

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 062**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2013 PCT/DE2013/100327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14040591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013 E 13783244 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2895198**

54 Título: **Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, para aplicaciones biotecnológicas**

30 Prioridad:

13.09.2012 DE 102012108560

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

19.11.2018

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (50.0%)
Helmholtzstrasse 10
01069 Dresden, DE y
LEIBNIZ-INSTITUT FÜR POLYMERFORSCHUNG
DRESDEN E.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WIEDUWILD, ROBERT;
ZHANG, YIXIN;
WERNER, CARSTEN;
TSURKAN, MIKHAIL y
FREUDENBERG, UWE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 690 062 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

Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, para aplicaciones biotecnológicas

5 La invención se refiere a una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, para aplicaciones biotecnológicas. Además de ello, la invención se refiere a bolas de matriz de hidrogel formadas a partir de esta matriz de hidrogel, así como a una asociación de la matriz de hidrogel o de las bolas de matriz de hidrogel con células embutidas en ellas. Otros aspectos de la invención se refieren a una cápsula para la liberación preestablecida de reactivos terapéuticos, a una composición a base de la matriz de hidrogel, a productos químicos terapéuticos y a reactivos, así como a un sistema híbrido a base de una matriz de hidrogel no esférica y a base de bolas de matriz de hidrogel.

10 El diseño y la síntesis de sistemas macromoleculares auto-organizantes para aplicaciones en el sector de la "Ciencia de la Vida" y más allá es de gran interés para la química, ciencias de los materiales y biomedicina. Diferentes hidrogeles han despertado grandes esperanzas en una aplicabilidad para el sector biomédico tal como, por ejemplo, en el sector del transporte de sustancias activas y del cultivo de tejidos. Una serie de matrices poliméricas que proceden de fuentes vivas tales como, por ejemplo, matrigel e hidrogeles de colágeno, se han mostrado superiores en relación con su elevada biocompatibilidad en el cultivo celular a todos los polímeros sintéticos existentes. No obstante, biomateriales de este tipo de fuentes vivas no tienen composición química definida alguna, lo cual impide su amplia aplicación en biomedicina.

15 Por otra parte, un sistema de matrices poliméricas con una elevada durabilidad conduce a una gran pluralidad de estructuras "hechas a medida" que son adecuadas para diferentes aplicaciones. De este modo, puede influirse sobre muchas propiedades del sistema. A modo de ejemplo, en este punto se mencionan diferentes propiedades físicas y bioquímicas para el cultivo de diferentes tipos de células o diferentes tiempos de gelificación y velocidades de degradación para una implantación en diferentes puntos enfermos. En última instancia, un sistema de hidrogel sintético ideal no debería estar solo en condiciones de imitar las funciones biológicas de diferentes matrices extracelulares (ECM), sino también de ofrecer la posibilidad de controlar y optimizar estas funciones. La configuración de materiales adaptables de este tipo para aplicaciones biomédicas representa un gran reto. En particular, esto es válido para investigaciones biológicas sobre la composición y las funciones de las distintas matrices extracelulares (ECM), para investigaciones de polímeros y de ciencias de los materiales con la finalidad de la reconstrucción o bien para la construcción de este tipo de sistemas, así como para investigaciones químicas sobre el control de los procesos.

20 Polímeros sintéticos tales como polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico), poli(N-isopropilacrilamida), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) y copolímeros de estos y otros polímeros proporcionan muchos sistemas útiles para el empleo en el sector biomédico. Por una parte, los polímeros se han desarrollado como estructuras químicas con una interacción mínima con sistemas biológicos. Por ejemplo, a menudo no son reconocidos por el sistema inmunológico como antígenos, con lo cual se evitan complicaciones de inmunogenicidad. Sin embargo, por otra parte, esta ventaja de la carencia de función conduce también a una similitud deficiente de estos polímeros con importantes funciones del sistema vivo, ante todo en relación con la dinámica y la señalización en la matriz extracelular (ECM).

30 La conjugación de macromoléculas biológicas y polímeros sintéticos representa una vía interesante con el fin de desarrollar los sistemas de hidrogel arriba mencionados. Las macromoléculas biológicas de elección pueden ser de origen sintético tales como, por ejemplo, péptidos procedentes de la síntesis de péptidos en fase sólida y ADN procedente de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, o de origen biológico con una composición química bien definida. Es muy importante que las macromoléculas biológicas no presenten propiedades tóxicas ni una inmunogenicidad baja. Se pueden utilizar tanto métodos covalentes como no covalentes para la reticulación, en donde los métodos no covalentes, debido a la posibilidad de preparar diferentes geles, son de particular interés en la investigación. Además de ello, sistemas no covalentes, auto-organizantes, harán posible embutir células en un sistema de matriz, sin que esto vaya ligado con reacciones químicas.

35 La incorporación de moléculas de polisacáridos en materiales biohíbridos se aplica de manera creciente con el fin de alcanzar funciones de la ECM naturales en materiales sintéticos o semi-sintéticos. En particular, se utilizaron ácido hialurónico y heparina en una serie de conceptos de diseño en virtud de sus actividades biológicas, así como de su disponibilidad biológica. Heparina, un glicosaminoglicano (GAG) con la densidad de carga aniónica más alta que se manifiesta en un biopolímero, se utiliza en virtud de su afinidad por una pluralidad de importantes moléculas de señalización. Mientras que la heparina es un polímero complejo que puede ser extraído de una fuente biológica y correspondientes muestras se diferencian entre sí en relación con la distribución en masa, con la composición de monómeros de azúcares, así como con el grado de sulfatación, sulfato de dextrano y sulfato de ciclodextrina son oligosacáridos más sencillos. Además, algunos compuestos de sulfato de ciclodextrina pueden obtenerse en forma de compuestos químicos puros.

El desarrollo de hidrogel biocompatible representa un enfoque interesante para investigaciones, tanto en el campo de las ciencias de los materiales como en el campo de la biomedicina. En los últimos diez años se han desarrollado muchos hidrogeles no covalentes, auto-organizantes, o hidrogeles con contenido en oligosacáridos. En **Kiicks et al.** (N. Yamaguchi, B.-S. Chae, L. Zhang, K. L. Kiick, E. M. Furst, *Biomacromolecules* 2005, 6, 1931-1940; N. Yamaguchi, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* 2005, 6, 1921-1930; L. Zhang, E. M. Furst, K. L. Kiick, *Journal of Controlled Release* 2006, 114, 130-142; K. L. Kiick, *Soft Matter* 2008, 4, 29-37; F. J. Spinelli, K. L. Kiick, E. M. Furst, *Biomaterials* 2008, 29, 1299-1306) se describen el uso de conjugado de heparina-PEG tipo estrella, es decir, de heparina acoplada a PEG tipo estrella de cuatro brazos (NMH) y el uso de conjugado de péptido-PEG tipo estrella, es decir, de derivados de péptidos naturales acoplados a PEG tipo estrella de cuatro brazos. Después de la mezcla de estos dos compuestos, a saber, heparina-PEG tipo estrella y péptido-PEG tipo estrella, se configura de manera no covalente un hidrogel. La capacidad de heparina con bajo peso molecular (LMWH) de unirse a múltiples participantes, se aprovechó para la disposición y para la entrega de factores de crecimiento u otros péptidos o bien proteínas de unión a heparina deseado a las matrices dispuestas de forma no covalente. Así, también se aprovechó la disposición de estos hidrogeles con el factor de crecimiento de unión a heparina dimérico VEGF (VEGF = siglas inglesas de factor de crecimiento endotelial vascular). Un resultado interesante de las redes de hidrogel inducidas con un factor de crecimiento es la capacidad de una correspondiente erosión del gel inducida por el receptor. Reticulaciones de VEGF pueden competir selectivamente y disociarse en presencia de receptores de VEGF que controlan la proliferación y migración de células endoteliales vasculares.

En el caso del desarrollo y la síntesis de hidrogeles se aplicaron de manera creciente reacciones bio-ortogonales y reacciones de tiol-eno foto-inducidas. La denominada química de click posibilita reacciones muy selectivas y ortogonales que discurren con una elevada eficacia y bajo una serie de condiciones suaves. **Anseth et al.** (S. B. Anderson, C.-C. Lin, D. V. Kuntzler, K. S. Anseth, *Biomaterials* 2011, 32, 3564-3574) han introducido una estrategia de síntesis que funciona de manera segura, en la que precursores macromoleculares reaccionan por medio de una química de click con cobre, lo cual permite la encapsulación directa de células dentro de hidrogeles click. La suave reacción química entre tiol y vinilsulfona se utilizó también de manera intensa para la producción de diferentes hidrogeles. En los últimos tiempos, una sinergia de estas reacciones químicas y bioquímicas ha conducido al desarrollo y a la síntesis de una serie de sistemas de hidrogel multifuncionalizados.

En algunos trabajos de los autores de la invención se desarrolló un sistema modular de hidrogeles biohíbridos a base de heparina reticulada de forma covalente y PEG tipo estrella (A. Zieris, S. Prokoph, P. Welzel, M. Grimmer, K. Levental, W. Panyanuwat, U. Freudenberg, C. Werner, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2010, 21, 915-923; A. Zieris, S. Prokoph, K. R. Levental, P. B. Welzel, M. Grimmer, U. Freudenberg, C. Werner, *Biomaterials* 2010, 31, 7985-7994; U. Freudenberg, J.-U. Sommer, K. R. Levental, P. B. Welzel, A. Zieris, K. Chwalek, K. Schneider, S. Prokoph, M. Prewitz, R. Dockhorn, C. Werner, *Advanced Functional Materials* 2012, 22, 1391-1398; U. Freudenberg, A. Hermann, P. B. Welzel, K. Stirl, S. C. Schwarz, M. Grimmer, A. Zieris, W. Panyanuwat, S. Zschoche, D. Meinhold, *Biomaterials* 2009, 30, 5049-5060; M. V. Tsurkan, K. R. Levental, U. Freudenberg, C. Werner, *Chemical Communications* 2010, 46, 1141; K. Chwalek, K. R. Levental, M. V. Tsurkan, A. Zieris, U. Freudenberg, C. Werner, *Biomaterials* 2011, 32, 9649-9657; M. V. Tsurkan, K. Chwalek, K. R. Levental, U. Freudenberg, C. Werner, *Macromol Rapid Commun* 2010, 31, 1529-1533), en el que pueden variarse gradualmente propiedades de la red, mientras que los contenidos en heparina se mantienen constantes. Tal como se demostró, la anchura de malla, la expansión y los módulos de elasticidad se correlacionan bien con el grado de la reticulación del componente de gel. Además de ello, la transformación secundaria de heparina dentro de los geles biohíbridos permitió la unión covalente de péptidos RGD que inducen la adhesión celular. Los geles biohíbridos se emplearon con el fin de demostrar los efectos de señales mecánicas y biomoleculares sobre células nerviosas primarias y células madre neuronales. Los resultados demuestran la interacción específica para el tipo de célula de la emisión sinérgica de señales y el potencial de los materiales biohíbridos de estimular selectivamente la decisión aleatoria de las células. En los últimos tiempos, se combinó en algunos trabajos de los autores de la invención puntos de disociación, sensibles e insensibles a proteasas, para el control más amplio sobre las tasas de degradación de redes de hidrogel de PEG tipo estrella-heparina con elasticidad modulada ortogonal, presentación de péptidos RGD y entrega de VEGF. La disociación enzimática se aceleró masivamente cuando se aumentó la accesibilidad de los geles para proteasas por medio de disociaciones no enzimáticas de enlaces éster. Los efectos de la predisposición de degradación del gel se examinaron para el desarrollo tridimensional de células endoteliales humanas. Los geles con una degradación acelerada y una liberación de VEGF condujeron a un reforzamiento claro de la penetración de células endoteliales *in vitro*, al igual que de la densidad de los vasos sanguíneos en el ensayo de la membrana corioalantoides de gallinas (HET-CAM) *in vivo*. Por consiguiente, la combinación de puntos de disociación, sensibles e insensibles, a proteasas refuerza la degradación de materiales de gel de respuesta biológica de un modo que se aumenta la morfogénesis de las células endoteliales.

Hidrogeles de proteínas artificiales, que están constituidos por la interacción de dominios de leucina-cremallera tienen la capacidad de una auto-organización determinada por las secuencias de proteínas. **Tirrel et al.** (W. Shen, K. Zhang, J. A. Kornfield, D. A. Tirrell, *Nature materials* 2006, 5, 153-15) han desarrollado un hidrogel compuesto por los dominios de doble hélice. Investigaciones de las propiedades estructurales y dinámicas de los hidrogeles AC10A en sistemas cerrados dieron como resultado que estas cadenas de proteínas multidominio presentan una fuerte

tendencia a formar bucles intramoleculares. Esto conduce a una rápida erosión del gel. Por lo tanto, se mejoró el sistema, pudiendo confirmarse que la velocidad de erosión del hidrogel de proteínas puede ser adaptada aprovechando un reconocimiento molecular selectivo mediante un determinado número de agregaciones y mediante la discriminación de la orientación de dominios de proteínas de doble hélice. Los experimentos han demostrado que la interacción entre moléculas durante la auto-organización y la gelificación no funciona de una manera tan sencilla como un proceso de "llave-cerradura". Por el contrario, la dinámica y termodinámica del sistema completo determina las propiedades físicas y bioquímicas de las matrices poliméricas resultantes. Dado que parámetros físicos y químicos de este tipo no pueden ser examinados y predichos de manera sencilla en el sistema polimérico, por parte de algunos trabajos de los autores de la presente invención se aplicó un método de rastreo con el fin de encontrar un sistema óptimo auto-organizante de matrices mediante la síntesis de muchos péptidos diferentes y el examen de su relación estructura-función.

El reconocimiento entre los pares de bases de dos secuencias de ADN complementarias es probablemente la interacción entre biomoléculas mejor caracterizada y más ampliamente aplicada. Este reconocimiento de pares de bases es no solo el tema de una pluralidad de investigaciones genéticas y bioquímicas, sino también una herramienta creciente útil en las ciencias de los materiales. Por ejemplo, se desarrolló la técnica de Orgami de ADN muy prometedora para la construcción de nano-estructuras de forma y topología arbitraria. Mediante ligamiento auto-organizante de ADN y/o de ADN catalizado por enzimas se desarrollaron recientemente sistemas de hidrogel basados en ADN. Luo et al. (S. H. Um, J. B. Lee, N. Park, S. Y. Kwon, C. C. Umbach, D. Luo, Nature materials 2006, 5, 797-801) han informado sobre la construcción completa de un hidrogel a partir de ADN ramificado. Dado que el ADN es un componente esencial en biología, estos hidrogeles de ADN son biocompatibles, biológicamente degradables, de producción económica y pueden llevarse a las formas y tamaños deseados de una manera sencilla. Bajo condiciones fisiológicas pueden alcanzarse procesos de gelificación del ADN. Los procesos de envoltura de proteínas y células pueden llevarse a cabo *in situ*. Además, la determinación precisa de estos hidrogeles puede alcanzarse mediante la adaptación de las concentraciones iniciales y los tipos de monómeros de ADN ramificados. El resultado más importante consistía en que las matrices poliméricas que resultan de ello han mostrado estructuras altamente definidas en el intervalo de nanómetros, en buena concordancia con la previsión en relación con la estructura de doble hélice del ADN.

De manera desventajosa, el sistema de hidrogel que se basa en conjugados de péptido-PEG tipo estrella y conjugados de LMWH-PEG tipo estrella se ha manifestado muy blando, con lo cual es inadecuado para muchos procesos de construcción. Las secuencias peptídicas del péptido AT-III y del péptido HIP proceden en cada caso de las proteínas de unión a heparina antitrombina III (ATIII) y HIP (HIP = proteína de interacción de heparina/sulfato de heparano) que presentan en cada caso actividades biológicas por sí mismas. De manera similar, el factor de crecimiento dimérico o bien el gel de VEGF tiene también el riesgo potencial de provocar una reacción indeseada de células o del huésped. Así, el gel procedente de los factores de crecimiento diméricos y los factores de crecimiento diméricos propiamente dichos, pueden ser fuertemente tóxicos, dado que los factores de crecimiento se presentan en el cuerpo solo en concentraciones muy bajas y también actúan en concentraciones muy bajas. Una sobredosis es muy peligrosa y puede conducir desde un cáncer hasta la muerte inmediata. Diferentes sistemas de hidrogel basados en proteínas albergan también el riesgo potencial de provocar una respuesta inmunitaria, dado que las proteínas multi-dominio artificiales pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico del huésped como antígenos extraños. El hidrogel de ADN puede ser producido con costes asumibles para una aplicación de laboratorio, a pesar de que la síntesis a gran escala pudiera ser muy costosa. Aunque es químicamente posible incorporar en el hidrogel de ADN otros grupos funcionales bioactivos y/o grupos química/físicamente reactivos, esto aumentaría, sin embargo, de manera considerable los costes de producción. La mayoría de las reacciones de reticulación químicas para la polimerización conducirían también a una modificación de las moléculas de la superficie de la célula y serían tóxicas para las células. Las reacciones de adición tiol-eno o tiol-maleimida son con ello relativamente suaves, de modo que el alqueno y la maleimida pueden reaccionar con grupos tiol libres de las proteínas de la superficie de la célula, mientras que el grupo tiol en el polímero tendrá una reacción de intercambio de enlaces disulfuro con la proteína de la superficie de la célula con contenido en enlaces disulfuro. La química click exenta de cobre representa la estrategia mejor adecuada para la formación de gel química *in situ*. Sin embargo, la estructura de ciclo-octina es muy lipofílica y podría formar un racimo hidrofóbico en una matriz polimérica. Además de ello, el metabolismo y la toxicidad de la estructura de triazol resultante son desconocidos y deben detectarse en complejos ensayos biológicos y clínicos.

El documento **WO 2008/124165 A2** describe un sistema de entrega de medicamentos en nanopartículas auto-organizante para la entrega de diferentes sustancias bioactivas, incluidos péptidos, proteínas, ácidos nucleicos o medicamentos químicos sintéticos. Una secuencia dipeptídica (KA) se utiliza para unir ADN y ARN a partículas pequeñas.

Los documentos Yamaguchi, N. et al.: **Rheological Characterization of Polysaccharide-Poly(ethylene glycol) Star Copolymer Hydrogels**. *Biomacromolecules*, 2005, 6,1931-1940; y Yamaguchi, N., Kiick, K. L.: **Polysaccharide-Poly(ethylene glycol) Star Copolymer as a Scaffold for the Production of Bioactive**

Hydrogels. Biomacromolecules, 2005, 6, 1921-1930; enseñan en cada caso un hidrogel no covalente a base de una interacción péptido-oligosacárido, utilizándose en cada caso un péptido con un motivo dipéptido $(KA)_4$ repetitivo.

Del documento **US 6 958 212 B1** se conocen biomateriales poliméricos, por ejemplo hidrogeles, que se forman mediante reacciones de adición nucleófilas en grupos insaturados conjugados y contienen unidades farmacéuticamente activas. Los componentes del biomaterial pueden elegirse de un grupo que se compone de oligómeros, polímeros, proteínas o péptidos biosintéticos, proteínas o péptidos que se presentan de forma natural, péptidos o proteínas modificados que se presentan de forma natural, y polisacáridos.

En el documento **Alison B. Pratt et al.: Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86, 27-36;** se describe la formación de un hidrogel como matriz extracelular sintética, pudiendo formarse la red de hidrogel a partir de un péptido de unión a heparina y PEG.

Sistemas de hidrogel similares se dan a conocer en el documento **Kyung Jae Jeong et al.: Interplay between Covalent and Physical Interactions within Environment Sensitive Hydrogels. Biomacromolecules, 2009, 10, 1090-1099;** el documento **Seal B. L. et al. Physical matrices stabilized by enzymatically sensitive covalent crosslinks. Acta Biomaterialia, 2006, 2, 241-251;** el documento **Brandon L. Seal et al.: Physical Polymer Matrices Based on Affinity Interactions between Peptides and Polysaccharides. Biomacromolecules, 2003, 4, 1572-1582;** así como el documento **Brandon L. Seal et al.: Viscoelastic Behavior of Environmentally Sensitive Biomimetic Polymer Matrices, Macromolecules, 2006, 39, 2268-2274.** Como péptido de unión a heparina se emplea con ello en cada caso antitrombina III (ATIII). Otros documentos, tales como el documento **M. V Tsurkan et al.: Enzymatically degradable heparin-polyethylene glycol gels with controlled mechanical properties, Chemical Communications, 2010, 46, 1141-1143;** el documento **M. V. Tsurkan et al.: Modular StarPEG-Heparin Gels with Bifunctional Peptide Linkers. Macromol Rapid Commun, 2010, 31, 1529-1533;** el documento **U. Freudenberg et al.: A star-PEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapies for neurodegenerative diseases. Biomaterials, 2009, 30, 5049-5060;** el documento **T. Nie et al. Production of heparin-containing hydrogels for modulating cell responses. Acta Biomaterialia, 2009, 5, 865-875;** así como el documento **Benoit et al.: The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. Biomaterials, 2007, 28, 66-77;** se ocupan de hidrogeles covalentes de adhesión a heparina que presentan enlazadores enzimáticamente disociables y secuencias de adherencia a células.

El documento **WO 94/04176 A1** describe péptidos para la neutralización/unión de heparina para mejorar la coagulación de la sangre. En este caso, se emplean secuencias con glicina.

La misión de la invención consiste en proporcionar sistemas sintéticos de matrices poliméricas mediante un concepto de diseño racional. Con este sistema se ha de alcanzar una mejora de las propiedades para aplicaciones biológicas y clínicas.

La solución del problema de la invención consiste en una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, para aplicaciones biotecnológicas que contiene un conjugado de polímero-péptido covalente, comprendiendo el conjugado de polímero-péptido covalente, conjugados de dos o más péptidos que están acoplados a una cadena polimérica. La secuencia peptídica contiene un motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo, en donde B es un aminoácido con cadena lateral cargada positivamente, A es alanina y n es un número de 5 a 20, que indica el número de los distintos módulos dipéptido (BA) repetitivos dentro del motivo dipéptido $(BA)_n$. En este caso, el aminoácido B es preferiblemente arginina, con el código de una letra R, o lisina, caracterizada por el código de una letra K. El hidrogel de acuerdo con la invención se adecua para la formación de una matriz de hidrogel no covalente, la cual, en virtud de la formación del conjugado de polímero-péptido covalente, presenta propiedades auto-organizantes.

Por consiguiente, con la invención se proporciona un sistema de hidrogel que se forma *in situ*. Las matrices poliméricas pueden formarse mediante simple mezcladura de dos componentes que son totalmente compatibles con experimentos de embutición en células. Además de ello, se examinó una serie de conjugados de péptido-polímero, con el fin de someter a ensayo su capacidad de unirse con un oligosacárido con el fin de formar un hidrogel. Este modo de proceder ha conducido no solo a una serie de sistemas de gel con diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas, sino también a una visión en la relación estructura-función. Por lo tanto, se llevaron a cabo ensayos químicos, físicos, bioquímicos y biológicos de los hidrogeles resultantes. Dado que las secuencias peptídicas se basan en un motivo $(BA)_n$ sencillo, investigaciones sobre la relación estructura-función han demostrado que modificaciones muy sencillas en las secuencias pueden conducir a una pluralidad de modificaciones de las propiedades del gel.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, la cadena polimérica está formada por un polietilenglicol (PEG) lineal o de múltiples brazos. Particularmente preferida es en este caso una forma de realización en la que la cadena polimérica está formada por un polietilenglicol de cuatro brazos (PEG tipo estrella). Como aminoácido B está prevista preferiblemente arginina o lisina. Además de L- y D-aminoácidos de arginina y lisina de los aminoácidos

naturales son básicamente adecuados, sin embargo, casi todos los aminoácidos no naturales que están cargados positivamente (de carácter básico).

De manera correspondiente a la invención, la matriz de hidrogel comprende, además, un oligosacárido altamente cargado de forma negativa. De acuerdo con la invención, existe un sistema de oligosacárido/péptido/polímero en el que el péptido está conjugado químicamente al polímero y la formación del gel tiene lugar mediante mezcla del conjugado péptido-polímero y del oligosacárido. La auto-organización macromolecular no covalente es inducida también mediante la interacción entre el péptido y el oligosacárido. La elección del polímero y del oligosacárido puede conducir a diferentes propiedades del gel, incluido el comportamiento de flujo, el estado de gelificación y la velocidad de gelificación, así como la afinidad ajustable de proteínas bioactivas que interactúan con oligosacáridos, por ejemplo, factores de crecimiento o morfógeno. No obstante, la mayor pluralidad de propiedades del gel se alcanza de manera sorprendente mediante modificaciones de uno de los motivos de la secuencia peptídica muy sencillas y repetitivas, con lo cual, según el concepto de la invención, una matriz de hidrogel correspondiente es posible, en principio, también sin oligosacárido. De este modo, la configuración flexible de la secuencia peptídica puede conducir a una amplia pluralidad de propiedades del gel, no solo con respecto a las propiedades reológicas arriba mencionadas, el estado de gelificación, la velocidad de gelificación y las propiedades de unión a proteínas, sino también a propiedades tales como, por ejemplo, la degradabilidad biológica en virtud de la hidrólisis proteolítica u otra actividad enzimática así como la sensibilidad frente a la irradiación de luz.

El oligosacárido altamente cargado de forma negativa es, de acuerdo con una forma de realización ventajosa, un oligosacárido sulfatado o fosforilado, preferiblemente elegido de un grupo de oligosacáridos que comprende heparina, sulfato de dextrano, sulfato de α -ciclodextrina, sulfato de β -ciclodextrina, sulfato de γ -ciclodextrina, fosfato de α -ciclodextrina, fosfato de β -ciclodextrina y fosfato de γ -ciclodextrina. En una forma de realización particularmente preferida para un sistema de oligosacárido/péptido/polímero, la matriz de hidrogel comprende como oligosacárido heparina que procede del tejido de la mucosa del intestino de cerdos o de pulmón de vacas. En este caso, la heparina es preferiblemente de calidad farmacéutica. En una forma de realización alternativa, la matriz de hidrogel comprende como oligosacárido sulfato de dextrano que presenta preferiblemente un peso molecular en el intervalo de 4 kDa a 600 kDa. Se prefiere el empleo de sulfato de dextrano de calidad farmacéutica. Si la matriz de hidrogel contiene sulfato de ciclodextrina, ésta es preferiblemente sulfato de α -ciclodextrina, sulfato de β -ciclodextrina o sulfato de γ -ciclodextrina de calidad farmacéutica, pudiendo ascender el grado de sulfatación de tres sulfatos por molécula a la sulfatación completa. Si la matriz de hidrogel contiene fosfato de ciclodextrina, éste es preferiblemente fosfato de α -ciclodextrina, fosfato de β -ciclodextrina y fosfato de γ -ciclodextrina de calidad farmacéutica, pudiendo ascender el grado de fosforilación de tres grupos fosfato por molécula hasta la fosforilación completa.

De manera correspondiente a otra ejecución de la invención, la matriz de hidrogel comprende, además, un grupo químico disociable bajo la luz entre la cadena polimérica y la secuencia peptídica que contiene motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo. La matriz de hidrogel puede comprender, además, también un enlazador químico sensible al pH entre la cadena polimérica y la secuencia peptídica que contiene el motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo. De acuerdo con otra forma de realización de la invención la matriz de hidrogel comprende, además, un enlazador enzimáticamente disociable entre la cadena polimérica, preferiblemente una molécula de PEG, y la secuencia peptídica que contiene el motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo. Como enlazador enzimáticamente disociable, la matriz de hidrogel comprende en este caso preferiblemente una secuencia peptídica que es un sustrato proteolíticamente activo. Alternativamente, la matriz de hidrogel puede comprender como enlazador enzimáticamente disociable, además, una secuencia de oligonucleótidos que es un sustrato activo de nucleasa.

La modificación del péptido puede conducir a la ampliación adicional de la función de hidrogel mediante la introducción de diferentes marcas, por ejemplo marca de fluorescencia para la vigilancia de las matrices *in vitro* e *in vivo*, y para la ampliación adicional de la conjugación de sustancias activas para una liberación de la sustancia activa. Además, dado que la formación de gel es inducida por dos componentes químicamente definidos, el sistema de matriz puede ser configurado capa por capa, con el fin de disponer con elevada precisión en una determinada capa un conjugado de péptido-polímero y/o un oligosacárido de una determinada función. Este procedimiento de capa por capa posibilita, en combinación con la realización fotosensible arriba mencionada de la matriz de hidrogel, además de ello, el desarrollo y la construcción de exigentes nanoestructuras y nanounidades bioactivas y biocompatibles.

Todos los componentes en el sistema de hidrogel de acuerdo con la invención pueden obtenerse o prepararse a costos relativamente bajos. Heparina, sulfato de dextrano y sulfato de ciclodextrina, al igual que polímero de PEG funcionalizado con maleimida, se pueden adquirir a un precio relativamente bajo de suministradores comerciales. Péptidos pueden ser sintetizados con un sintetizador de péptidos en fase sólida a escala de gramos. Por consiguiente, también el hidrogel resultante puede ser preparado a escala de gramos en el laboratorio con costos relativamente bajos. Ventajosamente, la matriz de hidrogel según una de las formas de realización arriba descritas presenta un módulo de elasticidad de al menos 10 Pa.

El sistema auto-organizante puede también utilizarse en un sistema de microfluído, con el fin de producir bolas de matriz de hidrogel, así como células a embutir en las bolas de la matriz de hidrogel. Otro aspecto de la invención se refiere, por consiguiente, a bolas de la matriz de hidrogel con un hidrogel de acuerdo con la invención, que forma una matriz auto-organizante. En una matriz de hidrogel auto-organizante formada con el hidrogel de acuerdo con la invención o en las bolas de la matriz de hidrogel de acuerdo con la invención pueden embutirse, como ya se ha mencionado, células a través de un procedimiento correspondiente, de modo que resulta una asociación correspondiente. En este caso, las células se eligen preferiblemente de un grupo que comprende células de mamíferos, células de insectos, células de bacterias y células de levaduras. Cuando las células son células de mamíferos, pueden elegirse de ellas, ventajosamente, diferentes líneas de células cancerosas, células de fibroblastos, células madre pluripotentes, células madre pluripotentes inducidas, células T humanas o células B humanas.

Células embutidas en una matriz de hidrogel de acuerdo con la invención o correspondientes bolas de la matriz de hidrogel pueden utilizarse para la preparación de proteínas, comprendiendo la proteína preferiblemente anticuerpos monoclonales terapéuticos.

Otro aspecto de la invención se refiere a cápsulas para la liberación preestablecida de reactivos terapéuticos, en donde, a través de un procedimiento correspondiente, reactivos terapéuticos son encapsulados con la matriz de hidrogel arriba descrita o las bolas de la matriz de hidrogel arriba mencionadas. El grupo de los reactivos terapéuticos utilizados en cada caso comprende con ello, preferiblemente, células de mamíferos, células de insectos, bacterias, células de levaduras, compuestos anti-cancerígenos, compuestos anti-coagulación, compuestos anti-inflamatorios, compuestos inmunosupresores, anticuerpos terapéuticos, reactivos de diagnóstico, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, pequeñas moléculas como inhibidores de factores de crecimiento, pequeñas moléculas como inhibidores de citoquinas, inhibidores de aptámeros para factores de crecimiento e inhibidores de aptámeros para citoquinas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición a base de una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, en una de las formas de realización arriba mencionadas y productos químicos terapéuticos y reactivos, en donde en el hidrogel terapéutico resultante se genera un gradiente de los productos químicos y reactivos. Es decir, es posible, mediante un procedimiento adecuado, generar un gradiente de productos químicos y reactivos en las matrices de hidrogel o bien bolas de la matriz de hidrogel terapéuticas de acuerdo con la invención. A los posibles productos químicos terapéuticos y reactivos, que forman gradientes en la matriz de hidrogel, pertenecen, preferiblemente, compuestos anti-coagulación, compuestos anti-inflamatorios, compuestos inmunosupresores, anticuerpos terapéuticos, reactivos de diagnóstico, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, pequeñas moléculas como inhibidores para factores de crecimiento, pequeñas moléculas como inhibidores para citoquinas, inhibidores de aptámeros para factores de crecimiento e inhibidores de aptámeros para citoquinas.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere a un sistema híbrido a base de una matriz de hidrogel de acuerdo con la invención, que no se presenta en forma de bolas, por una parte, y bolas de la matriz de hidrogel por otra. En este caso, la matriz de hidrogel no en forma de bolas y las bolas de la matriz de hidrogel presentan en cada caso una composición química diferente y un componente del sistema híbrido puede ser regulado mediante radiación con luz, mediante degradación química selectiva o mediante digestión enzimática.

Otras particularidades, características y ventajas de la invención resultan de la siguiente descripción de ejemplos de realización con referencia a los dibujos correspondientes. Muestran:

- Fig.1:** una representación esquemática de un procedimiento de elección para la detección de la formación de un hidrogel con heparina,
- Fig. 2:** los resultados de la cromatografía líquida a presión ultra-alta de fase reversa (UPLC) de péptidos purificados,
- Fig. 3:** los resultados del análisis por cromatografía líquida a presión ultra-alta de fase reversa (UPLC) de conjugados de péptido-polietilenglicol de cuatro brazos (péptido-PEG tipo estrella) purificados,
- Figs. 4a-f:** un análisis de una modificación de la estructura dependiente de heparina mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD),
- Fig. 5:** una representación esquemática del análisis de alto rendimiento de las propiedades mecánicas de los hidrogeles,
- Fig. 6:** la estabilidad de un hidrogel basado en lisina y alanina en comparación con L- y D-aminoácidos,

- Figs. 7a-b:** el comportamiento de flujo de conjugado de péptido-PEG tipo estrella y heparina de 14 kDa, en cada caso individualmente,
- Figs. 7c-d:** el comportamiento de flujo de conjugado de péptido-PEG tipo estrella con heparina de 14 kDa,
- Fig. 8a:** el análisis de una modificación de la estructura dependiente de heparina mediante espectroscopía de dicroísmo circular,
- Fig. 8b:** el resultado de la verificación de la erosión del hidrogel mediante la mezcladura conjunta de conjugado de péptido-PEG tipo estrella y con heparina de 14 kDa marcada con TAMRA,
- Fig. 9:** una fotografía de microscopía de barrido del hidrogel de KA7-PEG tipo estrella con heparina,
- Fig. 10:** un dispositivo para el análisis del tiempo de gelificación de un hidrogel,
- Figs. 11a-c:** el resultado del análisis del tiempo de gelificación de un hidrogel,
- Figs. 12a-f:** un ensayo de toxicidad para diferentes conjugados de péptido-PEG tipo estrella y heparina de 14 kDa y
- Figs. 13a-f:** los resultados de un ensayo de viabilidad y la estructura de fibroblastos humanos (HDF_n) embutidos de la piel de neonatos en un hidrogel.

Un motivo péptido sencillo, repetitivo, el cual se puede modificar de manera sencilla, con el fin de dirigir determinadas propiedades de unión a determinadas biomoléculas, es de gran interés en bioquímica, biotecnología y en las ciencias de los biomateriales. Por ejemplo, un sistema de este tipo puede aplicarse con el fin de desarrollar sistemas de matriz no covalentes, auto-organizantes, ajustables. Heparina se utilizó como compuesto de partida con el fin de sintetizar una plataforma de hidrogel covalente para la sustentación de terapias de reemplazo celular. En lo que sigue se presenta un banco de péptidos que en cada caso están conjugados a polietilenglicol de cuatro brazos (PEG tipo estrella), que en los ejemplos de realización sirve como cadena polimérica. El banco conduce a la determinación de un motivo péptido (BA)_n de unión a heparina mínimo, en donde B es un radical aminoácido, por ejemplo de arginina o lisina, y en donde A es alanina y n es un número entre 4 y 20. La repetición de este motivo o una mutación individual del aminoácido conduce a una pluralidad de propiedades físicas y bioquímicas del hidrogel auto-organizante dependiente de heparina resultante.

La **Fig. 1** muestra esquemáticamente un procedimiento de elección para la determinación de que los motivos péptido específicos que están acoplados a un polietilenglicol de cuatro brazos (PEG tipo estrella), pueden formar un hidrogel con heparina de 14 kDa. En la **Fig. 1** resulta claro que la formación del hidrogel va acompañada de una modificación estructural inducida por heparina en el motivo péptido (BA)_n.

La **Tabla 1** muestra primeramente el banco de péptidos sintetizados. Se muestran las secuencias, la abreviatura y el peso molecular de los péptidos.

Tabla 1

Nombre	Índice de la secuencia (SEQ ID NO)	Secuencia peptídica	Peso molecular [10 ⁻³ kg/mol]
ATIII	1	CWGGKAFKLAARL YRKA	2010,44
KA1	2	CWGGKA	620,72
KA3	3	CWGGKAKAKA	1019,22
KA5	4	CWGGKAKAKAKAKA	1417,72
KA7	5	CWGGKAKAKAKAKAKA KAKA	1816,22

ES 2 690 062 T3

Nombre	Índice de la secuencia (SEQ ID NO)	Secuencia peptídica	Peso molecular [10^{-3} kg/mol]
dKdA7	6	cwGGkakahakakakaka	1816,22
dKA7	7	CWGGkAkAkAkAkA kA	1816,22
KdA7	8	CWGGKaKaKaKaKaK aKa	1816,22
KA7-1a	9	CWGGKAKAKAKaKA KAKA	1816,22
KKA5	10	CWGGKKAKKAKKAK KAKKA	2058,57
KG1	11	CWGGKG	606,69
KG3	12	CWGGKGKGKG	977,13
KG5	13	CWGGKGKGKGKGK G	1347,57
KG7	14	CWGGKGKGKGKGK GKGKG	1718,01
KKG5	15	CWGGKGGKGGKGGK GKKG	1988,42
RA1	16	CWGGRA	648,74
RA3	17	CWGGRRARARA	1103,28
RA5	18	CWGGRRARARARARA	1557,82
RA7	19	CWGGRRARARARARA RARA	2012,36
RRA5	20	CWGGRRARRARRARR ARRA	2338,77
RG1	21	CWGGRG	634,71
RG3	22	CWGGRRGRGRG	1061,19

Nombre	Índice de la secuencia (SEQ ID NO)	Secuencia peptídica	Peso molecular [10^{-3} kg/mol]
RG5	23	CWGGRRGRGRGRGR G	1487,67
RG7	24	CWGGRRGRGRGRGR GRGRG	1914,15
RRG5	25	CWGGRRGRGRGRGR RGRRG	2268,62

En lo que sigue, se comparan el código de una letra utilizado con los correspondientes aminoácidos, así como (entre paréntesis) sus códigos de tres letras:

- A es la abreviatura para alanina (Ala),
- C para cisteína (Cys),
- F para fenilalanina (Phe),
- G para glicina (Gly),
- K para lisina (Lys),
- L para Leucina (Leu)
- R para arginina (Arg),
- W para triptófano (Trp) e
- Y para tirosina (Tyr).

L-aminoácidos se caracterizan mediante el uso de mayúsculas, D-aminoácidos por el uso de minúsculas.

Todos los péptidos recogidos en la **Tabla 1** se prepararon utilizando una química estándar de fluorenilmetoxicarbonilo (química FMOC) sobre una fase sólida con activación de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (activación HBTU) en un sintetizador de péptidos en fase sólida automático (ResPep SL, Intavis, Köln, Alemania). Para una buena calidad del péptido, cada uno de los aminoácidos se acopló en cada caso dos veces con un exceso quintuple, protegiéndose todos los grupos amino que no habían reaccionado con anhídrido de ácido acético. Para la disociación del péptido a partir de la resina, ésta se trató durante hora y media con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA)/trioisopropilsilano (TIS)/agua/ditiotreitol (DTT), presentándose estos componentes en la relación de 90 (v/v): 2,5 (v/v): 2,5 (v/v): 2,5 (m/v).

Los péptidos se disolvieron en agua que contenía de 2 mg/ml de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). La purificación de los péptidos se realizó mediante cromatografía líquida a alta presión de fase reversa (UPLC) en una instalación de HPLC preparativa (ProStar™, Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) que está dotada de una columna C18 preparativa (AXIA™ 100A, tamaño de grano 10 µm, 250 x 3 mm, Phenomenex, Torrance, EE.UU.). El péptido se eluyó de la columna aplicando un gradiente de 5 % a 100 % de disolvente B a 20 ml/min, siendo el disolvente A ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % en agua y el disolvente B TFA al 0,1 % y 5 % de agua en acetonitrilo.

La pureza se confirmó mediante cromatografía líquida a presión ultra-alta de fase reversa analítica (UPLC Aquity™ con detector UV, Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.), equipada con una columna C18 analítica (AQUITY™ UPCL BEH C18, tamaño de grano 1,7 µm, 50 x 2,1 mm, Waters Milford, Massachusetts, EE.UU.) aplicando un gradiente isocrático y una espectrometría de masas de ionización por electroproyección (ESI-MS) (AQUITY™ TQ Detector, Waters Milford, Massachusetts, EE.UU.). El péptido se liofilizó para formar un polvo blanco (CHRIST ALPHA™ 2-4 LD plus + vacubrand RZ6) y se almacenó bajo condiciones secas a 4 °C durante no más de una semana antes del tratamiento ulterior.

La **Fig. 2** muestra los resultados de la cromatografía líquida a presión ultra-alta de fase reversa (UPLC) de péptidos purificados a 280 nm utilizando una columna C18 analítica y un gradiente isocrático. Los péptidos ejemplo, mostrados en la **Fig. 2** del banco son **a)** CWGGKAKAKAKAKAKAKA (KA7) y **b)** CWGGKKGKKGKKGKKGK (KG7).

La síntesis de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella para una auto-organización del hidrogel se llevó a cabo mediante reacciones de adición de Michael entre PEG de cuatro brazos terminado en maleimida y péptidos terminados en cisteína del banco. Ambos componentes se disolvieron en solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) con un valor del pH de pH 7,4 y en una relación molar de 1 : 4,5 (PEG tipo estrella : péptido) con una concentración global de 80 mg/ml. La mezcla de reacción se cerró rápidamente y se agitó a 750 revoluciones por minuto a la temperatura ambiente durante 18 horas (patrón MR Hei, Heidolph, Schwabach, Alemania). Los productos brutos se analizaron mediante cromatografía líquida a presión alta de fase reversa (UPCL) analítica (UPLC Aquity™ con detector UV, Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.), utilizando una columna C18 (AQUITY™ UPCL BEH C18, tamaño de grano 1,7 μm, 50 x 2,1 mm, Waters Milford, Massachusetts, EE.UU.) y un gradiente isocrático. El producto bruto se dializó durante dos días frente a 10 litros de agua bajo un intercambio constante de agua con una membrana de diálisis con un límite de exclusión (corte) de 8 kDa, con el fin de liberarlo de péptidos no unidos y sal. Después, el producto se inyectó de nuevo en la UPLC con el fin de verificar la pureza en comparación con el análisis antes de la diálisis. El producto dializado se liofilizó en agua para formar un sólido.

La **Fig. 3** muestra los resultados del análisis por cromatografía líquida a presión alta de fase reversa (UPLC) de conjugados de péptido-polietilenglicol de cuatro brazos (péptido-PEG tipo estrella) mediante una detección UV a 280 nm. Los resultados se muestran en la **Fig. 3** para los conjugados de ejemplo del banco **a)** KA7-PEG tipo estrella y en **b)** KG-PEG tipo estrella.

En lo que sigue se describe la preparación de las redes de hidrogel. En este caso, heparina de 14 kDa (25 mM, 2,5 mM) y conjugados de péptido-PEG tipo estrella (6,25 mM, 3,125 mM) se disolvieron en solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS), agua o medio de cultivo celular con suero de bovino fetal (FBS) al 2 %. Estas soluciones se disolvieron en una relación de 1 : 4 de heparina : conjugado de péptido-PEG tipo estrella, obteniéndose heparina de 14 kDa 0,5 mM o 5 mM y conjugado de péptido-PEG tipo estrella 2,5 mM o 5 mM. La relación molar del ligando era 2 : 1, 1 : 1 y 1 : 5, referido a la relación molar de la heparina de 14 kDa y de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella. Las mezclas se incubaron antes del uso en un espacio de tiempo de una hora hasta a lo largo de la noche a temperatura ambiente o a 37 °C. El tiempo de gelificación osciló desde inmediatamente hasta varias horas, lo cual dependía del motivo péptido empleado. Se formó un hidrogel cuando superó la adición de solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS), pH 7,4 a la mezcla después de la incubación de la mezcla a lo largo de la noche anterior sin premezcla con la solución añadida.

En la **Tabla 2** se recogen péptidos elegidos del banco que reflejan de manera óptima la relación de la actividad estructural de la formación de hidrogel con heparina. ATIII es un péptido que se une a heparina conocido de la bibliografía. Todos los péptidos están unidos con un polietilenglicol de 10 kDa de cuatro brazos, funcionalizado con maleimida (PEG tipo estrella). La formación del hidrogel se sometió a ensayo en una mezcla de 50 μl que contiene heparina de 14 kDa 5 mM y conjugado de PEG tipo estrella-péptido 5 mM (2,5 mM) en solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) pH 7,4. La velocidad de deformación y de penetración se analizó mediante centrifugación del hidrogel en una centrífuga de mesa a 45° con bolitas de metal de 275 μm sobre la superficie. La deformación de la superficie y la penetración de las bolitas se vigilaron en función de la fuerza aplicada.

Tabla 2

Nombre	Secuencia peptídica	Peso molecular [10^3 kg/mol]	Cantidad de péptido [10^3 mol/l]	Velocidad de deformación [m/s^2]	Velocidad de penetración [m/s^2]
Gel formado con heparina					
ATIII	CWGGKAFK KLAARLYR KA	2010,44	5	no determinado, el gel se contrae	no determinado
KA5	CWGGKAK AKAKAKA	1417,72	5	11223 +/-4768	21209+/- 2188
KA7	CWGGKAK AKAKAKAK AKA	1816,22	2,5	43998 +/-3139	72780+/- 6926

Nombre	Secuencia peptídica	Peso molecular [10^3 kg/mol]	Cantidad de péptido [10^3 mol/l]	Velocidad de deformación [m/s^2]	Velocidad de penetración [m/s^2]
Gel formado con heparina					
KA7	CWGGKAK AKAKAKAK AKA	1816,22	5	>148317	138919+/- 16275
RA5	CWGGRAR ARARARA	1557,82	5	<687	<687
RA7	CWGGRAR ARARARAR ARA	2012,36	5	1069 +/- 579	1952 +/-491

Los dominios de unión a heparina de antitrombina III (ATIII) y heparina con un bajo peso molecular pueden formar un hidrogel blando cuando ambos están conjugados en el PEG tipo estrella, tal como se describe en **N. Yamaguchi, B.-S. Chae, L. Zhang, KL Kiick, EM Furst, Biomacromolecules 2005, 6, 1931-1940**. Con el fin de reducir la complejidad química, los exámenes se llevaron a cabo con heparina de 14 kDa. Se pudo comprobar que en presencia de péptido ATIII, que está conjugado a PEG tipo estrella (ATIII-PEG tipo estrella), el hidrogel resultante se forma inmediatamente, pero éste no cubre el volumen total tal como se desprende de la **Tabla 2**. El examen de ATIII-PEG tipo estrella y heparina demostró que una fuerte interacción entre heparina y el péptido no conduce necesariamente a una formación óptima de la red de hidrogel. Por lo tanto, se preparó el banco de conjugados de péptido-PEG tipo estrella con el fin de examinar secuencias peptídicas en cuanto a sus propiedades auto-organizantes dependientes de heparina.

La secuencia $(BA)_n$ abre la posibilidad de modificar fácilmente la longitud del péptido y, con ello, las propiedades, por lo cual se eligió esta secuencia como una base. Tal como se conoce de **R. Tyler-Cross, RB Harris, M. Sobel, D. Marques, Protein Science 1994, 3, 620-627**, el péptido ATIII cambia, tras una unión a heparina, desde un ovillo aleatorio a una hélice α , esperándose también del $(BA)_n$ que adopte preferiblemente una estructura de hélice α . Sorprendentemente, se encontró que el motivo $(BA)_n$ representa un requisito de la secuencia mínimo para la interacción con heparina.

Siguiendo el objetivo de alcanzar la flexibilidad mayor posible en relación con las propiedades, se sintetizaron diferentes repeticiones de $(BA)_n$ que están recogidas en las **Tablas 1 y 2** anteriores. Se utilizaron repeticiones individuales como control opuesto (negativo), dado que las formaciones en forma de espiral requieren al menos 5 aminoácidos (hélice α según Pauling-Corey-Branson). Con el fin de poder comparar, además de las dependencias de longitud-carga, teniendo en cuenta la unión a heparina, también dependencias de densidad de carga, se sintetizó $(BBA)_5$ (**Tabla 1**). $(BBA)_5$ presentan, en el caso de una longitud similar, una mayor densidad de carga que $(BA)_7$. Como ya se ha mencionado, B y A tienen la tendencia a la formación de estructuras α -helicoidales tal como se conoce de **C. Nick Pace, J. Martin Scholtz, Biophysical Journal 1998, 75, 422-427**. Con el fin de obtener siempre un tándem de péptidos potencialmente formadores de estructura y no formadores de estructura, cada uno de $(BA)_n$ y $(BBA)_5$ tenía, tal como lo muestra también la **Tabla 1**, un participante $(BG)_n$ y uno $(BBG)_5$, representando la letra G glicina. Glicina es conocida porque perturba todo tipo de formación de la estructura. Así, cada uno de los 20 miembros configurados de manera inteligente del banco tenía que cumplir una misión.

Adicionalmente al motivo péptido se unió un triptófano, caracterizado con el código de una letra W, para la detección UV y la purificación, y una cisteína, caracterizada con el código de una letra C, con dos glicinas en el extremo N-terminal del péptido. Mediante la aplicación de la química de adición de Michael, la cisteína se unió a un PEG tipo estrella de 10 kDa funcionalizado con maleimida. La síntesis y el acoplamiento de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella se han optimizado en relación con la pureza, rapidez y la sencilla manipulación, tal como lo muestra la **Fig. 3**. Este es el mayor banco de conjugados de péptido-polímero para el que se analizó en cada caso una

formación de hidrogel dependiente de oligosacáridos. Con el fin de analizar la formación de hidrogeles, todos los conjugados de péptido-PEG tipo estrella se mezclaron en cada caso con heparina de 14 kDa en 50 μ l de tampón fosfato fisiológico (1XPBS) hasta una concentración final de 5 mM. Tras la incubación a lo largo de la noche, se agregó el tampón fosfato fisiológico (1XPBS), con el fin de analizar qué mezclas habían formado un hidrogel. Conjugados de KA-, KA5-, RA7- y RA5-PEG tipo estrella con heparina no se mezclaron en 1XPBS, sino que formaron un hidrogel transparente estable, tal como lo muestra la **Tabla 2**. Estos son los péptidos más cortos preparados de nuevo, conocidos en la bibliografía que forman un hidrogel dependiente de heparina.

En la **Tabla 3** se muestran péptidos del banco de péptidos que no forman hidrogel alguno unido a heparina. Todos los péptidos están unidos a una maleimida de 10 kDa-PEG tipo estrella. La formación del gel se sometió a ensayo en una mezcla de 50 μ l que contiene heparina de 14 kDa 5 mM y conjugado de péptido-PEG tipo estrella 5 mM en 1XPBS a un valor del pH de pH 7,4.

Tabla 3

Nombre	Secuencia peptídica	Peso molecular [10^{-3} kg/mol]
No formado con heparina		
KA1	CWGGKA	620,72
KA3	CWGGKAKAKA	1019,22
dKA7	CWGGkAkAkAkAkAkA	1816,22
KdA7	CWGGKaKaKaKaKaKaKa	1816,22
KA7-1a	CWGGKAKAKAKaKAKAKA	1816,22
KKA5	CWGGKKAKKAKKAKKAKKA	2058,57
KG1	CWGGKG	606,69
KG3	CWGGKKGKKG	977,13
KG5	CWGGKKGKKGKKGKKG	1347,57
KG7	CWGGKKGKKGKKGKKGKKG	1718,01
KKG5	CWGGKKGKKGKKGKKGKKG	1988,42
RA1	CWGGRA	648,74
RA3	CWGGRRARARA	1103,28
RRA5	CWGGRRARRARRARRARRA	2338,77
RG1	CWGGRG	634,71
RG3	CWGGRRGRGRG	1061,19
RG5	CWGGRRGRGRGRGRG	1487,67
RG7	CWGGRRGRGRGRGRGRGRG	1914,15
RRG5	CWGGRRRRRGRRRRRRRG	2268,62

Es notorio que los (BBA)₅, a pesar de que presentan una mayor densidad de carga, no formaban hidrogel alguno con heparina tal como se desprende de la **Tabla 3**. Este comportamiento debe ser confirmado en la estructura, lo cual se analizó con los péptidos puros.

Los péptidos de unión a heparina preparados *de novo* se pudieron analizar mediante la aplicación de la espectroscopía de dicroísmo circular (CD) (J-810, REV. 1.00, JASCO Inc., Easton, MD, EE.UU.). Todos los espectros de CD se recogieron en una cubeta de cuarzo de una longitud de onda de 1 mm, a longitudes de onda de 185 a 260 nm. Los puntos de datos se registraron en cada nanómetro con un tiempo de respuesta de 4,0 s. Todos los valores se muestran como elipticidad molar $[\theta]$ referido al número medio de enlaces peptídicos en grados cm^2 dmol. Las **Figuras 4a a 4f** contienen el resultado del análisis de la modificación de la estructura dependiente de heparina mediante la espectroscopía de dicroísmo circular (CD). En este caso, péptidos se midieron en agua MilliQ solos y junto con heparina de 14 kDa en una relación molar de 1 : 1. Solo para RA7 y KA7 se utilizó el doble de heparina que de péptido. El gráfico para los péptidos que se mezclaron con heparina de 14 kDa se corrigió con los

espectros CD de heparina de 14 kDa pura utilizando la misma concentración. El intervalo para la concentración de péptidos se encontraba en 74,5 μ M a 137,6 μ M.

En agua Milli-Q (Advantage A10; Millipore GmbH) no solo los motivos (BG)_n y (BBG)₅ mostraron una estructura de ovillo aleatorio, sino también los motivos (BA)_n y (BBA)₅, tal como lo muestran las **Figuras 4a a 4f**. Durante la observación de la formación de hidrogeles de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella con heparina, los motivos (BA)₇ y los motivos (BA)₅ mostraron, junto con heparina, una modificación estructural. En virtud de las glicinas, motivos (BG)_n y motivos (BBG)₅ no pueden modificar la estructura en una medida significativa, lo cual se expresa también en la formación carente de hidrogel. RRA7 es el único péptido que mostró con heparina una modificación de la estructura en la espectroscopía de dicroísmo circular (CD), pero no pasó por formación de hidrogel alguna. En virtud de la distribución más densa de la carga no se da la eliminación óptima de la carga positiva del péptido para una interacción óptima con el sulfato de la heparina. El motivo péptido (BA)_n se prefiere, por lo tanto, para péptidos de unión a heparina. a pesar de que los motivos péptido (BBA)₅ presentan más carga positiva en el caso de una longitud del péptido similar. Esta relación estructura-actividad entre la distancia de los aminoácidos de carácter básico a alanina y la capacidad de unión a heparina en forma de la formación de hidrogeles es en cualquier caso nueva y sorprendente.

Finalmente, con el fin de subrayar la importancia de la relación estructura-actividad de motivos (BA)_n, se sintetizaron los mutantes dKA7 y KdA7, que también están recogidos en la **Tabla 3**. Mediante la mezcla de L- y D-aminoácidos debería perturbarse la formación de la estructura. El análisis demostró que estos mutantes no forman un hidrogel acoplado a PEG tipo estrella y mezclado con heparina de 14 kDa (véase la **Tabla 3**), ni uno de estos mutantes muestra una modificación de la estructura similar a la de KA7, lo cual también se puede deducir de la comparación de las **Figuras 4d y 4e**. También el mutante KA7-1a con intercambio de una L-alanina por una D-alanina, en donde en el centro del motivo péptido no forma un hidrogel que está acoplado con PEG tipo estrella y está mezclado con heparina, tal como se desprende asimismo de la **Tabla 3**. Tampoco tras la adición de heparina se manifiesta modificación de la estructura alguna en el dicroísmo circular (CD), tal como resulta claro de la **Fig. 4e**.

Se llevó a cabo un análisis de alto rendimiento comparativo en relación con las propiedades mecánicas de los hidrogeles. Con el fin de disponer de un rápido método de alto rendimiento para la comparación de pequeñas cantidades de hidrogel, se utilizó una centrífuga de mesa (5424R, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Para ello, se formaron 50 μ l del hidrogel mediante mezcla de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella y heparina de 14 kDa en tampón fosfato fisiológico (1XPBS, pH 7,4) hasta una concentración final de 5 mM (una vez de 2,5 mM para KA7-PEG tipo estrella). La mezcla se incubó durante la noche en recipientes de reacción de 0,2 ml. La deformación de la superficie del hidrogel se determinó, referida a un rotor de la centrífuga a 45° y a la penetración de esferas de metal de 275 μ m, en función de la fuerza que debe aplicarse a través de la centrífuga. Todos los experimentos se repitieron tres veces.

La **Fig. 5** representa el análisis de alto rendimiento en relación con las propiedades mecánicas de los hidrogeles. En este caso, **a)** y **b)** muestran una deformación de la superficie del hidrogel de 50 μ l en un tubo de reacción de 0,2 ml, mejor dicho **a)** por debajo de la velocidad que se requiere con el fin de deformar la superficie, y **b)** a la velocidad que es necesaria con el fin de deformar la superficie. La parte **c)** de la **Fig. 5** es una representación esquemática de la penetración de una bolita a través del hidrogel de 50 μ l en un tubo de reacción de 0,2 ml, en función de la fuerza que se aplica a través de la centrífuga a 45°.

Se comprobó que el hidrogel RA5-PEG tipo estrella con heparina proporcionó resultados similares a las mezclas con RRA7-PEG tipo estrella que no habían formado hidrogel alguno, véanse las **Tablas 2 y 3**. Los hidrogeles basados en RA7-, KA5- y KA7- son mucho más fuertes y muestran, conforme a la **Tabla 2**, un espectro amplio de rigidez. Arginina y lisina tienen diferentes distribuciones de carga en la cadena lateral, lo cual conduce a diferentes propiedades del hidrogel. Las dos concentraciones diferentes de KA7-PEG tipo estrella con heparina proporcionaron hidrogeles con diferentes propiedades mecánicas, tal como se puede reconocer de la **Tabla 2**. Esto demuestra que el hidrogel basado en una interacción péptido-biomolécula no covalente puede ser ajustado a través de diferentes vías. En este caso, es posible experimentar con la concentración de los componentes y con la secuencia peptídica. Mezclas de diferentes motivos péptido (BA)_n sobre una molécula de PEG tipo estrella o diferentes conjugados de péptido-PEG tipo estrella seguirían mejorando incluso la capacidad para el ajuste en pequeños pasos.

La **Fig. 6** muestra la estabilidad de un hidrogel basado en lisina y alanina, en comparación con L- y D-aminoácidos. Los hidrogeles se formaron mediante mezcla de las concentraciones finales de conjugado de péptido-PEG tipo estrella 5 mM y heparina de 14 kDa 5 mM en 50 μ l de solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS). El análisis se llevó a cabo mediante centrifugación de los hidrogeles en una centrífuga de mesa a 45° con bolas metálicas de 275 μ m sobre la superficie del gel. La deformación de la superficie y la penetración de las bolas se recogieron en función de la fuerza aplicada.

Como resultado importante se comprobó que la completa variación de KA7 a D-aminoácidos no modifica en nada la rigidez del hidrogel, tal como lo muestra la **Fig. 6**. En virtud de la resistencia de D-aminoácidos frente a proteasas, es

posible crear hidrogeles no covalentes que son muy estables en entornos biológicos. De este modo, se puede ajustar la capacidad de degradación mediante diferentes aminoácidos.

Con el fin de verificar el amplio espectro de las propiedades mecánicas conforme a la **Tabla 2**, tuvo lugar un examen reológico, es decir, el comportamiento de flujo de los hidrogeles de KA7-PEG tipo estrella de KA5-PEG tipo estrella con heparina se determinó a través de experimentos de paso de frecuencia y de palpación de la carga.

La **Fig. 7a** muestra el transcurso de amplitud del conjugado de péptido-PEG tipo estrella puro y de la heparina de 14 kDa pura con una frecuencia de 1 Hz. La **Fig. 7b** muestra el recorrido de frecuencia del conjugado de péptido-PEG tipo estrella puro y de la heparina de 14 kDa pura con un 2 % de amplitud. Las **Figuras 7c y 7d** representan el comportamiento de flujo del conjugado de péptido-PEG tipo estrella en forma de mezcla con heparina de 14 kDa. La mezcla final en solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) contiene de ambos conjugado de péptido-PEG tipo estrella 5 mM o 2,5 mM y heparina 5 mM o 0,5 mM. Las soluciones o bien mezclas se analizaron aplicando un reómetro controlado por tensión de empuje (MCR 301, Paar Physica, Anton Paar, Ashland, VA) a 20 °C y a una unidad de medición de 39,979 m de diámetro, un ángulo de 0,305° y un truncamiento de 24 μm.

Las soluciones de componentes individuales de heparina de 14 kDa, KA5-PEG tipo estrella y KA7-PEG tipo estrella se analizaron con el fin de mostrar las propiedades base mecánicas de los componentes de partida en comparación con las propiedades mecánicas de las mezclas. Las soluciones de componentes individuales péptido-PEG tipo estrella se trataron exactamente de la misma manera que las mezclas que contenían heparina de 14 kDa. Todas las mezclas y soluciones se incubaron aplicando un entorno continuamente cerrado en torno a la unidad de medición, con el fin de impedir una evaporación. Todos los tiempos de incubación se determinaron mediante un experimento de tiempo de gelificación que se describe más adelante. La mezcla final de KA7-PEG tipo estrella 5 mM y heparina de 14 kDa 5 mM se incubó durante 1,5 horas. La mezcla final de KA7-PEG tipo estrella 2,5 mM y heparina de 14 kDa 0,5 mM se incubó durante 3 horas. La mezcla final de KA5-PEG tipo estrella 5 mM y heparina de 14 kDa 5 mM se incubó durante 15 horas. Las mediciones del transcurso de amplitud se llevaron a cabo con una frecuencia de 1 Hz a lo largo de un intervalo de 0,1 a 100 %. Las dependencias de frecuencia se determinaron aplicando una amplitud de 1 % en un intervalo de 0,01 a 100 Hz. Todos los experimentos se repitieron dos veces y se registró el valor medio.

El módulo de almacenamiento G' era para todas las muestra significativamente mayor que el módulo de pérdida G'' (~ 2%). Estas propiedades viscoelásticas confirman que la interacción entre el $(KA)_n$ y la heparina es muy fuerte y estable. La rigidez de la heparina de 14 kDa pura o del conjugado de péptido-estrella puro es muy baja tal como lo muestran las **Figuras 7a y 7b**. El amplio intervalo de concentraciones de heparina que puede utilizarse abarca de 0,5 a 5 mM. También las propiedades mecánicas pueden ajustarse con un factor mayor que 10 solo mediante la modificación de la concentración de los componentes. La mezcladura de diferentes conjugados de péptido-PEG tipo estrella es una vía adicional para modificar las propiedades del gel. Con ello, se dispone de dos dimensiones, la concentración y la secuencia peptídica, que pueden ser modificadas individualmente o en común, con el fin de adaptar las propiedades del hidrogel para cualquier demanda. Esto es posible únicamente mediante la interacción del motivo péptido $(BA)_n$ con la biomolécula heparina.

Con el fin de verificar la intensidad de la interacción entre el motivo péptido y la heparina de 14 kDa, los hidrogeles formados se sometieron a ensayo frente a distintos disolventes. La **Tabla 4** representa el resultado de este ensayo de estabilidad frente a distintos disolventes. Para ello, los conjugados de péptido-PEG tipo estrella se mezclaron con heparina de 14 kDa en 50 μl de solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) hasta una concentración final de en cada caso 5 mM. Cada uno de los disolventes, es decir, solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS), agua Milli-Q, ácido clorhídrico (HCl) 1 M, solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M, solución de sal común (NaCl) saturada, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol y medio de cultivo celular con suero de bovino fetal (FBS) al 2 % se añadió en cada caso al hidrogel como 200 μl de sobrenadante. El hidrogel se incubó a una temperatura ambiente de 24 °C, y los sobrenadantes se cambiaron al menos tres días de manera consecutiva cada día. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Bajo ninguna de las condiciones sometidas a ensayo se pudo destruir al hidrogel de KA7. Ningún otro hidrogel dependiente de heparina no covalente conocido es estable de tal manera, lo cual subraya la interacción extraordinariamente estable entre el KA7 y la heparina. Incluso el hidrogel a base de KA5 muy corto pudo destruirse por parte de HCl 1 M solo después de más de una semana de incubación. 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) es conocido por destruir todo tipo de estructuras secundarias. A pesar de que el hidrogel de KA7-PEG tipo estrella parece ser indestructible con heparina, la estructura puede ser destruida mediante la adición de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) al sobrenadante. La liofilización de esta solución de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), KA7-PEG tipo estrella, heparina y la adición de solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) condujo de nuevo a un gel transparente.

Tabla 4

Sobrenadante	KA7	KA5	RA7
1XPBS	estable	estable	estable; la superficie del hidrogel se volvió lechosa
Agua	estable	estable	estable
HCl 1 M	estable	estable; el hidrogel se destruyó solo después de una semana	estable; el hidrogel se volvió lechoso y luego de nuevo transparente
NaOH 1 M	estable	estable	estable
Solución saturada de NaCl	estable	estable	no estable; el hidrogel se volvió lechoso
DMSO	estable	estable	Estable
Etanol	estable	estable	estable
Medio de cultivo celular	estable	estable	estable

5 Para el ensayo de estabilidad de formación del hidrogel se sometieron a ensayo tres casos distintos, bajo los cuales se conforman normalmente los hidrogeles. La **Tabla 5** muestra el ensayo para la formación de los hidrogeles en diferentes disolventes. Los hidrogeles se formaron mediante mezcla de las concentraciones finales de en cada caso conjugado de péptido-PEG tipo estrella 5 mM y heparina de 14 kDa 5 mM en 50 μ l de solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS), agua Milli-Q o medio de cultivo celular con suero de bovino fetal (FBS) al 2 %. La estabilidad de los hidrogeles se sometió a ensayo con el mismo disolvente en el que se formó en 200 μ l de sobrenadante. El hidrogel se incubó a la temperatura ambiente (24 °C), los sobrenadantes se cambiaron al menos durante tres días sucesivamente de forma diaria y el resultado se evaluó después de al menos 3 días.

Tabla 5

Conjugados de péptido-PEG tipo estrella	PBS	Agua	Medio de cultivo celular
KA7	conformado	conformado	conformado
KA5	conformado	conformado	conformado
RA7	conformado	conformado	conformado

15 Medio de cultivo celular con suero de bovino fetal (FBS) al 2 % contiene una cantidad de proteínas y otros componentes que pueden interrumpir la interacción entre el (BA)_n-motivo péptido y heparina de 14 kDa, caso de que no sea específico o lo suficientemente estable.

20 Además, se llevó a cabo un experimento de erosión. Para ello, conjugados de péptido-PEG tipo estrella se mezclaron en cada caso con heparina de 14 kDa marcada con TAMRA. Previamente, debió sintetizarse heparina de 14 kDa marcada con TAMRA para el experimento de erosión. En este caso, heparina de 14 kDa se marcó con 5- (y 6)-carboxitetrametilrodamina (TAMRA, Invitrogen) aplicando la química de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDAC/sNHS). Heparina, TAMRA, EDAC, sNHS y Na₂CO₃ se mezclaron en una relación molar de 1 : 2 : 5 : 4 : 20 en agua y se incubaron durante la noche. Después, la mezcla se dializó bajo la aplicación de una membrana de diálisis con un límite de exclusión de 8 kDa frente a 10 litros de agua bajo intercambio constante de agua durante 2 días. El producto dializado se filtró a través de un filtro de poli(fluoruro de vinilideno) (filtro PVDF) de 0,22 μ m y se liofilizó para formar un producto rojo.

25 Finalmente, los conjugados de péptido-PEG tipo estrella se mezclaron con la heparina de 14 kDa marcada con TAMRA en 50 μ l de medio de cultivo con suero de bovino fetal (FBS) al 2 % hasta una concentración final de 5 mM. Los hidrogeles se formaron a 37 °C a una humedad del aire de 95 % y 5% de CO₂ a lo largo de la noche (15 horas) (Galaxy 170S, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Tras una incubación a lo largo de la noche, se añadió 1 ml del medio de cultivo con suero de bovino fetal (FBS) al 2 %. En cada instante de medición se tomaron 200 μ l del sobrenadante y se intercambiaron por medio de cultivo celular nuevo con suero de bovino fetal (FBS) al 2 %. La fluorescencia se midió en determinados instantes en el sobrenadante, utilizando un lector de placas (plataforma de detección BECKMAN COULTER PARADIGM, BECKMAN COULTER, Brea, California, EE.UU.) y de placas negras de 96 pocillos con fondo claro.

La **Fig. 8a** muestra primeramente el análisis de una modificación de la estructura dependiente de heparina mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Ambos péptidos mostraron sin heparina en agua Milli-Q una estructura de ovillo aleatorio. Después de la adición de heparina de 14 kDa en una concentración 2 molar de los péptidos se manifestó una modificación estructural clara. La **Fig. 8b** muestra finalmente el resultado de la verificación de la erosión del hidrogel mediante la mezclado conjunta arriba mencionada de conjugado de péptido-PEG tipo estrella y heparina de 14 kDa marcada con TAMRA en 50 μ l de medio de cultivo celular con suero de bovino fetal (FBS) al 2 % hasta una concentración final de 5 mM. La fluorescencia se midió en 200 μ l de 1 ml de sobrenadante. Estos 200 μ l se reemplazaron en cada caso por 200 μ l de medio reciente.

Tal como se conoce de la bibliografía, entre otros de **JR Fromm, RE Hileman, EBO Caldwell, JM Weiler, RJ Linhardt, Archives of Biochemistry and Biophysics 1997, 343, 92-100**, arginina se une más fuertemente que lisina a heparina. RA7 está unido más fuertemente a heparina, de modo que se libera menos heparina del hidrogel con RA7-PEG tipo estrella que del hidrogel con KA7-PEG tipo estrella. KA5 tiene una carga menor que KA7, de modo que la unión es más baja, lo cual conduce a una mayor erosión. Los hidrogeles pierden masa de manera despreciable, de modo que es probable que la mayor parte de heparina que se liberó, es decir, hasta 35%, no sea parte de la red del hidrogel. Después de la estabilización de la erosión de heparina del hidrogel, éste es más estable que los hidrogeles de proteínas. El hecho de que el hidrogel continúe siendo muy estable frente al suero y a sus componentes, demuestra la especificidad de la interacción entre el motivo péptido $(BA)_n$ y la heparina. Con ello, el hidrogel no tiene que formarse previamente antes de la aplicación. Esta es una ventaja muy grande, dado que esto ahorra tiempo y la concentración, por ejemplo de las proteínas, se distribuye uniformemente. Además, la reproducibilidad es mayor, ya que existen menos pasos de preparación.

Para una fotografía al microscopio electrónico de barrido se mezclaron conjugados de KA7-PEG tipo estrella con heparina de 14 kDa hasta una concentración final de 5 mM, en cada caso en 50 μ l de solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) y se incubaron durante 3 días a la temperatura ambiente. La muestra se tomó mediante desplazamiento de un tubo capilar en el gel, congelación brusca en nitrógeno líquido y corte a través de la muestra con una cuchilla muy afilada. La muestra secada en superficie y cortada se registró en imagen con un microscopio electrónico de barrido (Supra 40VP, Zeiss, Jena, Alemania).

La **Fig. 9** muestra una fotografía de microscopía electrónica de barrido del hidrogel de KA7-PEG tipo estrella con heparina. La muestra se congeló bruscamente en nitrógeno líquido y se analizó tras un corto tiempo de vaporización. El hidrogel de KA7-PEG tipo estrella mostró una clara estructura de la red.

En relación con la preparación del hidrogel, el tiempo de gelificación es importante. Al comienzo, el tiempo de gelificación debería ser determinado mediante el uso del reómetro controlado por tensión de cizallamiento (MCR 301, Paar Physica, Anton Paar, Ashland, VA) a 20 °C y una unidad de medición con un diámetro de 39,979 mm, un ángulo de 0,305° y un truncamiento de 24 μ m. De manera desventajosa, la medición con una amplitud de 2 % y una frecuencia de 1 Hz modificó el tiempo de gelificación. La gelificación se inició de manera mucho más rápida que lo que se observó previamente en el laboratorio. En virtud de este comportamiento, existió la necesidad de una vía alternativa de medir el tiempo de gelificación. Se construyó y programó una máquina controlada por microchips que está en condiciones de medir la rigidez del hidrogel en función del tiempo en una balanza de precisión (XP 205 peso de precisión de intervalo delta, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Alemania). La **Fig. 10** muestra un dispositivo para el análisis del tiempo de gelificación de un hidrogel controlado por un microchip programable y el uso de la balanza de precisión para medir el tiempo de gelificación de los hidrogeles. Se muestra una parte móvil sobre la balanza de precisión, consistente en una aguja roma y un soporte para un recipiente de reacción de 0,2 ml que contiene la mezcla de hidrogeles. Un software LabX, que estaba instalado en un ordenador, se utilizó con el fin de vigilar y registrar la fuerza.

Concentraciones diferentes de conjugados de péptido-PEG tipo estrella se mezclaron durante arremolinamiento constante con heparina de 14 kDa con el fin de formar 50 μ l de hidrogel en solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS) en el recipiente de reacción de 0,2 ml. Después de la mezclado, el recipiente de reacción se cerró con una tapa con un agujero de 1,5 mm y se inició inmediatamente la medición. En la cara interna de la tapa, 10 μ l de agua protegían a la superficie del hidrogel frente al secado. Al comienzo de la medición, la aguja roma de 1 mm de diámetro, vista desde arriba, penetró 1 mm en el hidrogel. Cada 5 minutos, la aguja roma se introduce 1 mm en el gel y tras un tiempo de espera de un segundo se mueve hacia arriba de nuevo hasta 30 μ m por debajo de la posición original. Esta diferencia en altura de 30 μ m asegura que la aguja no genere canal alguno en el gel, que no presente resistencia alguna, pero que en cada medición penetre 30 μ m más y más en el gel (de manera perpendicular desde arriba), con el fin de disponer siempre de una mezcla de hidrogel intacta que puede ser medida. Todos los datos de la balanza de precisión se vigilan y documentaron utilizando el software LabX (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Alemania) que está instalado en un cuaderno y unido con la balanza de precisión con una conexión en serie RS-232. Se registraron las amplitudes de la resistencia del hidrogel frente a la presión tras presionar hacia abajo la aguja, corregidas por la línea base antes de la toma de un instante de medición.

Las **Figuras 11a a 11c** representan en este caso el resultado del análisis del tiempo de gelificación del hidrogel por medición de la fuerza que se requiere para penetrar utilizando una aguja con un diámetro de 1 mm. Inmediatamente

después de la mezcladura de los componentes, la medición se llevó a cabo cada 5 minutos. Para cada medición, la aguja se movió 1 mm en la mezcla hacia abajo y 0,970 mm hacia arriba. La fuerza se midió mediante pesaje y se registró la amplitud, corregida mediante la línea base.

5 El tiempo de gelificación se diferencia en virtud de las distintas propiedades de carga de RA7-PEG tipo estrella, KA7-PEG tipo estrella y KA5-PEG tipo estrella. El hidrogel de RA7-PEG tipo estrella se forma con heparina de 14 kDa en tampón fosfato fisiológico (1XPBS) inmediatamente con una concentración final de 5 mM. KA7-PEG tipo estrella necesita para la formación del hidrogel, bajo las mismas condiciones, aproximadamente una hora y KA5-PEG tipo estrella, varias horas. Mediante la disminución de la concentración de los componentes, aumenta el tiempo de gelificación tal como lo demuestra una comparación de las **Figuras 11a y 11b**. La mezcladura de diferentes motivos péptido (BA)_n que están acoplados en PEG tipo estrella abriría una posibilidad de ajustar conjuntamente la rigidez y el tiempo de gelificación. Esto proporciona al usuario un sistema con el que se puede ajustar el tiempo de gelificación mediante variación de la concentración de los componentes o de la relación de los distintos motivos péptido-(BA)_n acoplados a PEG tipo estrella conservando el contenido en sólidos.

15 El hidrogel, consistente en los conjugados de (BA)_n-PEG tipo estrella con heparina no es tóxico frente a células de mamífero tal como pudo demostrarse en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de los componentes del hidrogel (véanse las **Figuras 12a a 12f**). Dado que los fibroblastos es el componente más importante de todos los tejidos conjuntivos, se utilizaron con éxito para un cultivo celular en 3D durante 9 días aplicando KA7-PEG tipo estrella o KA5-PEG tipo estrella con heparina en el medio de cultivo celular con suero de bovino fetal (FBS) al 2 %.

20 Un frasquito congelado con células se descongeló en un baño de agua a 37 °C durante 2 minutos. Las células se transfirieron siempre en 5 ml de medio de cultivo celular completo 106 (con suero de bovino fetal (FBS) al 2 %). Esta suspensión celular se centrifugó a 700 g en una centrífuga (ROTINA 380R, Hettich, Tuttlingen, Alemania), el sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en 6 ml de medio de cultivo celular completo. Después de la mezcladura, la suspensión se transfirió a un recipiente de cultivo celular y se incubó a 37 °C, humedad del aire del 95 % y 5 % de CO₂. Cada 2 días, el medio se cambió hasta que las células eran confluentes. El medio de cultivo celular a base de la fase confluyente de las células se retiró y se añadió 1 ml de solución de tripsina/EDTA a la capa de células. Después de 5 minutos y de un eventual sacudimiento, las células están en suspensión y se añadieron a ello 3 ml del nuevo medio de cultivo completo. Estos 4 ml de suspensión de células se diluyeron en 20 ml del medio de cultivo celular completo y se transfirieron a 4 nuevos recipientes de cultivo celular (cada uno de 6 ml). Después se continuaron incubando, tal como se describe, hasta su uso o división ulterior.

30 El medio de cultivo celular se separó de la capa confluyente de las células y se añadió 1 ml de la solución de tripsina/EDTA a la capa de células. Después de 5 minutos y de un eventual sacudimiento, las células están en suspensión y se añadieron 3 ml del nuevo medio de cultivo celular completo. La cantidad de las células se contó mediante mezcladura de 50 µl de la suspensión de células con 50 µl de la solución de azul tripano, obteniéndose el número de las células con un hemocitómetro. Los 4 ml de la suspensión de células se centrifugaron a 700 g en una centrífuga (ROTINA 380R, Hettich, Tuttlingen, Alemania), el residuo se retiró y las células se disolvieron en una cantidad de medio de cultivo celular completo con el fin de alcanzar la concentración objetivo. Los exámenes de la toxicidad de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella se llevaron a cabo mediante inoculación de 5000 células HDFn por pocillo en una placa de 96 pocillos. Después de la transferencia de las células, éstas estaban en condiciones de adherirse a las placas de 96 pocillos. Las células se incubaron 24 horas antes de la administración de las muestras a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad del aire de 95 %.

45 Las **Figuras 12a a 12f** muestran un ensayo de toxicidad para diferentes conjugados de péptido-PEG tipo estrella y heparina de 14 kDa. El medio celular se reemplazó después de incubación durante 24 horas por 200 µl de una solución que contenía medio reciente y conjugado de péptido-PEG tipo estrella 10⁻⁴ y 10⁻⁵ M que se había filtrado a través de un filtro de tubitos de centrífuga de 0,22 µm. Con ello, conjugado de péptido-PEG tipo estrella o heparina 10⁻⁴ y 10⁻⁵ M se añadieron a los 5000 fibroblastos humanos resuspendidos en el medio de cultivo celular con suero. Después de la adición de todas las muestras de ensayo, las células se incubaron después durante otras 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad del aire de 95 %, con el fin de analizar tanto la citotoxicidad dependiente del tiempo como la citotoxicidad dependiente de la concentración. Al final de cada interrupción, la etapa de toxicidad de cada una de las muestras de ensayo se valoró mediante un ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con el fin de determinar la citotoxicidad de los conjugados de péptido-PEG tipo estrella en comparación con células no tratadas. En este caso, en células vivas, el bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se redujo en formazan de color lila. Del mismo modo, se llevaron a cabo todas los pasos sin la adición del compuesto a las células. Con ello, las células, que fueron incubadas con medio solo, se utilizaron como control.

55 El ensayo MTT ayuda en la valoración de la viabilidad de las células mediante la medición de la reducción enzimática de tetrazolio amarillo a cristales de formazan violetas. Tras la incubación de las células con las muestras de ensayo, se añadió MTT y se incubó durante otras 4 horas. Después de 4 horas, se retiró el medio y se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), con el fin de desprender los cristales de formazan que se habían formado de la

reducción de la sal de tetrazolio solamente por parte de las células metabólicamente activas. La absorción de los cristales de formazan disueltos se midió a 570 nm utilizando un lector de placas (plataforma de detección BECKMAN COULTER PARADIGM, BECKMAN COULTER, Brea, California, EE.UU.). Dado que la absorción indica directamente el número de las células viables, la viabilidad porcentual se calculó directamente a partir de los valores de absorción. La toxicidad media se calculó mediante el valor medio de 15 pocillos de las células que fueron tratadas con el mismo compuesto.

Las **Figuras 12a a 12f** muestran los resultados del ensayo de MTT para **a)** heparina de 14 kDa, **b)** conjugado de ATIII-PEG tipo estrella, **c)** conjugado de KA5-PEG tipo estrella, **d)** conjugado de RA5-PEG tipo estrella, **e)** conjugado de KA7-PEG tipo estrella y **f)** conjugado de RA7-PEG tipo estrella.

Para la embutición de las células en el hidrogel se retiró primeramente el medio de cultivo de la capa confluyente de las células y luego se añadió 1 ml de solución de tripsina/EDTA a la capa de células. Al cabo de 5 minutos y de un eventual sacudimiento, las células están en suspensión, tras lo cual se añadieron 3 ml de nuevo medio de cultivo celular. La cantidad de las células se contó mediante mezcladura de 50 μ l de la suspensión de células con 50 μ l de la solución de azul tripano, contándose las células con un hemocitómetro. Los 4 ml de la suspensión de células se centrifugaron a 700 g en una centrífuga (ROTINA 380R, Hettich, Tuttlingen, Alemania), el sobrenadante se retiró y las células se disolvieron en una cantidad de medio de cultivo celular completo con el fin de alcanzar la concentración objetivo. Conjugados de KA7-PEG tipo estrella se disolvieron en el medio de cultivo celular conjunto y luego se filtraron a través de un filtro de tubitos de centrífuga de 0,22 μ m. Lo mismo se hizo con la heparina de 14 kDa. A la solución de conjugado de KA7-PEG tipo estrella se añadieron células de manera correspondiente con el fin de obtener una concentración final de 10^6 células por mililitro. Después, la mezcla de células de conjugado de KA7-PEG tipo estrella se combinó con heparina de 14 kDa a una concentración final de 5 mM de ambos en 50 μ l, se pipetearon sobre el fondo de una placa de 8 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, humedad del aire de 95 % y 5 % de CO₂. Después de 1 día se añadieron 0,5 ml de todo el medio de cultivo celular (y se cambió cada 2 días), y las células se continuaron incubando a 37 °C, 95 % de humedad del aire y 5 % de CO₂. La embutición de las células en la mezcla de conjugado de KA5-PEG tipo estrella con heparina de 14 kDa se llevó a cabo de la misma manera que en el caso del conjugado de KA7-PEG tipo estrella con resultados similares.

La viabilidad de las células se determinó mediante la adición de 50 μ l de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en los 500 μ l del medio de cultivo celular completo, en forma de sobrenadante de las células embutidas en el hidrogel. Las células se continuaron incubando a 37 °C, humedad del aire de 95 % y 5 % de CO₂. De las células se tomaron fotografías con un microscopio de preparación después de un tiempo de incubación de 1 hora.

La viabilidad de las células se examinó con un denominado ensayo Live/Dead®. Los geles con contenido en células se aclararon dos veces con solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS). Sobre los geles se aplicó durante 3 minutos una solución de 10 μ M de yoduro de probidio (PI) (Molekulare Probes, Invitrogen, Alemania) y 0,15 μ M de diacetato de fluoresceína (FDA) (Fluka, Alemania) en solución fisiológica de tampón fosfato (1XPBS), seguido de un lavado con 1XPBS. De las células se tomaron fotografías con un microscopio confocal (Leica SP5, 10x/04). Las fotografías se recogieron de todos los 5 μ m para un segmento de gel de 100 μ m de grosor y se representó la proyección de intensidad máxima (MIP) de las fotografías.

Antes de la tinción inmunológica, las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 minutos a la temperatura ambiente y se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA) al 0,25 % (Sigma-Aldrich, München, Alemania) y Triton-X100 al 1 % (Sigma-Aldrich, München, Alemania) en PBS). Seguidamente, se aplicó faloidina-CF488 (Biotrend, Alemania) durante 5 minutos en tampón de bloqueo. Después se aplicaron 0,1 μ g/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, München, Alemania) en 1XPBS durante 5 minutos seguido de 3 lavados de 15 minutos con el tampón. Las muestras se fotografiaron con un microscopio confocal (Leica SP5 63x/1.4-0.6).

La **Figura 13** muestra en **a)** a **f)** los resultados del ensayo de viabilidad y la estructura de fibroblastos humanos (HDFn) embutidos de neonatos en un hidrogel. La mezcla final en medio de cultivo celular completo contiene conjugado de KA5-PEG tipo estrella 5 mM y heparina de 14 kDa para las partes **a)** a **c)** y conjugado de KA7-PEG tipo estrella 2,5 mM y heparina de 14 kDa para las partes **d)** y **f)** de la **Fig. 13**. La concentración de las células era de 10^6 células por mol. Las partes **a)** y **d)** de la **Fig. 13** muestran fotografías al microscopio de campo amplio, escala 1 mm, de HDFn teñidos con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en el hidrogel. Las partes **b)** y **e)** de la **Fig. 13** muestran HDFn teñidos en el ensayo Live/Dead®. En este caso, la parte **b)** de la **Fig. 13** muestra una proporción de las células vivas de 99 \pm 1 %. Las partes **c)** y **f)** de la **Fig. 13** muestran filamentos de actina y el núcleo de HDFn, teñido con foloidina-CF488 y DAPI. Las partes **b)** y **c)**, así como las partes **e)** y **f)** de la **Fig. 13** muestran fotografías de escaneo con láser confocales al microscopio.

En resumen, se puede decir que mediante la matriz de hidrogel de acuerdo con la invención se posibilitan funciones biológicas tales como la no toxicidad para células humanas, la unión a proteínas y una degradabilidad enzimática

ajustable junto con propiedades físicas flexibles tales como ajustabilidad del tiempo de gelificación y comportamiento de flujo mediante variación de los oligosacáridos y péptidos (conjugados de péptido-PEG tipo estrella) y sus concentraciones y una capacidad de modificación química más amplia, puramente mediante interacciones no covalentes de los componentes de la matriz de hidrogel sin reacciones químicas cualesquiera durante la conformación del gel.

En particular, heparina es un glicosaminoglucano altamente sulfatado que se une a factores de crecimiento que se utilizan, por ejemplo, en el cultivo celular. Se han desarrollado hidrogeles no covalentes que se basan en heparina y péptidos que se unen a heparina, pero no son ajustables. Péptidos de unión a heparina preparados *de novo*, cuyas propiedades pueden ser modificadas mediante el ajuste de la longitud, resuelven este problema. Todos los péptidos que funcionan como es debido, preparados hasta ahora *de novo* son de más de 20 aminoácidos de longitud. Esto conduciría a problemas de síntesis cuando tengan que introducirse propiedades adicionales. Aquí se demostró la pluralidad de las propiedades del nuevo motivo péptido $(BA)_n$ configurado mediante el uso de un banco de péptido-PEG tipo estrella desarrollado para la formación no covalente de hidrogel. No solo el que estos péptidos pasen por modificaciones estructurales después de la unión a heparina, tal como se informa para péptidos de origen natural, también se trata de los péptidos de unión a heparina sintéticos más cortos que son conocidos de la bibliografía. La ajustabilidad del hidrogel no covalente con conjugados de $(BA)_n$ -PEG tipo estrella y heparina es sorprendente. Es posible ajustar la rigidez, el tiempo de gelificación y la estabilidad biológica y química solo mediante la modificación de la longitud, de la concentración o del tipo de aminoácido base del motivo péptido $(BA)_n$. De este modo, es posible modificar las propiedades conservando el contenido en sólidos, o modificar el contenido en sólidos y mantener estables las propiedades.

REIVINDICACIONES

1. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, para aplicaciones biotecnológicas que contiene un conjugado de polímero-péptido covalente, comprendiendo el conjugado de polímero-péptido covalente conjugados de dos o más péptidos que están acoplados a una cadena polimérica, y la secuencia peptídica contiene un motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo, en donde B es un aminoácido con cadena lateral cargada positivamente, A es alanina y n es un número de 5 a 20, caracterizada por que comprende un oligosacárido altamente cargado de forma negativa y la matriz de hidrogel está configurada en forma de un sistema de oligosacárido/péptido/polímero en el que el péptido está conjugado químicamente al polímero y el hidrogel se puede obtener por mezclado del conjugado de péptido-polímero y del oligosacárido.
2. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según la reivindicación 1, caracterizada por que la cadena polimérica es formada a partir de un polietilenglicol (PEG) lineal o de varios brazos.
3. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el oligosacárido altamente cargado de forma negativa es un oligosacárido sulfatado o fosforilado.
4. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según la reivindicación 3, caracterizada por que el oligosacárido altamente cargado de forma negativa se elige de un grupo de oligosacáridos que comprende heparina, sulfato de dextrano, sulfato de α -ciclodextrina, sulfato de β -ciclodextrina, sulfato de γ -ciclodextrina, fosfato de α -ciclodextrina, fosfato de β -ciclodextrina y fosfato de γ -ciclodextrina.
5. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que contiene, además, un grupo químico disociable bajo la luz entre la cadena polimérica y la secuencia peptídica, que contiene el motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo.
6. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que contiene, además, un enlazador químico sensible al pH entre la cadena polimérica y la secuencia peptídica, que contiene el motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo.
7. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que contiene, además, un enlazador enzimáticamente disociable entre la cadena polimérica y la secuencia peptídica, que contiene el motivo dipéptido $(BA)_n$ repetitivo.
8. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que presenta un módulo de elasticidad de al menos 10 Pa.
9. Matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que está configurada de forma esférica.
10. Asociación de una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 9, con células embutidas en la matriz de hidrogel de forma esférica o de forma no esférica.
11. Asociación según la reivindicación 10, caracterizada por que las células se eligen de un grupo que comprende células de mamíferos, células de insectos, células de bacterias y células de levaduras.
12. Uso de una asociación según la reivindicación 10 u 11, para la preparación de proteínas, en donde la proteína comprende anticuerpos monoclonales terapéuticos.
13. Cápsula para la liberación preestablecida de reactivos terapéuticos, caracterizada por que los reactivos terapéuticos están encapsulados junto con una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 8 o junto con una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, esférica según la reivindicación 9.
14. Composición a base de una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, según una de las reivindicaciones 1 a 8 y productos químicos y reactivos terapéuticos, caracterizada por que en el hidrogel terapéutico se genera un gradiente de los productos químicos y reactivos.
15. Sistema híbrido a base de una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, no esférica según una de las reivindicaciones 1 a 8 y de una matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, esférica según la reivindicación 9, caracterizado por que la matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, no esférica y la matriz de hidrogel no covalente, auto-organizante, esférica presentan en cada caso una composición química diferente, y un componente del sistema híbrido puede ser regulado mediante irradiación con luz, mediante degradación química selectiva o mediante digestión enzimática.

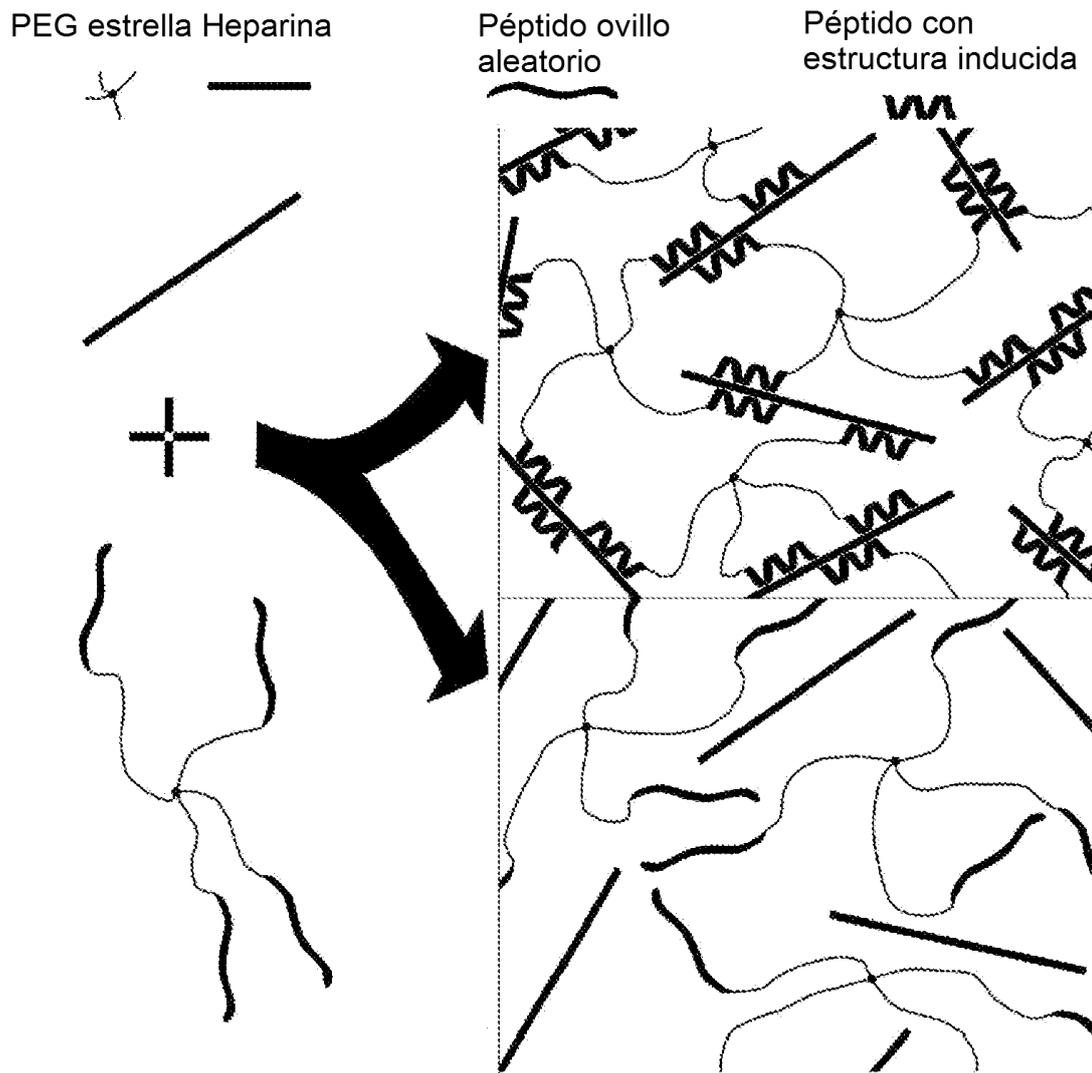


Fig. 1

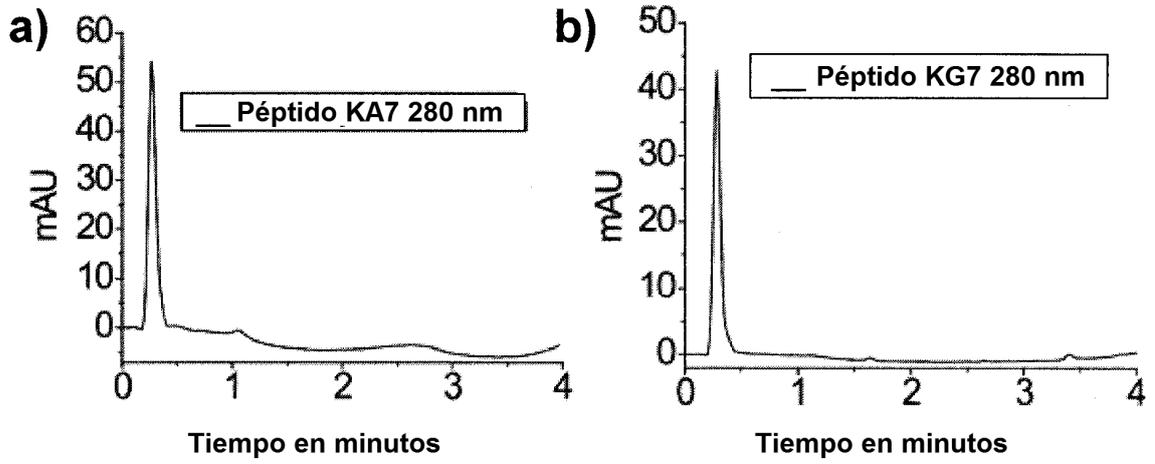


Fig. 2

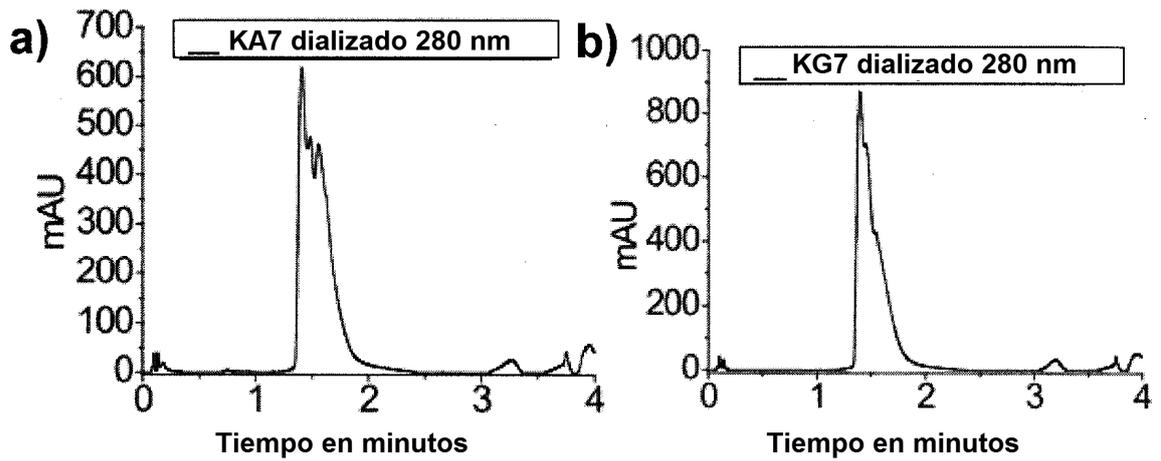
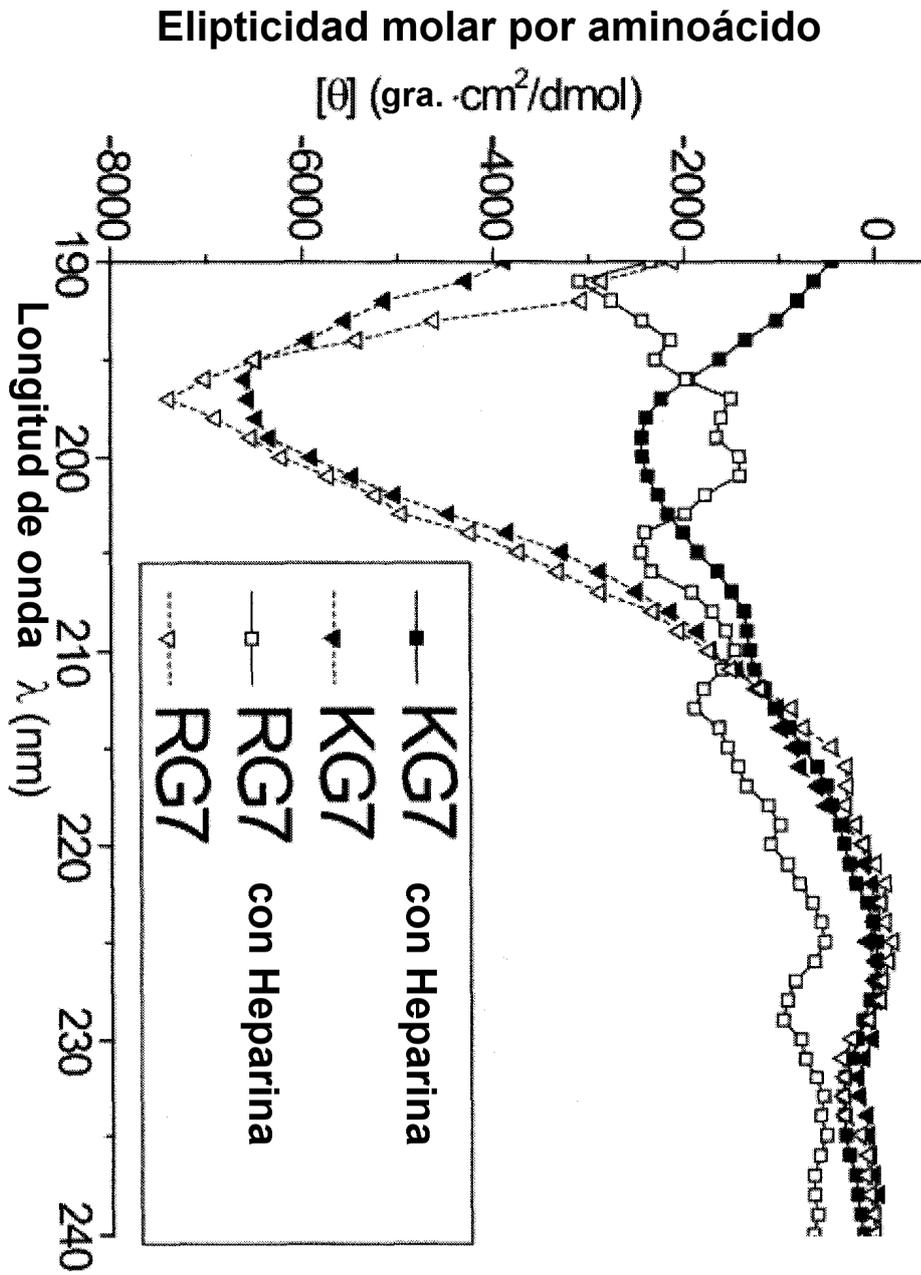


Fig. 3

Fig. 4a



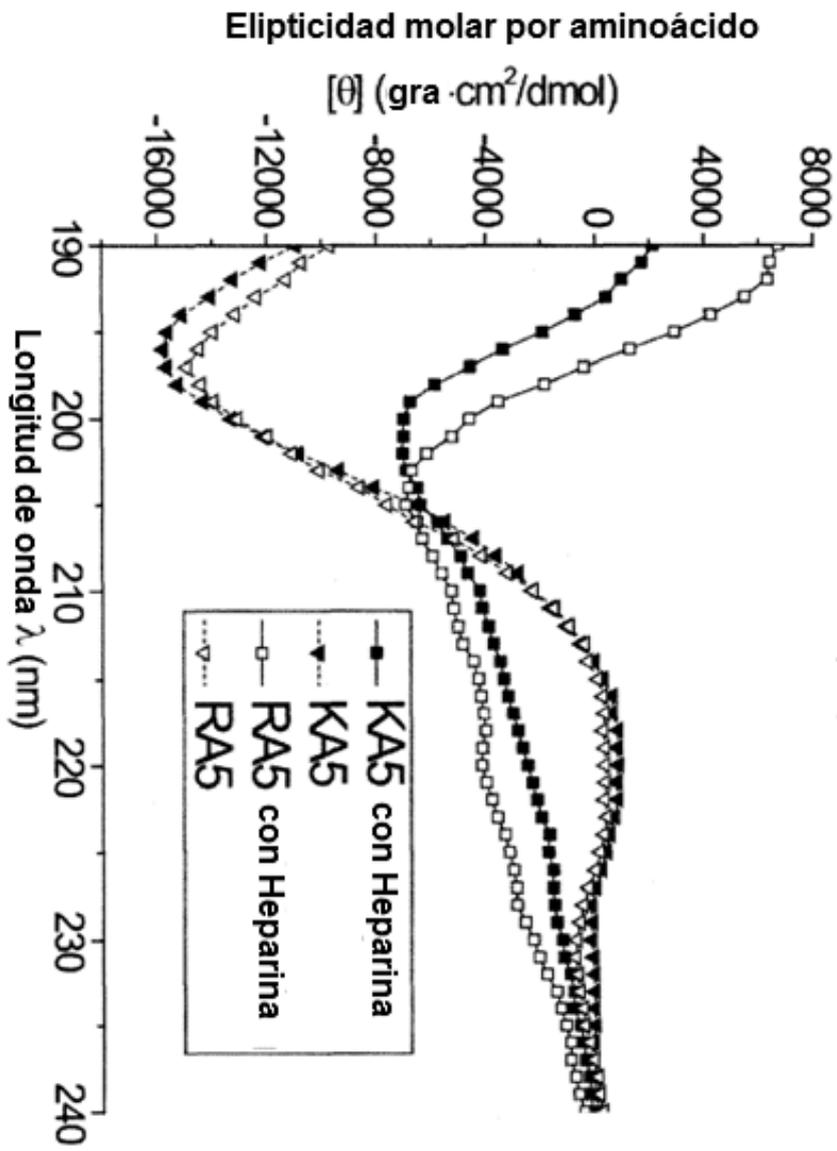


Fig. 4b

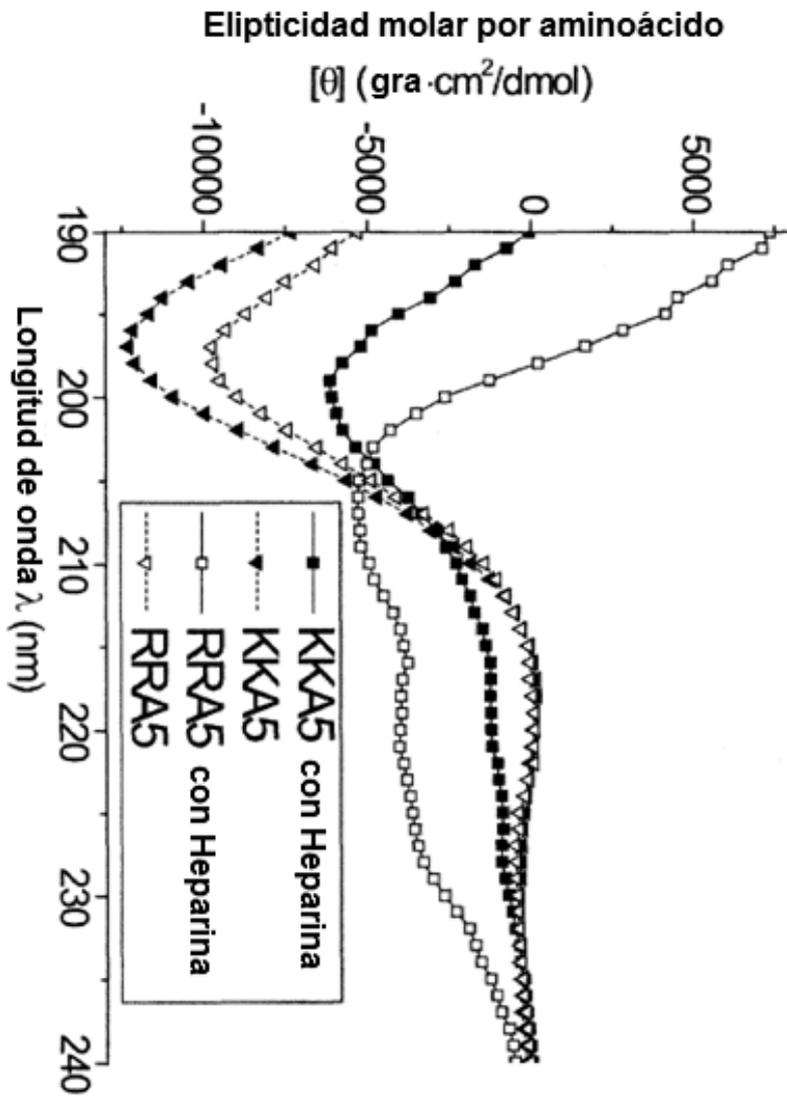


Fig. 4c

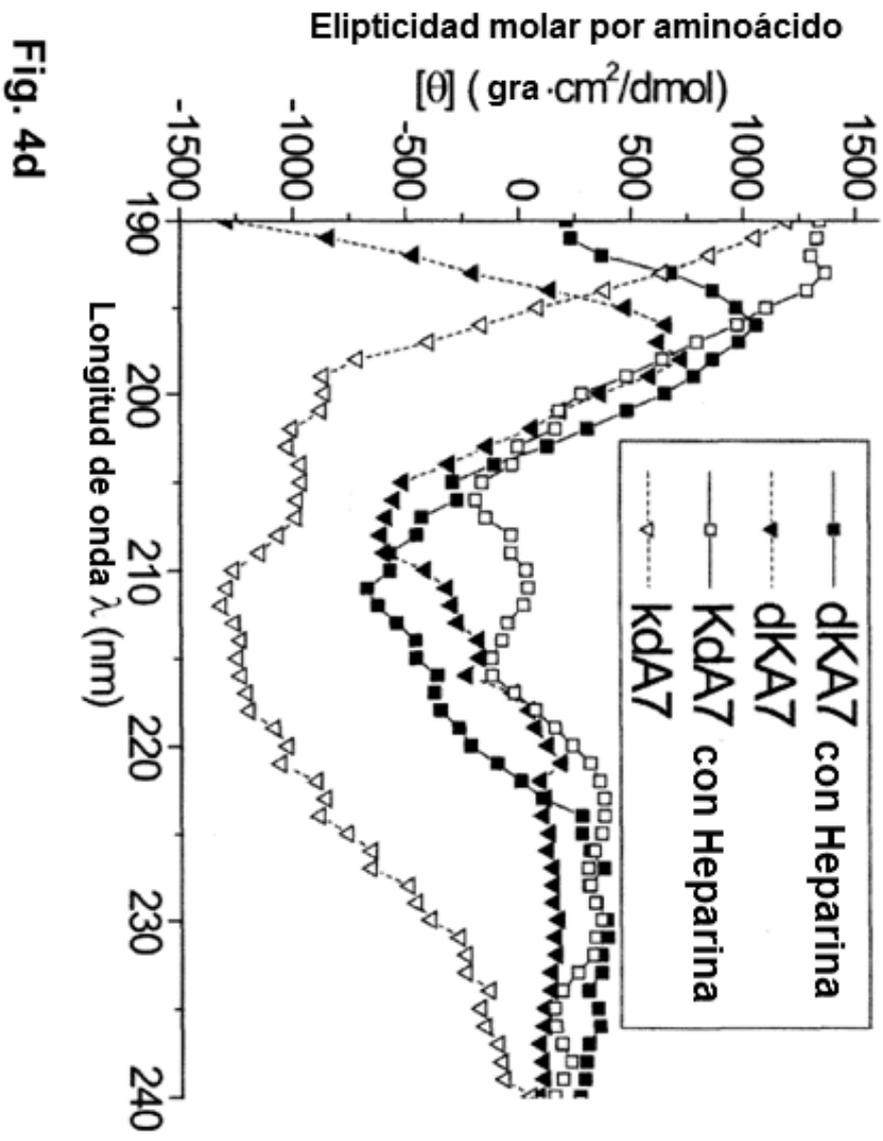


Fig. 4d

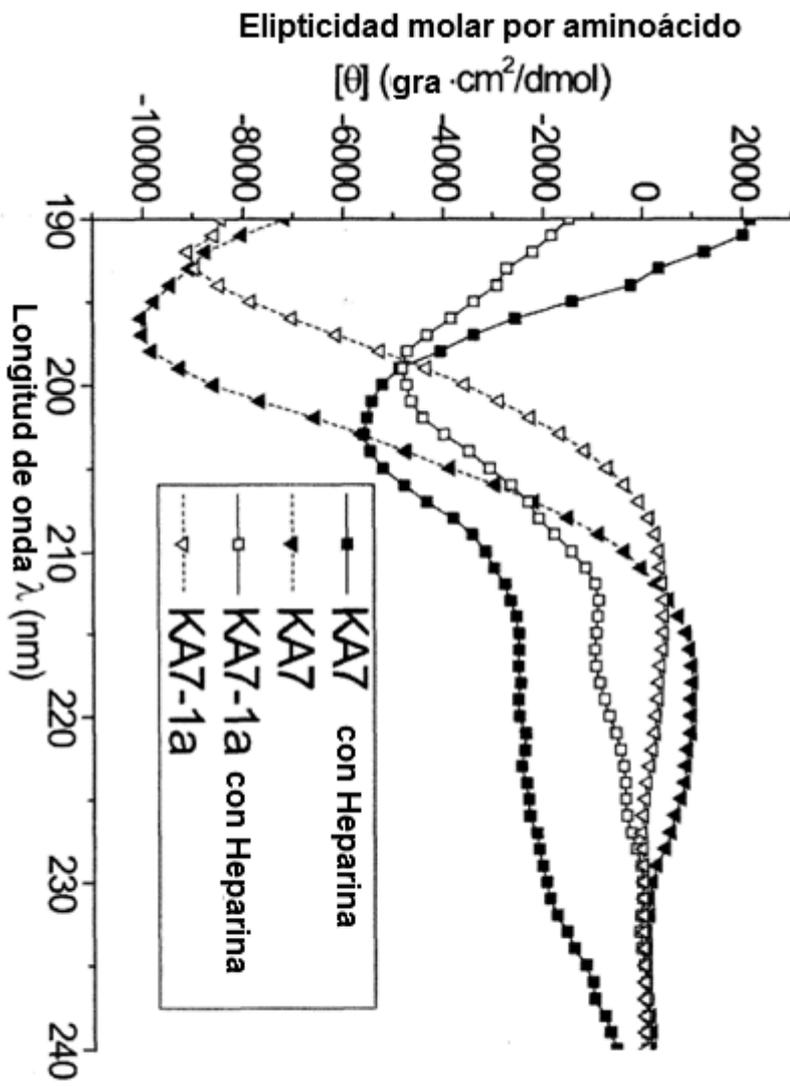


Fig. 4e

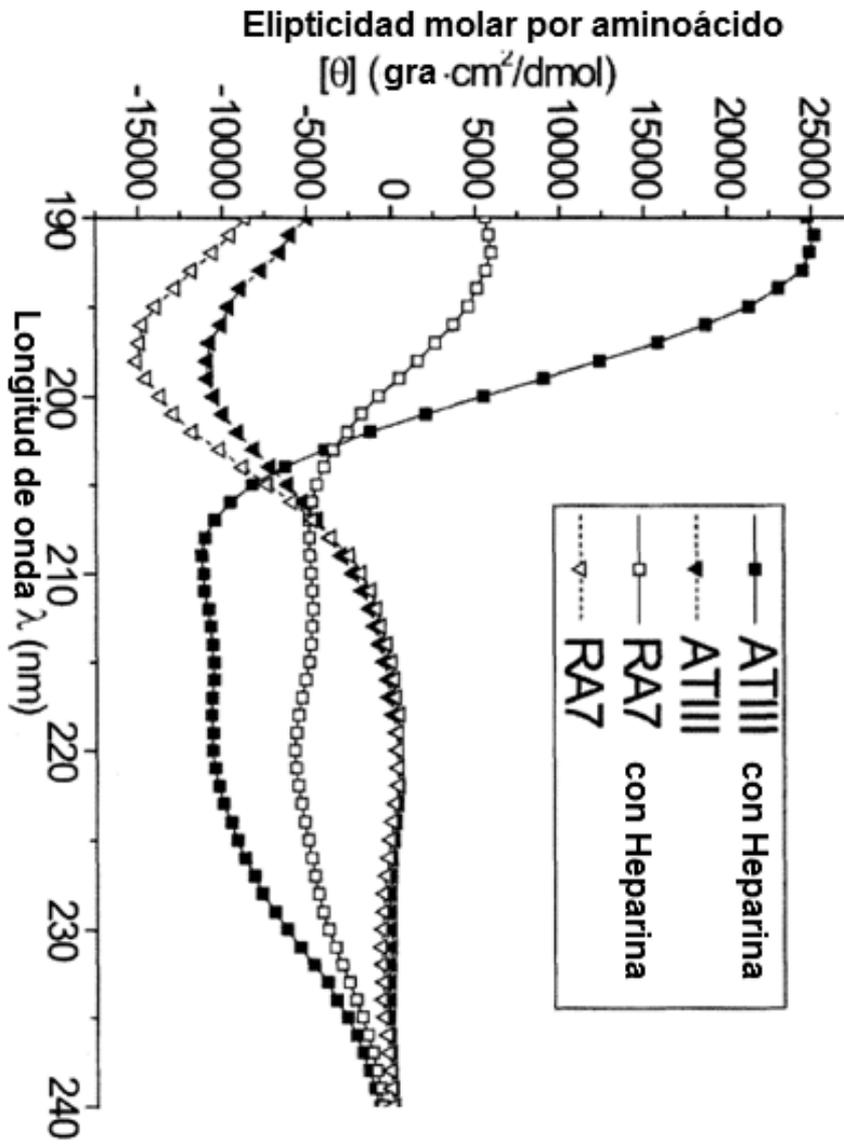


Fig. 4f

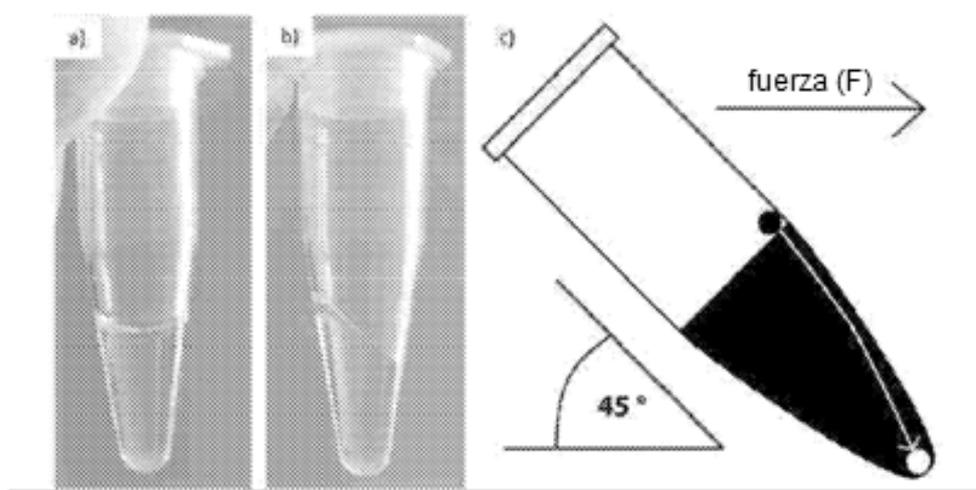


Fig. 5

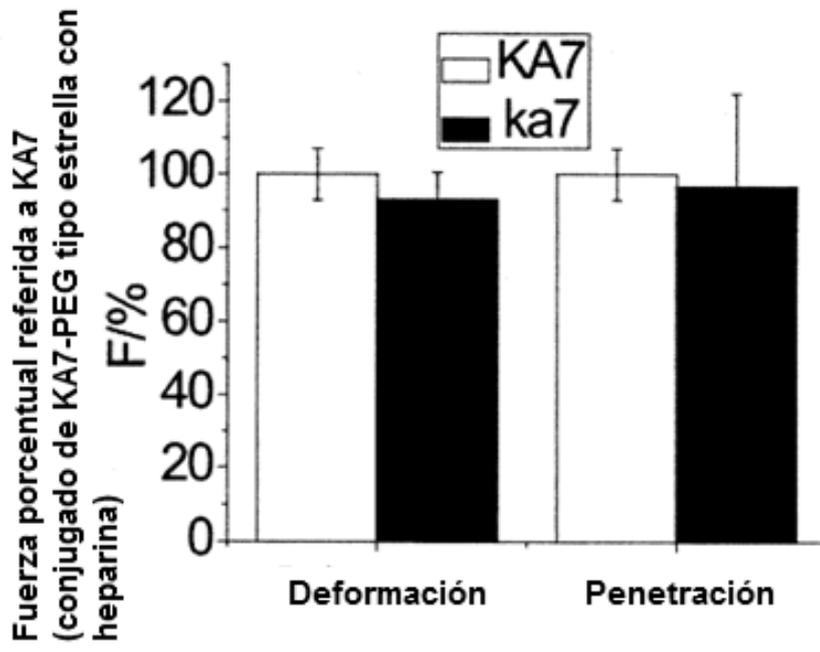


Fig. 6

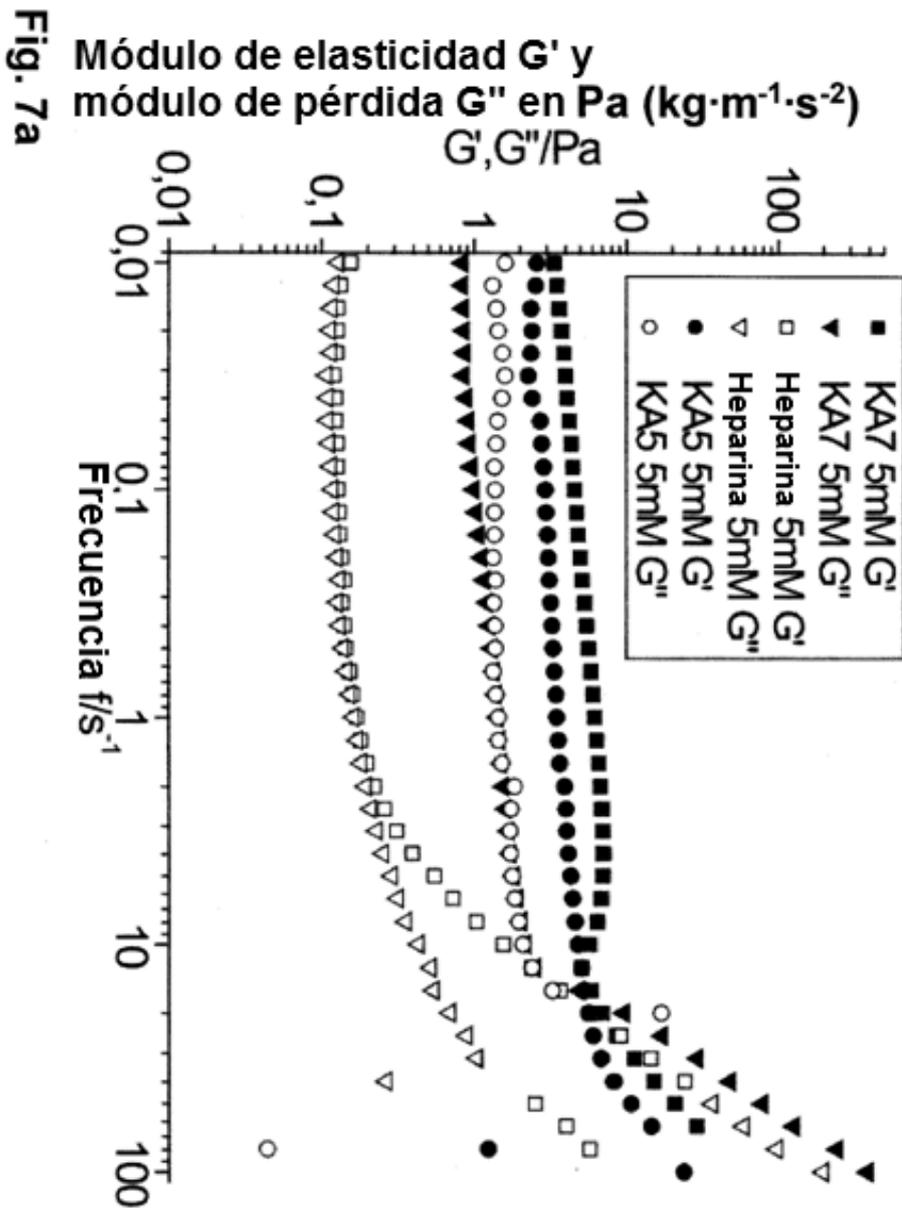
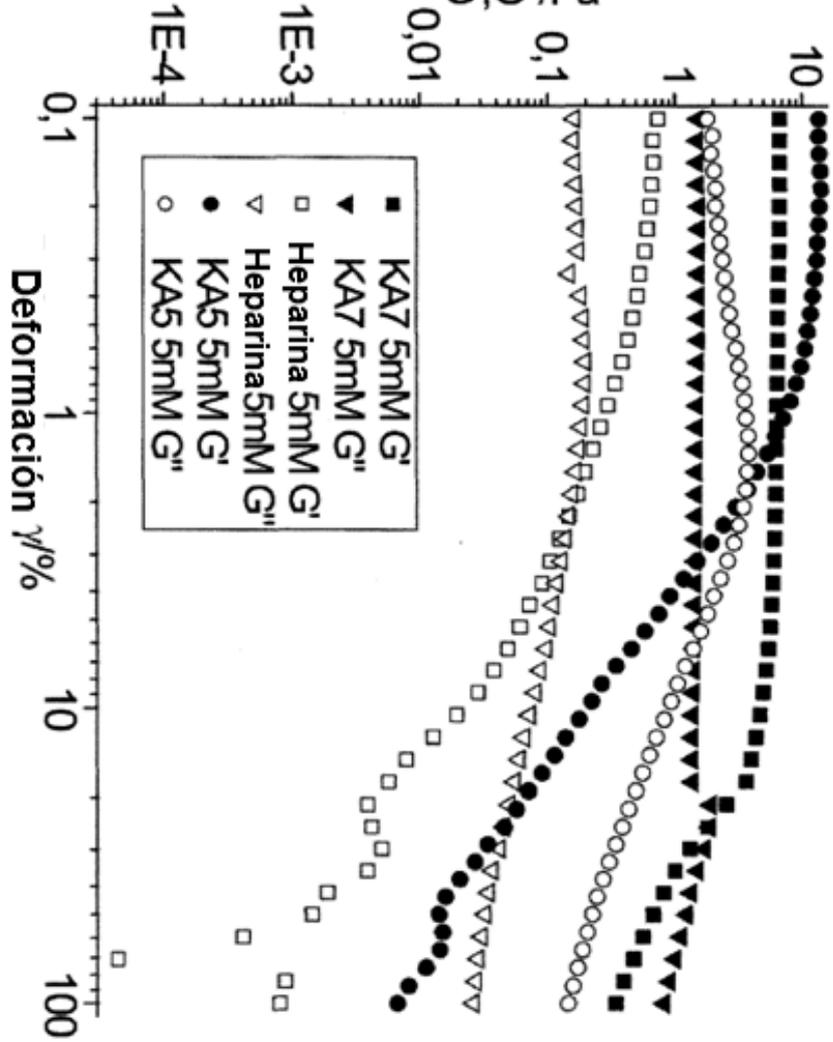


Fig. 7b

Módulo de elasticidad G' y
 'módulo de pérdida G'' en Pa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$)
 $G', G''/\text{Pa}$



Módulo de elasticidad G' y
 módulo de pérdida G'' en Pa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$)

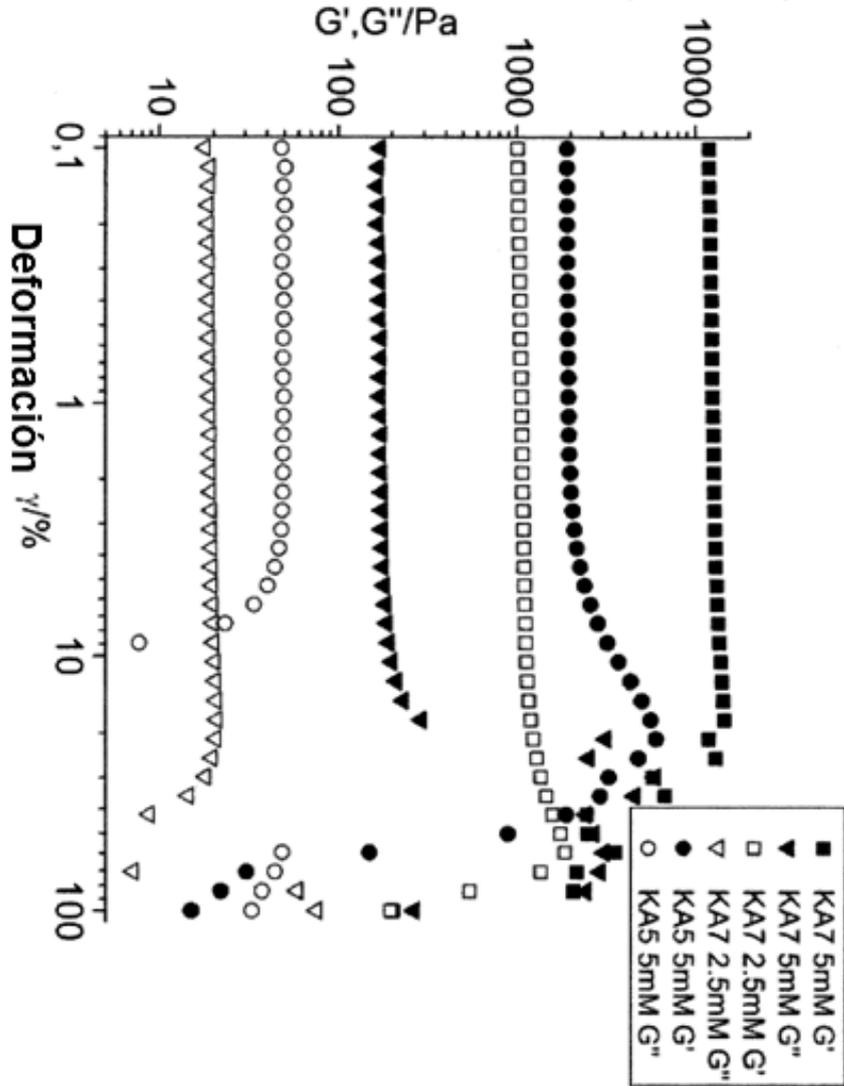
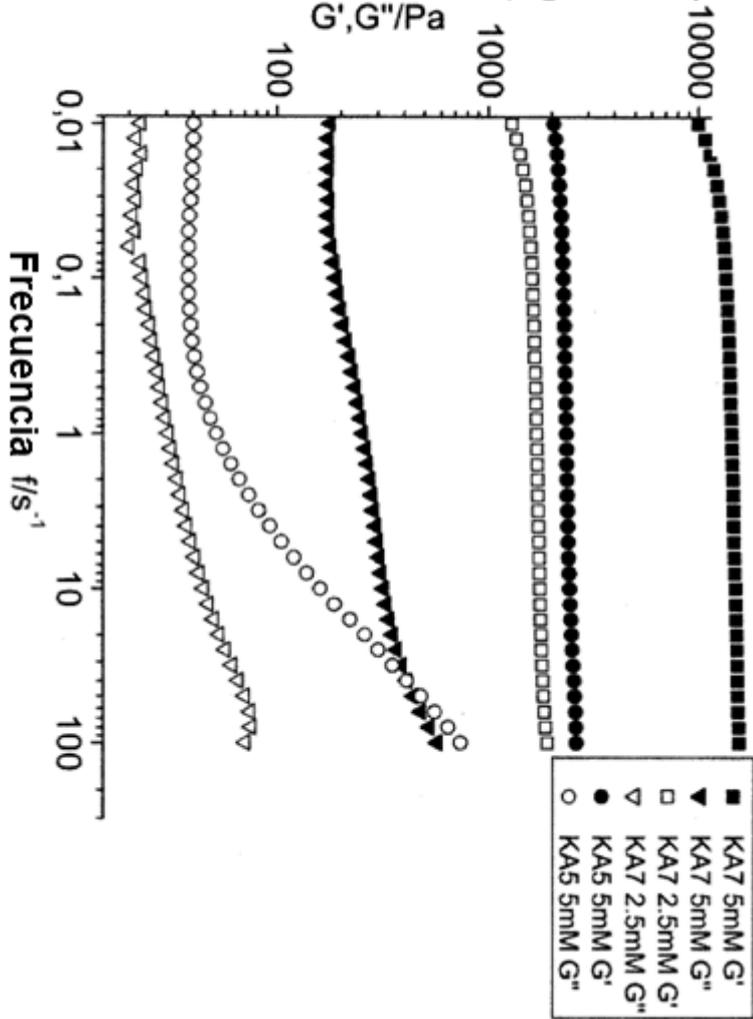


Fig. 7c

Fig. 7d Módulo de elasticidad G' y módulo de pérdida G'' en Pa ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$)



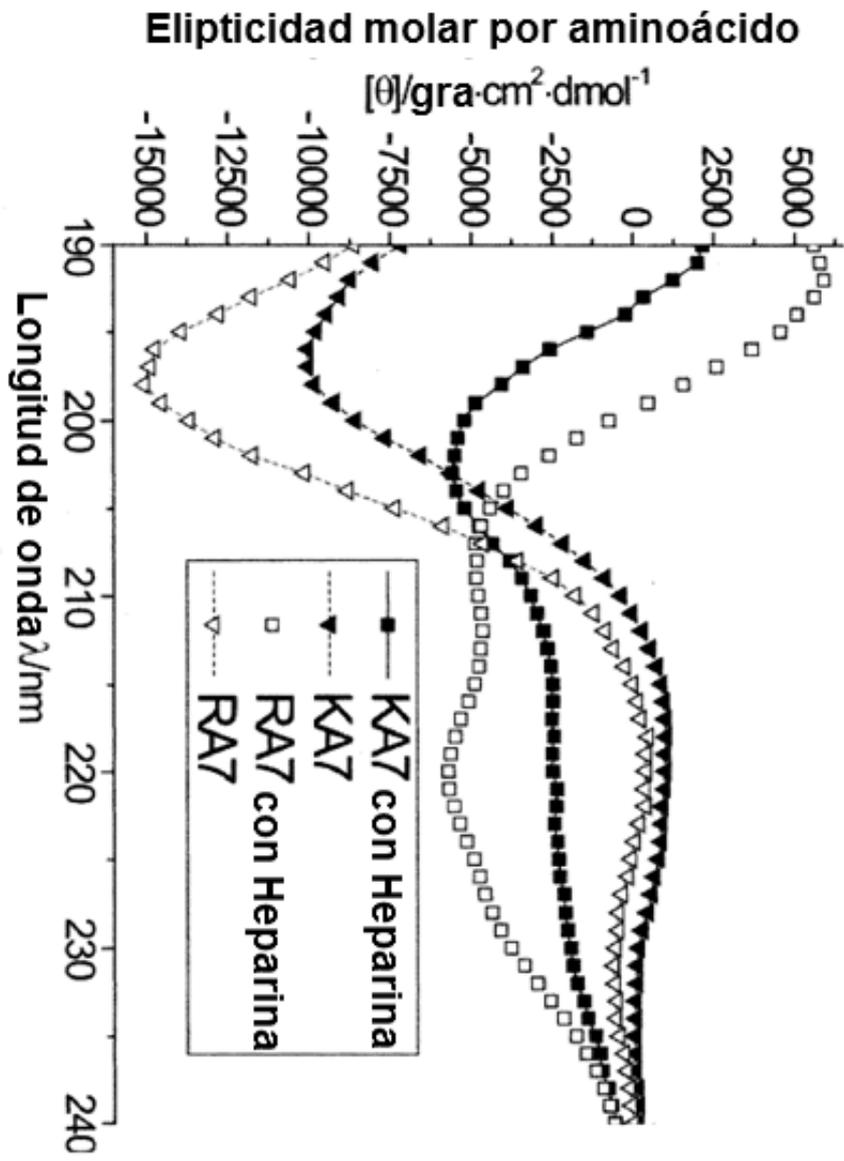
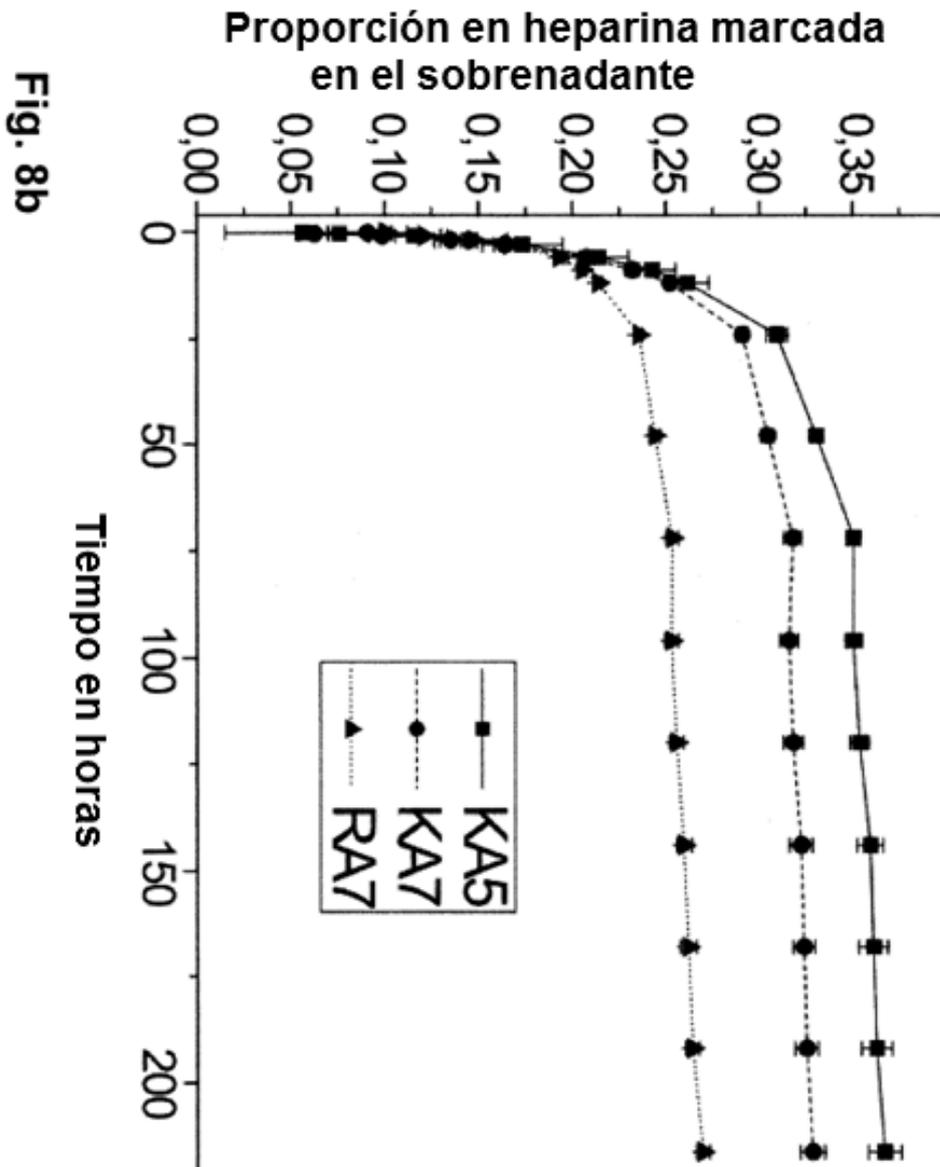


Fig. 8a



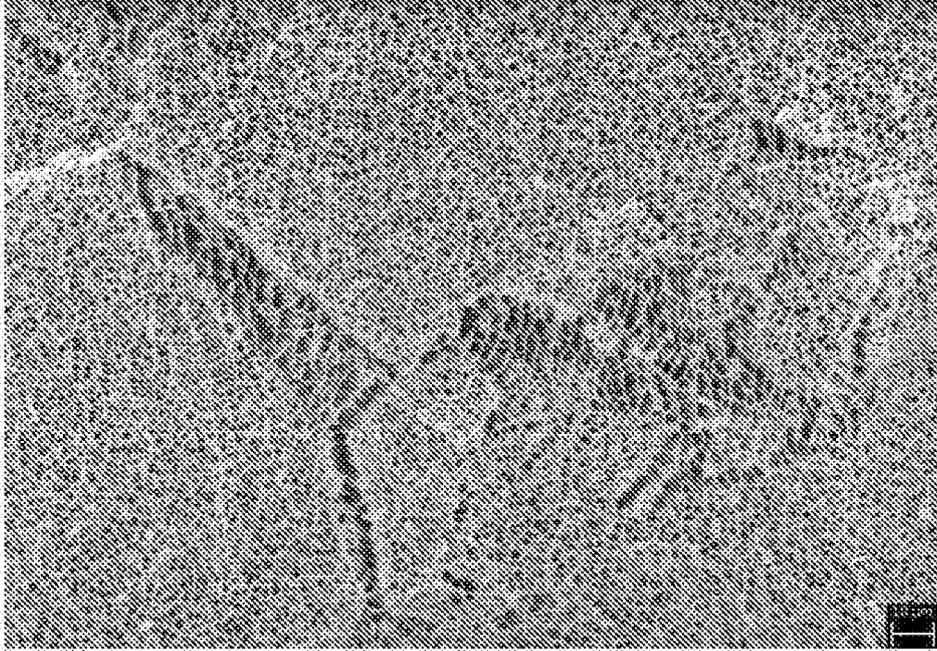


Fig. 9

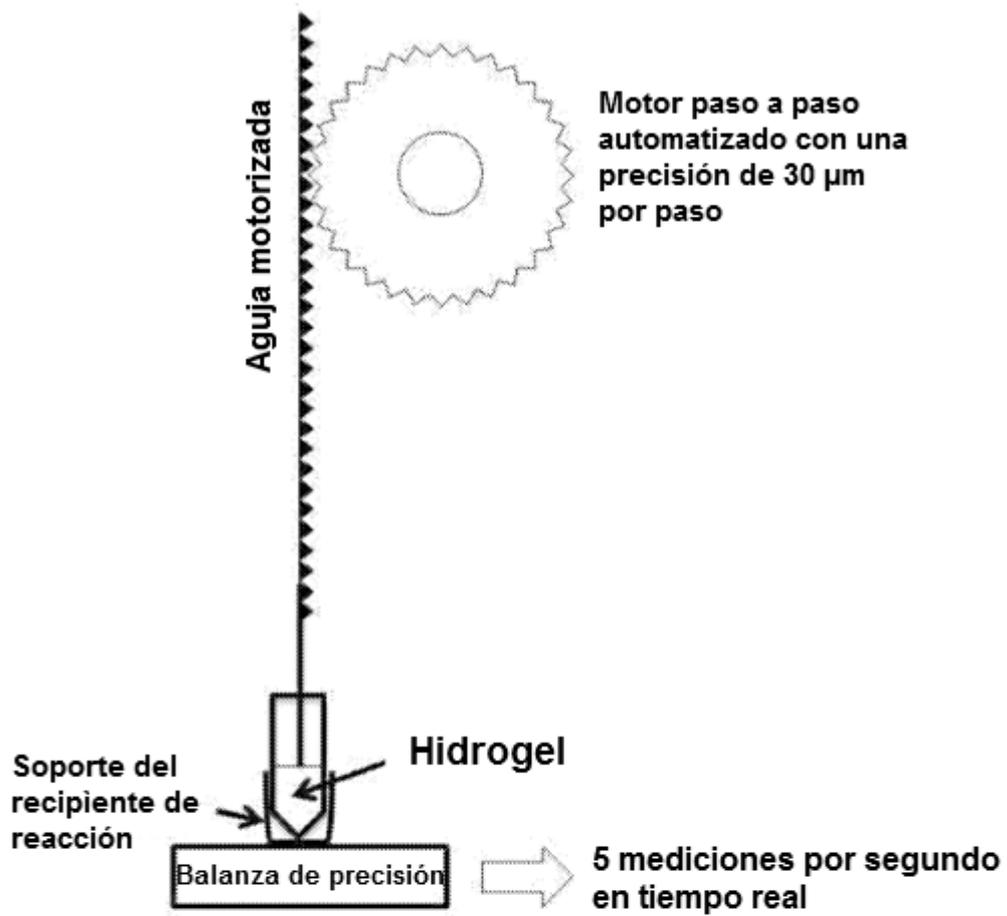


Fig. 10

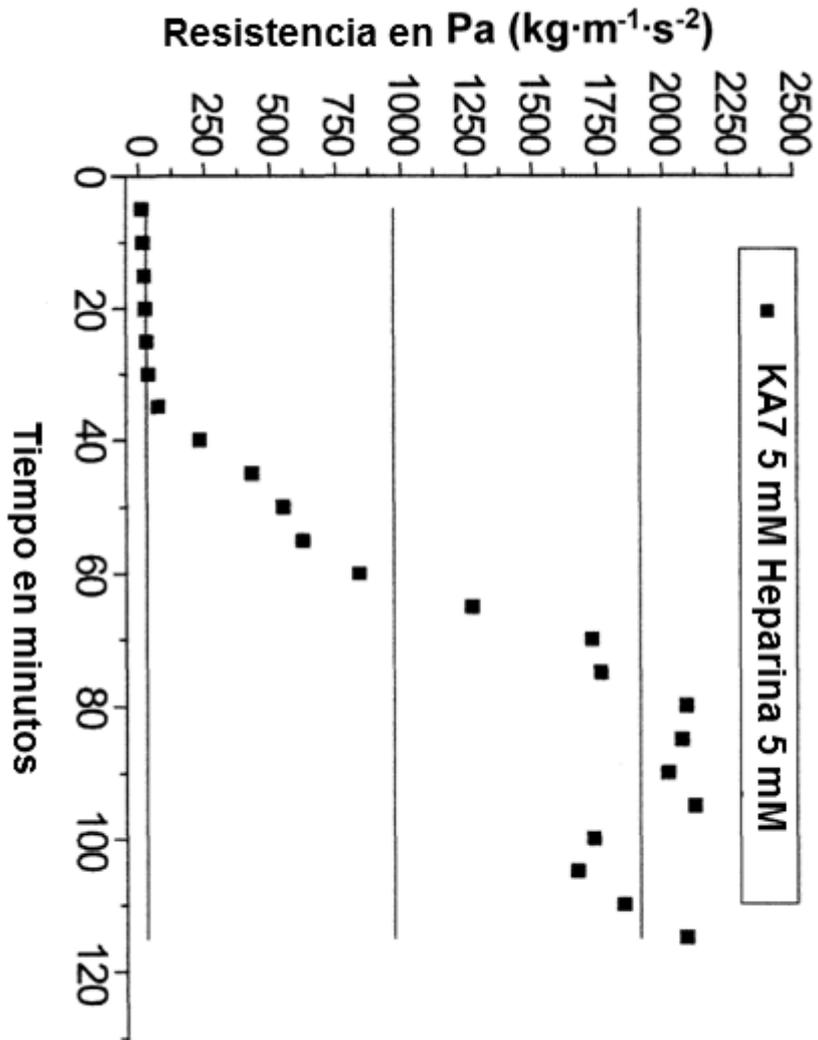


Fig. 11a

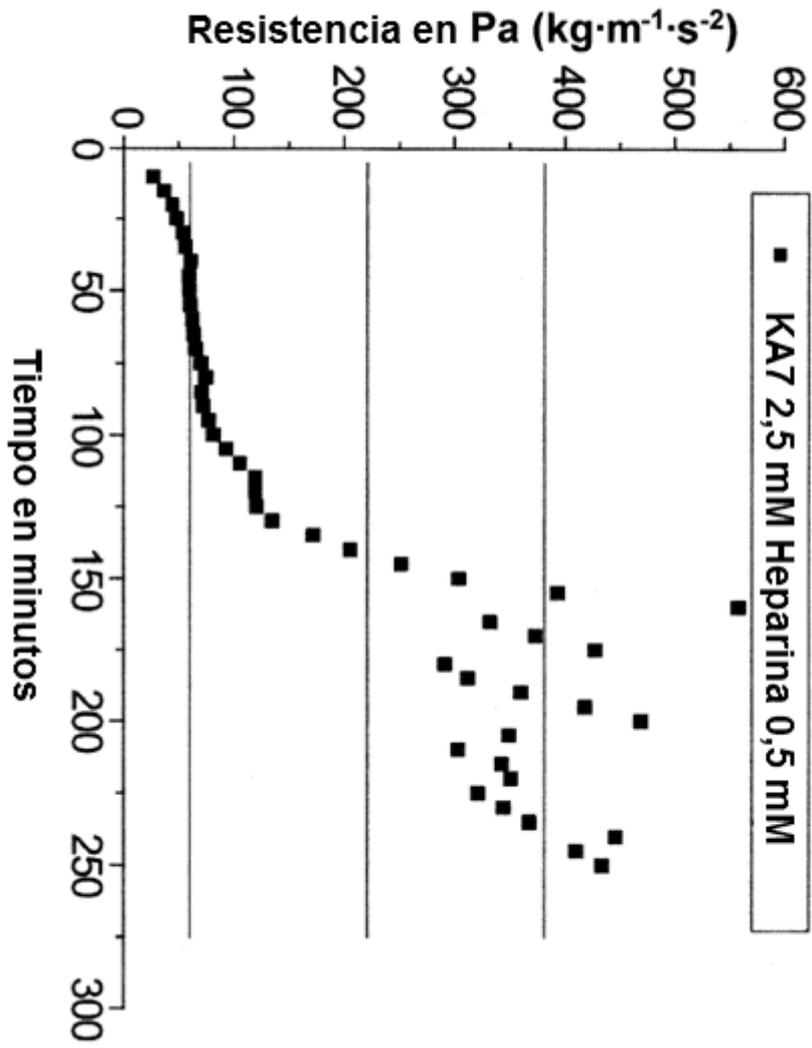


Fig. 11b

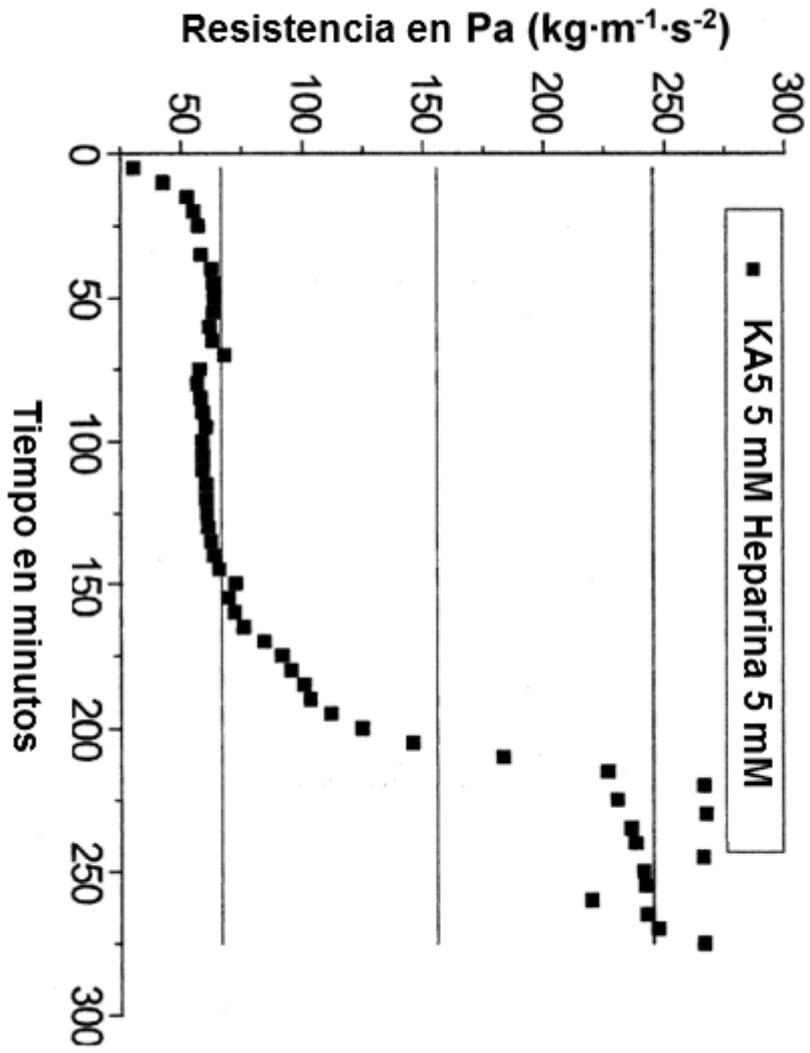


Fig. 11c

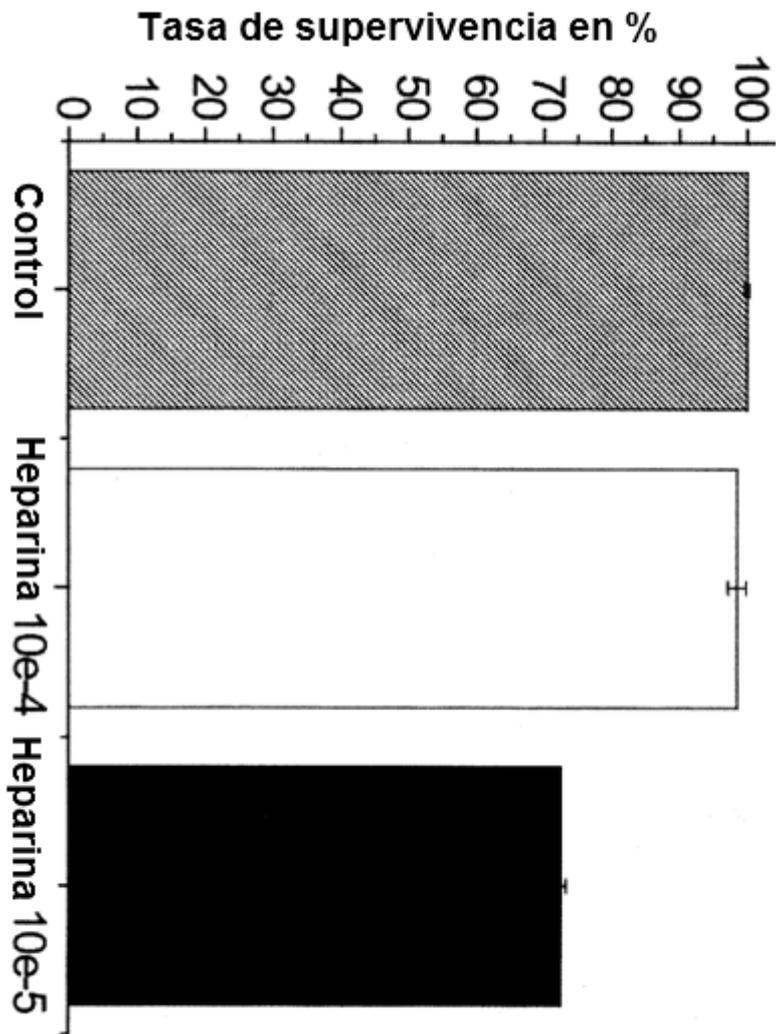


Fig. 12a

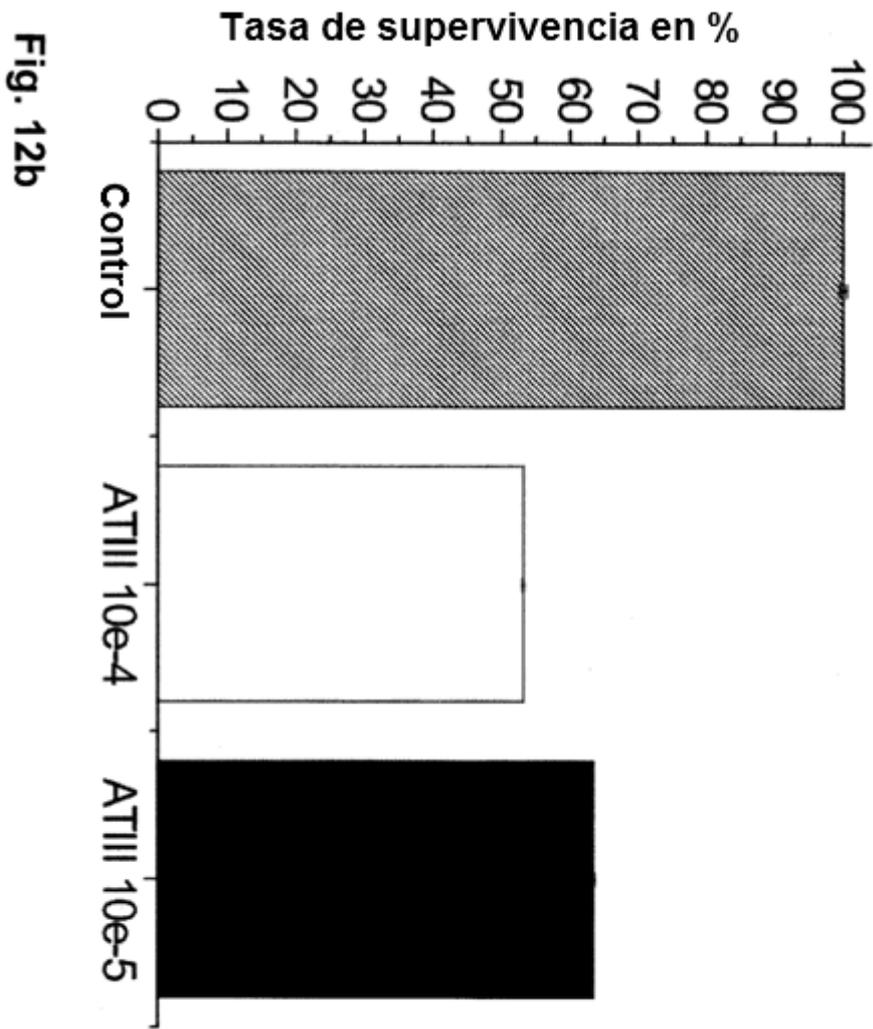
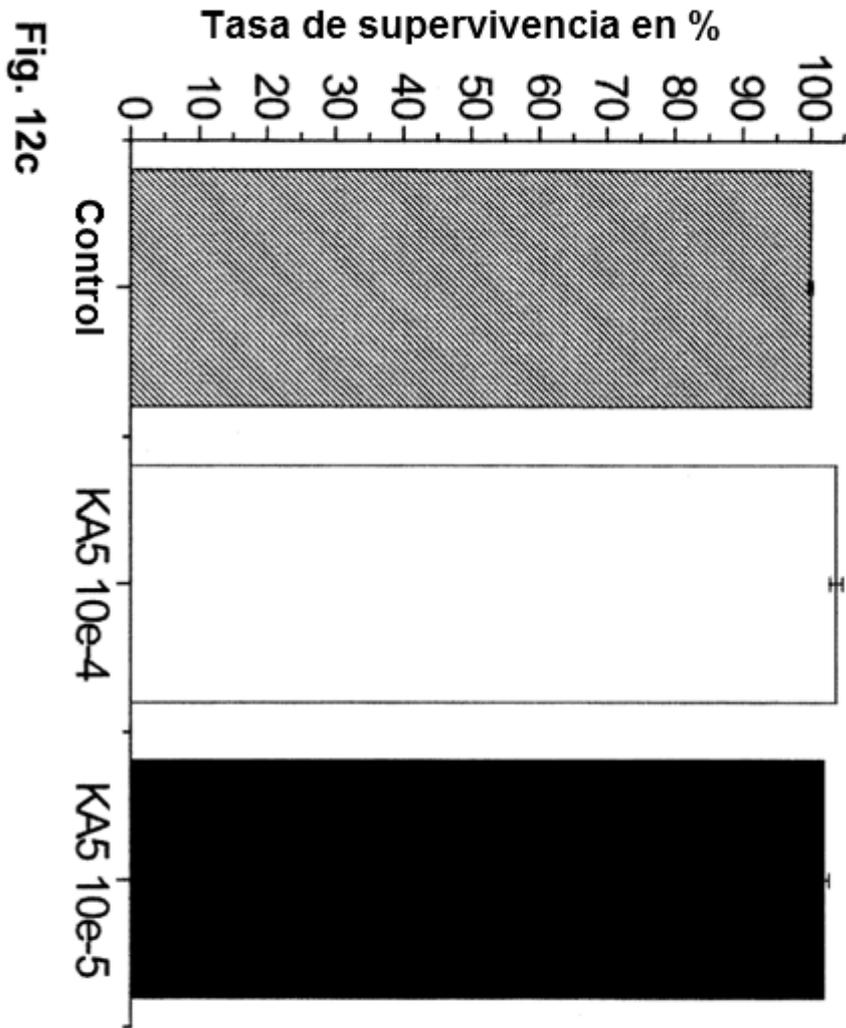


Fig. 12b



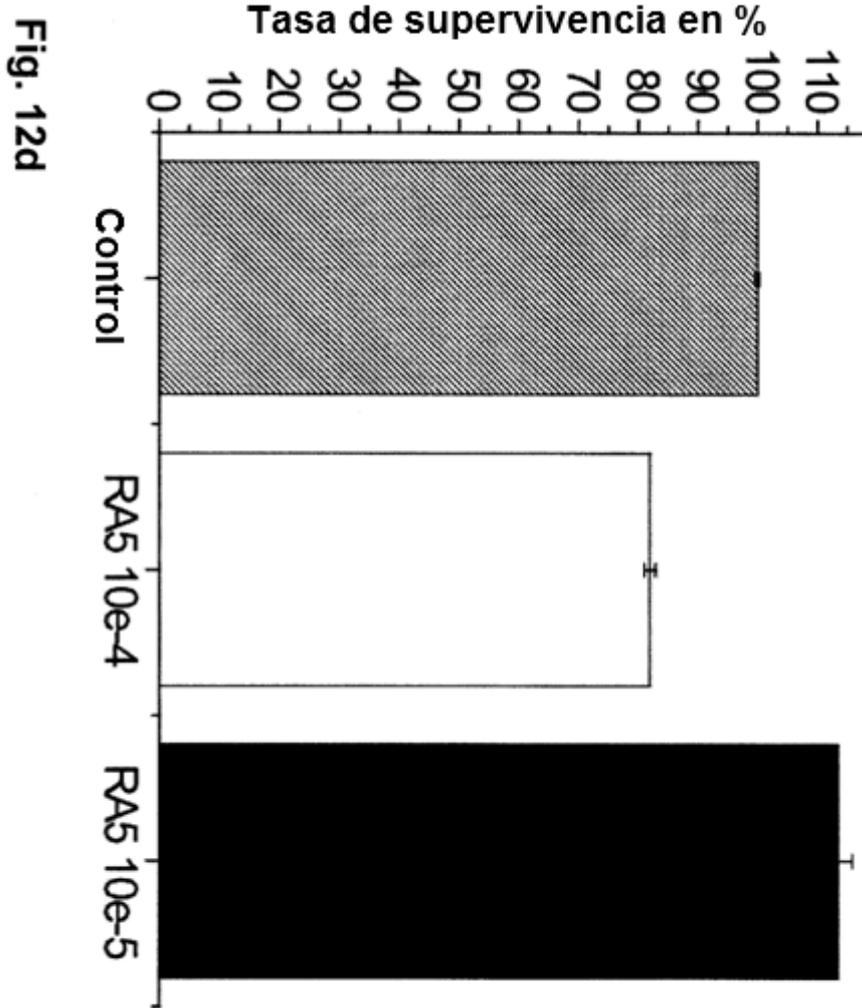
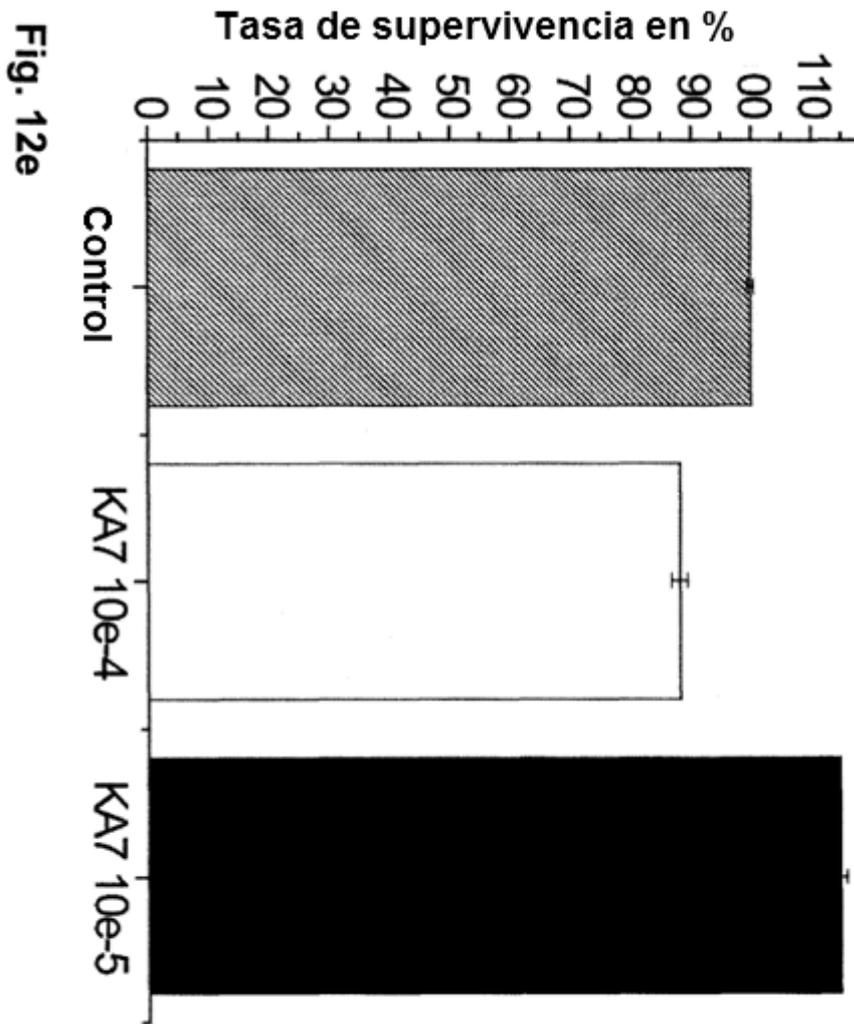


Fig. 12d



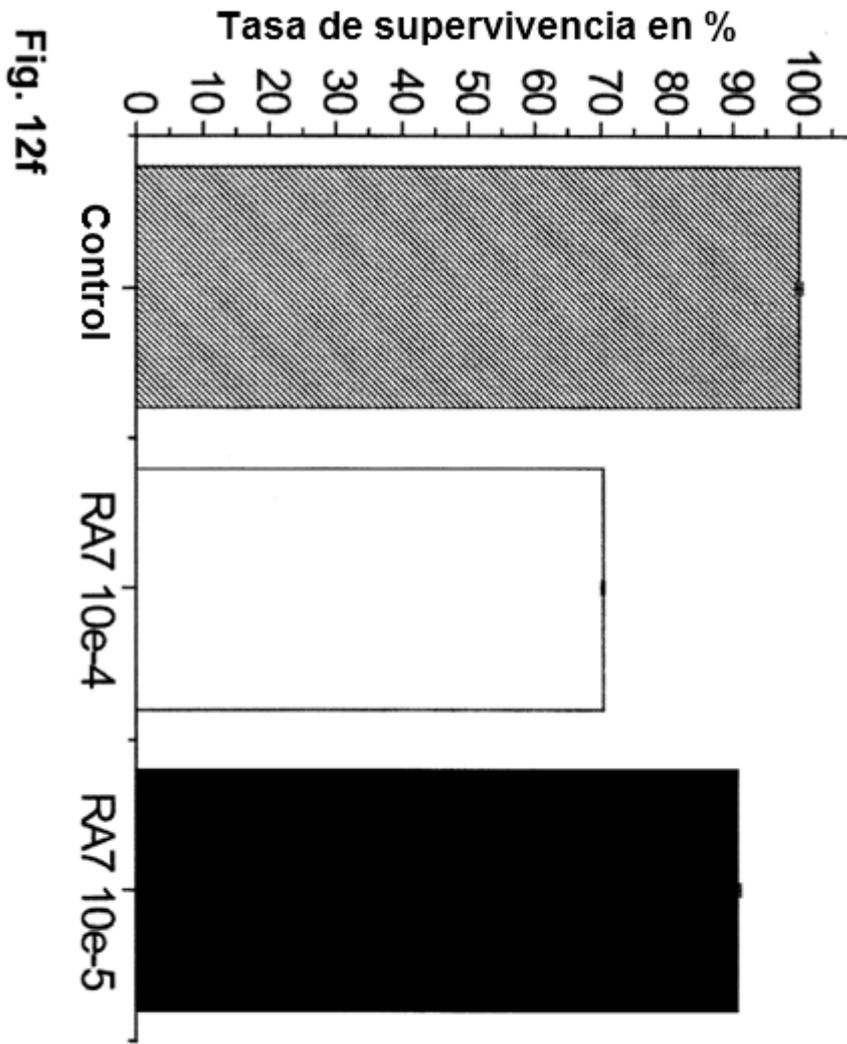


Fig. 12f

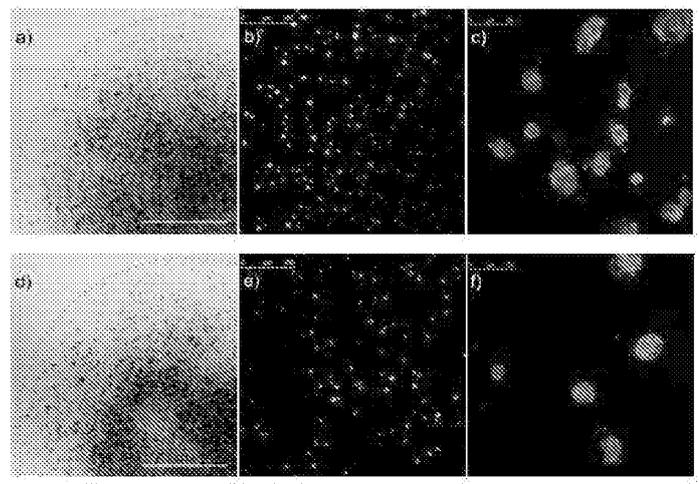


Fig. 13