de TA Instruments en una configuración de Couette de ~20 ml con control de temperatura usando un elemento peltier. Las muestras se prepararon mezclando la cantidad apropiada de polímero en agua desmineralizada (20 ml) y agitando con formación de vórtice la mezcla a lo largo del tiempo (al menos 24 horas) hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se prepararon soluciones de PIC en condiciones refrigeradas (4 °C) para evitar la formación temprana del gel. Las mediciones en la pauta de respuesta lineal se llevaron a cabo al 4 % de tensión a diferentes frecuencias entre 0,5 y 5 Hz. Los datos representados en el manuscrito se registraron a 1 Hz. Las exploraciones de temperatura se registraron a una velocidad de calentamiento de 2 °C min⁻¹. Las mediciones en medios biológicamente relevantes se realizaron en una placa paralela de aluminio de 40 mm Discovery HR-1 de TA Instruments, ajustada a un espacio de 750 um y 1 ml de muestra. La temperatura se controló usando un elemento peltier y protector de evaporación. Las muestras de PIC se prepararon mezclando la cantidad apropiada de polímero en DMEM y agitando continuamente de manera regular a 4 °C (al menos 48 horas) hasta que se obtuvo una solución homogénea. Las soluciones de PIC se usaron directamente o se congelaron hasta que se pudieron realizar mediciones para evitar los efectos de memoria de las muestras. El matrigel se usó tal como vino del proveedor, y los geles de fibrina se prepararon disolviendo fibrinógeno en DMEM, que contenía FBS, y se dejó gelificar durante 2 horas a 37 °C antes de la medición. Las mediciones en la pauta de respuesta lineal se realizaron a una tensión del 2 % a diferentes frecuencias entre 1 Hz. Las exploraciones de temperatura se registraron a una velocidad de calentamiento o enfriamiento de 2 °C min⁻¹.

El módulo elástico resultó ser esencialmente constante en el intervalo de temperaturas de 5 a 15 °C, y se midió en torno a 1 Pa. El módulo elástico aumentó hasta aproximadamente 100 Pa a 23 °C. El módulo elástico aumentó a aproximadamente 500 Pa a 35 °C.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de fabricación de un copoliisocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol), proceso que comprende las etapas de:

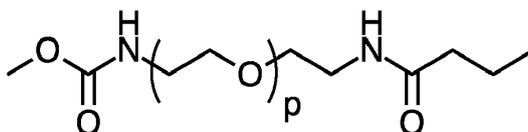
i) copolimerizar

- un primer comonómero de un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) injertado con un grupo enlazador y
- un segundo comonómero de un isocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) no injertado,

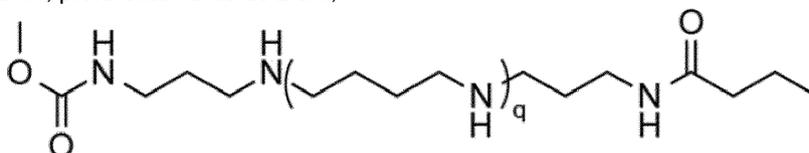
en el que la proporción molar entre el primer comonómero y el segundo comonómero es de 1:500 y 1:30 y ii) añadir un reactante de una unidad espaciadora y un factor de adhesión celular al copolímero obtenido en la etapa i), en el que la unidad espaciadora se representa por la fórmula general A-L-B,

en el que el grupo enlazador y el grupo A se seleccionan para que reaccionen y formen un primer acoplamiento, y el factor de adhesión celular y el grupo B se seleccionan para que reaccionen y formen un segundo acoplamiento, en el que el primer acoplamiento y el segundo acoplamiento se seleccionan independientemente del grupo que consiste en acoplamiento de alquino-azida, acoplamiento de dibenzociclooctina-azida, acoplamientos de azida a base de oxanorbomadieno, acoplamiento de vinilsulfona-tiol, acoplamiento de maleimida-tiol, acoplamiento de metilmetacrilato-tiol, acoplamiento de éter, acoplamiento de tioéter, acoplamiento de biotina-estreptavidina, amina-ácido carboxílico que da lugar a enlaces amida, acoplamiento de alcohol-ácido carboxílico que da lugar a enlaces éster y acoplamiento de éster de NHS (éster de N-hidroxisuccinimida)-amina y en el que el grupo L es un segmento de cadena lineal que tiene 10-60 enlaces entre los átomos seleccionados de C, N, O y S en la cadena principal.

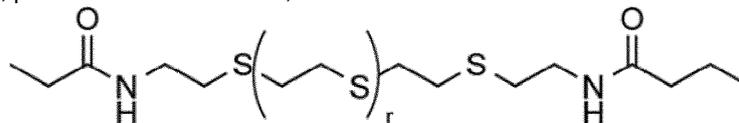
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo L se selecciona de:



en la que p es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5,



en la que q es de 1 a 9, preferentemente de 2 a 5,

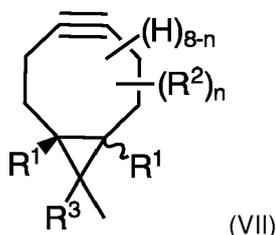


en la que r es de 1 a 10, preferentemente de 2 a 5.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el primer acoplamiento es acoplamiento de alquino-azida.

4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo acoplamiento es acoplamiento de éster de NHS (éster de N-hidroxisuccinimida)-amina o acoplamiento de maleimida-amina.

5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo A se representa por la fórmula (VII):



en la que:

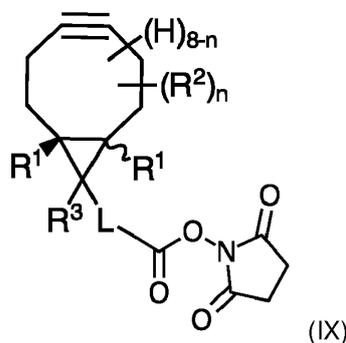
n es de 0 a 8;

R³ se selecciona del grupo que consiste en [(L)_p-Q], hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁-C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆-C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇-C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇-C₂₄, estando los grupos alquilo opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, en el que los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos alquenilo C₂-C₁₂, grupos alquinilo C₂-C₁₂, grupos cicloalquilo C₃-C₁₂, grupos alcoxi C₁-C₁₂, grupos alqueniloxi C₂-C₁₂, grupos alquiniloxi C₂-C₁₂, grupos cicloalquiloxi C₃-C₁₂, halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, en el que los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi están opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi están opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, estando los grupos sililo representados por la fórmula (R⁴)₃Si-, en la que R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos alquenilo C₂-C₁₂, grupos alquinilo C₂-C₁₂, grupos cicloalquilo C₃-C₁₂, grupos alcoxi C₁-C₁₂, grupos alqueniloxi C₂-C₁₂, grupos alquiniloxi C₂-C₁₂ y grupos cicloalquiloxi C₃-C₁₂, en el que los grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos cicloalquilo, grupos alcoxi, grupos alqueniloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi están opcionalmente sustituidos, los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi están opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S;

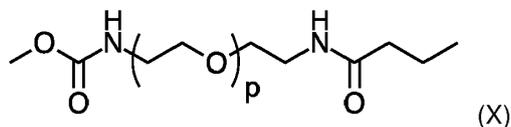
R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C₁-C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆-C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇-C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇-C₂₄; y

R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, -OR⁶, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁶, grupos alquilo C₁-C₁₂, grupos arilo C₁-C₁₂, grupos alquilarilo C₁-C₁₂ y grupos arilalquilo C₁-C₁₂, en los que R⁶ es como se ha definido anteriormente, y en los que los grupos alquilo, grupos arilo, grupos alquilarilo y grupos arilalquilo están opcionalmente sustituidos.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la unidad espaciadora se representa por la fórmula (IX):

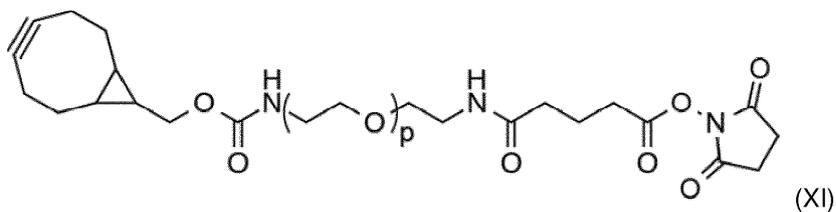


en la que R1, R2, R3 y n son como se han definido anteriormente y L se selecciona del grupo representado por la fórmula (X):



en la que p es de 2 a 5.

7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la unidad espaciadora se representa por la fórmula (XI):



en la que p es de 2 a 5.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el factor de adhesión celular se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos tales como RGD y GRGDS.
- 5 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la media del número de las unidades de alquilenglicol del primer comonomero y del segundo comonomero es de al menos 3 y, como máximo, de 4.
- 10 10. El copoliisocianopéptido con funcionalidad de oligo(alquilenglicol) que se puede obtener mediante el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 11 11. Un cultivo celular que comprende un hidrogel, que comprende el copoliisocianopéptido de la reivindicación 10 a una concentración de 1,2-3,0 mg/ml, y en el que el copoliisocianopéptido tiene una temperatura de gelificación de 18 a 40 °C.
- 15 12. El cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cultivo celular comprende al menos una de entre células endoteliales y células del músculo liso.
13. Un proceso de cultivo de células que comprende las etapas de:
- 20 a) proporcionar el cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 11;
b) añadir las células al cultivo celular a una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación del hidrogel;
y
c) cultivar las células.
- 25 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las células son células endoteliales y células musculares.
15. Uso del cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 12 para fabricar un sistema prevascular.

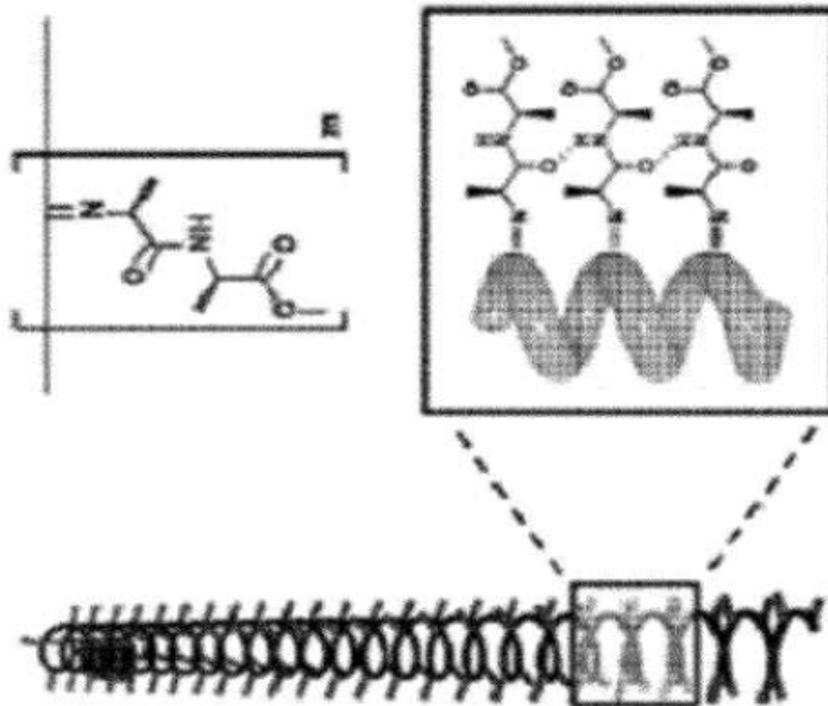
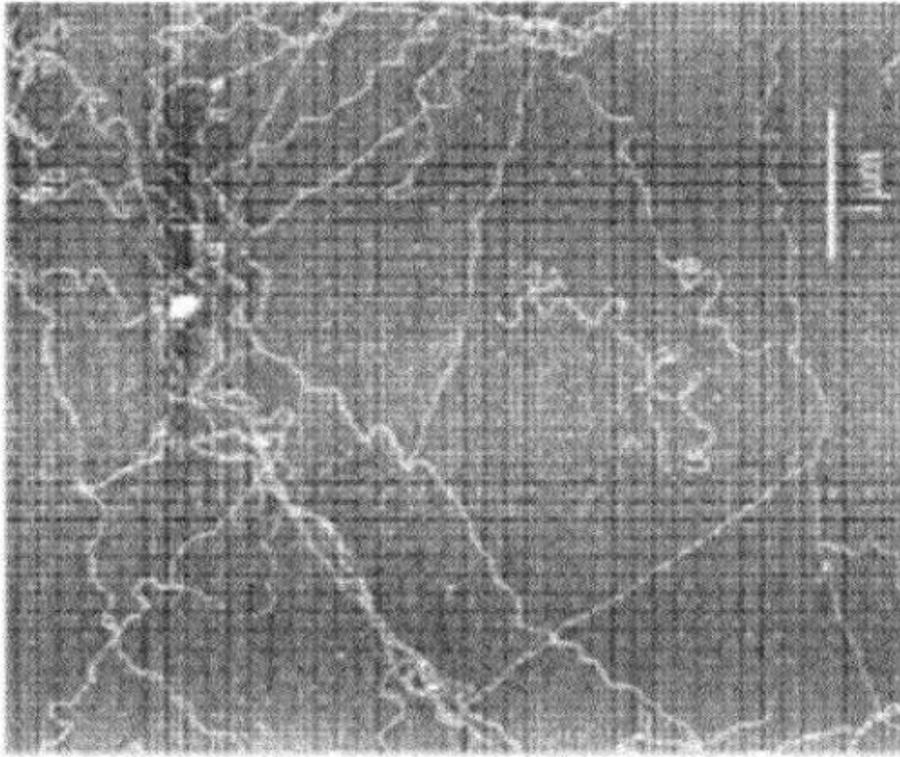


Figura 1

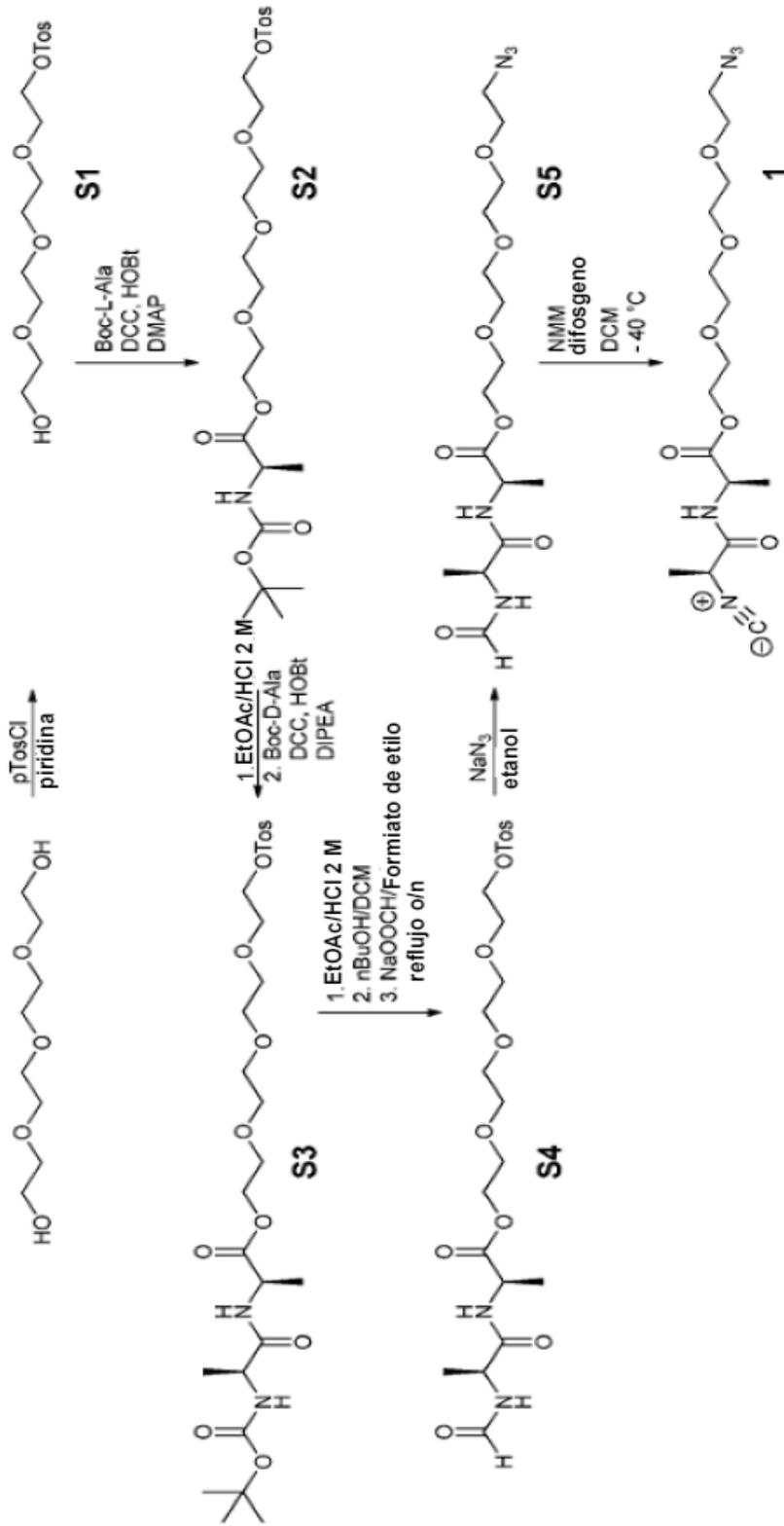


Figura 2

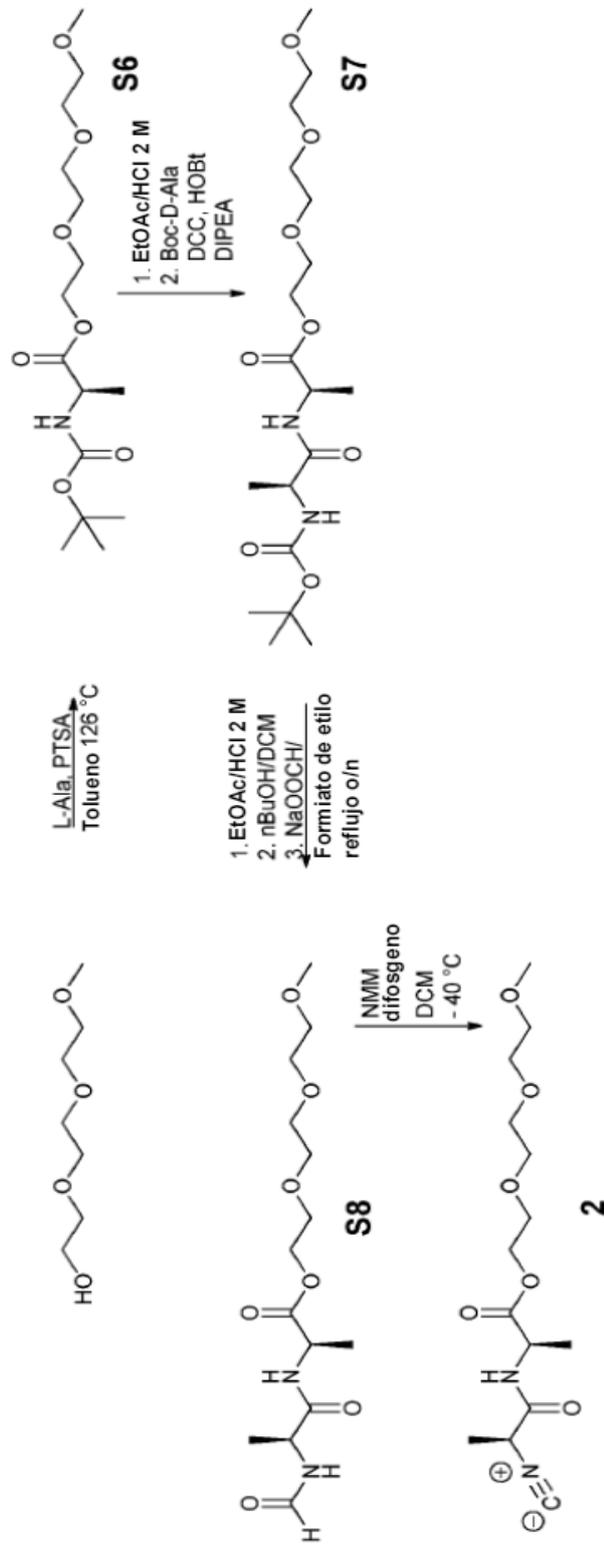


Figura 3