

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 125**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 17/02** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61L 15/00** (2006.01)

**C12N 11/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007 E 14185394 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2860194**

54 Título: **Péptidos autoensamblantes modificados**

30 Prioridad:

**26.09.2006 US 847303 P**

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

**15.04.2019**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)  
77 Massachusetts Avenue  
Cambridge, MA 02139-4307, US**

72 Inventor/es:

**HORII, AKIHIRO;  
ZHANG, SHUGUANG;  
WANG, XIUMEI y  
GELAIN, FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 709 125 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

Péptidos autoensamblantes modificados

**Información de prioridad**

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 60/847.303, presentada el 26 de septiembre de 2006.

**Antecedentes de la invención**

10 La matriz extracelular (MEC) está compuesta por un conjunto diverso de macromoléculas, que incluyen tanto proteínas como polisacáridos, que forman el ambiente tridimensional en el que existen las células en el organismo y constituye el material que rellena el espacio entre las células. La MEC también puede estar organizada en una capa de tipo laminar conocida como la lámina basal o la membrana basal. En muchas regiones del organismo, la membrana basal se encuentra por debajo de capas o tubos de células epiteliales (por ejemplo, células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos) o rodea a células individuales de diversos tipos, tales como células musculares, que en ocasiones sirven para separar capas de células entre sí o del tejido conectivo adyacente.

15 La MEC consiste principalmente en moléculas que se secretan localmente y se ensamblan en una matriz que estabiliza y soporta la estructura física de las capas de células y tejidos. Sin embargo, en lugar de ser simplemente un sustrato inerte para que se adhieran las células, la MEC constituye un ambiente que es rico en información biológica. Se reconoce que la MEC y diversas biomoléculas asociadas con esta (por ejemplo, biomoléculas secretadas localmente o transportadas a un sitio concreto desde otra parte), ejercen una influencia significativa en muchos aspectos del comportamiento y el fenotipo celular, regulando procesos tales como la migración y la proliferación, influenciando el desarrollo y la diferenciación celular y afectando a la forma y la función celular. La estructura de la MEC se ve, a su vez, influenciada por las células dentro de la misma. Estas células no solo secretan muchos constituyentes de la MEC, sino que también ayudan a establecer un patrón en la matriz. Por lo tanto, resulta evidente que las interacciones entre células-MEC son de vital importancia.

20 Aunque se ha reunido una gran cantidad de información biológica útil a partir de experimentos efectuados en células cultivadas en sustratos de cultivo tisular tradicionales, tales como vidrio o plástico, hay un interés creciente en desarrollar sistemas de cultivo y materiales que puedan reflejar de manera más precisa el ambiente celular nativo. Dichos materiales tendrán uso no solo para cultivo celular, sino también para la reparación tisular y la ingeniería de tejidos, tal como para cultivar células, tejidos y/u órganos artificiales o para su uso en biorreactores a base de células para la producción de biomoléculas.

30 Muchos esfuerzos anteriores para desarrollar dichos sistemas han implicado el uso de materiales, tales como proteínas y péptidos obtenidos de fuentes animales. Sin embargo, estos materiales tienen una serie de desventajas en comparación con los materiales sintéticos. Por ejemplo, presentan un riesgo aumentado de transmisión de enfermedades. Incluso cuando se recogen en condiciones supuestamente estériles, hay un riesgo significativo de contaminación. En caso de que se usen fuentes animales, hay una preocupación acerca de la inmunogenicidad en caso de que los materiales se introduzcan posteriormente en el cuerpo humano, tal como para la reparación de tejidos o como componentes en órganos artificiales. Además, puede ser difícil asegurar que las diferentes preparaciones del material tienen una composición consistente y reproducible.

35 Incluso cuando es posible lograr una consistencia en lo relativo a los componentes conocidos de un material aislado de una fuente natural, es difícil o imposible asegurar la exclusión de componentes desconocidos y/o no identificados que puedan afectar a las propiedades celulares. Asimismo, durante la recogida, el procesado y/o la reconstitución, el material puede dañarse y/o degradarse, por tanto reduciendo potencialmente la fidelidad con la que se replican en el ambiente celular natural.

40 Otra estrategia para el desarrollo de materiales que podrían imitar el ambiente de la MEC proporcionada es producir varios constituyentes de la MEC mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, pueden introducirse construcciones de expresión que codifican proteínas de la MEC en células procariontas o eucariotas y puede purificarse la proteína de interés a partir de las células o a partir del medio, en el caso de proteínas secretadas. Las proteínas pueden combinarse *in vitro* en las proporciones deseadas. Aunque posiblemente se reduzca la probabilidad de transmisión de enfermedades, esta estrategia también adolece de varias desventajas. Por ejemplo, en los casos en los que las proteínas se fabrican mediante un procedimiento biológico en lugar de uno puramente sintético, sigue habiendo la posibilidad de que haya presentes componentes no identificados del sistema de cultivo, incluso en las preparaciones altamente purificadas. Además, la purificación puede ser laboriosa y costosa y puede dar como resultado la degradación o desnaturalización de la proteína.

45 Aunque la MEC natural consiste en gran medida en proteínas y proteoglicanos, se han efectuado esfuerzos significativos en el desarrollo de materiales de cultivo celular y de ingeniería de tejidos a base de polímeros sintéticos no basados en aminoácidos. Por ejemplo, se han empleado ampliamente hidroésteres alifáticos para diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos. Entre los materiales completamente sintéticos normalmente usados se encuentran el ácido poliglicólico (PGA), el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), el polietilenglicol (PEG), el

poli(propilenglicol) y diversos copolímeros de estos y otros compuestos. Sin embargo, estos materiales también adolecen de una serie de desventajas. Por ejemplo, forman fibras con diámetros en el orden de decenas de micrómetros y estos procedimientos requieren de la introducción de las células en matrices formadas por dichos materiales y no son fácilmente compatibles con los requisitos fisiológicos de viabilidad celular.

- 5 Zhang y col. (Seminars in Cancer Biology 2005, 15:413-420) y Zhang y col. (Reactive & Functional Polymers 1999, 41:91-102) describen dominios de péptidos autoensamblantes. El documento WO 2005/014615, Genove y col. (Biomaterials 2005, 26:3341-3351) y Hucknall (2005, tesis de máster, Massachusetts Institute of Technology) describen péptidos autoensamblantes funcionalizados. El documento WO 2006/076042, Bellamkonda y col. (J. Neurosci. Res. 1995, 41:501-509), el documento WO 01/85180, Cui y col. (J. Bioactive & Compatible Pol. 2003, 18:413-432) y Caplan y col. (Biomaterials 2002, 23:219-227) se refieren a hidrogeles y matrices de péptidos autoensamblantes funcionalizados. Sigue habiendo necesidad de composiciones y materiales sintéticos con fines de cultivo celular y de ingeniería de tejidos que puedan permitir la creación de un ambiente que imite el ambiente celular nativo, pero sin las desventajas asociadas con los materiales procedentes de fuentes naturales. Por ejemplo, sería deseable desarrollar un material que pueda proporcionar estímulos biológicamente relevantes a células similares a los proporcionados por los componentes naturales de la MEC. Para las aplicaciones que impliquen el implante en el organismo, sigue habiendo una necesidad especial de dichas composiciones y materiales que no provoquen o que provoquen una respuesta inmunitaria o inflamatoria mínima y de composiciones y materiales que puedan degradarse dentro del organismo. Además, sigue habiendo necesidad en la técnica de composiciones y materiales que puedan influenciar las propiedades y funciones celulares de maneras deseables.

## 20 **Sumario de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Es posible modificar péptidos autoensamblantes incorporando un dominio adicional que no se autoensambla, mientras que se sigue permitiendo el ensamblaje de la porción autoensamblante. El dominio adicional puede conferir una serie de propiedades al péptido resultante. En ciertas realizaciones, el péptido resultante se autoensambla para formar nanofibras, láminas beta y/o una estructura macroscópica. Los materiales formados mediante el autoensamblaje de los péptidos tienen una gran variedad de usos, particularmente en las áreas de cultivo celular, la ingeniería de tejidos y la reparación de tejidos.

En un primer aspecto, la presente invención incluye una composición para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15. Se desvela un péptido autoensamblante que comprende: (a) un primer dominio de aminoácidos que media el autoensamblaje, en el que el dominio comprende aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternos que son complementarios y estructuralmente compatibles y se autoensamblan en una estructura macroscópica cuando se presentan en forma no modificada; y (b) un segundo dominio de aminoácidos que no media el autoensamblaje en forma aislada, en el que el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos una secuencia mínima biológicamente activa. Dichos péptidos autoensamblantes se describen en el presente documento como "péptidos autoensamblantes modificados".

35 El segundo dominio de aminoácidos puede comprender al menos dos secuencias mínimas biológicamente activas. El péptido autoensamblante modificado puede comprender una secuencia mínima biológicamente activa que tiene afinidad por o forma complejos con, una molécula biológica.

Se desvela una solución que comprende un péptido autoensamblante modificado.

Se desvela una composición farmacéutica que comprende un péptido autoensamblante modificado.

40 Se desvela una matriz que comprende un péptido autoensamblante modificado. La matriz puede ser un gel o un hidrogel. También se desvelan procedimientos para producir la matriz y para usar la matriz como relleno en defectos óseos y/o tisulares (por ejemplo, para su uso en ingeniería de tejidos y reparación de tejidos). Por ejemplo, se describen matrices que comprenden un péptido autoensamblante modificado que mejoran la regeneración ortopédica de tejidos aumentando la actividad de células progenitoras de proliferación y diferenciación. Estas matrices pueden usarse *in vivo* como rellenos en defectos óseos y/o tisulares para promover la regeneración ósea y/o tisular.

Se desvelan procedimientos para potenciar la diferenciación o la actividad funcional celular que comprenden administrar un péptido autoensamblante modificado, una solución del mismo, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo, a un sujeto que lo necesite.

50 Se desvela un procedimiento para tratar a un sujeto que comprende introducir un péptido modificado autoensamblante, una solución del mismo, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo, a un sitio en o dentro del cuerpo del sujeto. En ciertas realizaciones, el sitio es de un campo ortopédico; un defecto óseo; una deformidad ósea; una formación de hueso ectópica; una región de isquemia; una región de infarto de miocardio; una región vascular periférica; una región de infarto cerebral; o un defecto de la piel.

55 También se desvelan kits que comprenden un péptido autoensamblante modificado, una solución del mismo, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo y procedimientos para usar dichos kits.

Los detalles de una o más de las realizaciones de la invención se exponen en las *Figuras* adjuntas y en la *Descripción detallada*, como se describe a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidente a partir de la descripción, las figuras y de las reivindicaciones.

### **Definiciones**

5 Las siguientes definiciones son útiles para comprender la invención.

*Dominio de aminoácidos:* Por "dominio de aminoácidos" se entiende un polímero contiguo de al menos 2 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El dominio puede estar unido a otro aminoácido o dominio de aminoácidos mediante uno o más enlaces peptídicos. Un dominio de aminoácidos puede estar formado por al menos dos aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de un péptido o puede estar formado por dos aminoácidos en la parte media de un péptido.

*Anticuerpo:* En general, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina, que puede ser natural o producirse de manera total o parcialmente sintética. Un anticuerpo puede proceder de fuentes naturales (por ejemplo, purificado de un roedor, conejo, pollo (o huevo) de un animal que ha sido inmunizado con un antígeno o una construcción que codifica el antígeno) producido de manera parcial o totalmente sintética. Un anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El anticuerpo puede ser un fragmento de un anticuerpo, tal como un Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv (variable monocatenario) u otro fragmento que conserve un sitio de unión a antígeno o un fragmento scFv producido de manera recombinante, incluyendo fragmentos producidos de manera recombinante. Véase, por ejemplo, Allen, T., (2002) *Nature Reviews Cancer*, 2:750-765 y las referencias en el mismo. En ciertas realizaciones, pueden generarse y/o seleccionarse anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y/o dominios de proteína que comprenden un sitio de unión a antígeno *in vitro*, por ejemplo, usando técnicas tales como presentación en fagos (Winter G. y col. 1994. *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994) y/o presentación en ribosomas (Hanes, J. y Pluckthun, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4937-4942, 1997), etc. El anticuerpo puede ser un anticuerpo "humanizado" en el que, por ejemplo, se fusiona un dominio variable de roedor a un dominio constante de origen humano, conservando por tanto la especificidad del anticuerpo de roedor. Cabe destacar que el dominio de origen humano no se origina necesariamente directamente de un ser humano, en el sentido de que se sintetice en primer lugar en un ser humano. En cambio, pueden generarse dominios "humanos" en roedores cuyo genoma incorpore genes de inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Vaughan, y col., *Nature Biotechnology*, 16:535-539, 1998. Un anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal.

*Aproximadamente o alrededor de:* Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o la expresión "alrededor de" significa que la medición o el número pueden desviarse hasta un 10 % del valor numérico dado, en cualquier dirección.

*Motivo de péptido biológicamente activo:* Un "motivo de péptido biológicamente activo" es un péptido que induce una respuesta o cambio fenotípico en un tipo celular adecuado cuando se pone en contacto la célula con el péptido. El péptido puede estar presente o bien en forma aislada o como parte de un polipéptido mayor u otra molécula. Puede determinarse la capacidad del péptido para generar la respuesta, por ejemplo, comparando el parámetro relevante en ausencia del péptido (por ejemplo, mutando o eliminando el péptido cuando está normalmente presente en un polipéptido mayor). Las respuestas o cambios fenotípicos incluyen, pero sin limitación, mejora de la dispersión celular, la unión, la adhesión, la proliferación, la secreción de una molécula de la MEC o la expresión de un fenotipo característico de un tipo celular diferenciado concreto.

*Biomolécula:* Como se usa en el presente documento, una "biomolécula" se refiere a una molécula, tal como una proteína, péptido, proteoglicano, lípido, carbohidrato o ácido nucleico que tiene las características típicas de las moléculas encontradas en los organismos vivos. Una biomolécula puede ser de origen natural o puede ser artificial (es decir, no encontrada en la naturaleza y no idéntica a una molécula hallada en la naturaleza). Por ejemplo, se considera una biomolécula artificial una proteína que tenga una secuencia o modificación que sea el resultado del proceso mental de un ser humano y que no se produzca en la naturaleza.

*Sustancia quimiotáctica:* Una "sustancia quimiotáctica", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que tiene la capacidad de reclutar células en un sitio en el que está presente la sustancia. Dichas células pueden tener, por ejemplo, el potencial de contribuir a la formación o reparación de un tejido (por ejemplo, proporcionando factores de crecimiento) o de contribuir a una respuesta inmunitaria. Ciertas sustancias quimiotácticas también pueden funcionar como agentes de proliferación.

*Complementario:* Por "complementario", como se usa en el presente documento, se entiende que tiene la capacidad de formar interacciones iónicas o de enlace de hidrógeno entre restos hidrófilos de péptidos adyacentes en una fibra de una matriz macroscópica. Cada resto hidrófilo en un péptido o bien se une mediante enlace de hidrógeno o se empareja iónicamente con un resto hidrófilo en un péptido adyacente o se encuentra expuesto al disolvente. El emparejamiento también puede implicar fuerzas de *van der Waals*.

*Célula endotelial:* La expresión "célula endotelial", como se usa en el presente documento, ha de tener el significado generalmente aceptado en la técnica, es decir, la capa de células más interna que reviste las cavidades del corazón, los vasos sanguíneos (incluyendo capilares) y los vasos linfáticos. El término "endotelio" y la expresión "endotelio vascular" se usan de manera indistinta en el presente documento.

*Agente de gelación:* Por "agente de gelación", como se usa en el presente documento, se entiende un agente que transforma una solución de un péptido autoensamblante modificado en una matriz (por ejemplo, un gel o un hidrogel) tras mezclar o poner en contacto el agente de gelación con la solución. En ciertas realizaciones, la

solución de péptido antes de la gelación puede ser un fluido no viscoso, un fluido viscoso o una forma de sol. Los agentes de gelación ejemplares incluyen, pero sin limitación, electrolitos (por ejemplo, NaOH, KCl, NaCl, suero salino (NaCl acuoso), suero salino tamponado con fosfato (PBS acuoso)), medios de cultivo celular (por ejemplo, medio de cultivo de células de mamífero, tal como MEM), soluciones básicas (por ejemplo, solución de NaOH) o fluidos biológicos (por ejemplo, sangre, linfa, etc.).

*Aislado:* Como se usa en el presente documento, "aislado" significa 1) separado de al menos parte de los componentes con los que se asocia normalmente en la naturaleza; 2) preparado o purificado mediante un procedimiento que implica la mano del hombre; y/o 3) de origen no natural.

*Solutos isoosmóticos:* Por "solutos isoosmóticos" se entiende un compuesto no ionizante disuelto en una solución acuosa, de tal forma que la solución resultante (es decir, una "solución isoosmótica") tiene una presión osmótica u osmolalidad compatible con la viabilidad celular durante un periodo de tiempo de más de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, preferentemente de 50 minutos o aproximadamente 1 hora. En ciertas realizaciones, una solución isoosmótica tiene una presión osmótica que se aproxima a la presión osmótica del ambiente extracelular o intracelular de las células (por ejemplo, un ambiente *in vitro*, tal como un medio de cultivo celular o un ambiente *in vivo*, tal como aquel dentro de un sujeto). Por ejemplo, una solución isoosmótica puede tener una presión osmótica que se encuentra entre  $290 \pm 10$  mosm/kg H<sub>2</sub>O. Los solutos isoosmóticos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, hidratos de carbono, sales (por ejemplo, NaCl, KCl) y glicerol. En ciertas realizaciones, un soluto isoosmótico es un carbohidrato. En algunas realizaciones, un soluto isoosmótico es un monosacárido o un disacárido. En otras realizaciones, un soluto isoosmótico se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa, ribosa, manosa, arabinosa y xilosa. En otras realizaciones más, un soluto isoosmótico es una sal. En algunas realizaciones adicionales más, un soluto isoosmótico es glicerol. En algunas realizaciones adicionales más, un soluto isoosmótico es glicerol y la solución isoosmótica resultante del mismo tiene de un 5 a un 20 % (v/v) de glicerol.

*Macroscópico:* Por "macroscópico" se entiende que tiene unas dimensiones lo suficientemente grandes como para ser visible con un aumento de 10 o menor. En ciertas realizaciones, una estructura macroscópica es visible a simple vista. En algunas realizaciones, una estructura macroscópica puede ser transparente. En otras realizaciones, una estructura macroscópica es bidimensional. En otras realizaciones más, una estructura macroscópica es tridimensional. En caso de ser bidimensional, en determinadas realizaciones, la estructura macroscópica comprende más de una sola capa de moléculas individual, por ejemplo, al menos dos o más capas de moléculas. Normalmente, cada dimensión tiene un tamaño de al menos 10  $\mu$ m. En ciertas realizaciones, al menos dos dimensiones tienen un tamaño de al menos 100  $\mu$ m o de al menos 1000  $\mu$ m. Normalmente, al menos dos dimensiones tienen un tamaño de al menos 1-10 mm, un tamaño de 10-100 mm o más. Las dimensiones pueden medirse en, por ejemplo, longitud, anchura, profundidad, amplitud, altura, radio, diámetro, circunferencia o una aproximación de cualquiera de las anteriores en el caso de estructuras que no tengan una forma regular bi o tridimensional, tal como una esfera, cilindro, cubo y similares. También pueden usarse otras dimensiones relevantes.

*Marcador:* Un "marcador" puede ser cualquier gen o producto génico (por ejemplo, una proteína, péptido, ARNm y similares) que indique o identifique un tipo celular, tipo de tejido, origen embriológico, estado de diferenciación o estado fisiológico o metabólico particular y/o que indique o identifique un estado patológico o fisiológico particular (por ejemplo, carcinoma, normal, displasia y similares). El nivel de expresión o la ausencia de expresión, de un gen marcador puede indicar que la célula o el tejido que se están examinando es de un tipo celular o tipo de tejido particular o tiene un origen embriológico, un estado de diferenciación, un estado fisiológico o un estado metabólico particular. El nivel de expresión o la ausencia de expresión, de un gen marcador puede indicar un estado fisiológico o patológico particular de un paciente, órgano, tejido o célula. En ciertas realizaciones, puede determinarse la expresión o falta de expresión usando técnicas convencionales, tales como, por ejemplo, transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, secuenciación, inmunoquímica, inmunotransferencia, micromatrices de oligonucleótidos o ADNc, matriz de membrana de oligonucleótidos o ADNc, análisis de micromatriz de proteínas, espectrometría de masas y similares. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de un gen marcador es cuantificable. También puede determinarse el nivel de expresión de varios marcadores mediante ensayos funcionales. Por ejemplo, puede evaluarse la expresión de genes de citocromo P450 (por ejemplo, en hepatocitos) midiendo la capacidad de una célula o de un lisado celular para llevar a cabo una reacción característica de la presencia de la proteína P450 (por ejemplo, para metabolizar un sustrato particular). También pueden usarse otros marcadores que indican o identifican un tipo celular particular. Por ejemplo, puede usarse la producción o captación de un compuesto particular como marcador. Por ejemplo, la captación de LDL o la producción de óxido nítrico son marcadores útiles para células endoteliales. Los marcadores se analizan con más detalle en el presente documento.

*Microfibra:* Como se usa en el presente documento, el término "microfibra" se refiere a una fibra que tiene un diámetro de dimensiones micrométricas. En ciertas realizaciones, una fibra a escala micrométrica tiene un diámetro de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 1000  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 900  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 800  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 700  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 600  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a 500  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 400  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 300  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 200  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 100  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 90  $\mu$ m, de entre aproximadamente 5  $\mu$ m a aproximadamente 80  $\mu$ m, de entre

aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o de entre aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ .

*Escala micrométrica:* Como se usa en el presente documento, "escala micrométrica" se refiere, en general, a estructuras que tienen dimensiones que pueden expresarse de manera más conveniente en términos de micrómetros. Por ejemplo, la expresión "estructura a escala micrométrica" puede referirse a una estructura que tenga unas dimensiones de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  o menos, aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  o menos, aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  o menos, aproximadamente 20-50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5-10  $\mu\text{m}$  o 1-5  $\mu\text{m}$ . Un experto habitual en la materia reconocerá que la longitud de dichas estructuras puede llegar hasta los milímetros, pero que la mayor parte de las dimensiones se encuentran en el intervalo micrométrico.

*Escala nanométrica:* Como se usa en el presente documento, la expresión "escala nanométrica" se refiere, en general, a materiales de estructuras que tienen dimensiones que pueden expresarse de manera más conveniente en términos de nanómetros. Por ejemplo, la expresión "estructura nanométrica" o "matriz a escala nanométrica" puede referirse a una estructura que tiene dimensiones menores de 1  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, aproximadamente 500 nm o menos, aproximadamente 100 nm o menos, aproximadamente 50 nm o menos, aproximadamente 20-50 nm (ambos inclusive), aproximadamente 10-20 nm, aproximadamente 5-10 nm, aproximadamente 1-5 nm, aproximadamente 1 nm o entre 0,1 y 1 nm. Se asume que los intervalos listados incluyen ambos extremos. Las dimensiones relevantes pueden ser, por ejemplo, longitud, anchura, profundidad, amplitud, altura, radio, diámetro, circunferencia o una aproximación de cualquiera de las anteriores en el caso de estructuras que no tengan una forma regular bi o tridimensional, tal como una esfera, cilindro, cubo, etc. También pueden usarse otras dimensiones relevantes para determinar si una estructura es una estructura a escala nanométrica, dependiendo de la forma de la estructura. Un experto habitual en la materia reconocerá que una o más de las dimensiones de una estructura a escala nanométrica no se encuentran necesariamente en el intervalo nanométrico. Por ejemplo, la longitud de dichas estructuras puede encontrarse en el intervalo micrométrico o mayor. Sin embargo, generalmente, al menos una o más de las dimensiones se encuentran en el intervalo nanométrico.

*Secuencia mínima biológicamente activa:* Como se usa en el presente documento, una "secuencia mínima biológicamente activa" se refiere a la longitud mínima de una secuencia de un péptido que tiene una función biológica específica. En un primer ejemplo, -SEIKLLIS- es la secuencia de unión a células biológicamente activa de la laminina, en la que -IKLLI- tiene la función exclusiva de unión a células. Por tanto, en este caso, -IKLLI- es una "secuencia mínima biológicamente activa". En un segundo ejemplo, la secuencia -DGRGDSVAYG- contiene la secuencia -RGD-; -RGD- tiene una función de unión a células. Sin embargo, -DGRGDSVAYG- también tiene una función de diferenciación osteoblástica. Por tanto, en este caso, tanto - DGRGDSVAYG- como -RGD- se consideran una "secuencia mínima biológicamente activa". Como se entiende a partir de la presente divulgación, el segundo dominio de aminoácido del péptido modificado contiene al menos una secuencia mínima biológicamente activa. Esta secuencia mínima biológicamente activa es cualquier longitud de secuencia procedente de una secuencia de proteína original. Además, con la excepción de los aminoácidos de la secuencia mínima biológicamente activa, pueden intercambiarse, añadirse o eliminarse los aminoácidos del segundo dominio de aminoácido dependiendo del diseño de la molécula para ajustar su hidrofilia y/o carga neta general. En ciertas realizaciones, la secuencia mínima biológicamente activa se refiere a una cualquiera de las secuencias proporcionadas en la tabla 2a.

*Nanofibra:* Como se usa en el presente documento, el término "nanofibra" se refiere a una fibra que tiene un diámetro de dimensiones nanométricas. Normalmente, una fibra a escala nanométrica tiene un diámetro de 500 nm o menos. Una nanofibra puede tener un diámetro de 100 nm o menos. Una nanofibra puede tener un diámetro de 50 nm o menos. Una nanofibra puede tener un diámetro de 20 nm o menos. Una nanofibra puede tener un diámetro de entre 10 y 20 nm. Una nanofibra puede tener un diámetro de entre 5 y 10 nm. Una nanofibra puede tener un diámetro menor de 5 nm. Se asume que los intervalos listados incluyen ambos extremos.

*Ambiente de matriz a escala nanométrica:* La expresión "ambiente de matriz a escala nanométrica", como se usa en el presente documento, se refiere en la invención a que al menos un 50 % de las fibras que forman la matriz sean nanofibras. Al menos un 75 % de las fibras que forman la matriz pueden ser nanofibras. Al menos un 90 % de las fibras que forman la matriz pueden ser nanofibras. Al menos un 95 % de las fibras que forman la matriz pueden ser nanofibras. Obviamente, la matriz también puede comprender constituyentes que no sean fibras, por ejemplo, agua, iones, agentes de crecimiento y/o inductores de la diferenciación, tales como factores de crecimiento, agentes terapéuticos u otros compuestos, que pueden encontrarse en solución en la matriz y/o unidos a la matriz.

*De origen natural:* Como se usa en el presente documento, "de origen natural" significa encontrado en la naturaleza. Una biomolécula de origen natural, en general, se sintetiza por un organismo que se encuentra en la naturaleza y no está modificada por la mano del hombre o es un producto de degradación de dicha molécula. También se considera una molécula de origen natural una molécula que se sintetiza mediante un procedimiento que implica la mano del hombre (por ejemplo, mediante síntesis química que no implica un organismo vivo o mediante un procedimiento que implica un organismo vivo que se ha manipulado por la mano del hombre o que desciende dicho organismo) pero que es idéntica a una molécula que se sintetiza por un organismo que se

encuentra en la naturaleza y no se ha modificado por la mano del hombre.

*Péptido, polipéptido o proteína:* Como se usa en el presente documento, un "péptido", "polipéptido" o "proteína" comprende una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Un péptido representa generalmente una cadena de entre aproximadamente 2 y 200 aminoácidos, más normalmente entre aproximadamente 6 y 64 aminoácidos. Normalmente, la porción autoensamblante de un péptido autoensamblante tiene aproximadamente 8-24, con frecuencia aproximadamente 12-20 o 16-20 aminoácidos. Un péptido puede referirse a un péptido individual o a una colección de péptidos. Los péptidos de la invención contienen normalmente solo aminoácidos naturales, aunque como alternativa, pueden emplearse aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza pero que pueden incorporarse en una cadena de polipéptido; véase, por ejemplo, la página Web que tiene la dirección URL [www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif](http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif), que presenta estructuras de aminoácidos no naturales que se han incorporado con éxito en canales de iones funcionales) y/o análogos de aminoácidos. En particular, pueden usarse D-aminoácidos. Asimismo, se puede alterar o derivatizar uno o más de los aminoácidos en un péptido, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química, tal como un grupo acilo, un grupo carbohidrato, una cadena de carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso, un enlazador para conjugación o funcionalización, etc. Un péptido puede estar ramificado, en cuyo caso contiene al menos dos polímeros de aminoácidos, cada uno de los cuales consiste en al menos 3 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, pero los dos polímeros de aminoácido en sí no están unidos mediante un enlace peptídico. Agente de proliferación y agente mitogénico se usan en el presente documento de manera indistinta para hacer referencia a la capacidad de una sustancia para potenciar la proliferación de las células. Las proteasas, como se usa en el presente documento, son enzimas escisoras de proteínas que escinden fragmentos de enlaces peptídicos. Se ha identificado una gran colección de proteasas y familias de proteasas y se conocen en la técnica sitios específicos en los que estas proteasas escinden a las proteínas diana. Algunas proteasas ejemplares incluyen serina proteasas, aspartil proteasas, proteasas de ácido, proteasas alcalinas, metaloproteasas (por ejemplo, metaloproteasas de matriz), carboxipeptidasas, aminopeptidasas, cisteína proteasas, etc.

*Regeneración:* La regeneración de tejidos, como se usa en el presente documento, incluye cualquier aspecto de la restauración anatómica o funcional del estado del tejido antes de una lesión o de un proceso degenerativo o degradativo, que implica la producción de nuevo tejido (por lo que se entiende o células o porciones de células). La producción de nuevo tejido puede incluir el crecimiento de células existentes. Por ejemplo, en el caso de células endoteliales, la regeneración puede comprender la formación de nuevos vasos sanguíneos o la extensión o crecimiento de los vasos existentes. En el caso de la regeneración de neuronas, puede incluir, por lo tanto, el crecimiento de axones u otros procesos neuronales. Dichos procesos pueden surgir directamente del cuerpo de la célula o pueden ser extensiones de procesos que se rompieron o dañaron a causa de una lesión. El nuevo tejido puede reemplazar al tejido que había presente previamente. La producción de nuevo tejido puede incluir la división de células existentes.

*Reparación:* La reparación de un tejido, como se usa en el presente documento, puede incluir cualquier aspecto de la restauración anatómica o funcional del estado del tejido antes del daño o la degeneración. Por ejemplo, puede incluir la restauración de la continuidad física entre porciones de tejido que se separaron por una lesión. Preferentemente, dicha restauración de la continuidad física incluye la reposición o la reconexión de las partes de tejido sin una separación apreciable por un tejido de un tipo que no estuviese presente antes de la lesión, tal como tejido cicatricial. La reparación puede incluir, por tanto, el relleno de un defecto tisular, por ejemplo, mediante la reposición de partes de tejido separadas por el defecto y/o mediante el crecimiento de nuevo tejido del tipo que sufrió el daño o degradación, en lugar de mediante desarrollo de tejido cicatricial. La reparación puede incluir, aunque no necesariamente, el crecimiento o desarrollo de nuevo tejido. Por lo tanto, la regeneración puede considerarse en un aspecto de reparación, pero la reparación puede producirse sin evidencias de crecimiento de nuevo tejido.

*Solución que está sustancialmente libre de iones:* Por "solución que está sustancialmente libre de iones" se entiende una solución a la que no se le han añadido iones (o sales de los mismos) o en la que la concentración de iones (o sales de los mismos) es menor de 0,01 o 0,001 mM. Molécula pequeña:

*Molécula pequeña:* Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sean de origen natural o se creen de manera artificial (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Normalmente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 g/mol. Asimismo, las moléculas pequeñas tienen normalmente múltiples enlaces carbono-carbono.

*Unión específica o afinidad por o forma complejos con:* Como se usa en el presente documento, las expresiones "unión específica" o "afinidad por" o "forma complejos con" se refieren a una asociación física entre dos moléculas, que pueden citarse como una molécula diana (por ejemplo, un péptido diana, una biomolécula) y péptido autoensamblante modificado y/o no modificado. La interacción depende normalmente de la presencia de una característica estructural concreta de la molécula diana, tal como un dominio diana que se reconoce por el péptido autoensamblante. Por ejemplo, en caso de que un péptido autoensamblante sea específico para una molécula diana que contiene el dominio diana A, la presencia de un polipéptido que comprende el dominio diana A o la presencia de dominio diana A libre no marcado en una reacción que contiene tanto A libre marcado como un péptido autoensamblante específico para el mismo, reducirá la cantidad de A marcado que se une al péptido autoensamblante. Cabe destacar que no es necesario que la especificidad sea absoluta, sino que se refiere de manera general al contexto en el que se produce la unión. Los dominios diana y los péptidos autoensamblantes

que tienen un grado suficiente de especificidad para rendir adecuadamente en cualquier aplicación dada pueden seleccionarse por un experto en la materia. También cabe destacar que la especificidad puede evaluarse en el contexto de factores adicionales, tales como la afinidad del péptido autoensamblante por la molécula diana frente a la afinidad del péptido autoensamblante por otras dianas, por ejemplo, competidores. Una vez se ha determinado la especificidad del péptido autoensamblante en uno o más contextos, puede emplearse en otros contextos, preferentemente similares, sin volver a evaluar necesariamente su especificidad. Las moléculas diana preferidas en el contexto de la presente invención incluyen proteínas que están presentes en la superficie celular, proteínas que están presentes en el cuerpo en el ambiente extracelular (por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular, proteínas secretadas o de la superficie celular, incluyendo proteasas, factores de crecimiento y proteínas que circulan en la sangre). En ciertas realizaciones de la invención, la molécula diana es un anticuerpo. En el contexto de una interacción entre un péptido autoensamblante y una molécula diana, de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, una molécula diana presenta unión específica si se une al péptido autoensamblante con una fuerza al menos 2 veces mayor que a otros péptidos o polipéptidos presentes en el organismo dentro del ambiente extracelular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, una molécula diana presenta unión específica si se une al péptido autoensamblante con una fuerza al menos 5 veces mayor que a otros péptidos o polipéptidos presentes en el organismo dentro del ambiente extracelular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, una molécula diana presenta unión específica si se une al péptido autoensamblante con una fuerza al menos 10 veces mayor que a otros péptidos o polipéptidos presentes en el organismo dentro del ambiente extracelular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, una molécula diana presenta unión específica si se une al péptido autoensamblante con una fuerza al menos 50 veces mayor que a otros péptidos o polipéptidos presentes en el organismo dentro del ambiente extracelular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, una molécula diana presenta unión específica si se une al péptido autoensamblante con una fuerza al menos 100 veces mayor que a otros péptidos o polipéptidos presentes en el organismo dentro del ambiente extracelular. *Estructuralmente compatible*: Por "estructuralmente compatible" se entiende capaz de mantener una distancia dentro del péptido suficientemente constante para permitir la formación de una estructura. En ciertas realizaciones de la invención, la variación en la distancia dentro del péptido es menor de 4, 3, 2 o 1 Angstrom. También se contempla que las variaciones mayores en la distancia dentro del péptido pueden no impedir la formación de la estructura en caso de estar presentes fuerzas estabilizantes. Esta distancia puede calcularse basándose en modelado molecular o basándose en un procedimiento simplificado que se ha calculado previamente tomando la suma del número de átomos no ramificados en las cadenas laterales de cada aminoácido en un par. Por ejemplo, la distancia dentro del péptido para un par iónico de lisina-ácido glutámico es de  $5+4=9$  átomos y la distancia para un par de unión de hidrógeno glutamina-glutamina es de  $4+4=8$  átomos. Usando un factor de conversión de 3 Angstrom por átomo, la variación en la distancia dentro del péptido para péptidos que tienen pares de lisina-ácido glutámico y pares de glutamina-glutamina (por ejemplo, 9 frente a 8 átomos) es de 3 Angstrom.

*Sujeto*: El término sujeto, como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo al que se va a suministrar un agente, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos y/o terapéuticos. Los sujetos preferidos son mamíferos, tales como animales veterinarios/domésticos (por ejemplo, caballos, cerdos, primates, perros, gatos, etc.) y seres humanos (por ejemplo, bebés, niños, adolescentes, adultos o adultos ancianos masculinos y femeninos).

*Distribuido de una manera sustancialmente uniforme*: En general, en el caso de una matriz de la invención que encapsula células, la expresión "distribuido de una manera sustancialmente uniforme" pretende abarcar que la mayoría de las células se encuentran aproximadamente equidistantes entre sí. Por ejemplo, se considera que las células están distribuidas de manera sustancialmente uniforme en caso de que, en un momento particular (por ejemplo, inmediatamente después de la formación de la matriz) el centro de masas de al menos un 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de las células encapsuladas por la matriz está separado del centro de masas de la célula más próxima (es decir, la célula con el centro de masa más próximo) por una distancia que varía en menos de 500, 100, 50, 20, 10 o 1  $\mu\text{m}$ . Como alternativa, se considera que las células están distribuidas de manera sustancialmente uniforme en caso de que, en un momento particular, cuando se divide la matriz en porciones contiguas (por ejemplo, cubos) que tienen volúmenes equivalentes, el número de células cuyo centro de masa está contenido dentro de un volumen dado de matriz difiere del número medio de células cuyo centro de masas está contenido dentro de dicho volumen en menos de un 50 %, menos de un 40 %, menos de un 30 %, menos de un 20 % o menos de un 10 % del número medio de células, para al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de las porciones. Las matrices en las que las células están distribuidas de manera sustancialmente uniforme pueden conservar esta propiedad con el paso del tiempo o las células pueden quedar, con el paso del tiempo, distribuidas de manera sustancialmente uniforme en una matriz en la que las células no se encontraban inicialmente distribuidas de manera sustancialmente uniforme.

*Molécula, compuesto o agente terapéutico o agente biológicamente activo*: Una "molécula, compuesto o agente terapéutico" o un "agente biológicamente activo" es una molécula o combinación de moléculas de cualquier tipo que, cuando se administra a un sujeto que lo necesita, alivia uno o más síntomas de una enfermedad o afección clínica no deseada, reduce la gravedad de una enfermedad o afección clínica, previene o reduce la probabilidad de desarrollo de una enfermedad o afección clínica no deseada o facilita la reparación o regeneración del tejido de un modo distinto a simplemente proporcionar soporte nutricional al sujeto. Ha de entenderse que generalmente, una molécula terapéutica se administrará en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente para lograr un resultado clínicamente significativo. Una molécula terapéutica puede ser una molécula pequeña, una biomolécula, etc. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.<sup>a</sup> Ed. y

Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, para ejemplos.

*Disposición tridimensional:* Por "disposición tridimensional" se entiende que existe en tres dimensiones. Las células que tienen una disposición tridimensional no forman parte todas ellas de la misma monocapa. Como se usa en el presente documento, una monocapa es una sección transversal de la matriz que encapsula las células y que incluye al menos una célula encapsulada. Puede determinarse el diámetro medio de una celda midiendo el diámetro medio del cuerpo de la célula. Se considera que una célula forma parte de la monocapa en caso de que al menos un 51 % del volumen de la célula esté contenido en la monocapa. En ciertas realizaciones, inmediatamente después de la formación de la matriz, al menos una monocapa contiene menos de un 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5 o 1 % de células encapsuladas. Más preferentemente, inmediatamente después de la formación de la matriz, menos de un 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5 o 1 % de las células encapsuladas forman parte de la misma monocapa.

### **Breve descripción de las figuras**

**Figura 1A.** Modelos moleculares que representan un péptido autoensamblante RAD16-I (parte superior) y el péptido RAD16-I modificado para que incluya un dominio de aminoácido no autoensamblante (PRGDSGYRGDS: SEQ ID NO. 4) en su extremo C-terminal (parte inferior).

**Figura 1B.** Un modelo esquemático que representa una cinta de doble lámina Q de una nanofibra de péptido autoensamblado formada mediante el autoensamblaje de una mezcla compuesta por el péptido RAD16-I y un péptido RAD16-1 modificado extendido en su extremo N-terminal con el dominio de aminoácidos (PRGDSGYRGDS: SEQ ID NO. 4) en una mezcla 9:1 (basándose en la relación de volumen de péptidos disueltos a iguales concentraciones, sobre una base de p/p). Las secuencias (PRGDSGYRGDS: SEQ ID NO. 4) se extienden hacia fuera de la cinta de nanofibra. En general, el dominio de aminoácido modificante puede extenderse para formar un borde lateral de un conjunto de péptidos (por ejemplo, una nanofibra o una estructura macroscópica) o formar una superficie. También son posibles otras disposiciones.

**Figura 1C.** Una representación esquemática de una red de hidrogel de péptido genético (líneas gruesas continuas) en la que algunos de los péptidos se modifican para que incluyan motivos de péptido bioactivo (líneas finas cortas) que se extienden desde los extremos amino del péptido de base. *Ampliación:* nanofibra de péptidos autoensamblantes apilados (líneas gruesas continuas) y la secuencia extendida del motivo de péptido bioactivo en los extremos amino de una de las secuencias (líneas finas cortas).

**Figura 1D.** Representación de una variedad de configuraciones posibles para los péptidos autoensamblantes modificados. El dominio A representa un dominio de aminoácido autoensamblante. El dominio B representa un dominio de aminoácido no autoensamblante (dominio de modificación). Como se indica en la figura, puede estar presente un dominio de modificación en el extremo N y/o C-terminal del dominio autoensamblante o puede estar presente entre dos dominios autoensamblantes.

**Figura 2.** Datos de espectroscopía de masas del péptido SEQ4.

**Figura 3.** Los números de células a partir del contenido de ADN en los hidrogeles mostraron que los péptidos funcionales, en combinación con RAD16-I, promueven una mayor proliferación celular, en comparación con los geles de solo RAD16-I y colágeno-1.

**Figura 4.** Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) normalizada según la cantidad de ADN.

**Figuras 5A-5I.** Imágenes de tinción de fosfatasa alcalina que confirman la elevada actividad de ALP.

**Figura 6.** Los resultados de la osteocalcina secretada en el medio de cultivo demuestran que los péptidos autoensamblantes con motivos funcionales tienen el potencial de promover la diferenciación de los pre-osteoblastos.

**Figura 7.** Distancia entre el motivo funcional y la secuencia autoensamblante y la proliferación celular. La figura 7 muestra que la distancia entre el motivo funcional (RGD) y la secuencia autoensamblante (RADA) ha de ser al menos mayor de 2 mero (6,9A) de enlaces peptídicos.

**Figura 8.** Efecto de la relación de mezcla de péptido funcionalizado. El eje Y muestra el valor de intensidad de fluorescencia que es lineal para los contenidos de ADN. Las mezclas de al menos de RAD: DSG =99:1 a 67:33 aumentan la proliferación celular. La reducción en la fluorescencia con el hidrogel de DSG al 100 % puede estar causada por una diferencia en las propiedades mecánicas del hidrogel, un DSG forma un gel menos rígido en comparación con RAD.

**Figuras 9A-9B.** Reconstrucción en 3D de microscopia confocal de células cultivadas en las diferentes concentraciones de péptido funcional. La figura 9A muestra cuando la relación de DSG es del 10 %; la figura 9B muestra cuando la relación de DSG es del 70 %. En la figura 9A, las células permanecieron sobre la superficie de la matriz peptídica, mientras que en la figura 9B, las células migraron al interior de la matriz (hasta 300 um). Estos datos demuestran que puede controlarse el comportamiento celular cambiando la proporción de péptido funcionalizado.

**Figura 10.** Gráfica isoeléctrica y datos reológicos de la solución de RAD16-1 al 1 % cuando se añade solución de NaOH 0,1 N.

**Figura 11.** Estructura de Ac(RADA)<sub>4</sub>GGFHRRRIKA-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO. 6). En negro se representan los aminoácidos cargados positivamente, en gris se muestran los aminoácidos cargados negativamente.

**Figura 12.** Gráfica isoeléctrica y datos reológicos de FHR cuando se añade solución de NaOH 0,1 N.

**Figuras 13A-13D.** Reconstrucción en 3 dimensiones de la observación con microscopio confocal que muestra que el péptido FHR proporciona una proliferación celular en 3 dimensiones superior.

**Figura 14.** Números de células calculados a partir del contenido de ADN en gel que miden los efectos en la

proliferación y diferenciación del hidrogel de péptido FHR.

**Figura 15.** Actividad de ALP normalizada por la cantidad de ADN que mide los efectos en la proliferación y diferenciación del hidrogel de péptido FHR.

**Figuras 16A-16B.** Imágenes de tinción con ALP de RAD (Figura 16A) y FHR (Figura 16B).

**Figura 17.** Osteocalcina secretada en el medio de cultivo.

**Figura 18.** Gráfica isoelectrica y datos reológicos de la solución de PFS al 1 % cuando se añade solución de NaOH 0,1 N.

**Figura 19.** Retención de factores de crecimiento durante el lavado y cultivo.

**Figura 20.** Distribución de carga molecular de bFGF. Las secciones oscuras representan la carga positiva y las secciones blancas representan la carga negativa.

**Figuras 21A-21F.** Imágenes de HUVEC cultivadas en diferentes matrices de péptido. *Fila superior:* RAD-2P; *Fila inferior:* DGR-2P.

**Figura 22.** Retención de factores de crecimiento cuando el factor de crecimiento se mezcla antes de la gelación.

**Figuras 23A-23C.** Imágenes de rayos X de cráneos de ratas 2 semanas después del implante de los materiales.

**Figuras 24A-24M.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de HUVEC cultivadas en los hidrogeles durante dos días. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. El gel de colágeno, Matrigel, PRGmx, KLTmx, FHRmx, PFSmx tenía una mayor unión celular en comparación con RAD. En Matrigel, las células HUVEC mostraron una estructura capilar, lo que se considera que está relacionado con la capacidad de formación de vasos. En KLTmx, las células mostraron una estructura capilar similar a Matrigel.

**Figura 25.** Cultivo de 3 días de HUVEC en matrices de nanofibras de péptido.

**Figura 26A-26F.** Imagen de microscopía de fluorescencia de perlas en la matriz de péptido en el día 1 y el día 2 después de colocar las perlas. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. La barra de color blanco representa 100 um. En el día 1, la mayoría de las células permanecieron en las perlas. En el día 2, las células habían migrado bien de las perlas al hidrogel de colágeno, PRGmx y KLTmx en comparación con RAD. En Matrigel, solo una pequeña cantidad de las células migraron al gel.

**Figura 27.** Número de células de la migración desde las perlas en el día 2. Las células se cuentan a partir de las imágenes de microscopía de fluorescencia en las Figuras 26A-26F.

**Figuras 28A-28C.** Imagen de microscopía confocal de fluorescencia reconstruida del día 2 desde la siembra. El color verde muestra células vivas usando tinción de calceína, el color rojo muestra núcleos de células muertas. Estas imágenes muestran una elevada viabilidad celular en los hidrogeles.

**Figuras 29A-29B.** Formación capilar en cultivo en 3D. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. *Figura 29A:* muestra la cavidad capilar (flechas). *Figura 29B:* muestra la sección transversal en la línea de puntos en la figura 29A. También se muestra la cavidad capilar en la imagen en sección transversal (círculo punteado).

**Figuras 30A-30G.** Imágenes histológicas de la membrana corioalantóica (CAM) incubada con diferentes hidrogeles.

**Figuras 31A-31K.** Unión de HUVEC con diferentes hidrogeles.

**Figuras 32A-32J.** Cultivo en 3 dimensiones de ADSC en matrices de péptidos funcionalizados.

**Figura 33.** Densidad celular en cultivo de ADSC en matriz de péptidos funcionalizados.

**Figura 34.** Profundidad de la migración celular en cultivo de ADSC en matriz de péptidos funcionalizados.

**Figuras 35A-35B.** Secreción de factores de crecimiento en el medio.

**Figuras 36A-36B.** Administración ejemplar de péptidos autoensamblantes modificados, composiciones farmacéuticas de los mismos y/o matrices formadas por los mismos. La *Figura 36A* representa una aguja con dos compartimentos. La solución de péptido y el agente de gelación se premezclan en la aguja inmediatamente antes de la inyección. La *Figura 36B* representa una aguja con dos compartimentos. La solución de péptido y una suspensión celular se premezclan en la aguja inmediatamente antes de la inyección.

## Descripción detallada

### I. Resumen

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. El desarrollo de nuevos materiales biológicos, en particular, materiales biológicamente compatibles que sirven como sustratos que permitan el crecimiento, la diferenciación y la función biológica celular tiene amplias implicaciones para avanzar la tecnología médica y para comprender las características biológicas básicas de las células. Se ha reconocido que es posible producir composiciones que posean las ventajas asociadas normalmente con un material completamente sintético y que siga poseyendo ciertas características deseables de los materiales procedentes de fuentes naturales. Las composiciones pueden usarse *in vitro* o *in vivo* para fines que incluyen, pero sin limitación, cultivo celular o ingeniería de tejidos, regeneración y/o reparación de tejidos y/o como agentes de suministro para moléculas biológicamente activas, tales como agentes terapéuticos.

Se ha descrito previamente una clase de materiales de inspiración biológica que se forman mediante el autoensamblaje de péptidos autocomplementarios iónicos o polares (véase, por ejemplo, Zhang (1993); Zhang (1995); y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.955.343 y 5.670.483). Los péptidos son complementarios y estructuralmente compatibles. Están formados por unidades repetitivas de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos alternos, en los que los restos cargados pueden incluir cargas positivas y negativas alternas. En general, estos péptidos se autoensamblan en diversas estructuras macroscópicas tras su exposición a una concentración suficiente

de iones (por ejemplo, cationes monovalentes) para formar una matriz porosa macroscópica y estable. La matriz puede adoptar diversas formas físicas, tales como lazos, estructuras similares a cintas, matrices bi o tridimensionales, etc. Las matrices preferidas están formadas por filamentos entrelazados de manera ordenada con un diámetro típicamente de aproximadamente 10-20 nm o 10-30 nm, con un tamaño de poro en el orden de 50-100 nm de diámetro (u otras dimensiones relevantes). En ciertas realizaciones, los materiales son hidrogeles que contienen aproximadamente al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % o más de contenido de agua. Algunos de los péptidos sufren autoensamblaje para formar nanofibras que están elevadamente hidratadas (por ejemplo, con hasta un 99,5-99,9 % (1-5 mg/ml) de agua). Debido a que el hidrogel tiene un contenido de agua tan sumamente elevado, las células pueden migrar libremente y formar contactos intercelulares cuando se cultivan sobre o dentro de la matriz. Dicho ambiente también permite la difusión de moléculas pequeñas, incluyendo proteínas y moléculas de señalización. Además, algunos de los hidrogeles tienen un bajo módulo elástico. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se ha sugerido que el bajo módulo elástico puede facilitar la comunicación entre células. Las propiedades de los hidrogeles contrastan con aquellas de muchos materiales sintéticos que se están explorando para cultivo celular y/o ingeniería o reparación de tejidos. Por ejemplo, muchos de estos materiales comprenden microfibras y tienen tamaños de poro mucho mayores, presentando un ambiente que probablemente no se encuentra en la escala adecuada en comparación con las células y su ambiente natural. Además, los hidrogeles pueden formarse a fin de encapsular células durante el proceso de formación del gel, a diferencia de las estructuras preformadas en las que se siembran y/o incluyen las células.

Una característica de estos materiales es que sus propiedades y fuerza mecánica pueden controlarse mediante la manipulación de varios parámetros del péptido (véase, por ejemplo, Caplan y col., *Biomacromolecules* (2000) 1:627-631; Caplan y col., *Biomaterials* (2000) 23: 219-227; y Caplan (2002)). Por ejemplo, se ha demostrado que la rigidez del gel aumenta en gran medida con la concentración de péptido. Las secuencias, características y propiedades de los péptidos y las estructuras formadas por ellos tras su autoensamblaje se analizan con más detalle en la próxima sección.

Los inventores y otros han demostrado que las estructuras formadas por el autoensamblaje de estos péptidos son capaces de soportar la unión de células, su viabilidad y su crecimiento cuando las células se cultivan sobre la superficie de la estructura. Además, una estructura peptídica formada mediante el autoensamblaje de RAD16-I (AcN-RADARADARADARADA-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 21) era capaz de servir como sustrato para el recrecimiento de neuritas y para la formación de sinapsis funcionalmente activas cuando se cultivaron neuronas sobre su superficie (Holmes (2000)). También se ha demostrado que los geles de péptido soportan la unión, la migración, la proliferación y la formación de estructuras similares a capilares y la supervivencia de células endoteliales durante un periodo de al menos 3 semanas (véase, por ejemplo, la Publicación de la solicitud PCT WO2003/096972). A diferencia de otros sustratos tridimensionales que se han usados para estudios de la angiogénesis *in vitro*, incluyendo geles de colágeno o fibrina o Matrigel, esta respuesta angiogénica se observó en ausencia de factores angiogénicos suministrados de manera exógena y sin signos significativos de apoptosis o de degradación proteolítica del gel.

Además, se ha demostrado que pueden encapsularse células dentro de los hidrogeles de péptido, colocando de este modo a las células en una disposición tridimensional dentro de una matriz de péptido y que las células mantienen la viabilidad y la función cuando se encapsulan de este modo (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º US 2002--0160471 y la Patente de los Estados Unidos n.º 6.800.116). Asimismo, los condrocitos encapsulados dentro de una estructura de hidrogel formada mediante el autoensamblaje de KLD12 (AcNKLDLKLKLDL-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 53) conservaron su morfología y desarrollaron una MEC similar al cartílago, mecánicamente funcional rica en proteoglicanos y colágeno de tipo II, que es indicativa de un fenotipo de condrocitos estable (véase, por ejemplo, Kisiday (2002)). Las células progenitoras de hígado encapsuladas dentro de una matriz de péptido formada mediante el autoensamblaje de RAD16-I expresaron marcadores indicativos de fenotipo de hepatocitos (Semino (2003)). Los resultados de este tipo indican que el ambiente a escala nanométrica proporcionado por los geles de péptido autoensamblante pueden mejorar la actividad funcional de un conjunto diverso de tipos celulares y permite la instrucción celular y la expresión de fenotipos celulares diferenciados.

A diferencia de muchos otros materiales naturales o artificiales que se han usado hasta ahora en un esfuerzo de proporcionar un ambiente adecuado para cultivo celular, ingeniería de tejidos, etc., los materiales de la presente invención interactúan con células a escala nanométrica en lugar de a escala micrométrica. Los materiales están formados por nanofibras en lugar de microfibras, en la creencia de que el pequeño tamaño de las fibras y/o la estructura de tejido abierta de los materiales promueve la extensión de los procesos celulares y permite la difusión de nutrientes, productos de desecho, etc., de un modo que proporciona ventajas únicas para el crecimiento celular. Las nanofibras que forman el material pueden ordenarse durante el autoensamblaje de una manera complementaria, debido a las débiles fuerzas de interacción molecular. Sin embargo, también pueden estar ordenadas aleatoriamente, lo que puede preferirse para ciertas aplicaciones. En otras palabras, aunque las fibras pueden tener una estructura interna ordenada, pueden carecer de direccionalidad o alineamiento unas respecto de otras. Por ejemplo, las fibras pueden no ser sustancialmente paralelas entre sí.

Como se describe en más detalle más adelante, los inventores han descubierto inesperadamente que es posible modificar extensivamente los péptidos autoensamblantes previamente descritos incorporando dominios de aminoácido adicionales (que también pueden citarse en el presente documento como dominios peptídicos, en caso

de que tengan al menos 3 aminoácidos de longitud), lo que no se ajusta necesariamente a los requisitos estructurales para el autoensamblaje, sin eliminar la capacidad de autoensamblaje de los péptidos modificados para formar una estructura macroscópica. Por ejemplo, los péptidos autoensamblantes pueden modificarse para incorporar un dominio de aminoácidos no autoensamblante que puede comprender, por ejemplo, una secuencia mínima biológicamente activa para su interacción con una biomolécula. Los péptidos resultantes comprenden, por lo tanto, un primer dominio de péptido autoensamblante y un segundo dominio de aminoácidos no autoensamblante. Por dominio de aminoácidos no autoensamblante se entiende un dominio de aminoácidos que no se autoensambla cuando está presente en forma de un péptido aislado (es decir, cuando no está unido a un péptido autoensamblante no modificado) en condiciones (por ejemplo, concentración iónica, concentración de péptido, pH, temperatura) que podrían dar como resultado el autoensamblaje de un péptido autoensamblante no modificado y diseñado de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Por "no se autoensambla" se entiende que el dominio de aminoácidos no forma nanofilamentos, nanofibras, láminas  $\beta$ , microfibras y similares o no forma una estructura macroscópica.

La sección a continuación describe los péptidos autoensamblantes que pueden modificarse de acuerdo con la presente invención y procedimientos mediante los cuales puede controlarse el proceso de autoensamblaje y/o las características de la estructura ensamblada. Las secciones posteriores describen los procedimientos y las composiciones de la invención, procedimientos para caracterizar estructuras formadas a partir de los péptidos autoensamblantes modificados de la invención, procedimientos para evaluar el fenotipo celular y para seleccionar dominios de aminoácido que se usan para la modificación, etc., con más detalle.

## II. Péptidos autoensamblantes, estructuras formadas por los mismos y procedimientos de uso

### (A) Secuencias peptídicas y estructuras macroscópicas

Los péptidos autoensamblantes no modificados anteriormente descritos comprenden una familia de moléculas complementarias y estructuralmente compatibles. Los péptidos y sus propiedades se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2002/0160471, 2005/0181973 y en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.955.343 y 5.670.483. Estos materiales están formados por unidades repetitivas de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos, en varios patrones alternos.

La primera molécula de esta clase, EAK16-11 (AEAEAKAKAEAEAKAK, A, alanina, E, glutamina y K, lisina; SEQ ID NO: 38), un péptido de 16 aminoácidos, se identificó como un segmento en una proteína de levadura, zootina, que se caracterizó originariamente por la unión a Z-ADN levógiro (Zhang (1992)). Basándose en este péptido, se ha diseñado de manera sistemática un gran número de péptidos autocomplementarios iónicos autoensamblantes, cambiando la secuencia de aminoácidos y siguiendo un patrón periódico. Los péptidos preferidos asumen estructuras secundarias regulares, tales como estructuras de lámina  $\beta$ , en solución (por ejemplo, solución acuosa). Se cree que esto sucede debido a que los péptidos contienen dos superficies distintas, una hidrófila y la otra hidrófoba y forman enlaces iónicos complementarios con repeticiones regulares en la superficie hidrófila (Zhang (1999)). Las cadenas laterales de los péptidos se reparten en dos caras, una cara polar, con cadenas laterales iónicas cargadas y una cara no polar, por ejemplo, con alaninas u otros grupos hidrófobos. Estas cadenas laterales iónicas son autocomplementarias entre sí en tanto que los restos de aminoácido cargados positivamente y cargados negativamente pueden formar pares iónicos complementarios. Por lo tanto, estos péptidos se denominan "péptidos iónicos autocomplementarios".

Los lados iónicos complementarios se han clasificado en varios módulos, es decir, módulo I, II, III, IV, etc., y módulos mixtos (Zhang (1999)). En caso de que los restos iónicos se alternen con un resto cargado positivamente y uno cargado negativamente (-+-+), los péptidos se describen como "módulo I"; en caso de que los restos iónicos se alternen con dos restos cargados positivamente y dos negativamente (-++-), los péptidos se describen como "módulo II"; en caso de que los restos iónicos se alternen con cuatro restos cargados positivamente y dos negativamente (-++++), los péptidos se describen como "módulo IV". Los péptidos que cumplen los criterios anteriormente mencionados pueden citarse en el presente documento como "péptidos autoensamblantes no modificados" para distinguirlos de los péptidos autoensamblantes modificados de la presente invención, lo que incluye un dominio de péptido que no cumple los criterios anteriores y no se autoensambla.

Se han analizado previamente diversos péptidos autocomplementarios de módulo I y II, tales como EAKA16-I (SEQ ID NO: 26), RADA16-I (SEQ ID NO: 21), RAEA16-I (SEQ ID NO: 28), and KADA16-I (SEQ ID NO: 30) (Tabla 1). Estos péptidos también se citan como RAD16-I, RAE16-I, KAD16-I, etc. (es decir, puede omitirse en la abreviatura el último aminoácido del módulo de cuatro aminoácidos). Los péptidos autocomplementarios iónicos del módulo IV que contienen 16 aminoácidos, tales como EAK16-IV, KAE16-IV, DAR16-IV y RAD16-IV, también se han estudiado. En caso de que los restos cargados de estos péptidos autoensamblantes estén sustituidos de manera adecuada sin cambiar el patrón general descrito anteriormente (por ejemplo, las lisinas cargadas positivamente se reemplazan por argininas cargadas positivamente y los glutamatos cargados negativamente se reemplazan por aspartatos cargados negativamente), estos efectos son esencialmente no significativos para el proceso de autoensamblaje. Sin embargo, en caso de que los restos cargados positivamente, lisina y arginina, se reemplacen por restos cargados negativamente, tales como aspartato y glutamato, los péptidos dejan de poder sufrir autoensamblaje para formar estructuras macroscópicas; sin embargo, siguen pudiendo formar una estructura de lámina  $\beta$  en presencia de sal.

Otros restos hidrófilos, tales como asparagina y glutamina, que forman enlaces de hidrógeno, pueden incorporarse en los péptidos en lugar de o además de los restos cargados. En caso de que las alaninas en los péptidos se cambien por restos más hidrófobos, tales como leucina, isoleucina, fenilalanina o tirosina, estos péptidos tienen una mayor tendencia a autoensamblarse y formar matrices peptídicas con una resistencia aumentada. Algunos péptidos que tienen composiciones y longitudes similares a estos péptidos anteriormente mencionados forman hélices  $\alpha$  y bucles aleatorios, en lugar de láminas  $\beta$ . Dichos péptidos normalmente no forman estructuras macroscópicas, aunque no se impide de manera absoluta la formación de estructura. Por tanto, además de la autocomplementariedad, es probable que sean importantes otros factores para la formación de estructuras macroscópicas, tales como la longitud del péptido, el grado de interacción intermolecular y la capacidad para formar matrices escalonadas.

Cabe destacar que en ciertas realizaciones de la invención, está presente un grupo o radical, tal como un grupo acilo (RCO-, en el que R es un grupo orgánico), por ejemplo, un grupo acetilo (CH<sub>3</sub>CO-; Ac-) en el extremo N-terminal de los péptidos a fin de neutralizar una carga positiva adicional que de lo contrario podría estar presente (por ejemplo, una carga que no sea el resultado de la cadena lateral del aminoácido N-terminal). De manera similar, puede usarse un grupo, tal como un grupo amina (-NH<sub>2</sub>) para neutralizar una carga negativa adicional que de lo contrario podría estar presente en el extremo C-terminal (por ejemplo, una carga que no sea el resultado de la cadena lateral del aminoácido C-terminal), convirtiendo de este modo el extremo C-terminal en una amida (-CONH<sub>2</sub>). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la neutralización de las cargas en las moléculas N y C-terminales puede facilitar el autoensamblaje. Un experto habitual en la materia será capaz de seleccionar otros grupos adecuados.

Los péptidos se autoensamblan para formar estructuras macroscópicas en diversas condiciones, por ejemplo, tras la adición de cationes monovalentes a una solución acuosa de péptido o tras la introducción de una solución de péptido a una solución que contiene cationes monovalentes. Antes del autoensamblaje, los péptidos pueden disolverse en una solución que está sustancialmente libre de iones monovalentes (por ejemplo, cationes) o que contiene únicamente una baja concentración de dichos iones, por ejemplo, menos de 10 mM, 5 mM, 1 mM, 0,5 mM o 0,1 mM. El autoensamblaje puede iniciarse o acelerarse sustancialmente mediante la adición de un soluto iónico a una solución de péptido o mediante un cambio en el pH. Por ejemplo, el NaCl a una concentración de entre 5 mM y 5 M induce el ensamblaje de los péptidos hasta formar estructuras macroscópicas en pocos minutos. Otras concentraciones más bajas de NaCl también pueden inducir el ensamblaje, pero a una menor velocidad. Algunos de los péptidos también pueden autoensamblarse en ausencia de concentraciones significativas de iones, en un proceso que puede ser dependiente del pH. Por ejemplo, algunos de los péptidos pueden permanecer en solución a un pH de aproximadamente 3,0 pero pueden autoensamblarse cuando se aumenta el pH.

Como alternativa, puede iniciarse el autoensamblaje introduciendo los péptidos en una solución que comprende iones, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato convencional (PBS), medio de cultivo tisular o un fluido fisiológico, tal como sangre, fluido cefalorraquídeo (CSF) y similares. Por lo tanto, los péptidos pueden autoensamblarse en una ubicación *in vivo*. Los iones ejemplares incluyen, pero sin limitación, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>. En ciertas realizaciones, la concentración del ion es de al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM o 50 mM a fin de inducir o acelerar sustancialmente el autoensamblaje. Un experto habitual en la materia será capaz de seleccionar concentraciones preferidas de iones basándose en la secuencia peptídica particular y/o la concentración y la velocidad deseada del ensamblaje. En general, la resistencia de la estructura resultante aumenta en presencia de iones en relación con su resistencia en ausencia de iones o con una concentración iónica menor, aunque cabe destacar que puede alcanzarse un máximo tras el cual un aumento en la concentración de iones no da como resultado un aumento de la resistencia.

Como se ha mencionado anteriormente, los péptidos preferidos se autoensamblan para formar una red de nanofibras, dando como resultado hidrogeles con un contenido de agua mayor del 99 %, cuando se disuelven en agua en un intervalo de 1-10 mg/ml (véase, por ejemplo, Zhang (1993); Zhang (1995); Leon (1998); Holmes (2000); Kisiday (2002); Caplan (2000); Caplan (2000b); y Caplan (2002)). La Figura 1A muestra la estructura de un péptido representativo, RAD16-II (RARADADARARADADA, R, arginina, A, alanina, D, ácido aspártico) (SEQ ID NO. 24). El material se autoensambla en fibras entrelazadas con un diámetro de 10-20 nm que forman espacios cerrados de 50-100 nm de diámetro. La red de nanofibras puede dar lugar a la formación de un hidrogel, creando una estructura macroscópica con un tamaño, preferentemente, que puede observarse a simple vista y que puede ser tridimensional.

Los péptidos autoensamblantes modificados o no modificados que forman la estructura macroscópica pueden contener entre 8 y 200 aminoácidos, entre 8 a 64 aminoácidos, entre 8 a 46 aminoácidos, entre 8 a 36 aminoácidos o entre 8 a 16 aminoácidos, inclusive. En ciertas realizaciones, los péptidos autoensamblantes modificados o no modificados contienen entre 8-46 aminoácidos, entre 8-36 aminoácidos, entre 8-26 aminoácidos, entre 8-16 aminoácidos, entre 10-16 aminoácidos o entre 12-16 aminoácidos, inclusive. La concentración de la solución de péptido autoensamblante antes de la formación de la matriz puede variar, por ejemplo, entre el 0,01 % (0,1 mg/ml) y el 99,99 % (999,9 mg/ml), inclusive. En ciertas realizaciones, la concentración de la solución de péptido autoensamblante antes de la formación de la matriz es de entre el 0,1 % (1 mg/ml) y el 10 % (100 mg/ml), inclusive, en particular, para aplicaciones de cultivo celular y/o terapéuticas. En algunas realizaciones, la concentración de la solución de péptido autoensamblante antes de la formación de la matriz es de entre el 0,1 % (1 mg/ml) y el 5 % (50 mg/ml), inclusive, o entre el 0,5 % (5 mg/ml) y el 5 % (50 mg/ml), inclusive. En otras realizaciones más, la concentración de la solución de péptido autoensamblante antes de la formación de la matriz es de aproximadamente

5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml.

Si se desea, las matrices pueden ser "tridimensionales", es decir, pueden formarse con una forma o volumen predeterminado. Para formar una matriz con una geometría o dimensiones deseados, puede colocarse una solución acuosa de péptido en un molde de formación preformado y se induce el autoensamblaje de los péptidos en una matriz mediante la adición de un ion, como se describe en el presente documento. Por matriz que tiene tres dimensiones se entiende que la matriz no es solo una fina sustancia de recubrimiento sobre el otro material, sino que tiene un espesor tal que pueden incluirse en el espesor al menos una serie de células.

Como alternativa, puede añadirse el ion a la solución de péptidos autoensamblantes modificados o no modificados poco después de poner la solución en el molde, a condición de que se tenga la precaución de colocar la solución en el molde antes de que se produzca un ensamblaje sustancial. Las características del material resultante, el tiempo necesario para el ensamblaje y la geometría y las dimensiones de la matriz macroscópica de péptido están regidas por parámetros que incluyen la concentración y la cantidad de solución de péptido que se aplica, la concentración de iones usada para inducir el ensamblaje de la matriz, el pH, la secuencia concreta del péptido autoensamblante modificado y las dimensiones del aparato de moldeado. En los casos en los que la estructura o matriz de péptido se vaya a implantar en el organismo, puede seleccionarse la forma basándose en el sitio de implante previsto. De acuerdo con diversas realizaciones de la invención, la matriz puede existir en forma de una fina capa, tal como un recubrimiento en la parte inferior de un cultivo tisular convencional o flotando en una solución. La capa puede tener un espesor de varios micrómetros, por ejemplo, 10 micrómetros, 10-50 micrómetros, 50-100 micrómetros, 100-200 micrómetros, etc. La capa puede comprender múltiples capas de lámina β.

Las matrices a escala nanométrica de péptido autoensamblante modificado o no modificado pueden formarse con diversos grados de rigidez o elasticidad. Las matrices de péptido tienen normalmente un bajo módulo elástico, por ejemplo, en el intervalo de 1-10 kPa, medido en un reómetro de cono-placa convencional. Dichos bajos valores permiten la deformación de la matriz como resultado de la contracción celular y esta deformación puede proporcionar un medio para la comunicación entre células. Puede controlarse la rigidez de la matriz mediante varias técnicas que incluyen cambios en la secuencia peptídica, cambios en la concentración de péptido y cambios en la longitud del péptido. También pueden usarse otros procedimientos para aumentar la rigidez, tal como la adición de una molécula de biotina al extremo amino o carboxilo de los péptidos o entre los extremos amino y carboxilo, que después puede reticularse.

**Tabla 1. Péptidos autoensamblantes "no modificados" representativos**

N.º	Nombre	Secuencia	Módulo
SEQ ID NO: 21	RADA16-I	n-RADARADARADARADA-c	I
SEQ ID NO: 22	RGDA16-I	n-RADARGDARADARGDA-c	I
SEQ ID NO: 23	RADA8-I	n-RADARADA-c	I
SEQ ID NO: 24	RAD 16-11	n-RARADADARARADADA-c	II
SEQ ID NO: 25	RAD8-II	n-RARADADA-c	II
SEQ ID NO: 26	EAKA16-I	n-AEAKAEAKAEAKAEAK-c	I
SEQ ID NO: 27	EAKA8-I	n-AEAKAEAK-c	I
SEQ ID NO: 28	RAEA16-I	n-RAEARAEARAEARAEA-c	I
SEQ ID NO: 29	RAEA8-I	n-RAEARAEA-c	I
SEQ ID NO: 30	KADA16-I	n-KADAKADAKADAKADA-c	I
SEQ ID NO: 31	KADA8-I	n-KADAKADA-c	I
SEQ ID NO: 32	EAH16-II	n-AEAEAHAAEAEAHAAH-c	II
SEQ ID NO: 33	EAH8-II	n-AEAEAHAAH-c	II
SEQ ID NO: 34	EFK16-II	n-FEFKFKFEFKFK-c	II
SEQ ID NO: 35	EFK8-II	n-FEFKFEFK-c	I
SEQ ID NO: 36	ELK16-II	n-LELELKLKLELELKLK-c	II

(continuación)

<b>Tabla 1. Péptidos autoensamblantes "no modificados" representativos</b>			
<b>N.º</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Módulo</b>
SEQ ID NO: 37	ELK8-II	n-LELELKLK-c	II
SEQ ID NO: 38	EAK16-II	n-AEAEAKAKAEAEAKAK-c	II
SEQ ID NO: 39	EAK12	n-AEAEAEAEAKAK-c	IV/II
SEQ ID NO: 40	EAK8-II	n-AEAEAKAK-c	II
SEQ ID NO: 41	KAE16-IV	n-KAKAKAKAEAEAEAE-c	IV
SEQ ID NO: 42	EAK16-IV	n-AEAEAEAEAKAKAKAK-c	IV
SEQ ID NO: 43	RAD16-IV	n-RARARARADADADADA-c	IV
SEQ ID NO: 44	DAR16-IV	n-ADADADADARARARAR-c	IV
SEQ ID NO: 45	DAR16-IV*	n-DADADADARARARARA-c	IV
SEQ ID NO: 46	DAR32-IV	n-(ADADADADARARARAR)-c	IV
SEQ ID NO: 47	EHK16	n-HEHEHKHKHEHEHKHK-c	N/A
SEQ ID NO: 48	EHK8-I	n-HEHEHKHK-c	N/A
SEQ ID NO: 49	VE20*	n-VEVEVEVEVEVEVEVEVE-c	N/A
SEQ ID NO: 50	RF20*	n-RFRFRFRFRFRFRFRFRF-c	N/A
SEQ ID NO: 51	KFQ12	n-FKFQKFQKFQ-c	I
SEQ ID NO: 52	EIK8	n-IEIKIEIK-c	I
SEQ ID NO: 53	KLD12	n-KLDLKLKLDL-c	I
N/A: indica no aplicable			
*Estos péptidos forman una lámina Q cuando se incuban en una solución que contiene NaCl, aunque no se ha observado que se autoensamblen formando estructuras macroscópicas.			

Los péptidos autoensamblantes modificados y/o no modificados pueden incluir L-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o una combinación de los mismos. En caso de que haya presencia de L-aminoácidos en la matriz, la degradación produce aminoácidos que pueden reutilizarse, por ejemplo, por las células en el cultivo o por células en un tejido hospedador. El hecho de que la subunidad monomérica básica de los péptidos sea, en ciertas realizaciones de la invención, L-aminoácidos, que se producen de manera natural en el organismo, distingue a esta clase de compuestos de varias otras sustancias biocompatibles y puede ofrecer ventajas únicas. Los péptidos pueden sintetizarse químicamente o purificarse de fuentes naturales o recombinantes y los extremos amino y carboxilo de los péptidos pueden estar protegidos o no protegidos. La matriz de péptido puede estar formada por una o más especies de péptido distintas que son complementarias y estructuralmente compatibles entre sí. Los péptidos que contienen pares desemparejados, tales como el emparejamiento repulsivo de dos restos cargados de manera similar de péptidos adyacentes, también pueden formar estructuras en caso de que la fuerza disruptiva esté dominada por interacciones estabilizantes entre los péptidos. Las matrices de péptido también pueden citarse en el presente documento como hidrogeles de péptido o matrices de hidrogel de péptido.

Los péptidos, incluyendo péptidos capaces de reticularse y los péptidos autoensamblantes modificados o no modificados, pueden sintetizarse usando química de F-moc convencional, que incluye síntesis tanto en solución como en fase sólida y se purifican usando cromatografía líquida de alta presión. Puede iniciarse la formación de una matriz de péptido mediante la adición de iones o sales de los mismos, como se describe en el presente documento. Los restos hidrófobos con cadenas laterales aromáticas pueden reticularse mediante exposición a irradiación UV. El alcance de la reticulación puede controlarse de manera precisa por la duración predeterminada de exposición a luz UV y por la concentración de péptido predeterminada. El alcance de la reticulación puede determinarse por la dispersión de la luz, la filtración en gel o microscopía electrónica de barrido usando procedimientos convencionales. Asimismo, también puede examinarse el alcance de la reticulación mediante HPLC o análisis de espectrometría de masas de la estructura tras la digestión con una proteasa. La resistencia del material puede determinarse antes y

después de la reticulación.

### *B. Cultivo celular y encapsulamiento*

5 Las matrices peptídicas (por ejemplo, geles, hidrogeles) formadas a partir de péptidos autoensamblantes no modificados o de los péptidos autoensamblantes modificados de la presente invención pueden usarse de varias maneras para cultivar células y tejidos. Las células y tejidos pueden cultivarse sobre la superficie de una estructura de matriz. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores sugieren que dicho ambiente puede imitar más estrechamente el ambiente celular natural que el cultivo sobre un sustrato rígido, tal como una placa de cultivo tisular de plástico convencional. En caso de que la matriz forme una estructura tridimensional, las células pueden extender procesos dentro de la estructura o migrar a su interior.

10 Las células también pueden encapsularse dentro de la matriz. Para encapsular células dentro de una estructura peptídica, pueden incubarse péptidos y células vivas en una solución acuosa que tenga un soluto isoosmótico a una concentración adecuada para soportar la viabilidad celular, en condiciones en las que los péptidos no se autoensamblen sustancialmente. En ciertas realizaciones de la invención, la solución contiene una concentración de catión monovalente de menos de 10 mM, 5 mM, 1 mM o 0,1 mM o está sustancialmente libre de cationes monovalentes. La solución también puede contener menos de 10 mM, 5 mM, 1 mM o 0,1 mM o estar sustancialmente libre de otras especies iónicas, por ejemplo, otros cationes o aniones. Se añade una cantidad de ion suficiente (por ejemplo, catión monovalente) para iniciar el autoensamblaje de los péptidos en una estructura macroscópica, tal como una estructura macroscópica de lámina Q, en la que se encapsulan las células mediante la formación de la estructura macroscópica. En ciertas realizaciones, las células encapsuladas están presentes en la estructura macroscópica en una disposición tridimensional. La solución puede estar contenida en un molde preformado con unas dimensiones que establecen un volumen o forma deseado en la estructura macroscópica.

20 En ciertas realizaciones de la invención, la concentración del ion añadido es de al menos 5 mM, 10 mM, 20 mM o 50 mM. Los iones adecuados incluyen, pero sin limitación, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>. En algunas realizaciones, la concentración del soluto isoosmótico es de al menos 50 mM, 150 mM o 300 mM. En otras realizaciones, la concentración del soluto isoosmótico está contenida en uno de los siguientes intervalos: 200 a 250 mM, 250 a 270 mM, 270 a 300 mM, 300 a 400 mM, 400 a 500 mM, 500 a 600 mM, 600 a 700 mM, 700 a 800 mM u 800 a 900 mM, inclusive. Los solutos isoosmóticos adecuados incluyen, pero sin limitación, hidratos de carbono, tales como la sacarosa, manitol y similares. Pueden emplearse otros solutos isoosmóticos, preferentemente no tóxicos para células a la concentración usada. El autoensamblaje también puede verse afectado por un cambio en el pH (por ejemplo, un aumento de un pH bajo a un pH mayor).

30 Pueden introducirse células y agentes, tales como moléculas biológicas (por ejemplo, agentes inductores de la diferenciación, agentes de proliferación, factores de crecimiento y similares) y compuestos terapéuticos en la solución de péptido antes del autoensamblaje. Posteriormente, el proceso de autoensamblaje forma una estructura que encapsula a las células o moléculas. Para lograr una distribución uniforme de las células o moléculas dentro de la estructura, puede ser deseable mezclar exhaustivamente la solución antes de iniciarse el autoensamblaje. Puede ser deseable mantener las células o los agentes en una solución que sustancialmente no contenga iones o solo una baja concentración de iones a fin de evitar el inicio o el autoensamblaje inmediatamente tras combinar las células o agentes con la solución de péptido. En ciertas realizaciones, las células se mantienen en una solución isoosmótica (por ejemplo, una solución de sacarosa) antes de combinarlas con la solución de péptido. Los péptidos en sí pueden disolverse en una solución isoosmótica a la que se añaden las células (por ejemplo, un sedimento de células, suspensión de células) o los agentes. La composición resultante puede mezclarse para lograr una distribución más uniforme de las células y/o agentes, tras lo cual, la composición se expone a iones (por ejemplo, se añaden iones a la composición o la composición se mezcla con una solución que contiene iones).

45 Las células pueden cultivarse sobre la superficie de una estructura de matriz de péptido de un modo similar a aquel en el que se cultivan en un sustrato convencional, tal como una placa o portaobjetos de cultivo tisular o una placa o portaobjetos de cultivo tisular que está recubierta con un material de origen biológico, tal como colágeno, Matrigel y similares. En general, las células pueden cultivarse hasta cualquier grado deseado de confluencia. En ciertas realizaciones, las células encapsuladas están presentes en la estructura macroscópica en una disposición tridimensional. La densidad de las células puede ser, por ejemplo, de entre 5x10<sup>3</sup>/ml a 5x10<sup>4</sup>/ml, de entre 5x10<sup>4</sup>/ml a 5x10<sup>5</sup>/ml, de entre 5x10<sup>5</sup>/ml a 5x10<sup>6</sup>/ml o de entre 5x10<sup>6</sup>/ml a 5x10<sup>7</sup>/ml, incluyéndose los extremos. También pueden usarse otros intervalos.

55 Las condiciones de cultivo han de ser próximas a las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el pH del medio de cultivo es próximo al pH fisiológico. En algunas realizaciones, el pH es de entre aproximadamente 6-8. En otras realizaciones, el pH es de entre aproximadamente 7 a 7,8. En otras realizaciones más, el pH es de aproximadamente 7,4. En ciertas realizaciones, la temperatura del medio de cultivo es próxima a la temperatura fisiológica. Las temperaturas biológicas varían entre aproximadamente 30 °C a 40 °C para las células de mamífero. En ciertas realizaciones, las células se cultivan a temperaturas entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 38 °C o entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C.

Las células pueden cultivarse sobre o dentro de la estructura de péptido durante cualquier tiempo adecuado,

- dependiendo del número de células y de la densidad deseada, la velocidad de proliferación de las células y el tiempo necesario para que se produzca la reprogramación celular deseada. Estos parámetros variarán dependiendo de las células particulares y los fines para los que se vaya a usar la invención. Un experto habitual en la materia será capaz de variar estos parámetros y de observar los efectos de hacerlo, a fin de determinar el tiempo óptimo para mantener las células en cultivo sobre o dentro de la estructura. En ciertas realizaciones de la invención, las células se cultivan durante aproximadamente 3 días, 7 días, 14 días, 21 días, 28 días, 56 días o 90 días. En ciertas realizaciones de la invención, las células se cultivan durante entre 1 y 3 días, inclusive, entre 4 y 7 días, inclusive, entre 8 y 14 días, inclusive, entre 15 y 21 días, inclusive, entre 22 y 28 días, inclusive, entre 29 y 56 días, inclusive o entre 57 y 90 días, inclusive. También pueden usarse periodos de cultivo más largos o cortos.
- En ciertas realizaciones, al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células (ya estén cultivadas sobre una superficie o encapsuladas) son viables 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas tras la formación de la matriz macroscópica. En otras realizaciones, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de las células son viables un día o una semana después de la formación de la matriz macroscópica.
- En general, puede cultivarse y/o encapsularse cualquier tipo celular de acuerdo con la presente invención, incluyendo, pero sin limitación, células endoteliales y precursores de las mismas, células de médula ósea, células del perostio, células pericondriales, fibroblastos, mioblastos o miocitos esqueléticos, células neuronales, células del hipocampo, células epidérmicas, células endoteliales no vasculares o células de músculo liso, queratinocitos, células basales, células espinosas, células granulares, células madre (por ejemplo, embrionarias, fetales, de sangre del cordón, adultas), células pulmonares, células del sistema inmunitario, células de ovario, células pancreáticas, células de cuello de útero, células de hígado o células de prepucio. Las células pueden comprender células madre embrionarias, células madre fetales, células madre de sangre del cordón umbilical o células madre adultas, por ejemplo, células madre que son capaces de o que pueden inducirse para que se diferencien en cualquiera de los tipos celulares anteriores.
- Las fuentes de las células también pueden incluir organismos fetales o adultos, en particular, mamíferos o líneas celulares establecidas. Se conocen en la técnica numerosas líneas celulares establecidas, muchas de las cuales se encuentran disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (véase la página web que tiene la URL [www.atcc.org](http://www.atcc.org), que también proporciona referencias que describen estas líneas celulares). A la hora de analizar las células y líneas celulares, la expresión "procedente de" indica que se obtiene una célula de una fuente particular o que la célula es descendiente de una célula obtenida de esa fuente. Por ejemplo, una célula procedente de hígado es una célula que se obtiene del hígado o la progenie o descendencia de dicha célula. Cuando se usa el término "progenie" en el presente documento, se refiere no solo a los productos inmediatos de la división celular, sino también a los productos de las divisiones celulares posteriores, es decir, a células que son descendientes de una célula particular. Una célula que procede de una línea celular es un miembro de dicha línea celular o es la progenie o un descendiente de una célula que es un miembro de dicha línea celular. Una célula procedente de un órgano, tejido, individuo, línea celular, etc., puede modificarse *in vitro* después haberse obtenido. Dicha célula se sigue considerando procedente de la fuente original.
- Los procedimientos para aislar células se conocen en la técnica. Pueden usarse células recogidas de un individuo ya sea con o sin un periodo de expansión en cultivo. Como alternativa, pueden usarse células que se han propagado en cultivo como una línea celular estable. En ciertas realizaciones de la invención, por ejemplo, en ciertas aplicaciones terapéuticas, como se proporciona en el presente documento, las células son autólogas, mientras que en otras realizaciones de la invención, las células son alogénicas o xenogénicas. Cuando se usan células no autólogas, las células pueden tratarse de varias maneras antes de introducirlas en el organismo, a fin de reducir la probabilidad o reducir el alcance de una respuesta del sistema inmunitario por parte del sujeto. Dichos tratamientos pueden incluir modificar, enmascarar o eliminar un antígeno en la superficie de una célula como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud PCT n.º WO/2001/007568.
- En ciertas realizaciones, las células se recogen de un sujeto (tal como, por ejemplo, un paciente humano) y se obtiene una línea celular clonal de una o más de estas células. Pueden obtenerse líneas clonales mediante siembra de dilución limitante o clasificación de células individuales. Los procedimientos para obtener líneas celulares clonales se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Puck y Marcus, *Experimental Medicine* (1956) 103:653; C. V. Ramakrishnan, Ed., *Cell Culture*, "Clone size distribution in the study of inhomogeneity of growth rates in tissue culture," Dr. W. Junk Publishers, Países Bajos: 1965; y Leong y col., *Mutat. Res.*(1985) 150:403-410. Las células de la línea celular se usan en la práctica de la invención. Cuando están pensadas para el tratamiento de un paciente particular, pueden usarse ventajosamente células de un donante coincidente. Pueden cultivarse células aisladas de un individuo o mantenidas como línea celular de acuerdo con cualquier técnica adecuada, incluyendo técnicas de cultivo celular convencionales antes de su uso en la práctica de la presente invención.
- También puede ser deseable alterar genéticamente las células antes de su uso en la invención. Se conocen en la técnica numerosos procedimientos para introducir material genético exógeno (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud PCT n.º WO/2001/007568). Dichos procedimientos incluyen normalmente introducir material genético, tal como una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en la célula, en la que la molécula de ácido nucleico codifica un producto que se va a expresar por la célula. El producto puede ser, por ejemplo, un agente de

reprogramación, tal como un factor de crecimiento, un factor de transcripción que a su vez inducirá la expresión de otros productos génicos y similares. En ciertas realizaciones de la invención, se introduce en las células un marcador de selección. En otras realizaciones de la invención, se introduce en las células un gen que codifica un marcador de selección, tal como, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a fármacos o un marcador detectable (por ejemplo, GFP) bajo el control de un promotor específico de tejido. En ciertas realizaciones, se usa la expresión del marcador de detección como un medio para determinar si la célula o su progenie se ha diferenciado, desdiferenciado o transdiferenciado a lo largo de una vía de linaje celular concreta característica de ese tejido. En otras realizaciones, el marcador detectable se usa para aislar células que se han diferenciado, desdiferenciado o transdiferenciado a lo largo de una vía particular, por ejemplo, usando procedimientos inmunológicos, FACS u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica numerosos marcadores de selección y detectables. Además, se conocen bien promotores específicos de tejido, específicos de órgano y específicos de linaje. Los genes pueden introducirse bajo el control de un promotor constitutivo o inducible de los muchos que se conocen en la técnica.

Las matrices sobre las que se cultivan las células o en las que se encapsulan las células pueden someterse a diversas condiciones ambientales que pueden afectar al fenotipo celular. Por ejemplo, las matrices pueden someterse a varios estreses mecánicos definidos o predeterminados, por ejemplo, estrés de cizalladura, pautas de compresión y similares, que pueden dar como resultado una síntesis alterada de los componentes de la MEC. Es de sobra conocido, por ejemplo, que el flujo, por ejemplo, flujo pulsátil, puede alterar la secreción de proteínas por las células cultivadas *in vitro*. Las células en el cartílago articular natural y en construcciones de ingeniería de tejidos responden a estímulos mecánicos a través de múltiples vías regulatorias. Dichos estudios dan como resultado una señalización intra e intercelular, alteraciones en el nivel de transcripción, la traducción de proteínas, las modificaciones postraduccionales y la síntesis de macromoléculas intracelulares y extracelulares (Kisiday (2002)).

#### C. Modificación de péptidos autoensamblantes mediante la adición de un dominio de aminoácidos

Los inventores han descubierto una flexibilidad no prevista ya que los péptidos autoensamblantes (proporcionados en la Tabla 1) pueden modificarse mediante la adición de dominios de aminoácido adicionales que no se autoensamblarían en caso de presentarse en forma aislada en condiciones (por ejemplo, fuerza iónica, concentración de péptido, pH, temperatura) para formar péptidos autoensamblantes modificados. Asimismo, en determinadas realizaciones, la adición de uno o más dominios de aminoácidos no autoensamblantes no impide el autoensamblaje del péptido modificado, por ejemplo, para formar nanofibras y/o una estructura macroscópica. En ciertas realizaciones, el péptido modificado se autoensambla para formar una estructura macroscópica que comprende nanofibras. Aunque la estructura resultante puede ser menos resistente y/o estable que una estructura resultante del autoensamblaje del péptido no modificado, la observación visual y/o los estudios reológicos, como se describen en los ejemplos, confirman que se produce la formación de hidrogel.

Por lo tanto, los péptidos modificados pueden usarse para varios fines descritos anteriormente y en el presente documento. Para los fines de la presente invención, un péptido autoensamblante que posee las características estructurales descritas en la sección anterior y que no incluye una porción que carezca de estas características se denominará como "péptido autoensamblante no modificado". Ha de entenderse que puede alterarse un péptido autoensamblante no modificado de varias maneras descritas anteriormente que no incluyen la adición de aminoácidos al péptido. Dichos péptidos autoensamblantes alterados no se citan como "modificados" dentro del significado de la expresión como se usa en el presente documento, sino como "alterados" o "derivatizados". Los péptidos autoensamblantes modificados de la invención son distintos de las moléculas de origen natural, es decir, no se encuentran en moléculas de origen natural, aunque pueden producirse uno o más de los dominios de aminoácido de un péptido de la invención en una molécula de origen natural. Por lo tanto, pueden considerarse "aislados" o "sintéticos", lo que significa que la secuencia total del péptido no se produce en la naturaleza sin la intervención del ser humano.

Un péptido que incluye un dominio de aminoácidos que comprende un péptido autoensamblante no modificado y un segundo dominio de aminoácido que carece de una o más de las características estructurales de un péptido autoensamblante no modificado y por lo tanto, no se autoensambla para formar nanofibras o para formar una estructura macroscópica en condiciones que darían como resultado el autoensamblaje de un péptido autoensamblante no modificado, se cita como un "péptido autoensamblante modificado" en caso de que sea capaz de autoensamblarse (por ejemplo, para formar nanofibras y/o una estructura macroscópica) en condiciones que darían como resultado el autoensamblaje de un péptido autoensamblante no modificado. Se apreciará que, en general, un péptido autoensamblante modificado corresponderá a un péptido autoensamblante no modificado particular que no incluirá el segundo dominio de aminoácido, pero que tiene la misma porción autoensamblante. En ciertas realizaciones de la invención, las condiciones en las que se produce el autoensamblaje del péptido autoensamblante modificado son las mismas que las condiciones en las que se ensambla el péptido autoensamblante no modificado correspondiente. En otras realizaciones de la invención, las condiciones en las que se produce el autoensamblaje del péptido autoensamblante modificado son diferentes a las condiciones en las que se ensambla el péptido autoensamblante no modificado correspondiente. En este caso, las condiciones para el autoensamblaje del péptido autoensamblante modificado son las mismas que las condiciones en las que se autoensambla un péptido autoensamblante no modificado diferente (no correspondiente).

Por lo tanto, los péptidos autoensamblantes modificados de la invención comprenden (a) un primer dominio de aminoácidos que media el autoensamblaje, en el que el dominio comprende aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternos que son complementarios y estructuralmente compatibles y se autoensamblan en una estructura macroscópica; y (b) un segundo dominio de aminoácidos que no se autoensambla en forma aislada (es decir, cuando está presente como el único péptido en una solución, en condiciones que podrían dar como resultado el ensamblaje de un péptido autoensamblante no modificado, como se ha descrito anteriormente).

En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos permite el ensamblaje del primer dominio de aminoácidos, de tal forma que el péptido se ensambla para formar nanofibras y/o una estructura macroscópica. En otras realizaciones de la invención, el péptido forma láminas  $\beta$ .

En ciertas realizaciones de la invención, un dominio de aminoácidos tiene al menos 3 aminoácidos; al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos o más, por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20 etc. aminoácidos. En ciertas realizaciones de la invención, el primer dominio de aminoácidos (porción autoensamblante) tiene al menos 3 aminoácidos; al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos o más, por ejemplo, al menos 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. En ciertas realizaciones, el primer dominio de aminoácidos tiene al menos de 12 a 16 aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones de la invención, el segundo dominio de aminoácidos (porción no autoensamblante) tiene al menos 3 aminoácidos; al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos o más, por ejemplo, al menos 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. Sin embargo, en algunas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos se limita a 20 aminoácidos o menos, 18 aminoácidos o menos, 16 aminoácidos o menos, 14 aminoácidos o menos, 12 aminoácidos o menos, 10 aminoácidos o menos, 9 aminoácidos o menos, 8 aminoácidos o menos, 6 aminoácidos o menos o 4 aminoácidos o menos.

Puede ser deseable mantener una cierta proporción de aminoácidos en las porciones autoensamblantes y no autoensamblantes del péptido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, el segundo dominio de aminoácidos es un 50 % o menos del número total de aminoácidos en el péptido. En ciertas realizaciones, el dominio de aminoácidos no autoensamblante está presente entre dos dominios autoensamblantes. En algunas realizaciones, cada uno de los dominios autoensamblantes que flanquean al dominio no autoensamblante tiene más de 8, 12, 14, 16, 18 o 20 aminoácidos de longitud.

La Figura 1A muestra modelos moleculares que representan un péptido autoensamblante representativo, RAD16-I (parte superior) y el péptido RAD16-I modificado para incluir un dominio de aminoácidos no autoensamblante en su extremo C-terminal (parte inferior).

La Figura 1D muestra una variedad de configuraciones posibles para los péptidos autoensamblantes modificados de acuerdo con la invención. El dominio A representa un dominio de aminoácido autoensamblante. El dominio B representa un dominio de aminoácido no autoensamblante (dominio de modificación). Como se indica en la figura, puede estar presente un dominio de modificación en el extremo N y/o C-terminal del dominio autoensamblante o puede estar presente entre dos dominios autoensamblantes.

Los dominios de aminoácido pueden estar unidos a través de un grupo enlazador que comprende uno o más aminoácidos o una entidad molecular diferente. Puede usarse un grupo enlazador de aminoácidos que consiste en uno o más restos de glicina o alanina, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 etc. glicinas. En ciertas realizaciones, el grupo enlazador de aminoácidos consiste en uno o más restos de glicina. Ya que la glicina y la alanina son pequeñas y no polares, la incorporación de dicho grupo enlazador minimiza la posibilidad de interferencia con el autoensamblaje.

Aunque los péptidos modificados descritos en los ejemplos se prepararon mediante síntesis en fase sólida del péptido extendido, dando como resultado una cadena lineal, también están abarcadas por la presente invención variaciones en las que el motivo modificante se conjuga o reticula con una cadena lateral. Los procedimientos para lograr dicha conjugación o reticulación se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede acoplarse un péptido que contiene un resto de cisteína (o cualquier aminoácido modificado para que incluya un átomo de azufre) a un segundo péptido que contiene un átomo de azufre mediante la formación de enlaces disulfuro. Por tanto, en general, el péptido autoensamblante modificado puede ser un polímero de aminoácidos lineal individual unido mediante enlaces peptídicos o puede tener una estructura ramificada en la que se unen entre sí dos polímeros de aminoácidos (por ejemplo, siendo cada uno un polímero de aminoácidos unido mediante enlaces peptídicos) ya sea de manera covalente (por ejemplo, mediante enlaces disulfuro, enlaces de carbono-carbono y similares) o de manera no covalente (por ejemplo, mediante una interacción de biotina-avidina).

Los ejemplos de procedimientos de reticulación incluyen, pero sin limitación, el procedimiento de glutaraldehído, que se acopla principalmente a través del grupo amino de V y el grupo amino de W, químicas de acoplamiento de maleimida-sulfhidrilo (por ejemplo, el procedimiento con éster de maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS)) y procedimientos de oxidación de peryodato. Además, se conocen numerosos agentes de reticulación. Los agentes de reticulación ejemplares incluyen, pero sin limitación, carbodiimidas, ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHS-ASA), diclorhidrato de dimetil pimelimidato (DMP), dimetilsuberimidato (DMS) y 3,3'-ditiobispropionimidato

(DTBP). Para información adicional acerca de los procedimientos de conjugación y los reticuladores, véase el Journal Bioconjugate Chemistry, publicado por la American Chemical Society, Columbus Ohio, PO Box 3337, Columbus, Ohio, 43210. Véase también "Cross-Linking", Pierce Chemical Technical Library, disponible en la página Web que tiene la URL [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) y publicado originariamente en el catálogo de Pierce de 1994-1995 y las referencias citadas en el mismo y Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991.

Los reactivos de reticulación bifuncionales contienen dos grupos reactivos, proporcionando de este modo un medio para unir covalentemente dos grupos diana. Los grupos reactivos en un reactivo químico de reticulación pertenecen normalmente a las clases de grupos funcionales que incluyen ésteres de succinimidilo, maleimidas y yodoacetamidas. Una serie de esquemas comunes para formar un heteroconjugado implican el acoplamiento indirecto de un grupo amina en una biomolécula a un grupo tiol en una segunda biomolécula, normalmente, mediante una secuencia de reacción en dos o tres etapas. La elevada reactividad de los tioles y su rareza relativa en la mayoría de las biomoléculas hacen que los grupos tiol sean buenas dianas para la reticulación química controlada. En caso de que ninguna de las moléculas contenga un grupo tiol, puede introducirse uno o más usando uno de los diversos procedimientos de tiolación. La biomolécula que contiene tiol puede hacerse reaccionar entonces con una biomolécula que contiene amina usando un reactivo de reticulación heterobifuncional, por ejemplo, un reactivo que contiene tanto un éster de succinimidilo y una maleimida o una yodoacetamida. También puede usarse reticulación de ácido amino-carboxílico y ácido tiol-carboxílico. Por ejemplo, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) puede reaccionar con biomoléculas para formar reticulaciones de "longitud cero", normalmente con una molécula o entre subunidades de un complejo de proteína. En esta química, el reactivo de reticulación no se incorpora en el producto final.

Hay disponibles varios procedimientos para introducir tioles en las biomoléculas, incluyendo la reducción de los disulfuros intrínsecos, así como la conversión de grupos amina, aldehído o ácido carboxílico en grupos tiol. Las reticulaciones por disulfuro de cisteínas en las proteínas pueden reducirse a restos de cisteína mediante ditiotreitolo (DTT), tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o tris-(2-cianoetil)fosfina. Las aminas pueden tiolarse indirectamente mediante reacción con 3-(2-piridiltio)propionato de succinimidilo (SPDP), seguido de reducción del conjugado de 3-(2-piridiltio)propionilo con DTT o TCEP. Las aminas pueden tiolarse indirectamente por reacción con acetiltioacetato de succinimidilo, seguido de la eliminación del grupo acetilo con hidroxilamina o hidrazina 50 mM a un pH próximo al neutro. Los restos de triptófano en las proteínas libres de tiol pueden oxidarse en restos de mercaptotriptófano, que después pueden modificarse mediante yodoacetamidas o maleimidas.

#### D. Mezclas de péptidos

La invención abarca el reconocimiento de que es posible mezclar uno o más péptidos autoensamblantes no modificados junto con uno o más péptidos autoensamblantes modificados de la presente invención en diversas proporciones y que las estructuras macroscópicas que comprenden péptidos autoensamblantes tanto no modificados como modificados pueden formarse a partir de dichas mezclas. Las características resultantes pueden tener ciertas características ventajosas en relación con las estructuras formadas mediante el autoensamblaje de un péptido autoensamblante homogéneo (es decir, un 100 % de un péptido individual). Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente y en el presente documento, los péptidos autoensamblantes modificados pueden dar como resultado estructuras macroscópicas que son más débiles que las estructuras formadas por el péptido no modificado correspondiente, por ejemplo, pueden tener un carácter menos parecido a un gel.

Sin embargo, los péptidos modificados pueden inducir ciertos efectos fisiológicos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los péptidos modificados inducen fenotipos celulares deseables. En otras realizaciones, los péptidos modificados alteran el comportamiento celular. En otras realizaciones más, los péptidos modificados alteran la unión de las moléculas de la MEC. Una estructura macroscópica formada a partir de una composición (también citada como una mezcla) de péptidos autoensamblantes no modificados y modificados puede tener propiedades mecánicas que se asemejan a las de las estructuras macroscópicas formadas mediante el autoensamblaje del péptido no modificado, a la vez que poseen la capacidad de influenciar el comportamiento celular, el fenotipo, etc., de maneras deseables.

En general, pueden usarse una gran variedad de proporciones de péptido no modificado a modificado, dependiendo de las propiedades de la matriz macroscópica que se vaya a formar. Por ejemplo, la proporción de péptido no modificado a modificado puede ser, por ejemplo, 100:1, 99:1, 50:1, 25:1, 10:1, 9:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:99, 1:50, 1:25, 1:10, 1:9, 1:5, 1:4, 1:2, 1:1 y similares. Estas proporciones se enumeran con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Los péptidos pueden mezclarse sobre una base molar o basándose en el peso, el volumen de la solución de péptido, etc. Los péptidos pueden mezclarse en forma seca, tras lo cual se forma una solución de péptido mixto.

Como alternativa, puede disolverse cada péptido y mezclarse entre sí las soluciones resultantes. La invención también abarca la mezcla de múltiples péptidos autoensamblantes modificados con o sin la adición de un péptido autoensamblante no modificado a fin de generar una estructura macroscópica que combina características deseadas de los diferentes péptidos autoensamblantes modificados. Los diversos péptidos autoensamblantes modificados pueden contener diferentes dominios de aminoácido, ya sean dominios de aminoácidos de la misma proteína de

origen natural o de diferentes proteínas o completamente artificiales, etc.

En ciertas realizaciones de la invención, un péptido autoensamblante modificado no se autoensambla cuando está presente como único péptido en una solución en condiciones que podrían dar como resultado el ensamblaje del péptido no modificado correspondiente, pero se autoensambla con péptidos autoensamblantes no modificados cuando está presente en combinación con dichos péptidos. En ciertas realizaciones, el autoensamblaje da como resultado una composición que comprende nanofibras que opcionalmente forman una estructura macroscópica que contiene una mezcla tanto de péptidos no modificados como de péptidos modificados, por ejemplo, principalmente péptidos no modificados. Como alternativa, el autoensamblaje da como resultado una composición que comprende algunas nanofibras que no contienen péptidos modificados mientras que otras nanofibras no contienen dichos péptidos.

*E. Motivos de péptido funcionalizado*

En general, puede añadirse cualquiera de una gran variedad de diferentes dominios de aminoácidos a los péptidos autoensamblantes, a condición de que la presencia del dominio adicional no impida el autoensamblaje (por ejemplo, para formar nanofibras, láminas beta y/o una estructura macroscópica). Los dominios adicionales pueden conferir cualquiera de una serie de propiedades deseables a los péptidos resultantes. Por ejemplo, el dominio adicional puede mediar una actividad biológica, por ejemplo, puede afectar al comportamiento de las células que se ponen en contacto con una matriz formada mediante el autoensamblaje de los péptidos. El dominio adicional puede unirse a una biomolécula de origen natural o artificial, tal como una proteína de la MEC, una molécula de la superficie celular, factor de crecimiento, proteína, péptido, anticuerpo, etc. El dominio adicional puede unirse a una sustancia inorgánica, tal como un metal, ion, etc. La presencia del dominio adicional puede alterar las propiedades materiales (por ejemplo, resistencia, elasticidad, etc.) de una estructura macroscópica creada mediante el autoensamblaje del péptido, en relación con las propiedades de una estructura macroscópica creada mediante el autoensamblaje del péptido no modificado. Por lo tanto, mediante la modificación de un péptido autoensamblante para que incluya un dominio no autoensamblante, pueden ajustarse las propiedades materiales de una estructura macroscópica de acuerdo con las necesidades del usuario. Por ejemplo, para su implante en el cuerpo, puede ser deseable emplear materiales con diferentes propiedades materiales, dependiendo del sitio de implante y/o el tejido que el implante vaya a reemplazar (por ejemplo, hueso, tejido conectivo, tejido blando, tal como músculo, tejido ocular, tejido de órgano sólido, etc.). Las secciones a continuación proporcionan una descripción no limitante de los dominios de aminoácido ilustrativos que pueden añadirse a un péptido autoensamblante no modificado y de procedimientos para su selección.

La tabla 2a presenta una lista no limitante de varias secuencias mínimas biológicamente activas que han demostrado tener actividades biológicas en varios sistemas. Puede incorporarse o usarse cualquiera de estas secuencias como segundo dominio de aminoácidos para la modificación de un péptido autoensamblante "no modificado" para formar uno "modificado". En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos una secuencia mínima biológicamente activa. En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos dos secuencias mínimas biológicamente activas. Ha de entenderse que cualquiera de estas secuencias u otras, puede evaluarse sintetizando realmente el péptido modificado y probando su capacidad para autoensamblarse, por ejemplo, para formar láminas beta, nanofibras y/o una estructura macroscópica, en condiciones que podrían dar como resultado el autoensamblaje de un péptido no modificado. Los procedimientos para llevar a cabo dichas pruebas se describen más adelante y las pruebas en sí no requieren más allá de experimentación rutinaria. Las pruebas pueden llevarse a cabo en condiciones adecuadas para el autoensamblaje de péptidos autoensamblantes no modificados. En ciertas realizaciones, se seleccionan péptidos modificados que se autoensamblan formando láminas beta, nanofibras y/o estructuras macroscópicas.

Puede usarse cualquiera de una gran variedad de secuencias mínimas biológicamente activas además de las listadas en la Tabla 2a como secuencias peptídicas biológicamente activas para modificar los péptidos autoensamblantes no modificados. Estas secuencias pueden proceder de cualquiera de una gran variedad de proteínas y péptidos de origen natural, incluyendo componentes de la MEC, moléculas de adhesión celular, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, etc. Por ejemplo, la secuencia -RGD- es una secuencia de reconocimiento celular prototípica que se encuentra en la fibronectina y es de sobra conocido que es reconocida por las integrinas y que media la unión celular.

-PRGDSGYRGD-	-DGRGDSVAYG-	-ALKRQGRTLYGF-
-PFSSTKT-	-FLGFPT-	-KLTWQELYQLKYKGI-
-SKPPGTSS-	-STFTKSP-	-IKVAV-

(continuación)

<b>Tabla 2a. Secuencias mínimas biológicamente activas ejemplares proporcionadas en los motivos funcionalizados</b>		
-FHRRIKA-	-IKLLI-	-RGD-
-REDV-	-LKKTETQ-	

5 Como se describe en el presente documento, los inventores crearon una variedad de péptidos modificados (Tabla 2b) que incorporan las secuencias mínimas biológicamente activas y evaluaron su capacidad para ensamblarse en estructuras macroscópicas que podrían usarse para fines tales como cultivo celular, ingeniería de tejidos o aplicaciones terapéuticas, ya sea con o sin células. Sorprendentemente, se ha descubierto que pueden hacerse grandes modificaciones sin impedir la formación de la matriz. Los inventores comprobaron la capacidad de estos nuevos materiales para soportar la formación de monocapas, el crecimiento y la función de células preosteoblásticas de ratón, células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC), células madre procedentes de tejido adiposo humano (ADSC) y células madre mesenquimales humanas (MSC). La adición de una serie de las secuencias mínimas biológicamente activas anteriores confirió nuevas actividades biológicas a los péptidos, según se evidencia por una alteración en comportamiento celular cuando se cultivaron en presencia de matrices hechas de los péptidos modificados.

<b>Tabla 2b. Péptidos autoensamblantes modificados ejemplares</b>		
<b>N.º</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Descripción</b>
SEQ ID NO.1	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.2	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFLGFPT-CONH <sub>2</sub>	MP-1 (purificación de médula ósea)
SEQ ID NO.3	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGALKRQGRTLYGF-CONH <sub>2</sub>	Péptido de crecimiento osteogénico
SEQ ID NO.4	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.5	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGDGRGDSVAYG-CONH <sub>2</sub>	Dom. de adhesión a células (Osteopontina)
SEQ ID NO.6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRRIKA-CONH <sub>2</sub>	Dominio de unión a heparina
SEQ ID NO.7	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDSG-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.8	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGRGDSCONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGF con 2 glicinas enlazadoras
SEQ ID NO.9	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGRGDSCONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGF con 4 glicinas enlazadoras
SEQ ID NO.10	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGREDV-CONH <sub>2</sub>	Fibronectina/adhesión de células endoteliales
SEQ ID NO.11	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGKLTWQELYQLKYKGI-CONH <sub>2</sub>	Péptido de imitación de VEGF/Se une a receptores de VEGF
SEQ ID NO.12	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.13	AcIEIKIEIKIGGPRGSYRGDS-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.14	AcIEIKIEIKIGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea

(continuación)

<b>N.º</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Descripción</b>
SEQ ID NO.15	AcIEIKIEIKIGGSKPPGTS-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.16	AcFKFQFKFQFKFQGGPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.17	AcFKFQFKFQFKFQGGFHRRRIKA-CONH <sub>2</sub>	Dominio de unión a heparina
SEQ ID NO.18	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSTFTKSP-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.19	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSIKVAVS-CONH <sub>2</sub>	Laminina (proteína receptora de laminina de 110 kDa)
SEQ ID NO.20	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSEIKLLIS-CONH <sub>2</sub>	Laminina (α3β1 y heparina de la superficie celular)

**Secuencia de unión a RGD repetitiva(-PRGDSGYRGD-, SEQ ID NO.4: PRGmx, SEQ ID NO. 7: DSG):** RGD es una secuencia de unión clave para la unión celular que funciona específicamente con integrinas. -PRGDS- e -YRGDS- son los motivos RGD que aparecen más comúnmente en las proteínas naturales. La unión de -RGD- puede afectar a las conformaciones estructurales de la proteína (Kantlehner y col., *Chembiochem* (2000) 1:107-114). Las repeticiones de la secuencia de unión a RGD aumentan la posibilidad de la unión celular y aumentan la posibilidad de una conformación eficaz.

**Motivo de osteopontina para osteoclastos y osteoblastos (-DGRGDSVAYG-, SEQ ID NO. 5: DGRmx):** La osteopontina, que tiene 264-301 aminoácidos, dependiendo de la especie, se sintetiza y fosforila tanto por osteoblastos como por osteoclastos en el hueso y también se sintetiza por los odontoblastos durante la semetogénesis. También se ha denominado uropontina o sialoproteína ose I (BSP1), 2aR, 2B7, eta-1, fosfoproteína ósea 44Kd y fosfoproteína secretada (Kreis y Vale, (1999) *Guide book to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*, 2ª Edición, Oxford University Press, Oxford, R. U.). La osteopontina regula la adhesión celular, la migración y la supervivencia, la actividad de NF-κB, la síntesis de NO y la formación de cristales de calcio. Se ha observado que varios motivos son importantes para esta proteína.

**Péptido de crecimiento osteogénico (-ALKRQGRTLYGF-, SEQ ID NO. 3: ALKmx):** El péptido de crecimiento osteogénico (ALKRQGRTLYGF) es un factor clave en el mecanismo de la respuesta sistémica del sistema osteogénico a la lesión local en la médula ósea. Cuando se administra *in vivo*, OGP estimula la osteogénesis y la hematopoyesis. El pentapéptido C-terminal de OGP (10-14) es la secuencia mínima de aminoácidos que conserva la actividad similar a OGP completa. Asimismo, también parece ser la forma fisiológica activa de OGP. Los restos Tyr (10), Phe (12), Gly (13) y Gly (14) de OGP son esenciales para la actividad de OGP (10-14). (Greenberg y col., *J Cell Biochem.* (1997) 65: 359-67; Chen y col., *J Med Chem.* (2002) 45:1624-1632). Por lo tanto, la forma de longitud completa, así como la forma activa del OGP se usaron como motivos funcionales para una matriz a medida para células óseas.

**Péptido de médula ósea seleccionado por presentación en fagos (-PFSSTKT-, SEQ ID NO.1: PFSmx, -SKPPGTSS-; SEQ ID NO.12: SKP, -STFTKSP-, SEQ ID NO. 18: STF):** Becker y colaboradores usaron presentación en fagos de una biblioteca de 7 restos para seleccionar el ensayo de alojamiento en médula ósea. Hallaron una familia de péptidos ricos en K, P, F, S, S, T y T. Estos péptidos se unen a células madre y un 85 % se alojan *in vivo* en la médula ósea (Nowakowski y col., "Bone marrow homing heptapeptides bears homology to CD84," *Preventive Oncology & Intervention Strategies (Conference)*; París, 9 al 12 de febrero de 2002). Uno de estos péptidos que se aloja en la médula ósea y que también se une a células madre primitivas, es homólogo a CD84 N-terminal, una proteína de la superficie celular expresada por linfocitos (Palou y col., *Tissue Antigens* (2000) 55:118-127).

**Mielopéptidos (MP) (-FLGFPT-, SEQ ID NO. 2: FLGmx):** Las células de la médula ósea de seres humanos y diversos animales también producen un grupo de mediadores biorreguladores, péptidos denominados mielopéptidos (MP). Uno de estos, MP-1 (Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr) se ha sintetizado y se han estudiado exhaustivamente sus actividades biológicas. El hexapéptido presentó una actividad inmunorreguladora pronunciada (Petrov y col., *Biopolymers* (1997) 43: 139-146). El péptido se ha usado en ensayos clínicos en Rusia para tratar una serie de enfermedades (Petrov y col., *Ann N. Y. Acad Sci.* (1993) 685:351-361). Los MP influyen la diferenciación de la médula ósea y las células de sangre periférica procedentes de donantes sanos y con leucemia. Inducen la

diferenciación terminal en la línea celular HL-60 humana de leucemia. Los MP parecen proporcionar no solo inmunorregulación, sino que también participan en complejas interacciones entre diferentes sistemas en el organismo (Petrov y col., Biosci Rep. (1995) 15, 1-14). MP-1 aumenta un nivel reducido de producción de anticuerpos en ratones tratados con ciclofosfamida (Cy), pero no tiene influencia en la formación de anticuerpos en animales normales. (Mikhailova y col., Regul Pept. (2003) 114:183-187).

**Secuencia de motivo de unión a heparina** (-FHRRIKA-, SEQ ID NO. 6: FHR). Existen secuencias de motivo de unión a heparina e las proteínas de unión celular, tales como fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno, VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- $\beta$  y BMP. Muchas de estas secuencias mantienen secuencias consenso de motivo de unión a heparina -XBBXBX- y -XBBBXXBX-, en la que X representa un aminoácido no cargado o hidrófobo (por ejemplo, F, I, L, P, M, W, Y, V, A, C y Q) y B representa péptidos cargados positivamente (por ejemplo, R, H y K). El motivo de unión a heparina también trabaja de manera sinérgica con el motivo -RGD- para promover la mineralización de los osteoblastos (Rezania A y col, Biotechnol. Prog. 1999, 15, 19-32). Mediante el uso de motivos de unión a heparina como motivos funcionales de péptido modificado en matrices de péptidos autoensamblantes, puede incorporarse a las matrices heparina o heparán sulfato. Las matrices de péptido autoensamblante que incorporan heparina o heparán sulfato pueden usarse para la liberación controlada de factores de crecimiento de unión a heparina.

**Dominio de adhesión celular de laminina** (-IKVAV-, SEQ ID NO 20: SIK; -IKLLS-, SEQ ID NO 21: SEI). La laminina es el componente principal de la membrana basal y se considera que es importante para el mantenimiento de células madre. -IKVAV- (incluida en la SEQ20) e IKLLS (incluida en la SEQ21) se conocen como las secuencias de adhesión celular de la laminina. Se usan para preservar la viabilidad, reducir la apoptosis y reducir la secreción de insulina en las células beta encapsuladas (Laney y col., Biomaterials (2007) 28:3004-3011).

**Dominio III-CS de fibronectina plasmática humana** (-REDV-, SEQ ID NO. 10: REDmx). El dominio III-CS de fibronectina plasmática humana (REDV) soporta la unión de las células endoteliales vasculares y la dispersión de células endoteliales (Shin y col., Biomaterials (2003) 24:4353-4364; Welsh y col., Biomaterials (2000) 1:23-30).

**Sitio de unión a actina de timosina  $\beta$ 4** (-LKKTETQ-, SEQ ID NO. 9: LKKmx). El sitio de unión a actina de timosina  $\beta$ 4 (-LKKTETQ-) puede promover la migración y adhesión de células endoteliales, la formación de túbulos, la brotación del anillo aórtico y la angiogénesis (Huff y col., FASEB Journal (2003) 17:2103-2105)

**Dominios de adhesión a células de fibronectina** (-RGD-, SEQ ID NO.: 4: PRGmx; SEQ ID NO.5: DGRmx; SEQ ID NO. 7: DSG; SEQ ID NO. 8: 2G; SEQ ID NO.9: 4G). Una secuencia Arg-Gly Asp (RGD) ubicada en la 10.<sup>a</sup> unidad repetitiva de tipo III de fibronectina. RGD está presente no solo en la fibronectina, sino también en muchas otras proteínas de la matriz extracelular, tales como laminina, sianoproteína ósea, osteopontina y vitronectina. La secuencia RGD es importante para la adhesión celular. La inmovilización del motivo RGD a polímeros y a gel de alginato mejora la formación ósea *in vitro* e *in vivo* (Alsberg E y col, J Dent Res 80:2025-2029.DJ (2001)).

#### F. Moléculas biológicamente activas que interactúan con secuencias mínimas biológicamente activas

Los esfuerzos para modificar los péptidos autoensamblantes identificados con anterioridad se inspiraron, en parte, por el deseo de crear un material completamente sintético que pudiera recrear características importantes del microambiente proporcionado por la membrana basal celular. La membrana basal celular es una red tridimensional formada principalmente por lamininas, colágenos y proteoglicanos. Las membranas basales subyacen a láminas y tubos de células epiteliales y también rodean a células individuales de diversos tipos, tales como células musculares, células adiposas y células de Schwann. En ciertas ubicaciones (por ejemplo, pulmón, glomérulos renales) la membrana basal separa láminas de células y sirve como filtro. Bajo visualización por microscopía electrónica, puede observarse que las membranas basales incluyen dos capas distintas: una capa luminosa a los electrones adyacente a la membrana basal de las células que reposan sobre la membrana basal y una capa densa a los electrones por debajo. Las membranas basales también pueden incluir una tercera capa que conecta la capa inferior con el tejido conectivo subyacente.

Además de su importancia como componente estructural, soportando la unión celular y actuando como barrera que separa diversas células, tejidos y órganos, también proporciona a las células un microambiente instructivo que interactúa con ellas y modula su función. La polaridad celular, el metabolismo, la diferenciación y la migración se encuentran entre los aspectos de la función celular modulados por la membrana basal. Además, las moléculas en la membrana basal pueden contribuir a la organización estructural de la membrana basal y las moléculas intracelulares. Las moléculas de la membrana basal también interactúan entre sí.

El papel de la MEC para modular la función celular tiene un interés particular en el contexto del sistema vascular, en el que los vasos y las cámaras cardíacas contienen una monocapa interna de células endoteliales que reposa sobre una membrana basal que separa las células endoteliales de las capas musculares subyacentes. Se cree que la membrana basal desempeña un papel importante en procesos tales como la vascularización y su integridad es importante para mantener la función vascular adecuada. Es probable que el daño o las alteraciones en la capa de células endoteliales y/o la membrana basal subyacente desempeñen un papel clave en varios procesos patológicos, tales como la aterosclerosis.

Se ha identificado que secuencias de péptido cortas presentes en las proteínas de la membrana basal participan en

una variedad de funciones biológicas importantes, incluyendo la unión celular, la proliferación, la diferenciación y la migración (véase, por ejemplo, Iwamoto (1987) Kleinman. (1989); Koliakos (1989); Skubitz (1990); Tsilibary (1998); y Sakamoto (1991)). También se han identificado secuencias peptídicas que median la unión entre diferentes moléculas de la MEC o la unión entre moléculas de la MEC y moléculas no de la MEC en el organismo. Las secciones a continuación describen características de diversas moléculas de la membrana basal que pueden interactuar con las secuencias mínimas biológicamente activas, como se han descrito anteriormente y en el presente documento y proporcionan detalles adicionales acerca de aspectos relevantes del sistema vascular, las células endoteliales y la membrana basal endotelial.

(i) *Laminina-1*

10 Las lamininas representan una familia de proteínas de heterodímeros que contienen cadenas alfa, beta y gamma. Las lamininas se ubican principalmente en membranas basales, pero también en compartimentos mesenquimales. Las lamininas crean límites físicos entre la matriz estromal y las células epiteliales, endoteliales, musculares y nerviosas. Hasta la fecha, se han identificado 11 isoformas de laminina que contienen diversas combinaciones de cadenas alfa, beta y gamma. En todas ellas, es común un dominio de hélice superenrollada que desempeña un papel clave en el ensamblaje de heterotrímeros. La laminina-1 es la laminina más temprana producida durante el desarrollo del ratón, antes de la etapa de blastocisto, contribuyendo a los tejidos epiteliales durante la organogénesis (véase, por ejemplo, Dziadek y Timpl (1985)). Laminina-1 ( $M_r = 900.000$ ) está formada por subunidades alfa<sub>1</sub>, beta<sub>1</sub> y gamma<sub>1</sub>, que se ensamblan en una estructura similar a una cruz (véase Engel (1981)). Forma un complejo con el nidógeno, dando como resultado redes con un patrón prácticamente hexagonal y estructuras tridimensionales. La formación del complejo se produce de una manera dependiente de calcio, temperatura y concentración (véase Yurchenco y Cheng (1993)).

La laminina-1 está implicada en una serie de interacciones importantes, incluyendo interacciones tanto homotípicas o entre diferentes isoformas. También interactúa con otras proteínas de la matriz extracelular, formando puentes entre el complejo de proteína y las membranas celulares mediante receptores de la membrana celular o interactuando directamente con células a través de varios receptores de integrina o no integrina (véase Kreis y Vale (1999)). Las funciones biológicas principales atribuidas a la laminina-1 incluyen promover la adhesión celular, la migración celular, la diferenciación y proliferación celular, potenciar el recrecimiento de neuritas, regular la forma celular y establecer la polaridad celular de una serie de tipos de células (véase, por ejemplo, Martin y Timpl (1987), Timpl, (1980), Beck (1990); y Engel (1992)).

30 (ii) *Colágeno IV*

Las proteínas colagenosas forman una superfamilia de proteínas de la matriz extracelular con un papel estructural como función principal. Todos los colágenos tienen dominios con una conformación de triple hélice. Dichos dominios se forman por tres subunidades (cadenas alfa), que contienen un motivo de secuencia repetitivo (Gly-X-Y)<sub>n</sub> cada una.

35 El colágeno IV es el componente colagenoso principal de la membrana basal, formando una estructura de red que implica la interacción con otros componentes de la membrana basal que incluyen laminina, nidógeno y proteoglicano de heparán sulfato (Kreis y Vale (1999)). Las moléculas de colágeno están formadas por dos cadenas alfa<sub>1</sub>(IV) y una cadena alfa<sub>2</sub> (IV). Se cree que el colágeno IV interactúa con las células de manera indirecta a través de la laminina mediante interacciones directas de baja afinidad (Yurchenco y O'Rear (1994); Charonis (1985)) o mediante unión fuerte mediada por nidógeno, una glucoproteína de aproximadamente 150 kDa, que se une fuertemente a la laminina (Paulsson (1987); Poschl (1996)) y también tiene sitios de unión para colágeno IV (Timpl (1996)). El colágeno de tipo IV también se une a la heparina y al proteoglicano de heparán sulfato (véase, por ejemplo, Yurchenco y O'Rear (1994); Tsilibary (1988); Koliakos (1989); y Fujiwata (1984)).

(iii) *Nidógeno*

45 El nidógeno (antiguamente denominado en las referencias como entactina) consiste en una sola cadena de polipéptido que se une a la cadena gamma de laminina-1 por un solo módulo (LE) de 56 restos (Poschl (1996)). El nidógeno también interactúa con el colágeno de tipo IV mediante un epítipo separado y se considera que actúa como molécula enlazadora entre laminina-1 y colágeno IV en las membranas basales. Además, el nidógeno contiene secuencias RGD que pueden servir como sitios de unión celular a través de moléculas de integrina (Timpl (1989)).

50 (iv) *Proteoglicanos*

Los proteoglicanos son un conjunto de proteínas hallados en una serie de ubicaciones que incluyen las superficies celulares, dentro de las vesículas intracelulares e incorporados en las matrices extracelulares. Se definen y clasifican dependiendo de la presencia de una modificación postraducciona común, un tipo especial de polisacáridos, la familia de los glucosaminoglucanos. Los proteoglicanos son un conjunto diverso de macromoléculas formadas por una proteína central que puede consistir en una cadena polipeptídica grande o pequeña (10-400 kDa) que porta desde una hasta cientos de cadenas de glucosaminoglucano. Se conocen diversas actividades de los proteoglicanos. Entre estas, se sabe que regulan las interacciones entre células y entre células y la matriz mediante la unión con otras proteínas de la matriz extracelular. Regulan el ensamblaje y la estructura de la matriz extracelular

e inmovilizan moléculas difundibles dentro de la matriz extracelular como compartimentos de almacenamiento y liberación (Kreis y Vale (1999)).

Componentes adicionales de la membrana basal. Además de las proteínas descritas previamente, en la membrana basal está presente una serie de proteínas distintas que desempeñan papeles significativos. Entre estas se encuentra perlecano, agrina, BM-40/SPARC, fibulina-1, fibulina-2 (Timpl (1996) y las referencias en el mismo). También se ha descubierto una serie de proteínas relacionadas con estas.

Sistema vascular y la MEC. Las células endoteliales vasculares proporcionan una interfaz entre la circulación sistémica y los tejidos blandos y participa en procesos críticos que incluyen la inflamación, la coagulación y la hemostasia. El endotelio vascular también desempeña un papel en un conjunto diverso de patologías que van desde la aterosclerosis hasta la nefropatía diabética. La extensión de vasos sanguíneos preexistentes y/o la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente (angiogénesis) desempeña un papel esencial en la reparación y regeneración de tejidos, así como en el desarrollo embrionario. En general, estos procesos implican la formación de una red vascular tridimensional que proporciona nutrientes y oxígeno y retira los productos de desecho de las células. Durante las dos últimas décadas, se han practicado grandes esfuerzos de investigación acerca de la angiogénesis (Carmeliet (2000) y Han y Liu, (1999)).

Hasta la fecha, uno de los principales retos en la ingeniería de tejidos es la generación de estructuras tridimensionales vascularizadas (Eiselt (1998)). Las células pueden permanecer vivas mediante la difusión de nutrientes solo cuando están ubicadas a aproximadamente 100-200  $\mu\text{m}$  de un suministro de sangre (Colton (1995)). Sería deseable desarrollar procedimientos para crear redes vasculares artificiales para su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos que vayan más allá de finas estructuras, tales como piel, en las que los nutrientes y el oxígeno pueden suministrarse por difusión (Cassell (2002)) o tejidos avasculares, como el cartílago.

La estructura general de un vaso sanguíneo comprende un revestimiento interno de células endoteliales aplanadas con una morfología de adoquín que forma una monocapa de células que se separa de las células de músculo liso subyacentes por una fina matriz extracelular, la membrana basal. Las células endoteliales poseen una carga externa negativa que repele la adherencia de las plaquetas, produce glucosaminoglucanos que se unen a antitrombina III, así como activador del plasminógeno tisular, que facilitan las actividades anticoagulantes y fibrinolíticas de las células endoteliales. En común con la mayoría de las demás membranas basales, la membrana basal de los vasos sanguíneos está compuesta principalmente por laminina-1, colágeno IV, nidógeno y proteoglucanos. Está bien establecido que el comportamiento de las células endoteliales está influenciado por la interacción con la membrana basal (Tsilibary (1988); Tashiro (1989); Grant (1989); Skubitz (1990); Sakamoto (1991); Kanemoto (1990); Grant (1990); Nomizu (1997); Ponce (1999); y Malinda (1999)).

#### (v) Heparina

La heparina y el heparán sulfato (HS) son miembros del grupo de glucosaminoglucanos de polisacáridos complejos que incluye otros carbohidratos, tales como el sulfato de condroitina, el dermatán sulfato y el queratán sulfato, etc. El HS se distribuye de manera ubicua en la superficie celular y en la matriz extracelular. Se sabe que la heparina y el HS interactúan con una variedad de proteínas, tales como los factores de crecimiento de unión a heparina, componentes de la matriz extracelular, selectinas, inhibidores de la proteasa y lipoproteína lipasa y están, por lo tanto, implicados en varios comportamientos celulares dinámicos, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la adhesión, la migración y la regulación morfológica durante el desarrollo. Utilizando la fuerte afinidad entre la heparina y los factores de crecimiento de unión a heparina (VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- $\beta$  y BMP), se ha investigado la liberación controlada de factores de crecimiento mediante biomateriales que incorporan heparina y HS (Ishihara y col., J Biomed Mater Res 64A: 551-559, 2003).

#### (vi) Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas de origen natural capaces de promover la proliferación celular, la diferenciación y la maduración. Se conocen bien varios factores de crecimiento: factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF ácido (FGF1) y FGF básico (FGF2)), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), BMP (proteína morfogénica ósea), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Los factores de crecimiento no solo se usan para cultivo celular *in vitro*, sino también con fines terapéuticos. El EGF y el FGF se usan para acelerar la curación de heridas. El VEGF y el HGF se usan para promover la angiogénesis en las enfermedades isquémicas. La BMP se usa para acelerar la regeneración ósea. Aunque se han llevado a cabo diversos estudios del uso de factores de crecimiento en el campo de la regeneración de tejidos, no siempre se han logrado con éxito *in vivo*. Uno de los motivos de esta dificultad es la elevada capacidad de difusión y la corta semivida de los factores de crecimiento *in vivo* para mantener su actividad biológica. Por tanto, se han investigado diversos tipos de metodologías de liberación controlada y de retención para los factores de crecimiento. (Ishihara y col., J Biomed Mater Res 64A: 551-559, 2003).

Los factores de crecimiento son proteínas que tienen una carga total y una distribución de cargas como se muestra en la Figura 20, por ejemplo. Los factores de crecimiento también tienen un campo de interacción hidrófoba local.

Por lo tanto, cada uno de los factores de crecimiento tiene una afinidad diferente para las diferentes secuencias de aminoácidos que tienen una carga total, una distribución de cargas locales y un campo de interacción hidrófoba local diferentes. La diferencia en la secuencia de aminoácidos usada en la secuencia autoensamblante o la secuencia funcional da lugar a una afinidad diferente por ciertos factores de crecimiento, por lo que pueden usarse matrices de péptidos autoensamblantes modificados para la liberación controlada y la retención de factores de crecimiento.

*(vii) Función de células endoteliales*

La monocapa endotelial tiene múltiples funciones, incluyendo la de facilitar el flujo sanguíneo proporcionando una superficie no trombogénica, siendo una barrera permeable y una interfaz de transporte para los metabolitos, modulando la respuesta inflamatoria, modulando la contractilidad del músculo liso vascular y el miocardio y regulando el tono vascular y la homeostasia, entre otros (Boeynaems y Pirroton (1994); y Cines (1998)).

De manera continua, las células endoteliales producen, secretan y remodelan su propia membrana basal y también sintetizan autacoides (del griego, autos-propio y akos-remedio) vasoactivos, que contribuyen a regular el tono vascular y la homeostasia (Busse y Fleming (2003)). El óxido nítrico (NO) es uno de los vasodilatadores mejor conocidos. En los sistemas biológicos, el NO se sintetiza a partir de L-arginina mediante la acción de la sintasa de óxido nítrico, siendo el otro producto de la reacción la L-citrulina. Otro potente vasodilatador e inhibidor de la agregación de plaquetas es la prostaciclina (o también denominada prostaglandina I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>). PGI<sub>2</sub> pertenece a la familia de los eicosanoides y se forma a partir del ácido araquidónico mediante la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) gracias a la prostaciclina sintetasa. Se ha demostrado que un péptido de 21 aminoácidos, endotelina-1 (ET-1) promueve la vasoconstricción. Estas tres sustancias (y probablemente otras también) actúan en conjunto como reguladores del tono vascular.

Se sabe que la ausencia de endotelio sano puede contribuir a patologías vasculares importantes, tales como trombosis. Por ejemplo, la rotura de la monocapa endotelial lisa puede producirse debido a la deposición de lípidos y otros materiales hallados en las placas ateroscleróticas y/o puede contribuir al desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Cines (1998)). La presencia de una monocapa confluyente de células endoteliales podría mejorar la resistencia a los trombos. También podría prevenir o mejorar otras enfermedades, tales como la hiperplasia seudointima, por ejemplo, previniendo la adhesión de plaquetas, que liberan factores bioactivos que pueden contribuir al reclutamiento y/o proliferación del músculo liso. Además, podría ser útil la capacidad para generar una monocapa endotelial lisa para restaurar la integridad del endotelio tras procedimientos invasivos, tales como una angioplastia, cateterización, etc. Por lo tanto, en la actualidad los esfuerzos se centran en el estudio de la endotelización, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Varios investigadores han estudiado el papel de la matriz extracelular en la vascularización. Muchos de estos estudios implicaron la observación del comportamiento de las EC en materiales procedentes de la matriz extracelular, tales como Matrigel, un material procedente de la membrana basal obtenido del tumor de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm o colágeno (Grant (1989); Davis (2000); Bell (2001); Davis (2002)). Se han estudiado los procesos angiogénicos, tales como la formación de tubos, en sistemas tanto en 2D como en 3D (Davis (2000); Bell (2001); Davis (2002)). Se ha explorado la interacción de las EC con varios péptidos sintéticos (Grant (1989); Grant (1992); Ponce (1999); Nomizu (2001)).

*G. Pruebas de actividad biológica*

Esta sección describe una serie de pruebas que pueden usarse para determinar si un péptido es biológicamente activo. Las pruebas descritas a continuación se proporcionan solo con fines ilustrativos y un experto en la materia será capaz de seleccionar y emplear una serie de pruebas adicionales y variaciones de las pruebas descritas en el presente documento, dependiendo del tipo celular y del comportamiento celular de interés. En cualquiera de estas pruebas, el péptido soluble puede usarse como control. Puede usarse un intervalo de concentraciones de péptido (tanto unidos a sustrato, presentes como parte de un péptido autoensamblante modificado o en forma soluble).

Asimismo, puede ser deseable evaluar y/o monitorizar cualquiera de una serie de indicadores del fenotipo celular, la viabilidad celular o la proliferación, el fenotipo celular y/o el estado funcional de la células o varios comportamientos celulares. Como es bien sabido en la técnica, hay una serie de procedimientos para evaluar la viabilidad celular, la proliferación y para evaluar diversos aspectos del comportamiento y el fenotipo celular. En general, puede emplearse cualquier procedimiento adecuado para investigar y evaluar los efectos del cultivo de células en las condiciones descritas en el presente documento. Además, pueden monitorizarse los efectos de las células en la composición general y las propiedades de un conjunto de células/hidrogel. Pueden examinarse características tales como contenido de proteína, resistencia, etc.

*(i) Viabilidad y proliferación celular*

Puede evaluarse la viabilidad celular examinando una exclusión con colorante vital (por ejemplo, exclusión con azul de tripano). La división celular puede observarse mediante microscopía óptica y se indica por la presencia de figuras mitóticas. También puede observarse un aumento en el número de células que acompaña a la división, por ejemplo, contando con un hemocitómetro. La división también puede ir acompañada de cambios morfológicos, tales como redondeo celular. La síntesis de ADN puede monitorizarse detectando y/o midiendo la incorporación de diversas

sustancias, tales como nucleótidos radiomarcados (por ejemplo,  $^3\text{H}$ timidina), bromodesoxiuridina (BrdU), etc., en el ADN. También se encuentran disponibles numerosos ensayos distintos. Por ejemplo, de acuerdo con el ensayo MTS, cuando se aplica el reactivo MTS (una sal de tetrazolio) a células vivas, se convierte en un compuesto coloreado (formazano) con la emisión de luz a 490 nm. Se encuentran ampliamente disponibles kits, tales como el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD™ (Molecular Probes, n.º de catálogo L-3224). También puede usarse inmunotinción usando anticuerpos que se unen a proteínas que indican la proliferación celular, tales como el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). Se conocen bien en la técnica procedimientos para evaluarla apoptosis e incluyen examen visual, TUNEL y determinación del nivel de ARNm o de proteínas asociadas con la apoptosis, por ejemplo, caspasas.

10 *(ii) Unión celular*

Un procedimiento conveniente para medir la actividad promotora de la unión celular de un péptido es conjugar el péptido a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa) e incubar las células en presencia de las perlas funcionalizadas con o sin péptido soluble añadido. Las perlas no funcionalizadas pueden usarse como control. Después de la incubación, pueden desprenderse las células usando varios procedimientos, tales como tratamiento con una solución que contiene EDTA, teñirse y analizarse por microscopía, FACS, etc. (véase Nomizu (2001) para más detalles). Pueden usarse procedimientos similares para evaluar la unión celular a matrices que comprenden péptidos autoensamblantes modificados y/o no modificados.

15 *(iii) Morfología y dispersión celular*

La dispersión celular implica una serie de características morfológicas que pueden diferir, dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, los fibroblastos de prepuccio humanos normalmente adoptan una forma celular poligonal alargada (Hem y Hubbel (1998)) cuando se dispersan y presentan una red de fibras de estrés de F-actina organizadas. La morfología celular puede evaluarse mediante microscopía óptica y puede evaluarse el número de células que adoptan una morfología característica de dispersión celular en las matrices modificadas frente a las no modificadas y/o en presencia o ausencia de péptido soluble competidor.

25 *(iv) Organización del citoesqueleto*

Ciertos péptidos afectan a la organización del citoesqueleto, lo que tiene influencia en la forma y la migración celular. La organización de las fibras de estrés de F-actina dentro de las células puede examinarse mediante tinción con faloidina conjugada con rodamina (Hem y Hubbel (1998)). Por ejemplo, pueden fijarse las células cultivadas en una matriz de péptido en solución de formaldehído al 4 %, permeabilizarse (por ejemplo, con Triton X-100 al 0,1 % en PBS), incubarse con faloidina conjugada con rodamina y fijarse nuevamente. A continuación, pueden visualizarse mediante microscopía, por ejemplo, usando microscopía de epifluorescencia.

30 *(v) Migración celular*

Se encuentra disponible una serie de ensayos para cuantificar la migración celular sobre o a través de diversos sustratos, incluyendo matrices que comprenden los péptidos autoensamblantes modificados de la invención. Por ejemplo, puede evaluarse la migración usando un ensayo de estilo barrera en el que las células se cultivan sobre un sustrato, por ejemplo, una matriz que comprende péptidos autoensamblantes modificados, en presencia de una barrera. Se registra la ubicación de la barrera. Después, se retira la barrera y se mantienen las células durante un periodo de tiempo. El número de células que atraviesan la barrera en un periodo de tiempo dado es una medida de la migración celular. Los valores pueden corregirse para tener en cuenta la proliferación celular, que pueden diferir dependiendo del sustrato. En una variación de la estrategia anterior, pueden crearse sustratos que comprenden dos o más superficies diferentes separando regiones de un recipiente por medio de una barrera que posteriormente se retira. Puede evaluarse la migración celular sobre varias superficies. También puede cuantificarse la migración usando un ensayo de migración con valla de Teflón, como se ha descrito para células de músculo liso (Mann (2002)) y células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) (Sagnella (2004)).

45 *(vi) Diferenciación, desdiferenciación y transdiferenciación celular*

Estas características pueden evaluarse basándose en una serie de parámetros, incluyendo la morfología. La diferenciación, desdiferenciación y transdiferenciación celular también pueden evaluarse detectando y/o midiendo la presencia de ciertos polipéptidos o polinucleótidos conocidos como marcadores. Esta última estrategia se usa ampliamente y se han identificado marcadores celulares característicos de numerosos tipos celulares diferentes. Puede detectarse la expresión de ARNm y/o proteína mediante técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, puede detectarse y cuantificarse ARNm usando transferencia de Northern, análisis de micromatrices de ADNc u oligonucleótidos, RT-PCR, etc. La expresión de proteínas puede detectarse y cuantificarse usando análisis de inmunotransferencia, inmunofluorescencia, análisis FACS, ensayos ELISA, etc. Dichas técnicas inmunológicas pueden emplear anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen a la proteína.

55 La variedad de marcadores es inmensa y se identifican de manera rutinaria nuevos marcadores. Por ejemplo, la nestina es una proteína de filamento intermedio expresada en las células madre precursoras de neuronales neuroepiteliales y su expresión se reduce con la maduración neuronal (Lendahl (1990)). La nestina se considera un

marcador para las neuronas inmaduras y las células positivas a nestina pueden diferenciarse en neuronas o glía. NeuN es un marcador específico de neuronas expresado en células postmitóticas (Sarnat (1998)). La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un marcador típico de astrocitos gliales. La beta III tubulina es otra proteína específica de neuronas. La expresión de proteínas CYP450 es característica de los hepatocitos.

- 5 En el contexto de la presente invención, tienen un significado particular los marcadores que pueden usarse para identificar células endoteliales vasculares y para evaluar la actividad funcional de las células endoteliales. El factor de von Willebrand es un marcador ampliamente reconocido para las células endoteliales vasculares. Otros marcadores de células endoteliales vasculares incluyen CD31, DC102, CD106 e isolectina B4 (Williams K S, 1995; "Microvascular endothelium from adipose tissue" Endothelial Cell Culture. Roy Bicknell (ed). Cambridge University Press, 1996). En ciertas realizaciones de la invención, la matriz de péptido promueve la angiogénesis. Los marcadores de angiogénesis incluyen los factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis VEGF, angiopoyetinas 1 y 2 y sus receptores, Flt-1, Flk-1, Tie2 (Ferrara (2001); Gale y Yancopoulos (1999)). Se encuentran disponibles comercialmente anticuerpos monoclonales conjugados directamente con colorantes fluorescentes que se unen a varios de estos marcadores, por ejemplo, de Dako, Chemicon, etc.
- 10
- 15 También pueden usarse ensayos funcionales para evaluar el fenotipo o el estado celular. Por ejemplo, puede evaluarse la capacidad de una célula para captar, producir o secretar una molécula concreta característica de un tipo celular particular o para llevar a cabo una reacción enzimática característica de un tipo celular particular. La captación de lipoproteína de baja densidad (LDL) y la liberación de NO son características de las células endoteliales.

20 *(vii) Producción de componentes de la MEC*

Puede ser particularmente interesante evaluar el efecto de diversos motivos peptídicos candidatos biológicamente activos, biomoléculas activas, parámetros ambientales, tales como la aplicación de fuerzas mecánicas, etc., en la producción de componentes de la MEC y/o para monitorizar la producción de dichos componentes con el paso del tiempo. Hay disponibles varios procedimientos para hacer esto. Pueden usarse transferencias de Western (u otros procedimientos inmunológicos) para cuantificar la producción de proteínas de la MEC. Para análisis histológico, puede llevarse a cabo tinción con azul de toluidina del glucosaminoglucano (GAG), un componente de proteoglicano, de acuerdo con protocolos convencionales. La deposición de colágeno puede medirse usando técnicas conocidas (Ioannidis y col., Cell Tissue Res. (1999) 297:141-147; Domm y col., Orthopde (2000) 29:91-99). La producción de proteínas extracelulares puede medirse mediante la adición de [<sup>3</sup>H]-prolina al medio. La prolina radiomarcada se capta por las células y se incorpora en las proteínas recién sintetizadas. Tras un periodo de tiempo (por ejemplo, 16-24 horas) en el medio radiomarcado, se retira la [<sup>3</sup>H]-prolina libre mediante aclarado. La proteína extracelular puede digerirse, por ejemplo, mediante incubación en una solución de proteinasa K durante una noche a aproximadamente 60 °C y se cuantifica la radiactividad presente en la proteína digerida mediante conteo de centelleo. La producción de proteoglicano puede medirse de un modo similar, salvo por que se añade al medio [<sup>35</sup>S]-sulfato en lugar de [<sup>3</sup>H]-prolina. Puede medirse la acumulación total de GAG basándose en el análisis fluorimétrico de la cantidad de colorante DMMB unido (Chandrasekhar y col., Analytical Biochemistry (1987) 161:103-108).

25

30

35

*(viii) Ensayos en sistema nervioso*

Existe un interés considerable en desarrollar materiales que podrían ser útiles para el cultivo *in vitro* de tejido del sistema nervioso (por ejemplo, nervios, células gliales), la reparación y la regeneración de tejido del sistema nervioso. Pueden medirse varios parámetros indicativos de la función del tejido nervioso. Por ejemplo, puede evaluarse el recrecimiento de neuritas mediante el examen microscópico (y opcionalmente procesamiento de imágenes digitales) de células aisladas cultivadas sobre las matrices de péptido, por ejemplo, células PC12 (Holmes (2000)). Dichas células también pueden estar encapsuladas. Otra estrategia es encapsular los ganglios de la raíz dorsal diseccionados de animales, tales como pollos, y medir la longitud media de neuritas que se extienden desde los ganglios en diferentes puntos de tiempo (Schense y Hubbel (1999); Schense y col., Nature Biotechnology (2000) 18: 415-419). La formación de sinapsis puede evaluarse del modo descrito, por ejemplo, en Holmes (2000). La producción de neurotransmisores y enzimas que se sabe que están implicadas en la síntesis de neurotransmisores proporciona un medio adicional para evaluar la actividad funcional del tejido nervioso.

40

45

50 *(ix) Brotación endotelial*

Puede usarse un ensayo de anillo aórtico, en el que se aíslan anillos de aorta de animales, tales como ratas, se cultivan sobre matrices de péptido durante un periodo de tiempo que permita la brotación, seguido de fijación y examen microscópico para cuantificar la capacidad de un péptido candidato biológicamente activo para inducir la brotación endotelial, un aspecto importante de la angiogénesis (Malinda (1999)).

55 *(x) Formación de tubo endotelial*

Puede cuantificarse la organización celular y la formación de estructuras de tipo capilar después del cultivo de EC sobre la superficie de o encapsuladas dentro de matrices de péptido en diversos puntos de tiempo, por ejemplo, 2 h, 8 h, 12 h, 24 h, 3 días, 1 semana y 2 semanas después de la siembra, determinando la longitud de correlación, como

se describe en la Publicación de Solicitud PCT n.º WO/2003/096972. La tinción con hematoxilina y eosina, tricromo de Massone, así como la inmunotinción para actina permite la evaluación visual de la formación de cúmulos de células endoteliales, la brotación, y la formación de estructuras de tipo capilar. La presencia de una luz en las estructuras de tipo capilar puede evaluarse visualmente y usando sistemas de obtención de imágenes automatizados, incluyendo sistemas de obtención de imágenes en tres dimensiones. Se conocen bien en la técnica procedimientos para evaluar la formación de tubos (por ejemplo, Davis (2000); Bell (2001); Davis (2002)).

#### H. Identificación de dominios de aminoácidos de interés

Una estrategia para identificar dominios de aminoácidos adicionales que pueden usarse como parte no autoensamblante de un péptido de la invención es la selección sistemática de péptidos derivados de la secuencia de una proteína de origen natural que se cree que interactúa con células, se une a una molécula particular, etc. Esta estrategia se ha usado para identificar numerosos péptidos biológicamente activos, como se ha descrito anteriormente. En general, se sintetiza *in vitro* un conjunto de péptidos, opcionalmente solapantes, que en conjunto abarcan la totalidad o una parte significativa de la secuencia. Posteriormente, se ponen en contacto células o una molécula de unión potencial, con péptidos individuales y se evalúa la respuesta celular, el grado de unión, etc. Los péptidos pueden estar marcados para facilitar la detección.

En general, pueden evaluarse péptidos obtenidos a partir de la secuencia de cualquier proteína de origen natural incluyendo, pero sin limitación, las proteínas analizadas específicamente con anterioridad. Un experto habitual en la materia será fácilmente capaz de localizar la secuencia completa para estas proteínas, proteínas relacionadas, otras proteínas de interés (por ejemplo, otras proteínas de la MEC), genes que codifican las proteínas, etc., en bases de datos disponibles al público, tales como aquellas disponibles a través del National Center for Biotechnology Information (véase la página Web que tiene la URL [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) usando, por ejemplo, el motor de búsqueda Entrez. Pueden efectuarse búsquedas en la base de datos por el gen o por el nombre de la proteína, por la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, efectuando búsquedas en GenBank) o por la secuencia de proteína, etc. Por ejemplo, pueden identificarse genes que codifican proteínas de colágeno IV efectuando una búsqueda en la base de datos Gene usando el término "colágeno". Los resultados contienen enlaces a la secuencia de proteína, a partir de la cual se pueden seleccionar dominios de aminoácido candidatos (se han retirado los vínculos). Pueden identificarse proteínas que contienen un dominio de secuencia particular o un dominio con una secuencia relacionada con un dominio particular efectuando una búsqueda con la secuencia de interés. Pueden identificarse fácilmente proteínas que contienen secuencias similares pero no idénticas.

Como se ha mencionado anteriormente, otras proteínas de interés incluyen proteínas de la MEC adicionales, por ejemplo, proteínas adicionales de la membrana basal. Pueden crearse matrices de péptidos particularmente adecuadas para diferentes tipos celulares mediante la selección de proteínas que se sabe que están presentes en la MEC sobre o en la que ese tipo celular se encuentra normalmente. Por ejemplo, la membrana basal en la que normalmente se encuentran diferentes tipos celulares puede contener diferentes isoformas de laminina, colágeno, etc. Los dominios de aminoácidos pueden seleccionarse a partir de proteínas presentes en el ambiente extracelular de cualquier tipo celular de interés. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, es posible que dichas proteínas sean favorables para el cultivo de dicho tipo celular y/o para la introducción en el organismo en un sitio que se sabe que contiene células de dicho tipo o en el que se desea implantar o atraer células de dicho tipo.

Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para diseñar un péptido autoensamblante para la formación de una matriz de péptido para un tipo celular de interés que comprende identificar un dominio de aminoácidos presente en una proteína de origen natural presente en el ambiente extracelular de dicho tipo celular (por ejemplo, en la MEC o la membrana basal sobre o en la que el tipo celular se encuentra en la naturaleza), explorar el péptido para determinar si produce un efecto biológico en la célula (ya sea cuando está presente en una matriz de péptido o presente de otro modo en el ambiente de una célula, como se ha descrito anteriormente), utilizar el dominio de aminoácidos como el segundo dominio de aminoácidos de un péptido autoensamblante modificado y probar una matriz que comprende el péptido autoensamblante modificado para determinar si es favorable para el crecimiento celular, da como resultado un fenotipo celular alterado, etc. Puede omitirse la etapa de exploración, es decir, puede incorporarse directamente el péptido candidato como parte de un péptido autoensamblante modificado sin probar primeramente su efecto biológico, si así se desea.

Otra estrategia es emplear técnicas de presentación que implican bibliotecas de péptidos, tales como presentación en fagos, presentación en la superficie celular o presentación en ribosomas (véase Sarikaya (2004) y las referencias en el mismo). La presentación en fagos y la presentación en la superficie celular emplean proteínas químicas que están presentes de manera natural en la superficie de un fago o una célula. La proteína química contiene normalmente la totalidad o parte de una proteína de fago o de la superficie celular de origen natural y un segundo dominio que contiene una secuencia de péptido aleatoria codificada por un ácido nucleico expresado por el fago o la célula. Normalmente, se ha aleatorizado una porción del ácido nucleico mediante cualquiera de diversas técnicas de biología molecular antes de su introducción en el fago o la célula (o un precursor de la misma) o puede alterarse posteriormente mediante mutación. Se pone en contacto una biblioteca de fagos o células, cada una expresando una versión diferente de la proteína química en su superficie, con una diana (por ejemplo, un ligando que puede inmovilizarse o una población de células). Después de la etapa de puesta en contacto, se eliminan por lavado las células o los fagos que expresan la proteína química con unión débil, mientras que las que se unen con más fuerza

permanecen. El procedimiento se repite para aumentar la riqueza de los que tienen unión fuerte (biopano). También pueden usarse diversos procedimientos para llevar a cabo evolución dirigida.

5 Otra estrategia para identificar dominios de aminoácido útiles es producir un número limitado de mutaciones en motivos de péptido biológicamente activos conocidos, péptidos de unión, etc., por ejemplo, mediante sustitución de uno o más aminoácidos. Esto puede identificar péptidos con propiedades mejoradas en relación con la secuencia de partida. La invención abarca el uso de dominios de aminoácido cuya secuencia difiere de la de las secuencias listadas en el presente documento por 1, 2 o 3 restos de aminoácido.

*I. Caracterización de los péptidos autoensamblantes*

10 Las estructuras (por ejemplo, nanofibras, estructuras macroscópicas, hidrogeles) formadas por cualquiera de los péptidos autoensamblantes no modificados o los péptidos autoensamblantes modificados de la presente invención o composiciones de los mismos, pueden caracterizarse usando varias técnicas biofísicas y ópticas. Las técnicas adecuadas incluyen inspección visual, difracción circular (DC), dispersión dinámica de la luz, espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), ensayos reológicos, tales como reometría oscilante, microscopía de fuerza atómica (ATM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).  
15 Por ejemplo, pueden usarse procedimientos biofísicos para determinar el grado de estructura secundaria de lámina beta en la matriz de péptido. Además, pueden determinarse el tamaño de filamentos y poros, el diámetro de las fibras, la longitud, la elasticidad y la fracción volumétrica usando análisis de imágenes cuantitativo de microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

20 Las matrices de péptidos también pueden examinarse usando varias técnicas de evaluación mecánica convencionales para medir el alcance del hinchamiento, el efecto del pH y la concentración de iones en la formación de la matriz, el nivel de hidratación en varias condiciones y la resistencia a la tracción. Pueden medirse parámetros tales como el módulo elástico. Estos procedimientos permiten a un experto en la materia determinar cuáles de las diversas modificaciones y adiciones a los péptidos descritos anteriormente son adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención. En las secciones a continuación se proporcionan descripciones no limitantes de  
25 ciertas técnicas que pueden usarse.

Además de o en lugar de, evaluar la formación del gel de una manera cuantitativa, por ejemplo, usando las pruebas reológicas descritas en el presente documento, pueden usarse evaluaciones más cualitativas, incluyendo un simple examen visual. Una evaluación reproducible de la formación del gel implica sonar una composición usando un clip de papel agitando y barriendo el material por los lados de un vaso que contiene la composición, tal como un tubo de  
30 microcentrifugación (Sperinde, J C y Griffith L G, *Macromolecules* (2000), 33:5476-5480). Puede considerarse que una composición sufre gelación cuando atrapa al clip de papel. Además, puede evaluarse la gelación o la reversibilidad del estado de gel con sondado adicional. Además, la gelación puede dar como resultado un material más resistente y menos viscoso.

*(i) Reometría*

35 Pueden llevarse a cabo ensayos reológicos para probar las propiedades viscoelásticas de las matrices de péptido. Por ejemplo, puede llevarse a cabo reometría oscilante, que somete a las muestras a estrés oscilante o a tensión oscilante, por ejemplo, usando un reómetro de tensión controlada, que somete a cizalladura a la muestra con una tensión controlada dentro de un intervalo de frecuencias. Se encuentran disponibles comercialmente varios reómetros que pueden usarse. Los principios de la reometría y sus aplicaciones a geles, se describen, por ejemplo,  
40 en Clark AH, Ross-Murphy, SB, *Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels*, Springer-Verlag, Berlín, 1987; Vol.83, págs. 58-192 (85-86); y Kavanagh, G.M., Ross-Murphy, SB, "Rheological characterization of polymer gels," *Prog. Polym. Sci.* (1998) 23:533-562.

En general, la salida de dicha prueba es  $G^*$ , el módulo complejo. Este módulo complejo puede definirse como:

$$G^* = G' + iG'' \text{ [ec. 1]}$$

45 En esta ecuación:

- G' es el módulo de almacenamiento que representa el carácter elástico/sólido del material.
- G'' es la pérdida de módulo que representa el carácter viscoso/fluido del material.

50 En la reometría oscilante, para una solución viscosa, el componente viscoso del módulo complejo, el módulo de pérdida ( $G''$ ) se reduce normalmente con las frecuencias oscilantes decrecientes y el módulo de almacenamiento  $G'$  es bajo. Para los geles,  $G'$  y  $G''$  son relativamente constantes con una frecuencia oscilante. Por ejemplo, en realizaciones preferidas de la invención, las magnitudes de  $dG'/d\omega$  y  $dG''/d\omega$  son menores de 2 o, más preferentemente, menores de 1, a lo largo de un intervalo de frecuencia en la región lineal, cuando se miden con una prueba de barrido de frecuencia dinámica, en los casos en los que  $G'$  y  $G''$  se miden en Pascales (Pa) y  $\omega$  representa la frecuencia en rad/s. El intervalo de frecuencia puede ser, por ejemplo, entre 0,1 y 1 rad/s, entre 1 y 10  
55 rad/s, etc. En otras realizaciones preferidas de la invención, las magnitudes de  $dG'/d\omega$  y  $dG''/d\omega$  son menores de 0,5, menores de 0,2 o menores de 0,1 a lo largo de un intervalo de frecuencia en la región lineal, cuando se miden con

una prueba de barrido de frecuencia dinámica, en los casos en los que  $G'$  y  $G''$  se miden en Pa y  $w$  representa la frecuencia en rad/s.

Para los geles,  $G'$  es normalmente mayor de cero. En realizaciones preferidas de la invención,  $G'$  de una composición formada por el autoensamblaje de un péptido autoensamblante modificado de la invención es mayor o igual a 0,5 Pa. En otras realizaciones preferidas de la invención,  $G'$  de una composición formada por el autoensamblaje de un péptido autoensamblante modificado de la invención es mayor o igual a 1,0 Pa, mayor o igual a 5 Pa, mayor o igual a 10 Pa, entre 10 y 100 Pa o mayor de 100 Pa cuando se mide en una región lineal usando una prueba de barrido de frecuencia dinámica. La región lineal puede ser, por ejemplo, entre 0,1 y 1 rad/s, entre 1 y 10 rad/s o entre 10 y 100 rad/s. Cuando se llevan a cabo dichas mediciones, puede llevarse a cabo un primer barrido de tensión dinámica en el material para establecer la región viscoelástica de la prueba y para seleccionar una tensión fija para las pruebas de barrido de frecuencia dinámica. Este intervalo viscoelástico lineal se define generalmente por módulos constantes,  $G'$  y  $G''$ . Es importante seleccionar una tensión dentro de este intervalo para obtener resultados fiables (véase, por ejemplo, Schramm G. (1994) A Practical Approach to Rheology and Rheometry, Gebroeder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Alemania). Por ejemplo, para las matrices de péptido probadas en el ejemplo 1, la tensión seleccionada fue de 0,01 (adimensional) y se aplicó en todos los ensayos.

La descripción anterior no pretende limitar la invención sino que se refiere simplemente a ciertas realizaciones de la misma. De hecho, cabe destacar que un gel se ha definido como "cualquier sustancia que en solución no crea interacciones de reticulación (covalentes o no covalentes) para formar una red", entendiéndose que la sustancia conserva ciertas propiedades elásticas en cuanto a la deformación del material sometido a menos estrés (Scaling Concepts in Polymer Physics por Pierre-Gilles de Gennes, Cornell University Press (1979)). En el caso de un hidrogel, la red conserva una cantidad significativa de agua.

#### (ii) Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica que permite la resolución de estructuras superficiales hasta escala nanométrica midiendo la interacción de una afilada punta microscópica para hacer un barrido de la superficie de la muestra y de la muestra. La AFM implica hacer un barrido con una punta afilada hasta el extremo de un voladizo a lo largo de una superficie de la muestra usando una pequeña fuerza constante. El movimiento de barrido se lleva a cabo mediante un escáner de tubo piezoeléctrico que hace un barrido con la punta en un patrón de rasterizado respecto de la muestra (o escanea la muestra respecto de la punta). La interacción punta-muestra se monitoriza normalmente por un láser de reflexión fuera del voladizo en un detector de fotodiodo dividido. Al detectar la diferencia en los voltajes de salida del fotodetector, pueden determinarse los cambios en la deflexión del voladizo o la amplitud de oscilación.

Existen dos modos de funcionamiento más comúnmente usados: AFM en modo de contacto y AFM TappingMode™ que se llevan a cabo en ambientes de aire o líquidos. La AFM en modo de contacto funciona midiendo las fuerzas de repulsión entre una punta y la muestra (Binnig y col., 1986). El instrumento toca ligeramente la punta. En la AFM TappingMode™, las imágenes se obtienen de mediciones de fuerzas de atracción, la punta no toca la muestra. Oscila a medida al igual que su frecuencia de resonancia "tocando" ligeramente la superficie durante el escaneo. La AFM TappingMode™ puede ser particularmente adecuada para evaluar la formación de nanofibras en matrices de péptido de la invención debido a que permite efectuar medidas en superficies blandas, frágiles y adhesivas sin dañarlas, lo que puede ser un inconveniente para la AFM en modo de contacto.

#### J. Aplicaciones terapéuticas

Puede usarse una estructura de péptido formada por el autoensamblaje de los péptidos autoensamblantes modificados o mediante el autoensamblaje de combinaciones de péptidos modificados y no modificados descritos en el presente documento, para tratar una variedad de defectos y enfermedades tisulares. Las estructuras de hidrogel de péptido, ya sea con o sin células creciendo sobre la superficie o encapsuladas en su interior pueden implantarse en el organismo, por ejemplo, quirúrgicamente o usando cualquier otro tipo de procedimiento adecuado. Pueden emplearse otras vías, incluyendo la vía oral, percutánea, intramuscular, intravenosa y subcutánea. Un experto habitual en la materia será capaz de seleccionar una técnica de suministro adecuada.

En general, los procedimientos y las composiciones de la invención pueden ser útiles en cualquier situación que implique una lesión o daño en el tejido. Dicha lesión puede producirse como resultado de una cirugía, traumatismo, tumor, enfermedad degenerativa u otras enfermedades o afecciones. La lesión puede implicar, pero no necesariamente, la muerte de células. Los procedimientos y las composiciones son útiles para restaurar la integridad estructural y/o funcional del tejido, es decir, para ayudar a restaurar el tejido hasta el estado funcional o estructural que existía antes de la lesión. Ciertas lesiones pueden dar como resultado barreras físicas que pueden impedir la regeneración o reparación del tejido. Dichas barreras pueden incluir áreas de necrosis, cavitación o formación de tejido cicatricial. En ciertas realizaciones de la invención, la introducción de los materiales descritos en el presente documento en un sitio de lesión permite el crecimiento de células o tejido a partir de una ubicación próxima al sitio de lesión o la barrera hasta una ubicación distante respecto del sitio de lesión o la barrera.

Ciertas composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse para mejorar los efectos de la

enfermedad o la degeneración de un órgano, para reparar una lesión en un órgano u otra estructura corporal o para formar un órgano u otra estructura corporal. Dichos órganos o estructuras corporales incluyen, pero no se limitan necesariamente a, tejido vascular, cerebro, tejido nervioso, esófago, trompa de Falopio, corazón, intestinos, vesícula biliar, riñón, hígado, pulmón, ovarios, páncreas, próstata, vejiga, hueso, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra, útero y piel.

En general, puede usarse una variedad de dispositivos para introducir la el material de la matriz en el sitio de lesión. El suministro mediante jeringa es una técnica conveniente. Los péptidos también pueden introducirse mediante un catéter o directamente en un sitio de cirugía. En ciertas realizaciones de la invención, se introduce en el organismo una solución de péptido en la que los péptidos no están ensamblados o están mínimamente ensamblados (es decir, una solución que no ha formado un gel). En otras realizaciones de la invención, se permite que se produzca la formación de la matriz *in vitro* y la matriz ensamblada se introduce en el organismo.

Pueden usarse armazones de péptido que encapsulan células para una serie de fines terapéuticos. Los péptidos no ensamblados y las células pueden mezclarse *in vitro* y después, la estructura puede autoensamblarse tras la administración y encapsular las células *in vivo*. Como se ha descrito anteriormente, En ciertas realizaciones de la invención, la solución administrada contiene menos de 10 mM, 5 mM, 1,0 mM o 0,1 mM de ion (por ejemplo, catión) o está sustancialmente libre de iones (por ejemplo, cationes), y la concentración del soluto isoosmótico es de al menos 50 mM, 150 mM o 300 mM. En otras realizaciones, la concentración de soluto isoosmótico está contenida en uno de los siguientes intervalos: 200 a 250 mM, 250 a 270 mM, 270 a 300 mM, 300 a 400 mM, 400 a 500 mM, 500 a 600 mM, 600 a 700 mM, 700 a 800 mM u 800 a 900 mM, inclusive. Los solutos isoosmóticos adecuados se han descrito anteriormente y en el presente documento e incluyen, pero sin limitación, hidratos de carbono, tales como la sacarosa.

Puede usarse cualquiera de los tipos celulares mencionados anteriormente. Por lo tanto, además o en lugar de células endoteliales vasculares, las composiciones de la presente invención pueden incluir una variedad de tipos celulares distintos y/o precursores de dichos tipos celulares. Las células pueden ser autólogas o no autólogas. Pueden ser alogénicas o no alogénicas. Pueden ser de la misma especie que el sujeto en el que se introducen o de diferentes especies. Pueden ser fetales o adultas.

En diversas realizaciones de la invención, se añaden una o más sustancias a la matriz de péptido ya sea antes o después del autoensamblaje. La sustancia puede tener varios fines, incluyendo, pero sin limitación, los que se indican más adelante. En caso de que la matriz se implante en el organismo, los procesos de crecimiento celular o los tejidos pueden entrar en contacto con la sustancia a medida que se extienden o crecen en el área ocupada por la matriz de péptido. En ciertas realizaciones de la invención, la sustancia se libera de la matriz, por ejemplo, por difusión o por liberación de la matriz a medida que se degrada con el paso del tiempo. La secuencia de péptido particular y/o la concentración de péptido y los parámetros, tales como el grado de reticulación, pueden seleccionarse para proporcionar un grado deseado de degradación y liberación de la sustancia. La sustancia puede entrar en contacto con las células o tejidos en o próximos al sitio de implantación y/o pueden entrar en el torrente sanguíneo y viajar a ubicaciones más distantes. Las sustancias que pueden añadirse incluyen, pero sin limitación, antibióticos o agentes antifúngicos para tratar o reducir el riesgo de infección, agentes quimioterapéuticos para tratar tumores, etc. La solución de péptido, o una estructura macroscópica formada a partir de la misma puede comprender, por tanto, un compuesto terapéuticamente activo o un quimioatrayente. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen moléculas pequeñas naturales o sintéticas; moléculas de ácido nucleico, tales como moléculas de ácido nucleico que median la interferencia de ARN (iARN) (Dorsett y Tuschl (2004), y las referencias en el mismo), por ejemplo, ARN pequeños de interferencia (ARNpi) o ARN en horquilla corta (ARNhc), ribozimas o plásmidos; péptidos o proteínas, tales como integrinas o moléculas de adhesión celular; proteínas, tales como anticuerpos, etc.

En ciertas realizaciones de la invención, la solución de péptido o una estructura macroscópica formada a partir de la misma, incorpora un agente que potencia o promueve la diferenciación, desdiferenciación o transdiferenciación, por ejemplo, un factor de crecimiento, tal como factor de crecimiento endotelial vascular, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, angiopoyetina 1 o 2, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de hepatocitos, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor de crecimiento de queratinocitos, una proteína morfogenética ósea o un factor de crecimiento derivado de cartílago. Pueden usarse combinaciones de factores de crecimiento y/o agentes terapéuticos o quimioatrayentes. También pueden usarse hormonas peptídicas. Pueden usarse péptidos de origen natural o versiones modificadas, incluyendo péptidos, tales como el péptido atrial natriurético.

La estructura macroscópica puede incorporar un agente que induce la reentrada en el ciclo celular. Dichos agentes pueden añadirse a la solución de péptido o a la solución de electrolitos antes de iniciar el autoensamblaje. En este caso, es probable que la concentración del agente sea sustancialmente uniforme en la estructura ensamblada. En ciertas realizaciones de la invención, el agente se añade al medio con el que se incuba la estructura de péptido antes o después de la adición de células. Tras la adición al medio, una parte del agente entra en la estructura de péptido, por ejemplo, mediante difusión. Este proceso puede crear un gradiente. Las células sobre o en diferentes

regiones de la estructura pueden mostrar diferentes respuestas al agente, dependiendo de la concentración del agente en la ubicación de la célula. Las sustancias que contrarrestan el efecto de una molécula que es inhibidora para la regeneración o reparación de tejidos, ya sea causando degradación, secuestro, reducción de la expresión o interacción de bloqueo de la molécula con una célula, también pueden incorporarse.

5 Los factores de crecimiento se usan normalmente a concentraciones en el intervalo de aproximadamente 1 fg/ml a 1 mg/ml. Normalmente, los factores de crecimiento se usan a concentraciones en el intervalo nanomolar bajo, por ejemplo, 1-10 nM. En determinadas realizaciones de la invención, se usan factores de crecimiento a concentraciones que no se usan típicamente en la técnica anterior o que no se encuentran típicamente *in vivo* en condiciones normales. Por ejemplo, se pueden usar factores de crecimiento a concentraciones que son 5 veces mayores, 10 veces mayores, 20 veces mayores, 100 veces mayores, etc., de lo que normalmente se requiere para producir efectos o de lo que normalmente se produce *in vivo*. Pueden llevarse a cabo experimentos de titulación para determinar la concentración óptima de un agente particular, tal como un factor de crecimiento, dependiendo de los efectos particulares deseados. Los factores se pueden añadir en forma purificada o como componentes de una mezcla biológica compleja, tal como suero.

15 Como se ha descrito anteriormente, la reparación y regeneración de tejidos puede potenciarse suministrando factores, tales como factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, integrinas, etc. Una forma de proporcionar dichas moléculas (u otras), es suministrar células en el sitio de lesión. Las células pueden producir moléculas que promueven la regeneración o de otro modo contribuyen a producir un ambiente que permita la regeneración. También pueden ser útiles diversas células progenitoras. Puede incorporarse en la matriz cualquiera de estos tipos celulares. Además, puede modificarse genéticamente cualquiera de estos tipos celulares (u otros), por ejemplo, para aumentar la producción de un factor promotor de la regeneración, antes de incorporarlo en la matriz.

20 Pueden usarse técnicas de terapia génica para aumentar la expresión de genes que codifican productos deseables. La terapia génica abarca el suministro de ácidos nucleicos que comprenden moldes para la síntesis de una molécula de interés a una célula de interés. El ácido nucleico (o un ácido nucleico derivado del ácido nucleico tal como, por ejemplo, por transcripción inversa) puede incorporarse en el genoma de la célula o permanecer de manera permanente en la célula en forma de un episoma. Sin embargo, la terapia génica también abarca el suministro de ácidos nucleicos que no se integran o permanecen de manera permanente en la célula a la que se suministran. Dichas estrategias permiten la síntesis temporal o transitoria de una molécula de interés.

25 Pueden incorporarse en las matrices de péptido vectores y vehículos que proporcionan ácidos nucleicos que comprenden moldes para la síntesis de moléculas deseables, de las cuales pueden captarse por las células en o próximos al sitio de lesión. Preferentemente, el ácido nucleico incluye una secuencia codificante para un gen que se va a expresar en una célula de interés y también incluye señales de expresión adecuadas, por ejemplo, promotores, terminadores, etc., para asegurar una expresión adecuada. En ciertas realizaciones de la invención, las señales de expresión son específicas del tipo celular, de tal forma que el gen se expresará únicamente en células de un tipo celular particular.

30 En general, pueden usarse vectores víricos o no víricos. En ciertas realizaciones de la invención, el vector es un vector vírico que es capaz de infectar a neuronas. Por ejemplo, pueden usarse virus del herpes, adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus o lentivirus. Puede ser preferible evitar el uso de virus intactos en a la hora de suministrar moldes a las células. Por lo tanto, puede ser preferible suministrar vectores de ADN o moléculas de ADN lineales. Estos vectores pueden incluir, aunque no necesariamente, secuencias víricas, tales como repeticiones terminales largas, etc. Puede usarse cualquiera de una gran variedad de agentes útiles para la transfección para mejorar la captación de ácidos nucleicos por las células. Dichos agentes incluyen una gran variedad de polímeros catiónicos y polímeros catiónicos modificados, lípidos, etc. Los ligandos de direccionamiento específicos de un tipo celular, por ejemplo, ligandos o anticuerpos que se unen específicamente a una molécula expresada sobre un tipo celular de interés, pueden unirse a un agente de suministro de terapia génica para permitir la introducción del agente solo en ciertos tipos celulares. En general, puede incorporarse el ácido nucleico y cualquier agente de suministro de terapia génica adecuado (por ejemplo, un polímero catiónico) en la matriz de cualquiera de los modos descritos en el presente documento.

35 En ciertas realizaciones de la invención, puede efectuarse una modificación genética terapéuticamente deseable. Por ejemplo, en caso de que un individuo porte una mutación en un gen particular, puede ser deseable introducir una copia de tipo silvestre del gen en la célula progenitora con fines de terapia génica. En ciertas realizaciones de la invención, puede desearse introducir un gen que codifica un receptor particular, por ejemplo, un receptor de factor de crecimiento, a fin de conferir o potenciar un potencial de diferenciación, desdiferenciación o transdiferenciación particular, permitiendo que las células respondan al factor de crecimiento.

40 El número de células que se administran para fines terapéuticos, la proporción relativa de células de diferentes fenotipos y/o la concentración de células dentro de una estructura de péptido pueden alterarse según sea adecuado para la afección o lesión particular que se vaya a tratar.

45 En ciertas realizaciones de la invención, las células, por ejemplo, células endoteliales vasculares y/o su progenie que haya proliferado y/o se haya diferenciado sobre o dentro de una estructura de péptido se retiran o extraen de la

estructura. La retirada o extracción puede lograrse por cualquier medio adecuado, incluyendo la retirada con una pipeta de succión, rotura mecánica de la matriz, degradación enzimática de la estructura *in vitro*, etc. En ciertas realizaciones de la invención, el procedimiento seleccionado da como resultado una retirada o extracción de aproximadamente un 10 % de las células, entre un 10 % y un 25 % de las células, inclusive, entre un 25 % y un 50 % de las células, inclusive, entre un 50 % y un 75 % de las células, inclusive o entre un 75 % y un 100 % de las células, inclusive. Pueden seleccionarse procedimientos que dan como resultado cualquier intervalo conveniente. El procedimiento seleccionado puede depender de los fines para los que se vayan a usar las células, el número de células necesario, etc. En ciertas realizaciones de la invención, la viabilidad de las células retiradas o extraídas es de aproximadamente un 10 % de las células, entre un 10 % y un 25 %, inclusive, entre un 25 % y un 50 % de las células, inclusive, entre un 50 y un 75 % de las células, inclusive o entre un 75 % y un 100 % de las células, inclusive. Pueden seleccionarse procedimientos que dan como resultado cualquier intervalo conveniente. El procedimiento seleccionado puede depender de los fines para los que se vayan a usar las células, el número de células necesario, etc.

Las células extraídas pueden cultivarse adicionalmente *in vitro*, ya sea sobre o dentro de una estructura de hidrogel de péptido o dentro de cualquier otro vaso de cultivo. Las células extraídas pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía adecuada, incluyendo intravenosa, subcutánea, oral, percutánea, intramuscular o quirúrgica. Las células administradas pueden usarse para complementar un tejido, órgano o estructura corporal, por ejemplo, un tejido, órgano o estructura corporal que padezca una deficiencia de tejido vascular. Las células administradas pueden sintetizar o de otro modo suministrar un agente terapéutico. Por ejemplo, las células administradas pueden suministrar una proteína, por ejemplo, una enzima de la que carece el individuo. Las células administradas pueden modificarse genéticamente y por lo tanto, usarse como medio para suministrar terapia génica.

Los péptidos autoensamblantes de la invención pueden usarse para promover la formación de una capa de endotelio vascular en un sitio de lesión, por ejemplo, después de un procedimiento como angioplastia. También pueden usarse como materiales de recubrimiento, por ejemplo, para dispositivos tales como injertos o endoprótesis vasculares, para promover la endotelización. En una estrategia alternativa, los péptidos forman una capa en la superficie interna de un conducto artificial, tal como un vaso sanguíneo artificial. Las células endoteliales se cultivan sobre la capa formada por el autoensamblaje de los péptidos durante un periodo de tiempo. Las células secretan componentes de la MEC. Después, pueden retirarse las células, dejando atrás una capa de membrana basal intacta que contiene moléculas de la MEC sintetizadas por las células. Después, se implanta el conducto artificial en un hospedador. En otra estrategia, se implanta el conducto en un hospedador sin retirar las células endoteliales.

Los péptidos modificados autoensamblantes y las estructuras que los contienen pueden usarse como o dentro de guías para nervios, por ejemplo, para promover la generación de axones y nervios en el sistema nervioso periférico.

Los péptidos autoensamblantes modificados de la invención y las estructuras que los contienen pueden usarse como o dentro del hueso, por ejemplo, para promover la regeneración de células óseas y acelerar la regeneración del hueso y/o potenciando la actividad de mineralización de los osteoblastos y la proliferación y diferenciación de preosteoblastos o células madre.

#### K. Kits

La invención proporciona kits que pueden usarse para cultivar células y/o para formar matrices de péptido que pueden introducirse en el cuerpo de un sujeto. Los kits comprenden uno o más péptidos autoensamblantes de la invención, que pueden proporcionarse en forma seca o liofilizada, en solución o en forma ensamblada o parcialmente ensamblada. Los kits pueden comprender además uno o más de los siguientes artículos: una población de células, medio de cultivo celular o tisular, una cantidad predeterminada de un factor de crecimiento, una cantidad predeterminada de un ion o una sal del mismo, instrucciones para preparar el péptido autoensamblante para cultivo celular, instrucciones para cultivar células sobre o dentro de una estructura de hidrogel de péptido (por ejemplo, para encapsular células), instrucciones para introducir el péptido autoensamblante en un sujeto, un vaso en el que puede llevarse a cabo el cultivo celular, un líquido en el que puede disolverse el péptido, una jeringa, un ion o una sal del mismo para iniciar el autoensamblaje del péptido, uno o más factores de crecimiento o diferenciación, medio para cultivo tisular, células (por ejemplo, células endoteliales vasculares), péptido de control, etc. También pueden introducirse artículos adicionales.

### III. Resumen de varias realizaciones de la presente invención

#### (i) Péptido autoensamblante modificado

Por tanto, como se ha descrito y analizado de manera general anteriormente, la presente invención proporciona un péptido autoensamblante modificado que comprende:

- (a) un primer dominio de aminoácidos que media el autoensamblaje, en el que el dominio comprende aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternos que son complementarios y estructuralmente compatibles y se autoensamblan en una estructura macroscópica cuando se presentan en forma no modificada; y
- (b) un segundo dominio de aminoácidos que no media el autoensamblaje en forma aislada, en el que el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos una secuencia mínima biológicamente activa.

En ciertas realizaciones, el primer dominio de aminoácidos comprende al menos dos apariciones de una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: -RADA-; -IEIK-; o -FKFQ-. En algunas realizaciones, el primer dominio de aminoácidos comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la Tabla 1. En otras realizaciones, el primer dominio de aminoácidos comprende -RADARADARADARADA- (SEQ ID NO: 21); -FKFQFKFQFKFQ- (SEQ ID NO: 51); -IEIKIEIK- (SEQ ID NO: 52) o -KLDLKLKLDLKL- (SEQ ID NO: 53).

En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos dos secuencias mínimas biológicamente activas. En otras realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos tres secuencias mínimas biológicamente activas. En otras realizaciones más, las secuencias mínimas biológicamente activas se seleccionan entre las secuencias proporcionadas en la tabla 2a. En ciertas realizaciones, la al menos una secuencia mínima biológicamente activa incluye -RGD-.

En algunas realizaciones, el segundo dominio de aminoácido está unido covalentemente o no covalentemente al extremo C-terminal del primer dominio de aminoácidos. En otras realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos está unido covalentemente al extremo C-terminal del primer dominio de aminoácidos por medio de un enlace peptídico covalente. En algunas realizaciones adicionales más, el segundo dominio de aminoácidos está unido covalentemente al extremo C-terminal del primer dominio de aminoácidos por medio de un grupo enlazador de amino, como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es al menos un 2-mero (6,9 Angstrom). En otras realizaciones, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es de aproximadamente un 2-mero (6,9 Angstrom). En otras realizaciones más, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es menor de aproximadamente un 2-mero (6,9 Angstrom).

En ciertas realizaciones, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es al menos un 4-mero (13,8 Angstrom). En otras realizaciones, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es de aproximadamente un 4-mero (13,8 Angstrom). En otras realizaciones más, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es menor de aproximadamente un 4-mero (13,8 Angstrom).

En ciertas realizaciones, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es al menos un 8-mero (27,5 A). En otras realizaciones, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es de aproximadamente un 8-mero (27,5 A). En otras realizaciones más, la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es menor de aproximadamente un 8-mero (27,5 A).

En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos es biológicamente activo en forma aislada.

En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos procede de un dominio de unión a heparina de una proteína de unión celular. En algunas realizaciones, la proteína de unión celular se selecciona entre el grupo que consiste en fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno, VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF-β y BMP. En otras realizaciones, el dominio de unión a heparina es de las fórmulas (I) o (II):



en las que X representa un aminoácido hidrófilo seleccionado entre el grupo que consiste en F, I, L, P, M, W, Y, V, A, C y Q; y B representa un aminoácido cargado positivamente seleccionado entre el grupo que consiste en R, H y K.

En ciertas realizaciones, el péptido autoensamblante modificado, como se ha definido anteriormente y en el presente documento, tiene una carga neta positiva o negativa. En algunas realizaciones, esta carga se mide en una solución acuosa con un pH entre aproximadamente 5-9, inclusive. En otras realizaciones, el péptido autoensamblante tiene un pI mayor de o igual a 8. En algunas realizaciones adicionales más, la carga neta del péptido autoensamblante es mayor de o igual a aproximadamente 2 cuando el pH de la solución es de entre aproximadamente 6-8, inclusive.

En ciertas realizaciones, el primer dominio de aminoácidos es aproximadamente neutro o tiene una carga positiva o

negativa. En algunas realizaciones, esta carga se mide en una solución acuosa con un pH entre aproximadamente 5-9, inclusive. En otras realizaciones, el primer dominio de aminoácidos tiene una carga de entre -1 a 1 cuando el pH de la solución es de entre aproximadamente 6-8, inclusive. En otras realizaciones más, el primer dominio de aminoácidos tiene un pI de entre 5 a 9, inclusive.

5 En otras realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos tiene una carga positiva o negativa. En algunas realizaciones, esta carga se mide en una solución acuosa con un pH entre aproximadamente 5-9, inclusive. En otras realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos tiene una carga que es menor o igual a -2 cuando el pH de la solución es de entre aproximadamente 6-8, inclusive.

10 En ciertas realizaciones, el segundo dominio de aminoácidos no se autoensambla cuando está presente en forma aislada, pero permite el ensamblaje del primer dominio de aminoácidos, de tal forma que el péptido se ensambla para formar una estructura macroscópica. En ciertas realizaciones, esta estructura macroscópica comprende nanofibras y/o láminas beta.

En otras realizaciones, el péptido se autoensambla cuando está presente como el único péptido en una solución. En ciertas realizaciones, la solución es una solución acuosa.

15 En otras realizaciones más, el péptido autoensamblante no se autoensambla cuando está presente como el único péptido en una solución, pero se autoensambla cuando está presente en una solución con un péptido autoensamblante no modificado, como se ha definido en el presente documento.

En algunas realizaciones adicionales más, el péptido autoensamblante modificado comprende además un tercer dominio de aminoácidos, en el que el tercer dominio de aminoácidos comprende:

20 (a) un primer dominio de aminoácidos que media el autoensamblaje, en el que el dominio comprende aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternos que son complementarios y estructuralmente compatibles y se autoensamblan en una estructura macroscópica o

25 (b) un segundo dominio de aminoácidos que no se autoensambla en forma aislada, pero permite el ensamblaje del primer dominio de aminoácidos, de tal forma que el péptido se ensambla para formar una estructura macroscópica. Dicho péptido autoensamblante modificado (que incorpora este tercer dominio de aminoácidos) puede ser una cadena de péptido lineal en la que se ubica un dominio de aminoácidos que comprende la secuencia mínima biológicamente activa o el sitio diana para una interacción con una biomolécula entre dos dominios de aminoácidos que median el autoensamblaje, en el que los dominios que median el autoensamblaje comprenden aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternos que son complementarios y estructuralmente  
30 compatibles y se autoensamblan en una estructura macroscópica (por ejemplo, nanofibras y/o láminas beta).

En ciertas realizaciones, el péptido autoensamblante modificado se selecciona entre los péptidos de la Tabla 2b.

35 En ciertas realizaciones de la invención, el péptido autoensamblante modificado comprende una secuencia mínima biológicamente activa que tiene afinidad por o forma complejos con, una molécula biológica. Dichas moléculas biológicas se describen en el presente documento e incluyen, pero sin limitación, proteínas o péptidos (por ejemplo, heparina, heparán sulfato, factores de crecimiento y similares) y/o células (por ejemplo, osteoblastos, condrocitos, células de médula ósea, osteocitos, células del periostio, células pericondriales, fibroblastos, células mesenquimales, células madre mesenquimales, células procedentes de tejido adiposo, células madre procedentes de tejido adiposo, células neuronales, células del hipocampo, células epidérmicas, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos, células basales, células espinosas, células granulares, células madre embrionarias, células de ovario,  
40 células pancreáticas, células de cuello de útero, células hepáticas, células de prepucio, neutrófilos, linfocitos, macrófagos, células dendríticas o precursores de cualquiera de las anteriores).

*(ii) Composiciones farmacéuticas*

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido autoensamblante modificado, como se ha descrito anteriormente y en el presente documento.

45 Los péptidos autoensamblantes modificados, las composiciones farmacéuticas de los mismos y/o las matrices de la presente invención pueden inyectarse o implantarse quirúrgicamente en el organismo. El péptido/composición/matriz puede inyectarse en el organismo por diversas rutas, tales como inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea y/o intravenosa. Las rutas contempladas específicamente son administración por un suministro sanguíneo y/o linfático y/o administración quirúrgica directa al sitio del defecto. En general, la vía  
50 de administración más adecuada dependerá de una serie de factores que incluyen la naturaleza del péptido/composición/matriz empleada (por ejemplo, su estabilidad en el ambiente suministrado), la ubicación del defecto y el estado del sujeto (por ejemplo, si el sujeto es capaz de tolerar dicha administración), etc.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de  
55 suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-

butanodiol. Entre los vehículos y disolventes adecuados que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión aceites no volátiles estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de los inyectables.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Los péptidos autoensamblantes, las composiciones farmacéuticas de los mismos y/o las matrices de los mismos pueden administrarse (mediante inyección y/o implante quirúrgico) usando cualquier cantidad/peso/concentración eficaz para el tratamiento. Las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración. La cantidad terapéuticamente eficaz específica para un sujeto u organismo concreto dependerá de una diversidad de factores, incluyendo, pero sin limitación, la naturaleza y/o la actividad del péptido/composición/matriz que se emplee; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto; el tiempo y/o la ruta de administración; la velocidad de biodegradación del péptido/composición/matriz que se emplee; la duración del tratamiento; y/o los agentes biológicamente activos adicionales usados en combinación o de manera coincidente con la administración del péptido/composición/matriz.

La presente invención contempla una variedad de formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica es una solución de péptido autoensamblante modificado (por ejemplo, para inyección). En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica es una matriz que comprende un péptido autoensamblante modificado (por ejemplo, para inyección y/o implante). En ciertas realizaciones, la matriz es un gel o hidrogel.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una solución inyectable de péptido autoensamblante modificado. En ciertas realizaciones, la composición se inyecta en un defecto mediante una jeringa con una aguja o tubo grueso. En ciertas realizaciones, la composición se inyecta mediante una jeringa en un defecto mediante un catéter (por ejemplo, para el suministro transvascular y endoscópico). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende premezclar un agente de gelación y una solución inyectable de péptido autoensamblante modificado inmediatamente antes de la inyección (véase, por ejemplo, la Figura 36A, que representa la administración de una solución de péptido y un agente de gelación mediante una jeringa/catéter, en la que la solución de péptido y el agente de gelación se premezclan en la punta de la jeringa/catéter inmediatamente antes de la inyección en un organismo).

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una matriz inyectable de péptido autoensamblante modificado. En ciertas realizaciones, la composición se inyecta en un defecto mediante una jeringa con una aguja o tubo grueso. En ciertas realizaciones, la composición se inyecta mediante una jeringa en un defecto mediante un catéter (por ejemplo, para el suministro transvascular y endoscópico).

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además uno o más factores de crecimiento. En ciertas realizaciones, se premezclan uno o más factores de crecimiento con una solución de péptido autoensamblante modificado antes de la inyección. En ciertas realizaciones, la composición premezclada se almacena en una jeringuilla o recipiente estéril (por ejemplo, una botella de almacenamiento, vial, etc.). Sin embargo, en determinadas realizaciones, la solución de uno o más factores de crecimiento y la solución de péptido se almacenan por separado y la solución de factor de crecimiento se premezcla con una solución de péptido autoensamblante modificado solo inmediatamente antes de la inyección (tal como, por ejemplo, la configuración representada en la Figura 36A).

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un material sólido (por ejemplo, una cánula). En ciertas realizaciones, se premezcla un material sólido con una solución de péptido autoensamblante modificado antes de la inyección. En ciertas realizaciones, la composición premezclada se almacena en una jeringuilla o recipiente estéril (por ejemplo, una botella de almacenamiento, vial, etc.). Sin embargo, en determinadas realizaciones, el material sólido y la solución de péptido se almacenan por separado y el material sólido se premezcla con una solución de péptido autoensamblante modificado solo inmediatamente antes de la inyección (tal como, por ejemplo, la configuración representada en la Figura 36A).

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una molécula biológica (por ejemplo, tal como una proteína o péptido, como se describe en el presente documento). En ciertas realizaciones, la molécula biológica se premezcla con una solución de péptido autoensamblante modificado antes de la inyección. En ciertas realizaciones, la molécula biológica se almacena en una jeringuilla o recipiente estéril (por ejemplo, una botella de almacenamiento, vial, etc.). Sin embargo, en determinadas realizaciones, la molécula biológica y la solución de péptido se almacenan por separado y se premezcla una solución de la molécula biológica con una solución de péptido autoensamblante modificado solo inmediatamente antes de la inyección (tal como, por ejemplo, la configuración representada en la Figura 36A).

5 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además células. En ciertas realizaciones, las células se premezclan con una solución de péptido autoensamblante modificado antes de la inyección. En ciertas realizaciones, la composición premezclada se almacena en una jeringuilla o recipiente estéril (por ejemplo, una botella de almacenamiento, vial, etc.). Sin embargo, en determinadas realizaciones, las células/suspensión de células y la solución de péptido se almacenan por separado y las células/suspensión de células se premezclan con una solución de péptido autoensamblante modificado solo inmediatamente antes de la inyección (tal como, por ejemplo, la configuración representada en la Figura 36B).

10 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un péptido autoensamblante no modificado adicional (por ejemplo, tal como los péptidos representados en la Tabla 1) que comprenden aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternos que son complementarios y estructuralmente compatibles y se autoensamblan en una lámina beta y en la que el péptido autoensamblante adicional no contiene un dominio de aminoácidos que reduzca la compatibilidad del péptido con la unión celular o la viabilidad celular. En ciertas realizaciones, el péptido autoensamblante modificado y el péptido autoensamblante adicional (no modificado) están presentes en una relación de aproximadamente 1:1, 5:1, 9:1 o 99:1.

15 En ciertas realizaciones, la solución de péptido almacenada se encuentra a un pH ácido. En ciertas realizaciones, el pH de la solución de péptido almacenada se ajusta a un pH prácticamente neutro antes de la administración. En ciertas realizaciones, la solución de péptido se ajusta a un pH prácticamente neutro antes de la administración y se almacena en una jeringa o un recipiente esterilizado. En ciertas realizaciones, el pH se ajusta a un pH prácticamente neutro con una solución de ajuste (por ejemplo, una solución básica, tal como una solución de NaOH).

20 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de un agente de gelación y se autoensambla dentro del organismo para formar una estructura macroscópica (por ejemplo, nanofibras y/o láminas beta). En ciertas realizaciones, dicha composición farmacéutica se autoensambla dentro del organismo tras entrar en contacto con los fluidos corporales (por ejemplo, sangre, linfa, etc.).

25 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de suspensión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de administración y dosificación. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) desvela varios vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida en que cualquier medio transportador convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseado o la interacción de otro modo perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del ámbito de la presente invención.

35 En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % puro. En algunas realizaciones, el excipiente está aprobado para su uso en seres humanos y para uso veterinario. En algunas realizaciones, el excipiente está aprobado por la Administración para Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. En algunas realizaciones, el excipiente es de grado farmacéutico. En algunas realizaciones, el excipiente cumple con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

40 Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración a seres humanos, el experto en la materia entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su administración a animales de todo tipo. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer las composiciones adecuadas para la administración a diversos animales se comprende bien, y el farmacólogo veterinario experto puede diseñar y/o realizar dicha modificación con experimentación simplemente ordinaria, si la hay.

### (iii) Matrices

50 Como se ha analizado anteriormente, la presente invención también proporciona matrices de la invención que comprenden péptidos autoensamblantes modificados, como se ha descrito anteriormente y en el presente documento. En ciertas realizaciones, la matriz es un gel o un hidrogel. En otras realizaciones, la matriz es tridimensional (es decir, tiene una forma).

55 En ciertas realizaciones, la matriz comprende además una molécula biológica adicional. En algunas realizaciones, la molécula biológica adicional tiene una carga neta positiva o negativa. En otras realizaciones, la molécula biológica adicional es una proteína o péptido. En otras realizaciones más, la molécula biológica adicional es un factor de crecimiento o un péptido autoensamblante.

En algunas realizaciones, la molécula biológica adicional es un péptido autoensamblante. En otras realizaciones, la molécula biológica adicional es un péptido autoensamblante modificado (por ejemplo, como se describe en la Tabla

2a). En otras realizaciones más, la molécula biológica adicional es un péptido autoensamblante no modificado (por ejemplo, como se describe en la Tabla 1).

5 En ciertas realizaciones, la molécula biológica adicional es un factor de crecimiento. En ciertas realizaciones, la molécula biológica adicional es un factor de crecimiento de unión a heparina. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento de unión a heparina se selecciona entre el grupo que consiste en VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- $\beta$  y BMP.

En otras realizaciones, la molécula biológica adicional es un glucosaminoglucano. En algunas realizaciones, el glucosaminoglucano es heparina o sulfato de heparina.

10 En ciertas realizaciones, la matriz, como se ha descrito anteriormente y en el presente documento, comprende además una pluralidad de células unidas a la superficie de la matriz o encapsuladas dentro de la matriz. En algunas realizaciones, las células se encuentran distribuidas de manera sustancialmente uniforme dentro de la matriz. En ciertas realizaciones, las células se seleccionan entre el grupo que consiste en osteoblastos, condrocitos, células de médula ósea, osteocitos, células del periostio, células pericondriales, fibroblastos, células mesenquimales, células madre mesenquimales, células procedentes de tejido adiposo, células madre procedentes de tejido adiposo, células neuronales, células del hipocampo, células epidérmicas, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos, células basales, células espinosas, células granulares, células madre embrionarias, células de ovario, células pancreáticas, células de cuello de útero, células hepáticas, células de prepucio, neutrófilos, linfocitos, macrófagos, células dendríticas o precursores de cualquiera de las anteriores.

20 En ciertas realizaciones, la matriz, como se ha descrito anteriormente y en el presente documento, comprende además un material sólido. En ciertas realizaciones, el material sólido es una sal. En ciertas realizaciones, el material sólido es una sal inorgánica. En ciertas realizaciones, la sal inorgánica comprende calcio y/o fosfato. En otras realizaciones, la sal inorgánica se selecciona entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita y carbonato de calcio.

25 En ciertas realizaciones, el material sólido, como se ha descrito anteriormente, tiene un diámetro de poro de entre aproximadamente 100-500 micrómetros, inclusive.

En otras realizaciones, el material sólido, como se ha descrito anteriormente, tiene una forma similar a un bloque, cilíndrica, similar a una placa o similar a un gránulo.

*(iv) Fabricación de matrices de la invención*

30 Como se ha descrito de manera general anteriormente y en el presente documento, la presente invención también proporciona procedimientos para producir matrices de la invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una matriz de la presente invención que comprende las etapas de (i) disolver un péptido autoensamblante modificado en una solución acuosa y (ii) ajustar el pH. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de (iii) añadir un agente de gelación.

35 En otras realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una matriz de la presente invención que comprende las etapas de (i) disolver el péptido autoensamblante en una solución acuosa y (ii) añadir un agente de gelación. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además (iii) ajustar el pH de la solución.

En ciertas realizaciones, el agente de gelación es un electrolito. En algunas realizaciones, el agente de gelación es NaCl, solución salina, PBS, medio de cultivo celular o un fluido biológico (por ejemplo, sangre, linfa y similares).

40 En ciertas realizaciones, el pH se ajusta de ácido (por ejemplo, un pH de entre aproximadamente 2-3) a básico. En ciertas realizaciones, El pH de la se ajusta a aproximadamente 5-9, inclusive. En algunas realizaciones, El pH de la se ajusta a aproximadamente 6-8, inclusive. En otras realizaciones, El pH de la se ajusta a aproximadamente 5-7, inclusive. En otras realizaciones, El pH de la se ajusta a aproximadamente 6-8, inclusive. En otras realizaciones, El pH de la se ajusta a aproximadamente 5,7 a 5,8, inclusive.

45 *(v) Otros procedimientos de la invención*

50 Como se ha descrito de manera general anteriormente y en el presente documento, la presente invención proporciona procedimientos para usar los péptidos autoensamblantes modificados de la invención, péptidos autoensamblantes, una composición farmacéutica de los mismos y/o una matriz formada a partir de los mismos como un relleno de defectos de huesos y/o tejidos. "Tejido" incluye cualquier tejido corporal interno o externo. Los tejidos ejemplares incluyen, pero sin limitación, cerebro, piel, hígado, páncreas, estómago, riñón, tracto gastrointestinal, tracto esofágico, corazón, músculo, tejido conectivo, cartílago, nervio, grasa o tejido de médula ósea.

Asimismo, como se ha descrito de manera general anteriormente y en el presente documento, se desvelan procedimientos para potenciar la diferenciación o la actividad funcional celular que comprenden administrar un

péptido autoensamblante, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo a un sujeto que lo necesite.

Además, como se ha descrito de manera general anteriormente y en el presente documento, se desvela un procedimiento para tratar a un sujeto que comprende introducir o administrar un péptido autoensamblante, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo a un sitio sobre o dentro del organismo del sujeto. En ciertas realizaciones, el sitio es de un campo ortopédico; un defecto óseo; una deformidad ósea; una formación de hueso ectópica; una región de isquemia; una región de infarto de miocardio; una región vascular periférica; una región de infarto cerebral; o un defecto de la piel.

(vi) Kits

Como se ha descrito de manera general anteriormente y en el presente documento, la presente invención también proporciona kits que comprenden el péptido autoensamblante de la invención, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo. Los kits se proporcionan normalmente en un recipiente adecuado (por ejemplo, una lámina, plástico o envase de cartón). En ciertas realizaciones, un kit de la invención puede incluir uno o más excipientes farmacéuticos, aditivos farmacéuticos y similares, como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, un kit de la invención puede incluir medios para la administración adecuada o para cultivar células dentro de las matrices de la invención, tal como, por ejemplo, vasos graduados, jeringas, agujas, artículos de limpieza y similares. En ciertas realizaciones, un kit de la invención puede incluir instrucciones para la administración adecuada o el cultivo y/o preparación para una correcta administración o cultivo.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un kit de cultivo que comprende: (a) un péptido autoensamblante de la invención, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo; (b) instrucciones para iniciar el autoensamblaje del péptido en una estructura macroscópica; y (c) al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en: una población de células, medio de cultivo celular o tisular, una cantidad predeterminada de un factor de crecimiento, una cantidad predeterminada de un ion o una sal del mismo, instrucciones para preparar el péptido autoensamblante para cultivo celular, instrucciones para cultivar células sobre o dentro de una estructura de hidrogel de péptido, instrucciones para introducir el péptido autoensamblante en un sujeto, un vaso en el que puede llevarse a cabo el cultivo celular, un líquido en el que puede disolverse el péptido, una jeringa, un ion o una sal del mismo para iniciar el autoensamblaje del péptido y uno o más factores de crecimiento o diferenciación.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para cultivar células que comprende poner en contacto las células con un péptido autoensamblante de la invención, una composición farmacéutica del mismo o una matriz formada por el mismo y mantener la matriz durante un periodo de tiempo en condiciones adecuadas para el cultivo celular. En ciertas realizaciones, las células se cultivan sobre la superficie de la matriz y/o se cultivan incluidas en la matriz.

**Ejemplos**

Los ejemplos no incluidos en el ámbito de las reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos.

**Ejemplo 1. Efectos en la proliferación y diferenciación de preosteoblastos**

Recientemente, debido al envejecimiento de la sociedad, los problemas asociados con la degeneración ósea y la fractura de huesos se han vuelto un problema significativo tanto para la calidad de vida del paciente como para el coste médico social. Las fracturas de huesos en los ancianos son un problema prevalente debido a la osteoporosis, pero también debido a una escasa regeneración ósea. Por tanto, es interesante la aceleración de la regeneración ósea mediante el implante de biomateriales y/o una estrategia de ingeniería de tejidos. También es interesante potenciar la actividad de mineralización de los osteoblastos y la proliferación o diferenciación de preosteoblastos o células madre.

Se evaluó la regeneración ósea usando motivos funcionales como se proporcionan en la Tabla 2 (Synprep Corporation). Se usó la línea celular de preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1) para comparar los efectos de la proliferación y diferenciación de los motivos con RAD16-1 e hidrogeles de colágeno I como controles. La proliferación se midió por los contenidos de ADN y los efectos en la diferenciación se evaluaron usando la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina secretada. Se sabe que la fosfatasa alcalina es un marcador de diferenciación de los osteoblastos en la etapa temprana. se sabe que la osteocalcina secretada es un marcador de diferenciación de los osteoblastos en la etapa tardía y su actividad se correlaciona con la mineralización ósea.

La Figura 1 muestra los datos de espectrometría de masas del péptido de SEQ ID NO: 4, que se sintetizó mediante el procedimiento de síntesis en fase sólida de Fmoc como se describe en Grant, G.A. ed.: Synthetic Peptides. A User's Guide, UWBC Biotechnical Resource Series (Burgess, R.R. Series Editor), Oxford University Press (1992) y Atherton, E. y Sheppard, R. C.: Solid phase peptide synthesis. A practical approach, IRL Press, Oxford (1989). La intensidad relativa de la señal está relacionada con la cantidad del péptido que pertenece al pico, aunque no es cuantitativa (véase la Tabla 3). Los datos muestran que colocar el motivo de funcionalización en el lado C-terminal preserva con éxito la secuencia de motivo funcional.

PM	Intensidad rel.	Descripción
2919,00	100	El péptido (SEQ ID NO: 4) Ac-(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
2762,76	15	Sin "R" del extremo N-terminal Ac-ADA(RADA) <sub>3</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
2349,58	8	Sin "RADAR" del extremo N-terminal Ac-ADA(RADA) <sub>2</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
2062,51	8	Sin "RADARADA" del extremo N-terminal Ac-(RADA) <sub>2</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>
1460,93	28	El péptido (SEQ ID NO: 4) (señal cargada doble) Ac-(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS-CONH <sub>2</sub>

- Normalmente en la síntesis de péptidos, tal como la metodología sintética en fase sólida de Fmoc o tBoc, el péptido se sintetiza partiendo desde el extremo C-terminal. Entre los subproductos sintéticos más comunes se encuentran péptidos más cortos y normalmente son la principal fuente de impurezas. Cuando el motivo funcionalizado se coloca en el extremo C-terminal, el material producido tendrá una secuencia autoensamblante más corta pero tendrá una secuencia completa en el motivo funcionalizado. La ausencia de uno o unos pocos aminoácidos en el componente de péptido autoensamblante no afecta a la funcionalidad del hidrogel en su conjunto. En cambio, una pérdida de uno o unos pocos aminoácidos en el motivo funcionalizado provoca la pérdida de funcionalidad. Por tanto, el motivo funcionalizado ha de colocarse en el extremo C-terminal de la secuencia autoensamblante para asegurar su funcionalidad.
- 5 El motivo funcional puede colocarse a ambos lados de la secuencia autoensamblante; al hacer esto se puede aumentar la concentración del motivo funcional. Estos motivos funcionales en el extremo de la secuencia autoensamblante pueden tener la misma secuencia (motivo funcional) o una secuencia de aminoácidos diferente (motivo funcional). El coste de fabricación de un péptido con dos motivos funcionales a cada lado de la secuencia autoensamblante es relativamente barato en comparación con la síntesis de péptidos individuales.
- 10 Se obtuvo solución de RAD16-I al 1 % [solución de péptido autoensamblante] como RAD16-I (Puramatrix™, 3DM Inc./ BD Bioscience). Los péptidos funcionalizados de la Tabla 2 se disolvieron en agua a una concentración final del 1 % (v/p). Después, se mezclaron las soluciones de péptido funcionalizado con solución de RAD16-I al 1 % a una relación de 1:1 (Tabla 4). Cada solución de péptido se cargó en los insertos de placa de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore). Se añadió el medio de mantenimiento descrito a continuación para inducir la formación de hidrogel. Se cargó el gel de colágeno I de cola de rata (BD Biosciences) en los insertos de la placa de cultivo como control.
- 15
- 20

Código	Contenido del hidrogel
RAD	Solución de péptido RAD16-1 al 1 %
RAD2	Solución de péptido RAD16-1 al 0,5 %
PFSmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 1 al 1 % y solución de péptido RAD16-1 al 1 %, mezcladas a 1:1
FLGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 2 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
ALKmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 3 al 1 % y solución de péptido RAD16-1 al 1 %, mezcladas a 1:1
PRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 4 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
DGRmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 5 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
PRFmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 4 al 1 %, solución de péptido de SEQ ID NO: 6 al 1 % y solución de péptido RAD16-1 al 1 %, mezcladas a 1:1:2
COL	Gel de colágeno-1

**Cultivo celular y evaluación.** Se obtuvieron células MC3T3-E1 de la ATCC. Las células se mantuvieron en el medio de mantenimiento. El medio de mantenimiento es un medio esencial mínimo  $\alpha$ -modificado ( $\alpha$ -MEM, Gibco) que contiene suero fetal de ternero al 10 % (FCS, Gibco) y antibióticos (penicilina y estreptomina). Las células se sembraron a razón de  $2 \times 10^4$  en los hidrogeles en los insertos. Las células se cultivaron en el medio de mantenimiento del día 0 hasta el día 2 y después se convirtieron en el medio de diferenciación que contenía ácido L-ascórbico (Sigma) 50  $\mu$ g/ml y  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma) 10 mM. El medio se cambió cada tres días. El gel, la lisis celular y el medio de cultivo se recogieron tras 14 días de cultivo para su análisis.

La proliferación celular se evaluó usando el contenido de ADN en el hidrogel usando kits de ADNbc PicoGreen (Molecular Probes). La actividad de ALP se midió cuantitativamente del lisado de células usando un kit de ensayo de fluorescencia de fosfatasa alcalina (Sigma). La osteocalcina se midió en el medio de cultivo celular usando el kit EIA de osteocalcina de ratón (Biomedical Technologies, Inc.).

**Resultados de la proliferación celular.** Los números de células a partir del contenido de ADN en los hidrogeles mostraron que los péptidos funcionales, en combinación con RAD16-I, promueven una mayor proliferación celular, en comparación con los gels de solo RAD16-1 y colágeno-1 (Figura 3).

**Actividad de fosfatasa alcalina (ALP).** La actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de los péptidos funcionales es mayor o similar, en comparación con los controles (RAD16-I, Colágeno I) (Figura 4). Estos resultados se confirman por la tinción de fosfatasa alcalina (Figuras 5A-5I). Las áreas más oscuras (azuladas) representadas en las Figuras 5A-5I muestran mayores áreas de actividad de ALP.

**Secreción de osteocalcina en el medio de cultivo.** Para los resultados de la secreción de osteocalcina, los péptidos funcionalizados tuvieron una mayor concentración en comparación con los controles (Figura 6). Los resultados muestran que los péptidos autoensamblantes con motivos funcionales tienen el potencial de promover la diferenciación de pre-osteoblastos. Las matrices de péptido autoensamblante funcionalizado tienen el potencial de potenciar la proliferación de osteoblastos y la diferenciación osteoblástica. Pueden ser útiles como matrices para la regeneración de tejido óseo y para estudios de metabolismo óseo.

Los hidrogeles PRGmx, DGRmx y PRFmx tienen motivos de adhesión -RGD- en común. Esto muestra que tener el motivo RGD promueve tanto la proliferación como la diferenciación. PRGmx y PRFmx, que tienen el motivo -PRGDSGYRGDS-, tienen una secreción de osteocalcina varias veces mayor que otros péptidos. Un motivo para esto es que RGD se presenta bien a la célula en comparación con el motivo -DGRGDSVAYG-. Cuando el motivo RGF está próximo a la fibra autoensamblada, la integrina de la célula no se conecta al RGD debido a que la fibra interfiere con la superficie celular.

Se evaluó el efecto de la longitud del enlazador cambiando la distancia entre el motivo funcional (RGD) y la secuencia autoensamblante (RADA) (Tablas 5-7). Las células se cultivaron sobre los hidrogeles durante 7 días. La proliferación celular se evaluó usando los contenidos de ADN en el hidrogel al igual que en el experimento anterior.

**Tabla 5. Péptidos funcionalizados para evaluar los efectos de la longitud del enlazador**

N.º	Secuencia	Descripción
SEQ ID NO. 8	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGRGDSCONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGF con 2 glicinas enlazadoras
SEQ ID NO.9	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGRGDSCONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGF con 4 glicinas enlazadoras

**Tabla 6. La distancia entre el motivo funcional (RGD) y la secuencia autoensamblante (RADA)**

N.º	Distancia	
SEQ ID NO: 8 (2G)	2 mero (enlaces peptídicos)	6,9 A (Angstrom)
SEQ ID NO: 9 (4G)	4 mero (enlaces peptídicos)	13,8 A (Angstrom)
SEQ ID NO: 5 (DGRmx)	4 mero (enlaces peptídicos)	13,8 A (Angstrom)
SEQ ID NO: 4 (PRGmx)	8 mero (enlaces peptídicos)	27,5 A (Angstrom)

35

<b>Código</b>	<b>Contenido del hidrogel</b>
RAD	Solución de péptido RAD16-1 al 1 %
RAD2	Solución de péptido RAD16-1 al 0,5 %
2G	Solución de péptido de SEQ ID NO: 8 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
4G	Solución de péptido de SEQ ID NO: 9 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
PRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 4 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1

Los resultados se muestran en la Figura 7. El eje Y muestra la intensidad de fluorescencia que es lineal para los contenidos de ADN. Estos resultados muestran que la distancia entre el motivo funcional (RGD) y la secuencia autoensamblante (RADA) ha de ser al menos mayor de 2 mero (6,9A) de enlaces peptídicos. Es preferible una distancia mayor de 4 mero (13,8 A) de enlaces peptídicos. El otro motivo es que ya que -PRGD<sup>SGY</sup>RGDSG tiene múltiples motivos RGD, las probabilidades de que la integrina de la célula se una a un motivo RGD en la estructura tridimensional aumenta adicionalmente.

#### **Ejemplo 2. Efecto de la relación de mezcla de péptido funcionalizado**

Se evaluó el efecto de una mezcla de secuencia de péptido autoensamblante (por ejemplo, solución de péptido RAD16-1 al 1 %) y un péptido funcionalizado (SEQ ID NO: 7) con secuencia autoensamblante (RADA) y motivo funcional (RGD) (Tablas 8-9). La SEQ ID NO. 7 tiene una glicina adicional en el extremo N-terminal (en comparación con la SEQ ID NO. 4), que provoca un aumento en la hidrofobia del hidrogel. Biológicamente, la SEQ ID NO. 4 y la SEQ ID NO. 7 se consideran con efectos similares.

<b>N.º</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Descripción</b>
SEQ ID NO. 7	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGD <sup>SGY</sup> RGDSG-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva

<b>Código</b>	<b>Contenido del hidrogel</b>
RAD	Solución de péptido RAD16-1 al 1 %
DSG	Solución de péptido de SEQ ID NO: 7 al 1 %

Los hidrogeles se prepararon de tal modo que la relación de mezcla de RAD y DSG varió de 100:0 a 0:100 (Figura 8). Las células se prepararon y sembraron como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron sobre los hidrogeles durante 7 días. La proliferación celular se evaluó usando los contenidos de ADN en el hidrogel al igual que en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la Figura 8. El eje Y muestra el valor de intensidad de fluorescencia que es lineal para los contenidos de ADN. Esto muestra que la mezcla aumenta la proliferación celular en un intervalo amplio de al menos RAD: DSG = 99: 1 a 67:33. La caída en el gel de DSG al 100 % puede estar causada por la diferencia de las propiedades mecánicas del hidrogel, ya que DSG forma una menor rigidez del gel en comparación con RAD.

La Figura 9 muestra la reconstrucción en 3D de microscopía confocal de células cultivadas en las diferentes concentraciones de péptido funcional. La figura 9A muestra cuando la relación de DSG es del 10 %; la figura 9B muestra cuando la relación de DSG es del 70 %. En la figura 9A, las células permanecieron sobre la superficie de la matriz peptídica, mientras que en la figura 9B, las células migraron al interior de la matriz hasta 300  $\mu$ m. Estos datos demuestran que puede controlarse el comportamiento celular cambiando la proporción de péptido funcionalizado.

**Ejemplo 3. Cultivo en tres dimensiones usando el motivo funcionalizado cargado**

Los hidrogeles de péptidos autoensamblantes descritos anteriormente y en el presente documento proporciona a las células un ambiente de matriz extracelular (MEC) sintética para cultivo en 3 dimensiones, de un modo similar al del colágeno. Cuando se siembran las células en 3 dimensiones, la solución de péptido autoensamblante debe almacenarse a bajo pH (normalmente un pH de entre 2-3) para mantener el estado de solución viscosa. Sin embargo, la mezcla de células vivas en una solución de bajo pH durante largo tiempo tiene un impacto significativo en la viabilidad celular (por ejemplo, se sabe que unos pocos minutos en una solución a pH 2-3, se pierde la mayoría de la viabilidad de células humanas). Por tanto, cuando se siembran las células con una solución del péptido autoensamblante a bajo pH, (1) se añaden las células y (2) el pH se hace inmediatamente prácticamente neutro (pH entre 5-8) o básico.

La figura 10 muestra la gráfica isoelectrica y los datos reológicos correspondientes cuando se añade solución de NaOH 0,1 N a la solución de RAD16-1 al 1 %. En el punto de pH 3,6, la solución viscosa se vuelve un gel y tiene un mayor valor de G' (rigidez) y G'' (viscosidad). Cuando se aumenta el pH, el gel se rompe en pequeños trozos y se vuelve una solución con péptidos precipitados. A un pH menor, el péptido forma fibras y las fibras hacen que la solución sea viscosa. Cuando el pH se vuelve mayor y se aproxima al valor de pI, las fibras de péptido pierden su carga y se agregan para formar un gel. Se produce la misma formación de gel cuando la carga de péptido se explora con sales en una solución que contiene sal (por ejemplo, una solución que contiene un agente de gelación o un soluto isoosmótico). Una vez que se ha formado el gel, se rompe en varios trozos la estructura de fibra para formar un precipitado de partículas.

Los péptidos autoensamblantes que se sabe que soportan el crecimiento celular están formados por la secuencia repetitiva de [carga positiva]-[hidrófobo]-[carga negativa]-[hidrófobo]-, tal como -RADA- o -KLDL-, y el valor de pI es próximo a 7 (neutro). Los péptidos autoensamblantes se comportan de un modo similar con respecto a los cambios en el pH (es decir, a medida que aumenta el pH, y se aproxima al valor de pI, las fibras de péptido pierden su carga y se agregan para formar un gel). Por ejemplo, las secuencias de motivo de unión a heparina son -XBBXB- y -XBBBXXB-, que en ambos casos tienen una elevada carga positiva. X representa un aminoácido no cargado o hidrófobo. B representa péptidos con carga positiva. La Figura 11 representa la estructura del péptido autoensamblante AC(RADA)<sub>4</sub>GGFHRRRIKA-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 6) (Tabla 10). Las áreas en negro representan aminoácidos cargados positivamente; las áreas en gris representan aminoácidos cargados negativamente.

Tabla 10	
Código	Contenido del hidrogel
FHR	Solución de péptido de SEQ ID NO: 6 (Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRRRIKA CONH <sub>2</sub> ) al 1 %

Una comparación de la propiedad dependiente de pH de la solución de la secuencia de péptido autoensamblante Ac(RADA)<sub>4</sub>GGFHRRRIKA CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 6) al 1% (Código: FHR), se comparó con el motivo de unión a heparina. La Figura 12 representa la gráfica isoelectrica y los datos reológicos correspondientes cuando se añade NaOH 0,1 N a la solución de FHR para ajustar el pH. La carga neta de la molécula de péptido se mantiene a ≥ 2 cuando el pH <10. Hasta un punto de pH 5,7, la solución mantiene el estado viscoso. Este movimiento del punto de pH, en el que la solución de péptido se vuelve un gel, se controla por el cambio inducido por el motivo adicional en el péptido autoensamblante. La carga inducida impide que el péptido se agregue para formar el gel. Por tanto, la célula y la solución de péptido pueden mezclarse a un pH aproximadamente neutro. Tras mezclarse completamente, puede producirse la formación de gel añadiendo una solución que contiene sal (por ejemplo, una solución que contiene un agente de gelación o un soluto isoosmótico).

El cambio en el valor de pH del punto de gelación mediante el cambio de la carga del péptido autoensamblante prácticamente neutro es importante debido a que se efectúa sin perder la función autoensamblante básica y las propiedades biológicas de la secuencia autoensamblante original.

Los péptidos autoensamblantes cargados positivamente pueden disolverse en agua destilada. El ajuste del pH de la solución (es decir, usando una solución básica, tal como una solución de NaOH) permite a la solución de péptido permanecer en estado de sol (es decir, un pH = 5,7 para el péptido FHR). En este caso, ha de evitarse el uso de una elevada concentración de una sal tamponadora para estabilizar el pH ya que la concentración de sal por encima de la concentración crítica fuerza a que la solución de péptido forme un hidrogel (Caplan 2000, Caplan 2002a).

Para el cultivo celular en 3 dimensiones, las células suspendidas en fluido osmótico ajustado sin sal pueden mezclarse con la solución de péptido con el pH ajustado. Puede formarse un hidrogel que contiene células añadiendo una solución que contiene sal (por ejemplo, que contiene un agente de gelación o un soluto isoosmótico) (Caplan 2000, Caplan 2002a).

Para su uso *in vivo*, la solución de péptido con pH ajustado puede mezclarse con una solución/suspensión que contiene células (por ejemplo, una suspensión de células madre, una solución/suspensión que contiene células procedentes de tejido adiposo o una solución/suspensión que contiene células de médula ósea). La solución de

péptido puede formar un hidrogel poniendo en contacto la solución que contiene células o poniendo en contacto un fluido corporal, tal como sangre o linfa. La solución de péptido puede inyectarse directamente con o sin la solución que contiene células. Tras la inyección en el organismo, las células migran a y forman el hidrogel en el tejido adyacente o la sangre (Caplan 2000, Caplan 2002a).

5 **Experimento de cultivo tridimensional.** Se obtuvieron células MC3T3-E1 y se cultivaron para su siembra usando el mismo protocolo al descrito en el Ejemplo 1. Las células se centrifugaron y resuspendieron en solución de sacarosa (al 10 %) a  $4 \times 10^6$  células/ml. El péptido FHR se disolvió en agua para proporcionar una solución al 1,0 % p/t. La solución de RAD16-I al 1 % se obtuvo como RAD16-I (Puramatrix™, 3DM Inc./ BD Bioscience). Se ajustó el pH de la solución de péptido FHR a pH 5,7 mediante una solución de NaOH (es decir, de tal forma que las células pueden mezclarse a un pH aproximadamente neutro). La suspensión de células y la solución de péptido (FHR/RAD16-I) se mezclaron a una relación de 1:5. La solución mezclada se colocó en los insertos y se añadió el medio de cultivo celular al inserto para formar el hidrogel. Las células se mantuvieron mediante el medio de mantenimiento (como se describe en el presente documento).

15 **Observación por fluorescencia de las células.** Tras 14 días de cultivo, se lavaron los insertos con PBS y después se tificaron con solución de Calceína AM (4  $\mu$ M, Invitrogen). Esta solución tinte a las células vivas mediante fluorescencia verde cuando se excita con luz a 480 nm.

Los hidrogeles de RAD16-1 y FHR en el inserto se observaron mediante el microscopio confocal. Las Figuras 13A-13D muestran la reconstrucción de las imágenes fluorescentes en 3 dimensiones. Las áreas brillantes muestran la presencia de células. Estos datos indican que el péptido FHR proporciona una proliferación en 3 dimensiones superior en comparación con RAD16-1. También se evaluó la medida cuantitativa de los efectos de proliferación y diferenciación por el hidrogel de péptido FHR (Figuras 14-16A/B). Los procedimientos de análisis usados son iguales al Ejemplo 1, salvo por que se usó solución acuosa de péptido FHR al 1 % para formar el hidrogel.

La matriz de péptido promueve la proliferación celular en tres dimensiones y en dos dimensiones, debido a que la fibra de péptidos está cargada positivamente en una solución neutra. Ya que las células están cargadas negativamente, la célula se ve atraída por las fibras cargadas positivamente. Por tanto, este efecto también es posible uniendo la otra secuencia cargada positivamente, tal como polilisina.

Las Figuras 14-16A/B muestran que FHR también tiene alguna función para promover la diferenciación de preosteoblastos, en comparación con las Figuras 3-4. Sin embargo, cuando se compara la Figura 17 con la Figura 6, el efecto de FHR de promover la diferenciación no es tan fuerte cuando se compara con PRGmx o PRFmx, que contienen ambos la secuencia RGD.

La Figura 18 representa la gráfica isoeléctrica y los datos reológicos de la solución de PFS al 1 % cuando se añade solución de NaOH 0,1 N. La solución de Ac(RADA)<sub>4</sub>GGSKPPGTSS-CONH<sub>2</sub> al 1 % (Código: SKP, secuencia de péptido: SEQ ID NO: 7) es un hidrogel formado por péptidos con una secuencia autoensamblante y un motivo funcional cargado positivamente. Aunque el valor de pI del péptido es de 9,74 y mantiene una carga positiva a un intervalo próximo a pH 7, el gel se forma en el punto de pH 4,5. Esto se debe a que la carga de la molécula a un intervalo de aproximadamente pH 7 es +1 y menor que la carga de Ac(RADA)<sub>4</sub>GGFHRRIKA CONH<sub>2</sub>(FHR) (mayor de 3). La carga del péptido entero ha de ser mayor de 2 cuando se mezclan las células. Este pH debe ser próximo a 6-8 a fin de minimizar el daño a las células. Ya que esta secuencia es un motivo de unión a heparina, la fibra puede unirse a la molécula de heparina, que es abundante en la superficie celular. Este motivo de unión a heparina proporciona un anclaje específico para la célula. Como se describe en el Ejemplo 1, esta unión funciona de manera sinérgica con el otro motivo de unión (por ejemplo, RGD) para inducir estímulos biológicos para la proliferación y diferenciación celular. Este efecto no se limita a las secuencias descritas anteriormente, sino a los otros motivos, incluyendo las secuencias -XBBXB- y -XBBBXXB-.

#### **Ejemplo 4. Retención y suministro de proteínas usando el péptido autoensamblante**

45 El péptido autoensamblante con motivo de unión a heparina descrito anteriormente también es útil para la retención del factor de crecimiento y/o la proteína terapéutica y/o el suministro en ingeniería de tejidos y otros fines terapéuticos. Se sabe que muchos factores de crecimiento, tales como VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- $\beta$  y BMP se unen a la heparina o al heparán sulfato. Cuando se mezclan la heparina o el heparán sulfato con la solución de péptido de unión a heparina y otros factores de crecimiento, el péptido se une a la heparina o al heparán sulfato a través del motivo de unión a heparina y la heparina o el heparán sulfato se une a factores de crecimiento. Por lo tanto, los factores de crecimiento se mantienen durante más tiempo en la matriz de péptido, estimulando de manera continua a las células y se liberan lentamente por la degradación de la matriz de péptido. Sin embargo, no es necesario añadir heparina y/o factores de crecimiento a la matriz para tener propiedades biológicas deseadas. Por ejemplo, puede implantarse la matriz de péptido en el cuerpo del sujeto y pueden suministrarse la heparina y/o los factores de crecimiento presentes en el cuerpo del sujeto (por ejemplo, migrar a) la matriz implantada.

La adición de un motivo cargado positiva o negativamente a la secuencia autoensamblante también es útil para la retención de factores de crecimiento y su suministro en ingeniería de tejidos y otros fines terapéuticos. Muchos factores de crecimiento, tales como VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- $\beta$  y BMP tienen carga polar y tienen afinidad por

la matriz de péptido cargada positiva o negativamente, de acuerdo con la distribución de carga molecular tanto de los factores de crecimiento como de la matriz de péptido. Un ejemplo de dicho péptido es Ac(RADA)<sub>4</sub>-GGDGRGDSVAYG-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO. 9). La SEQ ID NO: 9 tiene por sí misma función de unión a células. Al añadir un motivo funcional cargado positiva o negativamente a la secuencia autoensamblante, puede lograrse la retención de proteínas introduciendo función biológica al mismo tiempo, manteniendo la función autoensamblante de a secuencia autoensamblante original.

La otra posibilidad es usar la secuencia autoensamblante que tiene una carga. Ac(FKQ)<sub>3</sub>-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO. 51) es una molécula cargada positivamente que tiene propiedades autoensamblantes. Aunque esta es la estrategia sencilla, las propiedades de la matriz de péptido autoensamblante no pueden evitar verse afectadas por el cambio de la secuencia autoensamblante.

Se estudió el efecto de la retención y el suministro usando el péptido autoensamblante (Tabla 11). Como proteína modelo, se usó bFGF. Se midió la retención de bFGF en diferentes matrices de péptido en diferentes condiciones de carga mediante ELISA tras lavar con PBS. Tras eliminar por lavado el bFGF no unido, se evaluó el efecto de la retención de proteína en la matriz de péptido autoensamblante usando cultivo celular de HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana).

N.º	Secuencia	Descripción	pl, carga
RAD16-1	Ac(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>		6,1, neutra
SEQ ID NO. 5	<b>Ac(RADA)<sub>4</sub>GGDGRGDSVAYG-CONH<sub>2</sub></b>	Dominio de adhesión celular (Osteopontina)	4,78, cargado negativamente
SEQ ID NO.6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRRIKA-CONH <sub>2</sub>	Dominio de unión a heparina	11,32, cargado positivamente
SEQ ID NO.51	Ac(FKQ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	Secuencia autoensamblante cargada	10,30, cargado positivamente

Los péptidos autoensamblantes en diferentes condiciones de carga se seleccionaron como se muestra en la Tabla 12. RAD16-1 tiene una secuencia autoensamblante neutra. La SEQ ID NO: 5 tiene una secuencia autoensamblante neutra pero la secuencia de unión celular cargada negativamente (-DGRGDSVAYG-) se une usando una secuencia enlazadora. La SEQ ID NO: 6 tiene una secuencia autoensamblante neutra y la secuencia de unión a heparina cargada positivamente (-FHRRIKA-) se une usando una secuencia enlazadora. La SEQ ID NO: 51 consiste en una secuencia autoensamblante cargada positivamente.

Código	Contenido del hidrogel
RAD-2P	Solución de péptido RAD16-1 al 2 %
DGR-2P	Solución de péptido de SEQ ID NO: 5 al 2 %
FHR-2P	Solución de SEQ ID NO: 6 al 2 %
FKF-2P	Solución de péptido de SEQ ID NO: 51 al 2 %

Las soluciones de péptido proporcionadas en la Tabla 12 se cargaron en los insertos de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore) y se formaron los genes usando PBS. Tras la gelación, se añadió la solución de bFGF en PBS dentro y fuera y se emplacó durante una noche. El bFGF se cargó a razón de 175ng/inserto. Tras cargar el bFGF, se intercambiaron el PBS dentro y fuera de los insertos tres veces (2 horas, 9 horas y 12 horas) para retirar el bFGF no unido (lavado). Tras el lavado, se intercambió el PBS por em medio de cultivo (EGM-2-MV, Camblex) sin factor de crecimiento unido (bFGF, VEGF y EGF) y se dejó durante más de un día (de tal forma que el fluido contenido en el gel se intercambia de PBS a medio de cultivo celular), después, se sembraron HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) a razón de 7,5x10<sup>4</sup> células en los insertos y se cultivaron durante tres días.

Se empleó cultivo celular usando medio de cultivo celular (EGM-2-MV) sin factor de crecimiento unido a la matriz de péptido como control negativo. Se empleó cultivo celular usando medio de cultivo celular (EGM-2-MV) con factor de crecimiento unido a la matriz de péptido sin cargar factor de crecimiento como control positivo. La concentración de bFGF en el tampón de lavado (PBS) y el medio de cultivo celular (EGM-2-MV) se midió usando ELISA. El tampón de lavado y el medio de cultivo celular se intercambiaron en cada periodo de medición (2 horas, 9 horas y 12 horas para

el lavado y en el momento de la siembra de células (D0), Día 1 (D1), Día 2 (D2) y día 3 (D3)). La tasa de retención de factores de crecimiento se calculó acumulando la cantidad de bFGF medida.

Los resultados se muestran en la Figura 19. La tasa de retención es elevada en el orden de KFQ-2P, FHR-2P, RAD-2P y después DGR-2P. Existe una diferencia en el perfil de retención/liberación de proteína de acuerdo con el cambio en las propiedades del hidrogel. KFQ-2P y FHR-2P están cargados positivamente y DGR-2P está cargado negativamente. Aunque bFGF es una molécula cargada positivamente, la distribución de carga local de bFGF muestra disparidad, como se presenta en la Figura 20, por lo que la matriz cargada positivamente puede atraer a la proteína cargada positivamente. El aumento de la tasa de liberación de proteína es completamente opuesto al aumento de la tasa de retención. También puede controlarse la tasa de liberación de proteína mediante la distribución de carga molecular de la matriz de péptido.

La Figura 20 representa la distribución de carga molecular de bFGF. Estos resultados demuestran que la retención de proteína en la matriz de péptido y el perfil de liberación de la matriz de péptido pueden controlarse cambiando las propiedades de carga de la matriz de péptido. Este perfil se controla por la afinidad molecular local, tal como la distribución de carga molecular de proteína y la fibra de la matriz de péptido.

La Figura 21 muestra la imagen de microscopía de fluorescencia de células sobre la matriz de péptido (RAD-2P y DGR-2P) en el día 3. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. Hasta el día 2, se mantuvo la unión celular tanto en bFGF como en el control positivo (factor de crecimiento añadido al medio) (no mostrado en la imagen). Sin embargo, la unión celular y la dispersión celular (mostrada por la dispersión del área de la fibra de actina) fue superior en los cargados con factor de crecimiento, en comparación no solo con el control negativo, sino también con el control positivo y tanto en RAD-2P como en DGR-2P. RAD-2P muestra el efecto dominante. Este dato indica que la retención de factor de crecimiento usando una matriz de péptido de carga controlada es útil para el mantenimiento celular. Esto también indica que la retención o inmovilización del factor de crecimiento en la matriz de péptido puede ser más eficaz que la proporcionada en forma soluble.

La carga de la proteína en la matriz de péptido puede efectuarse empleando procedimientos diferentes a los descritos anteriormente. La Figura 22 muestra la tasa de retención de factores de crecimiento cuando se mezcló bFGF con la solución en primer lugar y formó el gel. Mantuvo una tasa de retención mucho mayor en comparación con cuando se cargó bFGF tras la gelación (es decir, como se representa en la Figura 19) mientras que la liberación de bFGF se hizo menor.

**Ejemplo 5. Aplicación *in vivo* de los péptidos funcionalizados**

Se evaluaron los efectos del péptido funcionalizado *in vivo* en ratas. Se usaron cráneos de rata macho de 6 semanas para esta evaluación (dos muestras para cada experimento).

Las ratas en este estudio se sometieron a creación de dos defectos óseos de 4 mm de diámetro, bilateralmente en cada cráneo. Los defectos se rellenaron con los hidrogeles proporcionados en la Tabla 13. Algunos de los defectos se dejaron vacíos como controles. El fosfato beta-tricálcico ( $\beta$ -TCP) es un sustituto sintético del hueso y se usó por comparación (como puede observarse en la Figura 23B,  $\beta$ -TCP se colocó en el lado derecho del cráneo (gránulos blancos)).

Tabla 13. Aplicación <i>in vivo</i> de los péptidos funcionalizados	
Código	Hidrogeles
RAD	Solución de péptido RAD16-1 al 1 %
ALKmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 3 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
PRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 4 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
DGRmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 5 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
TCP	$\beta$ -TCP (fosfato beta-tricálcico: porosidad del 70 %)

La solución de péptido se inyectó directamente en los defectos sin células. La solución de péptido formó un hidrogel inmediatamente después de la inyección mediante la sal en el fluido corporal (por ejemplo, sangre, fluido linfático y similares).

**Evaluación de la formación de hueso:** Se sacrificó a todos los animales de cada grupo 2 y 4 semanas después. Se tomaron imágenes de rayos X de los cráneos. Se recogieron los cráneos, se hemiseccionaron y se fijaron en formalina. Después, se recortaron los defectos, se descalcificaron, se incluyeron en parafina, se tñeron mediante el

procedimiento de tinción de HE y se evaluaron por un patólogo veterinario, quien caracterizó mediante histomorfometría el tipo de tejido contenido dentro de los defectos. El grado de regeneración ósea se gradúa como Recuperación completa, 1 (más del 80 %), 2 (más del 50 %) o 3 (débil en los rayos X).

- 5 Los resultados de 2 semanas (Tabla 14 y Figuras 23A-23C) sugieren que ALKmx y PRGmx soportan la regeneración ósea en la etapa temprana de la reparación (las Figuras 23A-23C muestran las imágenes de rayos X del cráneo tras 2 semanas). Los resultados de las 4 semanas (Tabla 15) sugieren que el hidrogel compuesto del péptido autoensamblante promueve la regeneración ósea. Estos resultados sugieren que la mezcla de RAD16-I y la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 pueden usarse como relleno óseo que promueve la regeneración ósea.

<b>Tabla 14. Dos semanas</b>						
	<b>RAD</b>	<b>ALKmx</b>	<b>PRGmx</b>	<b>DGRmx</b>	<b>TCP</b>	<b>Defectos vacíos</b>
Puntuación media	3,0	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0

<b>Tabla 15. Cuatro semanas</b>					
	<b>RAD</b>	<b>ALKmx</b>	<b>PRGmx</b>	<b>DGRmx</b>	<b>TCP Defectos vacíos</b>
Puntuación media	1,0	1,5	1,5	1,0	2,0

- 10 El hidrogel de péptido puede usarse en combinación con sustitutos sintéticos de hueso, tales como fosfato beta-tricálcico o hidroxiapatita. Los sustitutos sintéticos del hueso, tales como fosfato beta-tricálcico o la hidroxiapatita contienen poros que son útiles para la regeneración ósea, al proporcionar un espacio mecánicamente estable para que funcionen los osteoblastos. Tienen una estructura porosa que tiene más de un 60 % de porosidad y consta de poros con un diámetro de 100-500 micrómetros. Cada poro está conectado a otro poro, por lo que las células y los vasos sanguíneos pueden migrar al material. La forma del sustituto sintético es un bloque de uno a unos pocos centímetros, un cilindro de unos pocos centímetros de longitud, placas de unos pocos centímetros y gránulos de unos pocos milímetros, y así sucesivamente. La forma se ajusta fácilmente por el cirujano en el momento del implante, dependiendo del tamaño del defecto.

- 15 También sirven como fuente de calcio para la regeneración ósea. La mezcla del hidrogel de péptido y el sustituto sintético del hueso tiene posibilidades de potenciar la regeneración ósea al proporcionar soporte tanto biológico como mecánico para la función de los osteoblastos.

- 20 Sin embargo, las soluciones de péptido que constan de poco o nada de péptido cargado en el intervalo próximo al neutro no pueden mezclarse con fosfato de calcio de tipo sal básico, fosfato tricálcico o hidroxiapatita. Esto se debe a que poco o nada de la molécula de péptido cargada es soluble solo cuando el pH de la solución es elevadamente ácido. En dichas condiciones ácidas, el fosfato de calcio de tipo sal básico, el fosfato tricálcico y la hidroxiapatita se disuelven en la solución de péptido y no pueden mantenerse sólidos. El aumento del pH de la solución de péptido convierte a la solución de péptido en un hidrogel frágil. Esto inhibe la integración del hidrogel de péptido y el sustituto sintético de hueso.

- 25 Como se describe en el Ejemplo 3, la solución de péptido cargada positivamente, como FHR (SEQ ID NO: 6) puede ajustarse al pH de la solución a próximo al neutro sin transformarlo en un hidrogel. Esto hace que sea posible la mezcla de la solución de péptido y la matriz porosa de sal básica, como fosfato de calcio, fosfato tricálcico o hidroxiapatita. Ya que la solución de péptido es un líquido poco viscoso, el péptido migra al interior del poro. Cuando los péptidos se autoensamblan debido al efecto de la solución salina (tal como un medio de cultivo y/o un fluido corporal, tal como sangre), el hidrogel de péptido y la matriz porosa quedan bien integrados.

- 30 Puede obtenerse el mismo efecto usando otras secuencias de péptido autoensamblante, tal como la SEQ ID NO. 51 (Tabla 16). La SEQ ID NO: 51 está cargada positivamente en el intervalo de pH neutro y FKF permanece en fase de solución en el intervalo de pH neutro (Caplan 2002a). Es posible la mezcla de FKF y la matriz porosa de sal básica, como fosfato de calcio, fosfato tricálcico o hidroxiapatita en el intervalo de pH neutro. El hidrogel puede formarse añadiendo la solución salada (Tabla 17). FKF soporta la proliferación celular, como preosteoblastos, cuando se convierte en hidrogel. Este tipo de hidrogel consiste en una secuencia de péptido autoensamblante cargada positivamente útil para la retención de proteína, como se describe en el Ejemplo 3. Los péptidos funcionalizados, tal como la SEQ ID NO. 1 - SEQ ID NO. 7, pueden mezclarse con la solución de péptido cargado, como FHR o FKF. Aunque los péptidos tienen diferentes cargas, pueden mantener las propiedades de solución de péptido cargado cuando predomina la cantidad de péptido cargado positivamente. Por tanto, la mezcla del péptido y el sustituto sintético de hueso también puede funcionalizarse mediante péptidos funcionalizados.

N.º	Secuencia	Descripción
SEQ ID NO 51	Ac(FKFQ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	Secuencia autoensamblante cargada

Código	Contenido del hidrogel
FKF	Solución de péptido de SEQ ID NO: 51 al 1 %

### Ejemplo 6. Matriz de péptido modificado funcional para la angiogénesis y la vascularización

5 La promoción de la angiogénesis y la vascularización en sí tiene un enorme potencial en el campo terapéutico, especialmente en enfermedades isquémicas, como el infarto de miocardio, la enfermedad vascular periférica y el infarto cerebral. La angiogénesis y la vascularización también tienen papeles importantes en la regeneración de tejidos, tal como la curación de heridas y la regeneración ósea. También son muy importantes en la construcción de varios tipos de tejido diseñado tridimensional, tal como piel, hígado, páncreas, hueso, músculo y similares. Es importante desarrollar matrices que ayudan y promueven la angiogénesis y la vascularización proporcionando microambientes adecuados a las células que forman la estructura vascular, tales como células endoteliales, células de músculo liso, pericitos y fibroblastos, que forman el tejido conectivo que soporta los vasos.

10 Se sabe que varias secuencias de péptido de motivo funcional promueven la angiogénesis. Por ejemplo, el sitio de unión a actina de timosina  $\beta$ 4 (-LKKTETQ-) puede promover la migración y adhesión de células endoteliales, la formación de túbulos, la brotación del anillo aórtico y la angiogénesis (Huff y col., FASEB Journal (2003) 17:2103-2105). El dominio III-CS de fibronectina plasmática humana (REDV) soporta la unión de las células endoteliales vasculares y la dispersión de células endoteliales (Shin y col., Biomaterials (2003) 24:4353-4364; Welsh y col., Biomaterials (2000) 1:23-30). La interfaz de unión a VEGF (-KLTWQELYQLKYKGI-) que reproduce una región de la región de hélice de VEGF 17-25 induce la proliferación de células endoteliales, la señalización de células activadas dependiente de VEGF y promueve la formación de capilares y la organización en ensayos *in vitro* (D'Andrea y col., PNAS (2005) 102:14215-14220).

15 Se evaluó el efecto de la matriz de péptido modificado funcional en HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) cultivando las células en 2 dimensiones sobre el gel. Los péptidos autoensamblantes estudiados se proporcionan en la tabla 18.

N.º	Secuencia	Descripción
RAD16-I	Ac(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	
SEQ ID NO 9	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGLKKTETQ-CONH <sub>2</sub>	El sitio de unión a actina en la timosina $\beta$ 4
SEQ ID NO 10	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGGREDV-CONH <sub>2</sub>	Fibronectina/adhesión de células endoteliales
SEQ ID NO 4	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO 11	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGGKLTWQELYQLKYKGI-CONH <sub>2</sub>	Péptido de imitación de VEGF/Se une a receptores de VEGF
SEQ ID NO 6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRIKA-CONH <sub>2</sub>	Dominio de unión a heparina
SEQ ID NO 1	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO 12	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea

25 Las soluciones de péptido mostradas en la Tabla 19 se cargaron en los insertos de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore) y se formaron los genes usando medio de cultivo celular (EGM-2-MV, Cambrex). Como matrices de control, se usaron colágeno-1 y Matrigel. Se sembraron HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) a razón de  $8 \times 10^4$  células en los insertos y se cultivaron durante hasta 7 días.

**Tabla 19. Componentes del hidrogel**

<b>Código</b>	<b>Contenido del hidrogel</b>
RAD	Solución de péptido RAD16-1 al 1 %
LKKmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 9 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
REDmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 10 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
PRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 4 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
KLTmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 11 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
FHR	Solución de péptido de SEQ ID NO: 6 al 1 %
FHRmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 6 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
PFS	Solución de péptido de SEQ ID NO: 1 al 1 %
PFSmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 1 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
SKPmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 12 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas 1 % RAD16-I:1
COL	Gel de colágeno-1 (0,25 %)
MTG	Matrigel

Las Figuras 24A-24M muestran las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de HUVEC cultivadas en los hidrogeles durante dos días. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. El gel de colágeno, Matrigel, PRGmx, KLTmx, FHRmx, PFSmx tenía una mayor unión celular en comparación con RAD. En Matrigel, las células HUVEC mostraron una estructura capilar, lo que se considera que está relacionado con la capacidad de formación de vasos. En KLTmx, las células mostraron una estructura capilar que se asemeja a Matrigel.

Los resultados se resumen en la Tabla 20 y la Figura 25. Se evaluó la cantidad ADN en el pocillo tras tres días de cultivo se evaluó en los hidrogeles seleccionados de la Tabla 19. La cantidad de ADN es proporcional al número de células. La Figura 25 indica que el gel de colágeno, PRGmx y KLTmx tuvo cantidades de ADN estadísticamente mayores en comparación con RAD. Estos resultados demostraron que las matrices de péptido funcionalizado tienen una mayor unión a células endoteliales en comparación con la matriz de péptido no funcionalizado y tienen una función similar en la morfología celular comparable a la matriz de origen natural, tal como colágeno o Matrigel, dependiendo del motivo funcional unido a la secuencia autoensamblante original.

**Tabla 20. Unión celular y morfología**

<b>Código</b>	<b>Unión celular</b>	<b>Morfología de tipo capilar</b>
RAD	+	
LKKmx	+	
REDmx	+	
PRGmx	++++	
KLTmx	+++	+++
FHR	++	+

(continuación)

Tabla 20. Unión celular y morfología		
Código	Unión celular	Morfología de tipo capilar
FHRmx	+++	
PFS	++	+
PFSmx	++++	
SKPmx	++	++
COL	++++	
MTG	+++	++++
Clave: (a) Unión celular [+ : Débil (<20 %); ++: 20-50 %; +++: 50-70 %; ++++: próxima a la confluencia (>70 %)]; (b) Morfología de tipo capilar [+ muestra el número de características observadas: ramificación, elongación de la célula, alineamiento de células circulares (débil: +; media: ++; fuerte: +++; muy fuerte: ++++)].		

Se evaluó el efecto de la migración de células endoteliales en los hidrogeles. La migración de células endoteliales es importante cuando el vaso ha crecido en el interior de la matriz. Se sembraron HUVECV (células endoteliales de vena umbilical humana) sobre colágeno y perlas recubiertas de dextrano (Cytodex3, perlas microtransportadoras, Sigma), después, se transfirieron a diferentes hidrogeles que se seleccionaron de la Tabla 19.

5 Las Figuras 26A-26F muestran la imagen de microscopía de fluorescencia de perlas en la matriz de péptido en el día 1 y el día 2 después de colocar las perlas. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. La barra de color blanco representa 100  $\mu$ m. En el día 1, la mayoría de las células permanecieron en las perlas. En el día 2, las células habían migrado bien de las perlas al gel de colágeno, PRGmx y KLTmx en comparación con RAD. En Matrigel, solo una pequeña cantidad de las células migraron al hidrogel.

10 La Figura 27 muestra el número de células que migró de las perlas en el día 2. Las células se cuentan en una imagen de microscopía de fluorescencia. Las observaciones anteriores también se confirmaron en la gráfica.

15 Se llevó a cabo el cultivo de células endoteliales en 3D en las matrices de péptido funcionalizado. Las células HUVEC se suspendieron en solución de sacarosa al 10 % y se mezclaron con solución de péptido. Las soluciones de péptido con células suspendidas se transfirieron a los insertos de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore) y los geles se formaron inmediatamente usando medio de cultivo celular (EGM-2-MV, Camblex). El número de células sembradas en el pocillo fue de  $1 \times 10^5$  células/pocillo. La Figura 28 muestra la imagen de microscopía confocal de fluorescencia reconstruida del día 2 desde la siembra. El color verde muestra células vivas usando tinción de calceína, el color rojo muestra núcleos de células muertas. Estas imágenes muestran una elevada viabilidad celular en los hidrogeles. PRGmx y KLTmx muestran una morfología celular extendida, que implica una buena unión celular.

20 Se añadió VEGF (20 ng/ml) al medio de cultivo celular y las células se cultivaron durante 7 días. La estructura capilar en 3 dimensiones se observó en PRGmx usando microscopía confocal de fluorescencia. Las Figuras 29A-29B muestran la imagen reconstruida. La tinción verde muestra los núcleos, la tinción roja muestra fibras de actina. La Figura 29A muestra la cavidad capilar (flechas). La Figura 29B muestra la sección transversal en la línea de puntos en la figura 29A. También se muestra la cavidad capilar en la imagen en sección transversal (círculo punteado).

25 Se llevó a cabo un estudio de angiogénesis *in vivo* usando un ensayo de membrana corioalantóica (CAM). En el día 8 de incubación del huevo fertilizado, se transfirieron hidrogeles de 10 mm de diámetro con un espesor de 1 mm a membrana corioalantóica de pollo. Los hidrogeles se seleccionaron de la Tabla 19 y los geles se formaron antes de la transferencia. En el día 12, se recogieron las CAM para histología. La angiogénesis dentro y por debajo del hidrogel se evaluaron mediante sección histológica transversal.

30 Las Figuras 30A-30G muestran imágenes histológicas de la membrana corioalantóica (CAM) incubada con diferentes hidrogeles. RAD (Figuras 30A-B), PRGmx (Figura 30E) y colágeno (Figura 30F) no muestran angiogénesis tanto dentro como fuera del hidrogel. Por otra parte, KLTmx (Figuras 30C-D) y Matrigel (Figura 30G) muestran angiogénesis con crecimiento del tejido conectivo dentro del gel (flechas negras). KLTmx también muestra angiogénesis en el borde del gel y la membrana corioalantóica (flechas negras).

#### Ejemplo 7. Péptidos funcionales basados en diversas secuencias autoensamblantes

En los ejemplos anteriores, se usó RAD16-1 ((RADA)<sub>4</sub>) como bloque de construcción básico de autoensamblaje. Al cambiar la secuencia autoensamblante básica, pueden controlarse las propiedades del hidrogel. (IEIK)<sub>2</sub> es una

secuencia corta que consiste en 8 restos, pero forma geles más rígidos en comparación con (RADA)<sub>4</sub> ya que usa isoleucina (I) como componentes de aminoácido hidrófilo que son menos flexibles que la alanina (A). Pueden obtenerse geles más rígidos haciendo que la secuencia repetitiva autoensamblante sea más larga, tal como (IEIK)<sub>3</sub>, (IEIK)<sub>4</sub> y similares.

- 5 (FKFQ)<sub>3</sub> está cargado positivamente en el intervalo de pH neutro y FKF permanece en solución en el intervalo de pH neutro, como se ha descrito anteriormente.

10 Se sintetizaron péptidos funcionales basados en (IEIK)<sub>2</sub> y (FKFQ)<sub>3</sub> como se muestra en la Tabla 21. Los hidrogeles formados por los péptidos en la Tabla 22 se muestran en la Tabla 22. Se proporcionan soluciones de péptido funcionalizado o de una mezcla de péptidos funcionalizados con secuencia repetitiva básica (SEQ ID NO. 54 o SEQ ID NO. 55).

N.º	Secuencia	Descripción
SEQ ID NO. 52	Ac-IEIKIEIKI-CONH <sub>2</sub>	Secuencia autoensamblante neutra
SEQ ID NO.13	Ac-IEIKIEIKIGGPRGSYRGDS-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.14	Ac-IEIKIEIKIGGPFSSTKT-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.15	Ac-IEIKIEIKIGGSKPPGTS-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO. 51	Ac(FKFQ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	Secuencia autoensamblante cargada
SEQ ID NO.16	Ac-FKFQFKFQFKFQGGPRGDSYRGDS-CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.17	Ac-FKFQFKFQFKFQGGFHRRIKA-CONH <sub>2</sub>	Dominio de unión a heparina

Código	Contenido del hidrogel
EIK	Solución de péptido de SEQ ID NO: 55 al 1 %
EPRG	Solución de péptido de SEQ ID NO: 13 al 1 %
EPRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 13 al 1 % y EIK, mezcladas a 1:1
EPFS	Solución de péptido de SEQ ID NO: 14 al 2 %
EPFSmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 14 al 1 % y EIK, mezcladas a 1:1
ESKP	Solución de péptido de SEQ ID NO: 15 al 2 %
ESKPmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 15 al 1 % y EIK, mezcladas a 1:1
FKF	Solución de péptido de SEQ ID NO: 54 al 1 %
KPRG	Solución de péptido de SEQ ID NO: 16 al 1 %
KPRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 16 al 1 % y FKF, mezcladas a 1:1
KFHRmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 17 al 1 % y FKF, mezcladas a 1:1

15 Todas las soluciones a base de (FKFQ)<sub>3</sub> (FKF, KPRG, KPRGmx y KFHRmx) permanecen en solución a un intervalo de pH neutro y hasta pH 8. Esta propiedad es útil cuando se incorporan células, material básico, como fosfato tricálcico y/o reactivos sensibles a ácidos (tales como proteínas y/o factores de crecimiento) en hidrogeles de péptido autoensamblante.

Se evaluaron la unión celular y la viabilidad de los hidrogeles usando HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana). Las soluciones de péptido mostradas en la Tabla 22 se cargaron en los insertos de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore) y se formaron los genes usando medio de cultivo celular (EGM-2-MV, Camblex). Las HUVEC se sembraron a razón de 8x10<sup>4</sup> células en los insertos y se cultivaron durante tres días.

5 Las Figuras 31A-31K muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia de HUVEC. La tinción verde muestra los núcleos de las células, la tinción roja muestra fibras de actina. Los hidrogeles que contienen secuencias de unión RGD tienen una mayor unión celular, en comparación con el hidrogel de péptido autoensamblante básico (EIK y FKF). Los resultados se resumen en la Tabla 23. Estos resultados se asemejan a los de la Tabla 20, Ejemplo 5. Esto implica que la funcionalización del péptido autoensamblante es útil independientemente de la secuencia repetitiva básica, aunque pueden controlarse las propiedades del hidrogel alterando la secuencia repetitiva básica en aminoácidos y longitud.

<b>Código</b>	<b>Unión celular</b>
EIK	++
EPRG	++++
EPRGmx	+++
EPFS	+
EPFSmx	++
ESKP	+
ESKPmx	+
FKF	++
KPRG	++++
KPRGmx	+++
KFHRmx	+++
Clave: <u>Unión celular</u> [+Débil(<20 %); ++: 20-50 %; +++: 50-70 %; ++++: próxima a la confluencia (>70 %)]	

**Ejemplo 8. Matriz de péptidos funcionalizados para soportar células madre**

10 Recientemente, muchas células madre, especialmente células madre mesenquimales, tales como células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSC) y células madre procedentes de tejido adiposo (ADSC) se evaluaron clínicamente con fines terapéuticos. Es importante, en las terapias basadas en células, mantener la viabilidad celular hasta que las células implantadas están soportadas por el microambiente circundante. Las células madre requieren no solo mantener la viabilidad celular, sino también mantener el estado celular. Por ejemplo, en la regeneración ortopédica, tal como la regeneración de hueso o cartílago, es importante mantener la capacidad de diferenciación para formar un tipo celular específico o para dirigirla a un linaje de diferenciación específico. En cambio, para la enfermedad isquémica, tal como el infarto de miocardio, la enfermedad vascular periférica y el infarto cerebral, es importante mantener el carácter de célula madre para conservar la capacidad de secretar factores de crecimiento de citocinas útiles como antiapoptóticos o contra la angiogénesis a la hora de soportar las células de tejido dañado.

20 A fin de mantener la viabilidad de las células madre, la capacidad de diferenciación o el carácter de célula madre, es importante proporcionar un microambiente temporal para soportar a las células madre. Las matrices de péptido autoensamblante funcionalizado son útiles cuando se inyectan en la región dañada en combinación con células madre. Los motivos de adhesión a células RGD, el dominio de unión a heparina y los motivos de alojamiento en médula ósea ya han demostrado la capacidad para mantener la viabilidad celular en varios tipos celulares, incluyendo osteoblastos y células endoteliales y pueden usarse para mantener las células madre. La laminina es el componente principal de la membrana basal y se considera que es importante para el mantenimiento de células madre. IKVAV (incluida en la SEQ20) e IKLLS (incluida en la SEQ21) se conocen como las secuencias de adhesión celular de la laminina. Se usan para preservar la viabilidad, reducir la apoptosis y reducir la secreción de insulina en las células beta encapsuladas (Laney y col., Biomaterials (2007) 28:3004-3011).

30 Se cultivaron células madre procedentes de tejido adiposo (ADSC) en 3 dimensiones en las matrices de péptido funcionalizado (Tabla 24) y se evaluó la capacidad de mantenimiento celular de las matrices de péptido autoensamblante. Las ADSC se suspendieron en solución de sacarosa al 10 % y se mezclaron con una solución de péptido seleccionada de la Tabla 25. Las soluciones de péptido con células suspendidas se transfirieron a los insertos de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore) y los geles se formaron inmediatamente usando medio de cultivo celular. El número de células sembradas en el pocillo fue de  $4 \times 10^4$  células/pocillo.

**Tabla 24. Matriz de péptidos funcionalizados para soportar células madre**

N.º	Secuencia	Descripción
RAD16-I	Ac(RADA) <sub>4</sub> -CONH <sub>2</sub>	
SEQ ID NO. 4	Ac(RADA) <sub>4</sub> GPRGDSGYRGDS CONH <sub>2</sub>	Secuencia de unión a RGD repetitiva
SEQ ID NO.6	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGFHRRIKA CONH <sub>2</sub>	Dominio de unión a heparina
SEQ ID NO.1	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGPFSSTKT CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.12	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSKPPGTSS CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.18	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSTFTKSP-CONH <sub>2</sub>	Alojamiento en médula ósea
SEQ ID NO.19	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSIKVAVS-CONH <sub>2</sub>	Laminina (proteína receptora de laminina de 110 kDa)
SEQ ID NO.20	Ac(RADA) <sub>4</sub> GGSEIKLLIS-CONH <sub>2</sub>	Laminina (α3β1 y heparina de la superficie celular)

**Tabla 25. Componentes del hidrogel**

Código	Contenido del hidrogel
RAD	Solución de péptido RAD16-1 al 1 %
PRGmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 4 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
FHR	Solución de péptido de SEQ ID NO: 6 al 1 %
FHRmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 6 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
PFS	Solución de péptido de SEQ ID NO: 1 al 1 %
PFSmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 1 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
SKPmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 12 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
STF	Solución de péptido de SEQ ID NO: 18 al 1 %
STFmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 18 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
SIK	Solución de péptido de SEQ ID NO: 19 al 1 %
SIKmx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 19 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1
SEI	Solución de péptido de SEQ ID NO: 20 al 1 %
SEImx	Solución de péptido de SEQ ID NO: 20 al 1 % y solución de péptido RAD16-I al 1 %, mezcladas a 1:1

Las soluciones de péptido mostradas en la Tabla 25 se cargaron en los insertos de cultivo (10 mm de diámetro, Millicell-CM, Millipore) y se formaron los genes usando medio de cultivo celular (DMEM-F12+FBS al 10%, Camblex). Las ADSC se sembraron a razón de  $4 \times 10^4$  células en los insertos y se cultivaron durante hasta 7 días.

- 5 Las figuras 32A-32E muestran la vista enfocada extendida reconstruida de la imagen de microscopía confocal de fluorescencia tras 7 días de cultivo. La parte superior muestra la vista vertical, la parte inferior muestra la vista horizontal correspondiente. El color verde muestra los núcleos celulares, el color rojo muestra las fibras de actina en la célula. Aunque las células se sembraron sobre la superficie de la matriz, las células migraron bien al interior de la



ES 2 709 125 T3

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Phe Leu Gly Phe Pro Thr  
20

- <210> 3
- <211> 30
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de crecimiento osteogénico
- <400> 3

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe  
20 25 30

- 10 <210> 4
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Secuencia de unión a RGD repetitiva
- <400> 4

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser  
20 25

- 20 <210> 5
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Dom. de adhesión a células (Osteopontina)
- <400> 5

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Ala Tyr Gly  
25 20 25

- <210> 6
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>

ES 2 709 125 T3

<223> Dominio de unión a heparina

<400> 6

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Phe His Arg Arg Ile Lys Ala

20

25

5 <210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

10 <400> 7

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser Gly  
20 25

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión a RGF con 4 glicinas enlazadoras

<400> 8

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Arg Gly Asp Ser Cys Asn His  
20 25

20 <210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de unión a RGF con 4 glicinas enlazadoras

<400> 9

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Ser Cys Asn His  
20 25

ES 2 709 125 T3

- <210> 10  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
<223> Fibronectina/adhesión de células endoteliales
- <400> 10
- Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15
- Gly Gly Gly Gly Arg Glu Asp Val  
20
- 10 <210> 11  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Péptido de imitación de VEGF/Se une a receptores de VEGF
- 15 <400> 11
- Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15
- Gly Gly Gly Gly Lys Leu Thr Trp Gln Glu Leu Tyr Gln Leu Lys Tyr  
20 25 30
- Lys Gly Ile  
35
- <210> 12  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> Alojamiento en médula ósea
- <400> 12
- Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15
- Gly Gly Ser Lys Pro Pro Gly Thr Ser Ser  
20 25
- 25 <210> 13  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva
- 30 <400> 13

ES 2 709 125 T3

Ala Cys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Gly Gly Pro Arg Gly

1 5 10 15

Ser Tyr Arg Gly Asp Ser  
20

5 <210> 14  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Alojamiento en médula ósea  
  
<400> 14

Ala Cys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Gly Gly Pro Phe Ser  
1 5 10 15

Ser Thr Lys Thr  
20

10 <210> 15  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
15 <223> Alojamiento en médula ósea  
  
<400> 15

Ala Cys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Gly Gly Ser Lys Pro  
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser  
20

20 <210> 16  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva  
  
<400> 16

Ala Cys Phe Lys Phe Gln Phe Lys Phe Gln Phe Lys Phe Gln Gly Pro  
1 5 10 15

25 Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser  
20 25

<210> 17  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 709 125 T3

<220>

<223> Dominio de unión a heparina

<400> 17

Ala Cys Phe Lys Phe Gln Phe Lys Phe Gln Phe Lys Phe Gln Gly Gly  
1 5 10 15

Phe His Arg Arg Ile Lys Ala  
20

5

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Alojamiento en médula ósea

<400> 18

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Thr Phe Thr Lys Ser Pro  
20 25

15

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Laminina (proteína receptora de laminina de 110 kDa)

<400> 19

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

20

Gly Gly Ser Ile Lys Val Ala Val Ser  
20 25

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Laminina (a3b1 y heparina de la superficie celular)

<400> 20

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Ile Lys Leu Leu Ile Ser  
20 25

ES 2 709 125 T3

<210> 21  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 21

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5 10 15

<210> 22  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 22

Arg Ala Asp Ala Arg Gly Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Gly Asp Ala  
1 5 10 15

<210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 23

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala  
1 5

<210> 24  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 24

Arg Ala Arg Ala Asp Ala Asp Ala Arg Ala Arg Ala Asp Ala Asp Ala  
1 5 10 15

<210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 25

Arg Ala Arg Ala Asp Ala Asp Ala  
1 5

40

ES 2 709 125 T3

<210> 26  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 26

Ala Glu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Ala Glu Ala Lys  
 1 5 10 15

10

<210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

15

<400> 27

Ala Glu Ala Lys Ala Glu Ala Lys  
 1 5

20

<210> 28  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 28

Arg Ala Glu Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Glu Ala  
 1 5 10 15

25

<210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

30

<400> 29

Arg Ala Glu Ala Arg Ala Glu Ala  
 1 5

35

<210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 30

Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asp Ala  
 1 5 10 15

40

ES 2 709 125 T3

<210> 31  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 31  
  

Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asp Ala  
 1 5

  
 10 <210> 32  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 15 <400> 32  
  

Ala Glu Ala Glu Ala His Ala His Ala Glu Ala Glu Ala His Ala His  
 1 5 10 15

  
 20 <210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 33  
  

Ala Glu Ala Glu Ala His Ala His  
 1 5

  
 25 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 34  
  

Phe Glu Phe Glu Phe Lys Phe Lys Phe Glu Phe Glu Phe Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

  
 35 <210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 35

ES 2 709 125 T3

Phe Glu Phe Lys Phe Glu Phe Lys  
1 5

5 <210> 36  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 36

Leu Glu Leu Glu Leu Lys Leu Lys Leu Glu Leu Glu Leu Lys Leu Lys  
1 5 10 15

10 <210> 37  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 37

Leu Glu Leu Glu Leu Lys Leu Lys  
1 5

20 <210> 38  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 38

Ala Glu Ala Glu Ala Lys Ala Lys Ala Glu Ala Glu Ala Lys Ala Lys  
1 5 10 15

25 <210> 39  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 39

Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Lys Ala Lys  
1 5 10

35 <210> 40  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

40 <400> 40

ES 2 709 125 T3

Ala Glu Ala Glu Ala Lys Ala Lys  
1 5

5 <210> 41  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 41

Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala  
1 5 10 15

10 <210> 42  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 42

Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys  
1 5 10 15

20 <210> 43  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 43

Arg Ala Arg Ala Arg Ala Arg Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala  
1 5 10 15

25 <210> 44  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 44

Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala Arg Ala Arg Ala Arg Ala Arg  
1 5 10 15

35 <210> 45  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

40 <400> 45

ES 2 709 125 T3

Asp Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala Arg Ala Arg Ala Arg Ala Arg Ala  
 1 5 10 15

5 <210> 46  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 46

Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala Asp Ala Arg Ala Arg Ala Arg Ala Arg  
 1 5 10 15

10 <210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 47

His Glu His Glu His Lys His Lys His Glu His Glu His Lys His Lys  
 1 5 10 15

20 <210> 48  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 48

His Glu His Glu His Lys His Lys  
 1 5

25 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
 <400> 49

Val Glu  
 1 5 10 15

Val Glu Val Glu  
 20

35 <210> 50  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 709 125 T3

<220>

<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 50

Phe Arg  
1 5 10 15

Phe Arg Phe Arg  
20

5

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 51

Phe Lys Phe Gln Phe Lys Phe Gln Phe Lys Phe Gln  
1 5 10

<210> 52

<211> 8

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 52

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys  
1 5

20

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 53

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu  
1 5 10

30

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

35

<400> 54

Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp  
1 5 10

<210> 55

ES 2 709 125 T3

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Dominio de adhesión celular (Osteopontina)  
 <400> 55

Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Ala Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido de crecimiento osteogénico  
 <400> 56

Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe  
 1 5 10

15 <210> 57  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Alojamiento en médula ósea  
 <400> 57

Pro Phe Ser Ser Thr Lys Thr  
 1 5

<210> 58  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> MP-1 (purificación de médula ósea)  
 30 <400> 58

Phe Leu Gly Phe Pro Thr  
 1 5

<210> 59  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido de imitación de VEGF/Se une a de VEGF  
 <400> 59

Lys Leu Thr Trp Gln Glu Leu Tyr Gln Leu Lys Tyr Lys Gly Ile  
 1 5 10 15

ES 2 709 125 T3

<210> 60  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Alojamiento en médula ósea  
 <400> 60  
  

Ser Lys Pro Pro Gly Thr Ser Ser  
1 5

  
 <210> 61  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Alojamiento en médula ósea  
 <400> 61  
  

Ser Thr Phe Thr Lys Ser Pro  
1 5

  
 <210> 62  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Laminina (proteína receptora de laminina de 110 kDa)  
 <400> 62  
  

Ile Lys Val Ala Val  
1 5

  
 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Dominio de unión a heparina  
 <400> 63  
  

Phe His Arg Arg Ile Lys Ala  
1 5

  
 <210> 64  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Laminina (α3β1 y heparina de la superficie celular)  
 <400> 64

ES 2 709 125 T3

Ile Lys Leu Leu Ile  
1 5

5 <210> 65  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Fibronectina/adhesión de células endoteliales  
<400> 65

Arg Glu Asp Val  
1

10 <210> 66  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> sitio de unión a actina en timosina beta-4  
<400> 66

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln  
1 5

20 <210> 67  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada  
<400> 67

Arg Ala Asp Ala  
1

25 <210> 68  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Alojamiento en médula ósea  
<400> 68

Ile Glu Ile Lys  
1

35 <210> 69  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

ES 2 709 125 T3

<400> 69

**Phe Lys Phe Gln**  
1

5 <210> 70  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Laminina (a3b1 y heparina de la superficie celular)

<400> 70

10 **Ser Glu Ile Lys Leu Leu Ile Ser**  
1 5

<210> 71  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

<400> 71

**Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser**  
1 5 10

20 <210> 72  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

25 <400> 72

**Pro Arg Gly Asp Ser**  
1 5

30 <210> 73  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

<400> 73

**Tyr Arg Gly Asp Ser**  
1 5

35 <210> 74  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

ES 2 709 125 T3

<400> 74

Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly  
1 5 10

<210> 75

<211> 5

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

<400> 75

Ile Lys Leu Leu Ser  
1 5

10

<210> 76

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Procedente de péptido autoensamblante - secuencia inventada

<400> 76

Lys Leu Asp Leu  
1

20

<210> 77

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

25

<400> 77

Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Gly  
1 5 10 15

Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser  
20 25

30

<210> 78

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva

<400> 78

ES 2 709 125 T3

Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Gly Pro Arg Gly Asp  
1 5 10 15

Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser  
20

5 <210> 79  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva  
<400> 79

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Gly Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr  
1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser  
20

10 <210> 80  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Alojamiento en médula ósea  
<400> 80

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys  
1 5 10

20 <210> 81  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Alojamiento en médula ósea  
<400> 81

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys  
1 5 10 15

25 <210> 82  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia de unión a RGD repetitiva  
<400> 82

Pro Arg Gly Asp Ser Gly Tyr Arg Gly Asp Ser Gly  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto, en la que la composición se administra como relleno para defectos en un defecto óseo dentro del organismo del sujeto, comprendiendo la composición un péptido autoensamblante modificado, comprendiendo el péptido:
- 5 un primer dominio de aminoácidos que comprende la secuencia RADARADARADARADA (SEQ ID NO. 21); y un segundo dominio de aminoácidos que no se autoensambla en forma aislada, en el que el segundo dominio de aminoácidos comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
- DGRGDSVAYG (SEQ ID NO. 55);  
 10 ALKRQGRTLYGF (SEQ ID NO. 56); y  
 FHRIKA (SEQ ID NO. 63),
- en el que el segundo dominio de aminoácidos está unido mediante un enlazador al extremo C-terminal del primer dominio de aminoácidos,  
 en el que la distancia entre el último aminoácido del primer dominio de aminoácidos y el primer aminoácido de la secuencia mínima biológicamente activa en el segundo dominio de aminoácidos es al menos un 2-mero o al  
 15 menos un 4-mero y  
 en el que el péptido se autoensambla para formar un relleno para defectos de hueso.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición se formula en forma de una solución, opcionalmente en la que la composición forma un gel o un hidrogel o en la que la composición forma una matriz.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un material sólido, opcionalmente en la que el material sólido comprende una sal inorgánica, opcionalmente, en la que la sal inorgánica comprende calcio y/o fosfato y/u opcionalmente en la que el material sólido tiene un diámetro de poro de entre 100-500 micrómetros.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la estructura macroscópica comprende nanofibras.
5. La composición para el uso de la reivindicación 1 que además comprende un agente de gelación.
- 25 6. La composición para el uso de la reivindicación 1, que además comprende un tercer dominio de aminoácidos o un compuesto terapéuticamente activo que potencia o promueve la diferenciación, desdiferenciación o transdiferenciación, tal como un factor de crecimiento, opcionalmente, una proteína morfogénica ósea (BMP) o un agente que potencia la reparación y regeneración de tejidos.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además células osteoblásticas o en la que la composición comprende una pluralidad de células y en la que las células comprenden células madre mesenquimales.
- 30 8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el primer dominio de aminoácidos y/o el segundo dominio de aminoácidos tiene entre 8 a 64 aminoácidos o entre 8 a 46 aminoácidos o entre 8 a 36 aminoácidos o entre 8 a 26 aminoácidos o entre 8 a 16 aminoácidos.
- 35 9. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la estructura macroscópica comprende fibras entrettejidas que tienen un diámetro de 10-20 nm.
10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para promover la regeneración ósea o tratar un defecto óseo y/o en la que el defecto óseo es un campo ortopédico dañado, una lesión ósea o una formación de hueso ectópica.
- 40 11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la composición está comprendida en un implante.
12. La composición para el uso de la reivindicación 11, en la que el implante comprende además un gel o un hidrogel y/o en la que el implante comprende además un material sólido, opcionalmente en la que el material sólido comprende una sal inorgánica, opcionalmente, en la que la sal inorgánica comprende calcio y/o fosfato y/u  
 45 opcionalmente en la que el material sólido tiene un diámetro de poro de entre 100-500 micrómetros.
13. La composición para el uso de la reivindicación 1, que además comprende una molécula biológica, preferentemente, un factor de crecimiento.
14. La composición para el uso de la reivindicación 11, en la que el segundo dominio de aminoácidos está unido mediante un enlazador, tal como glicina; y/o en la que dicho implante comprende un módulo de almacenamiento y un módulo de pérdida y/o en la que el módulo de almacenamiento es mayor o igual a 1,0 Pa o mayor o igual a 5 Pa y/o en la que el módulo de pérdida es menor de 0,5.
- 50

15. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para promover la regeneración ósea o tratar un defecto óseo y/o en la que el defecto óseo es un campo ortopédico dañado, una lesión ósea o una formación de hueso ectópica.

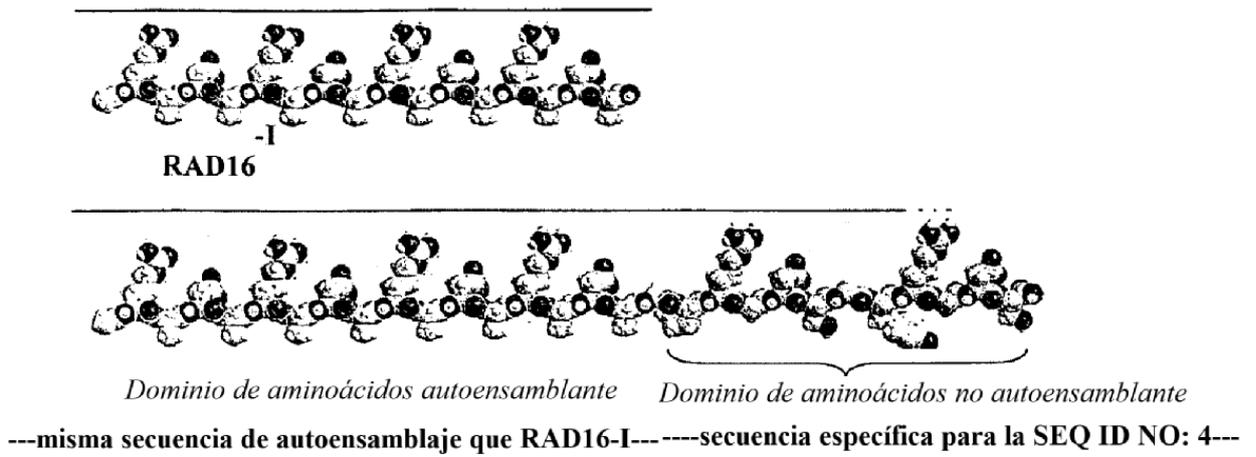


FIG. 1A

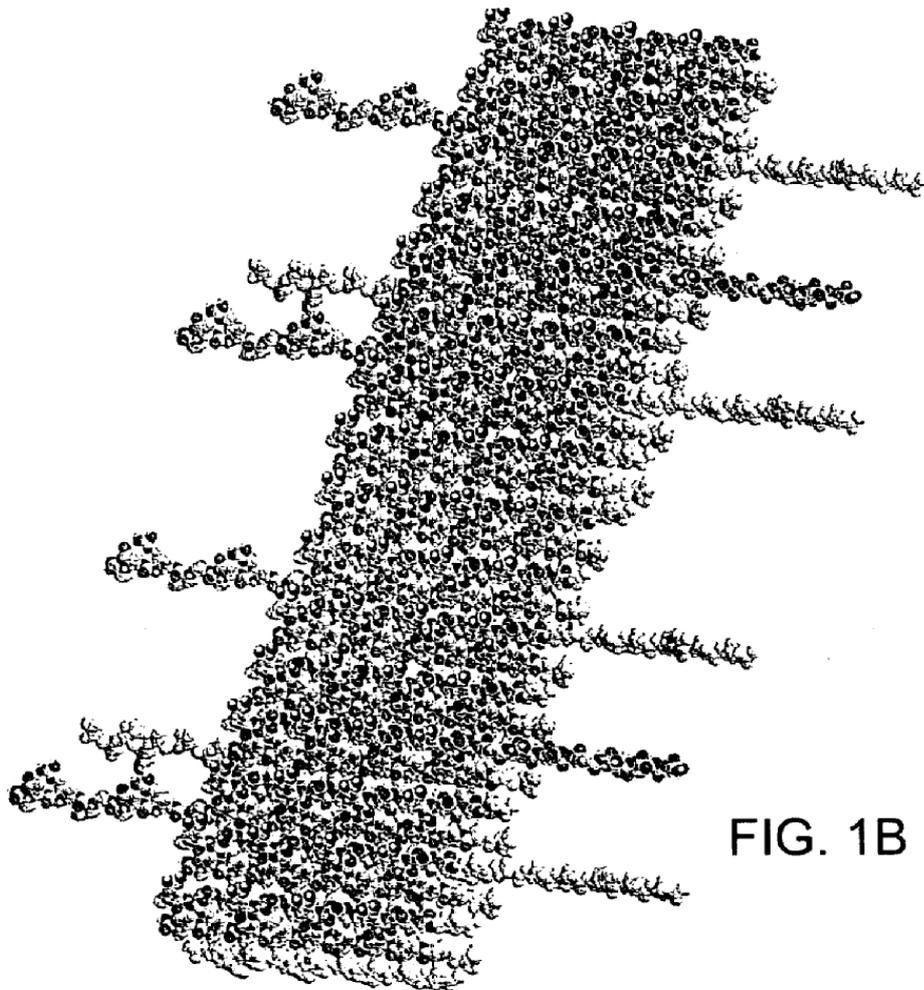


FIG. 1B

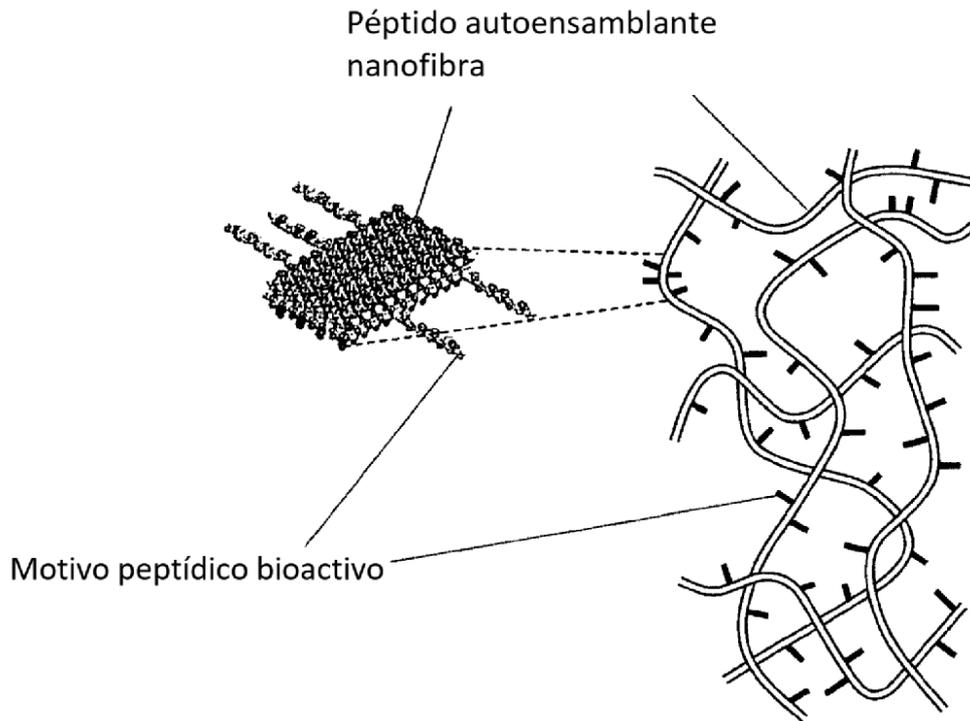


FIG. 1C

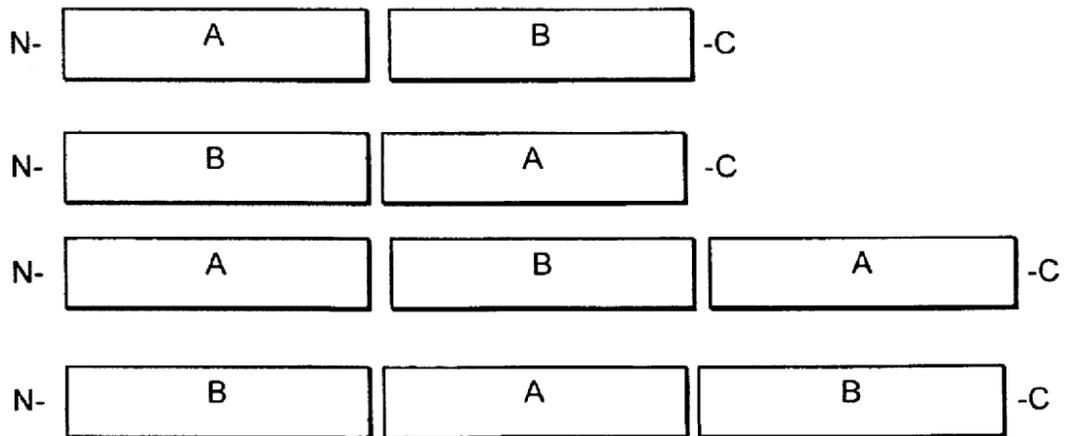


FIG. 1D

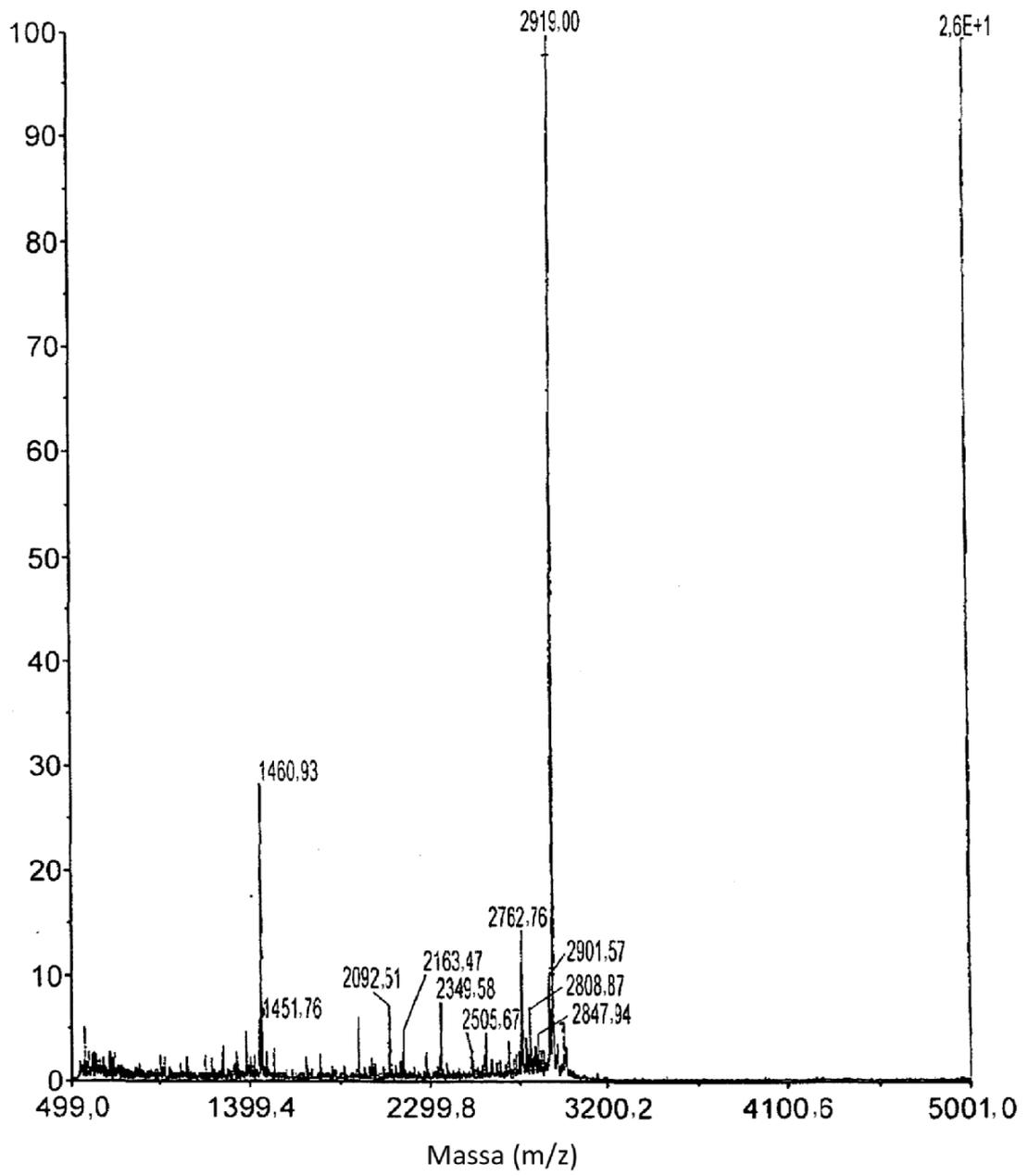


FIG. 2

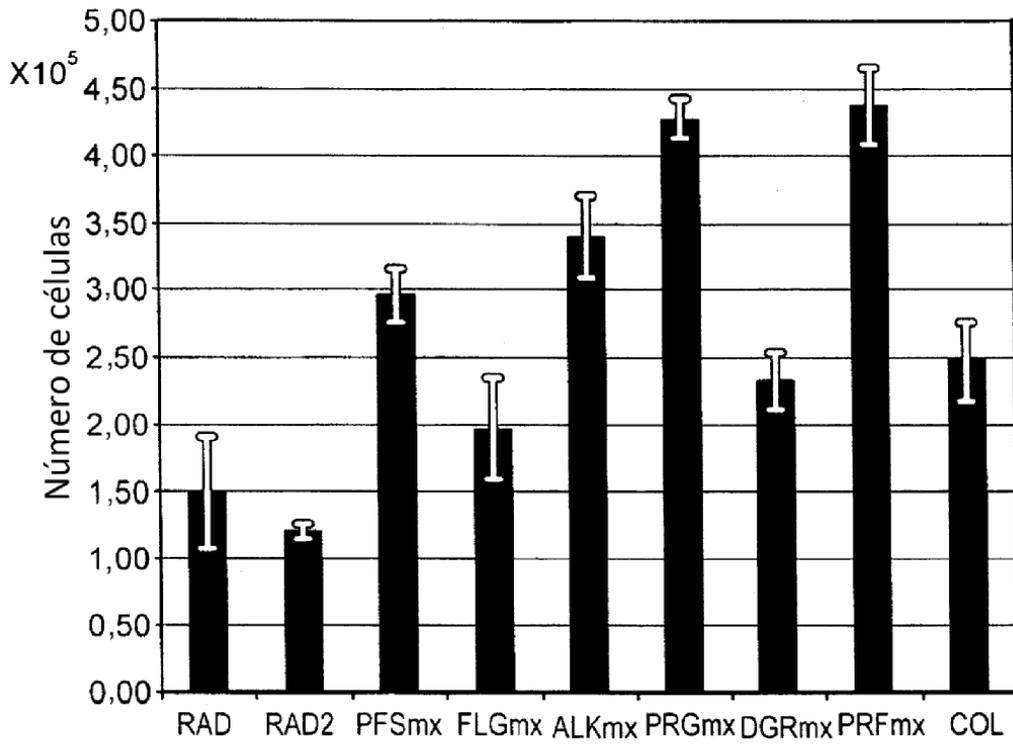


FIG. 3

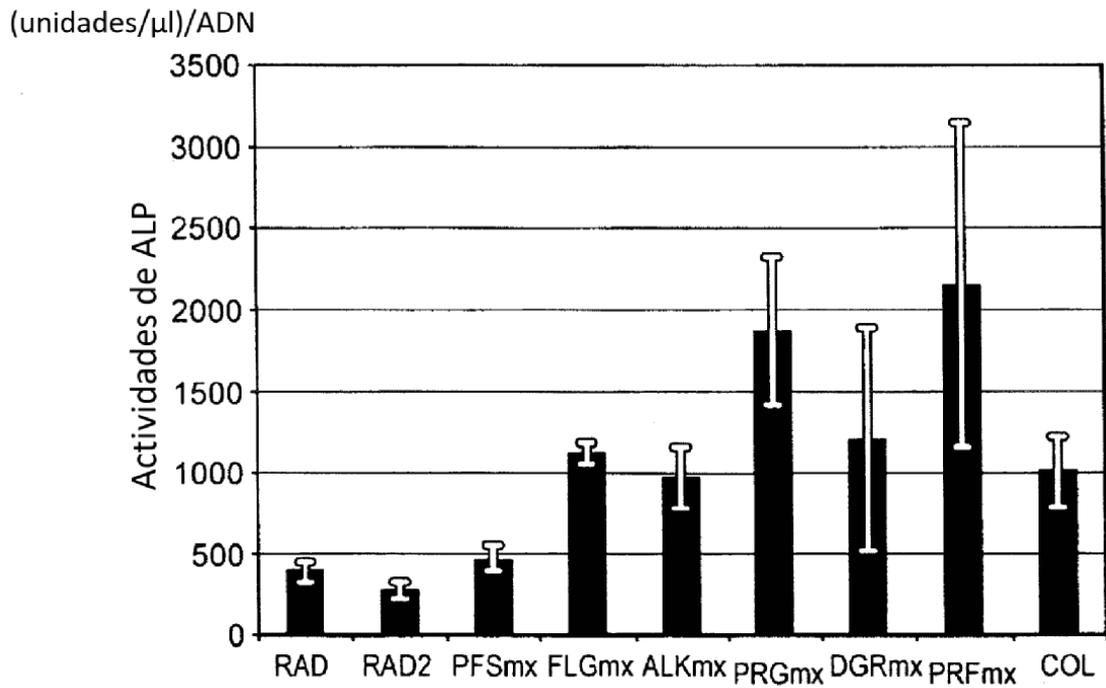
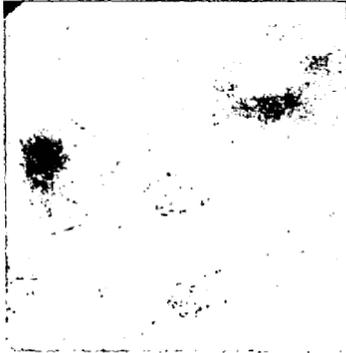
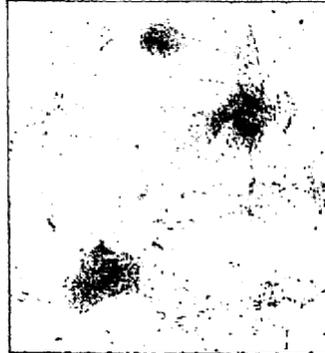


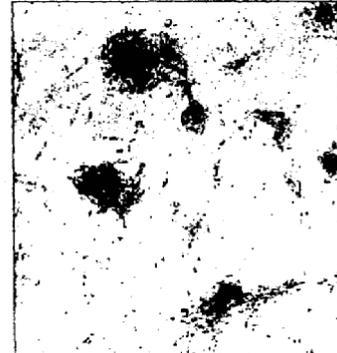
FIG. 4



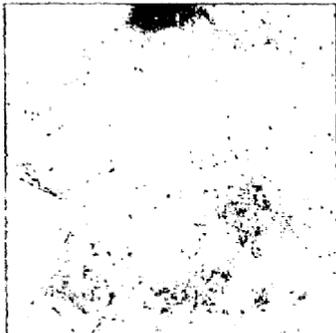
(A) RAD  
FIG. 5A



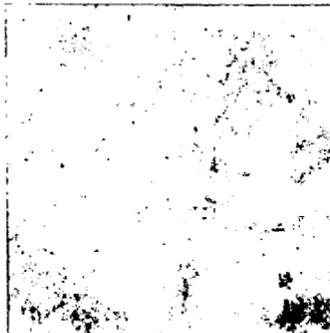
(B) RAD2  
FIG. 5B



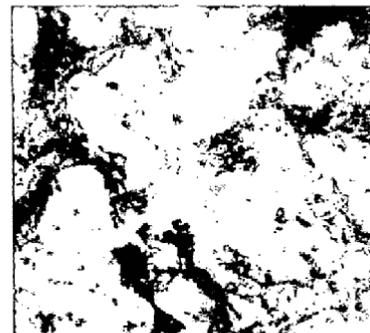
(C) PFSmx  
FIG. 5C



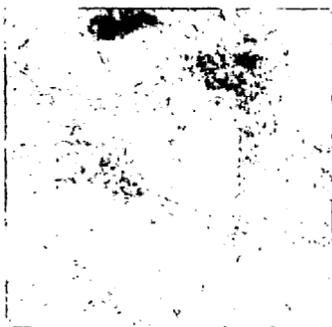
(D) FLGmx  
FIG. 5D



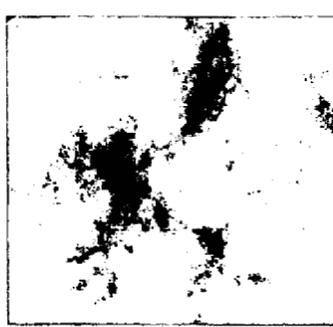
(E) ALKmx  
FIG. 5E



(F) PRGmx  
FIG. 5F



(G) DGRmx  
FIG. 5G



(H) PRFmx  
FIG. 5H



(I) COLmx  
Escala = 200 mm  
FIG. 5I

Osteocalcina (ng/ml)

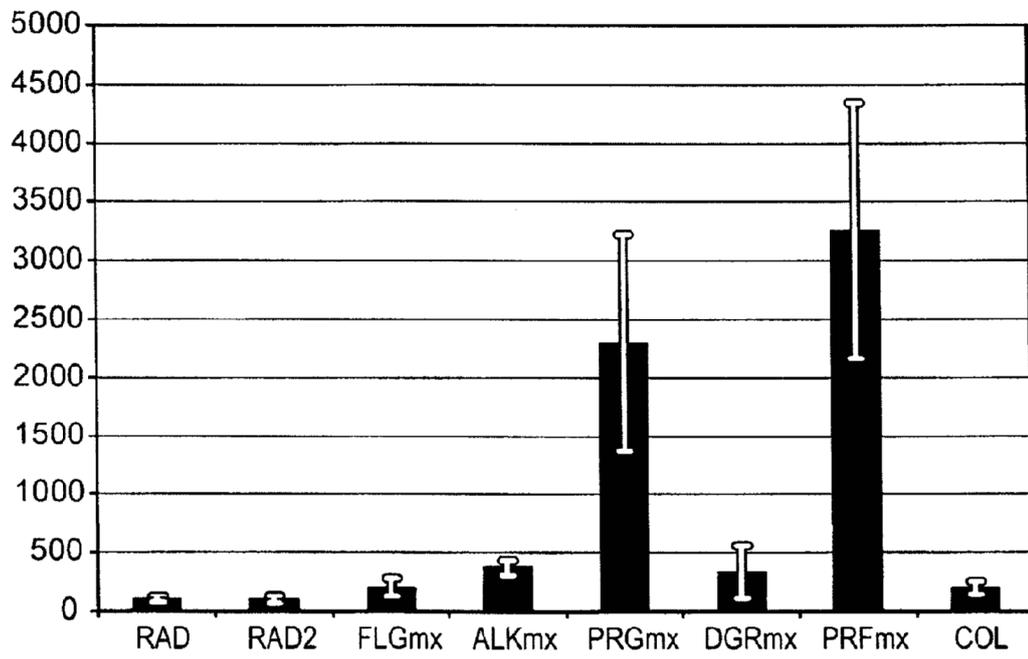


FIG. 6

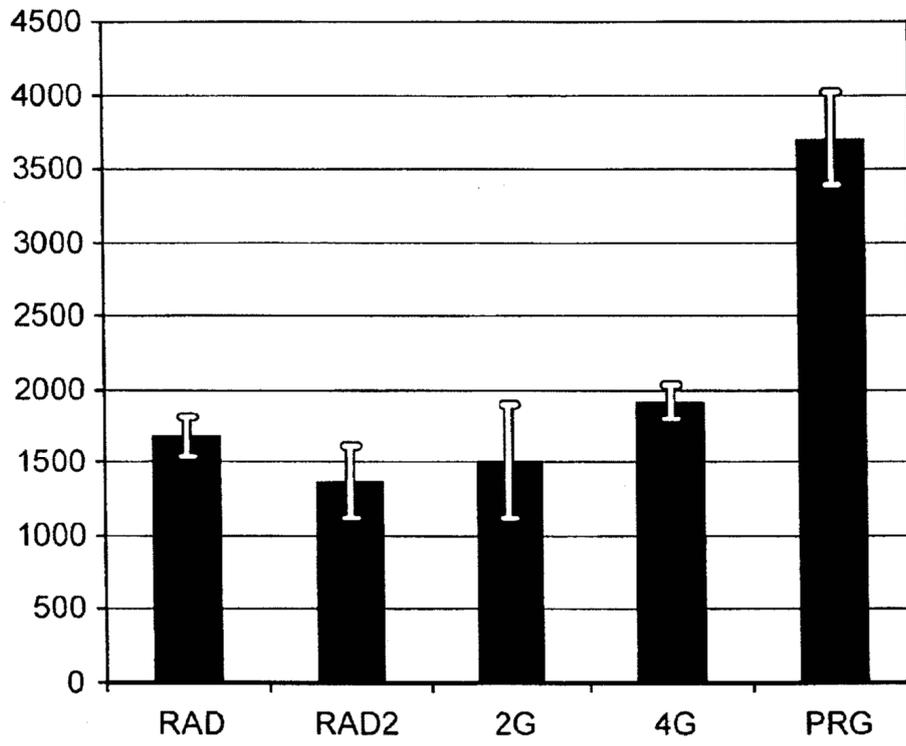


FIG. 7

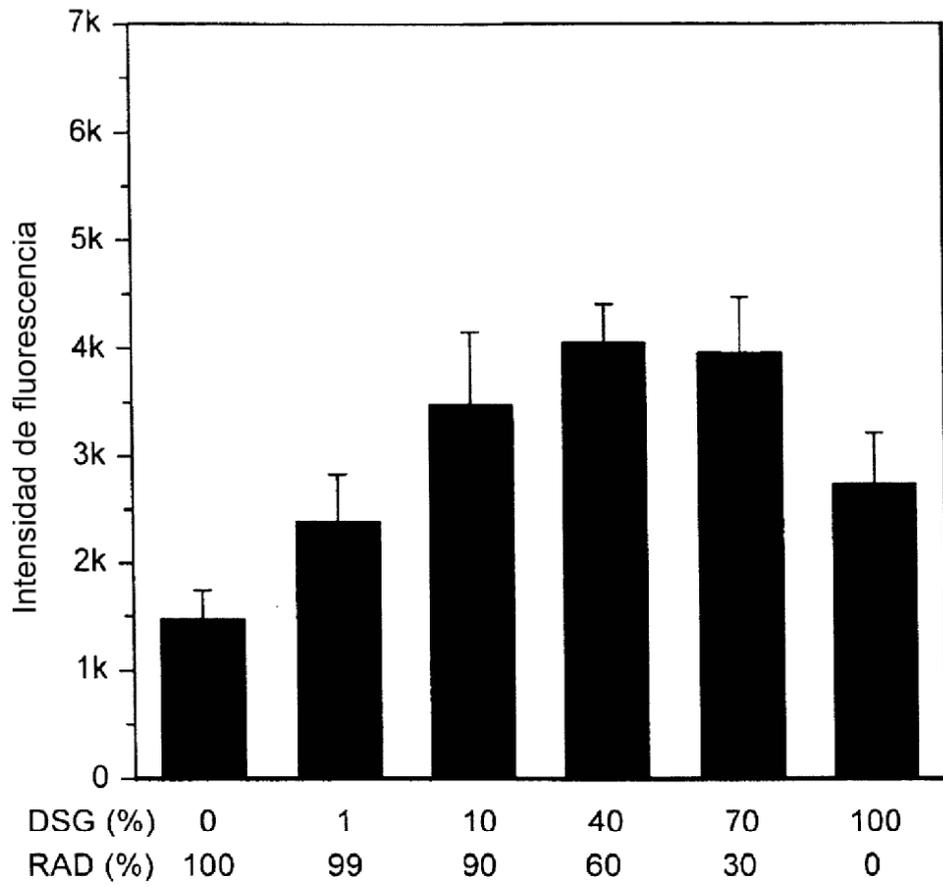


FIG. 8

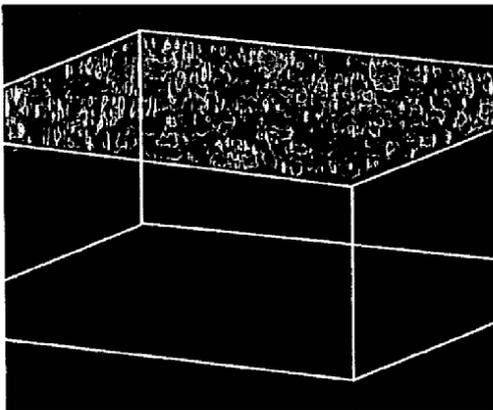
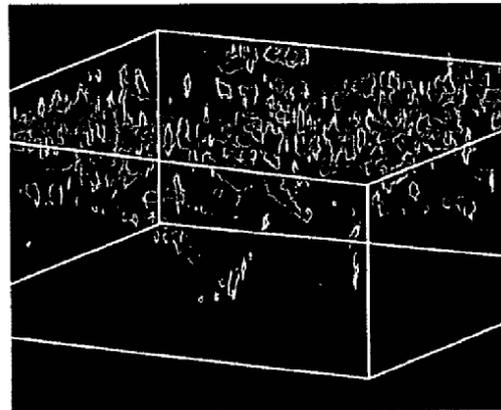


FIG. 9A



Escala = 100  $\mu$ m

FIG. 9B

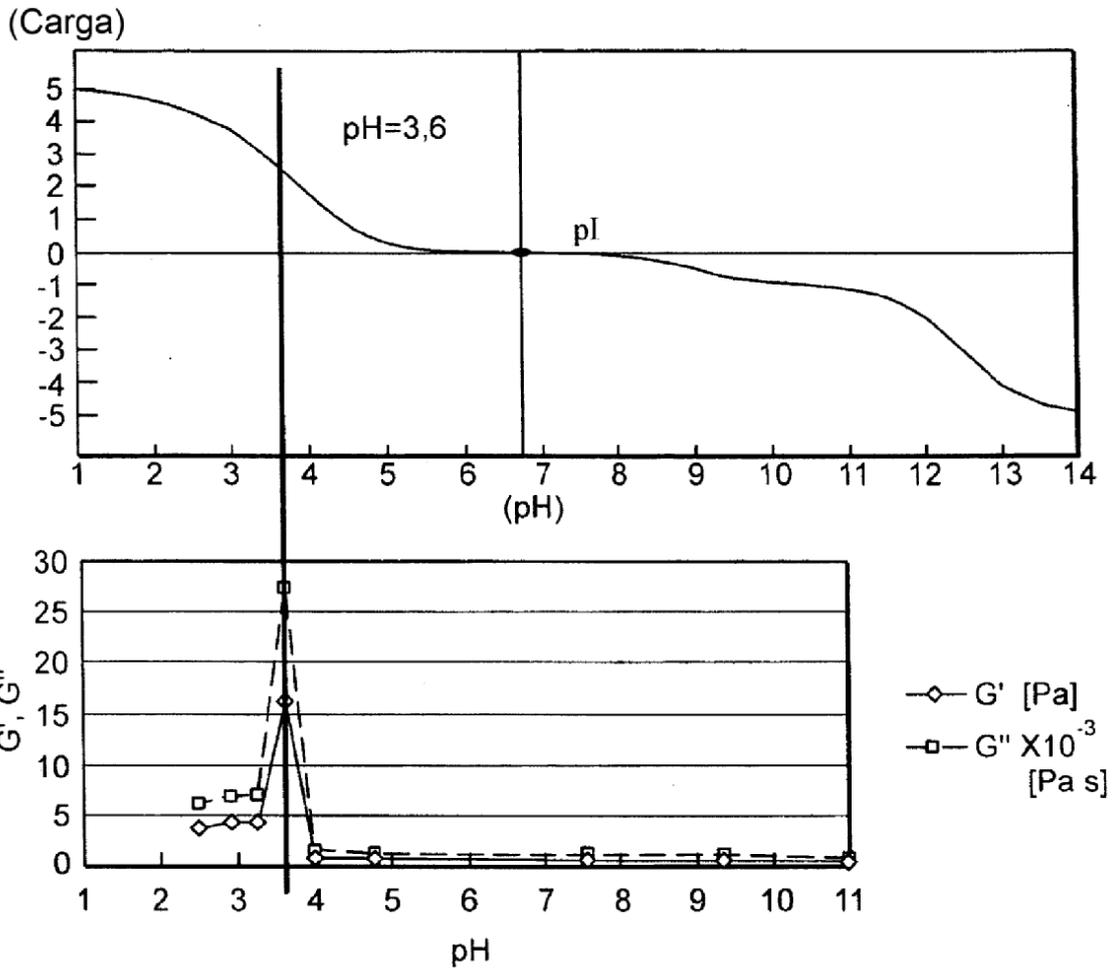


FIG. 10

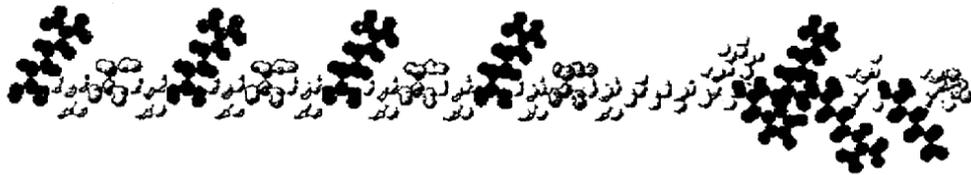


FIG. 11

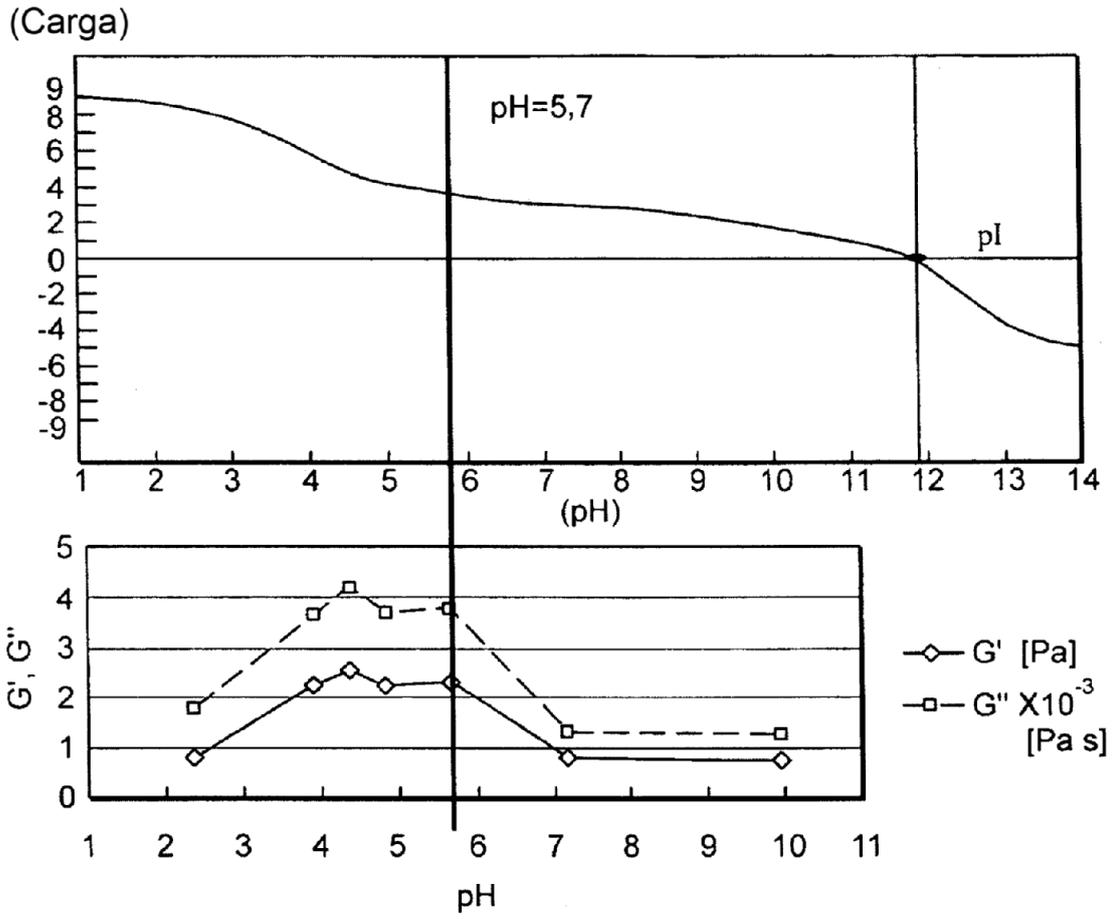
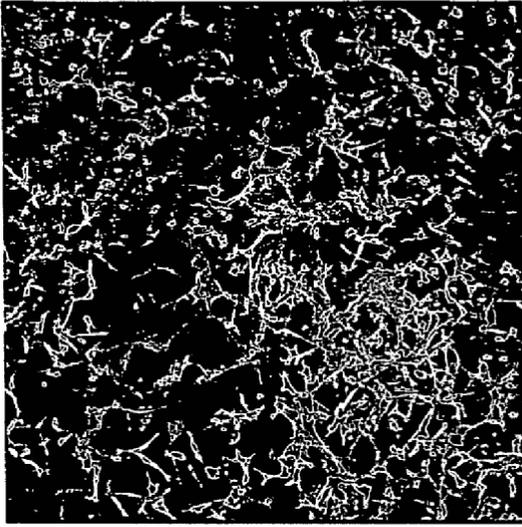
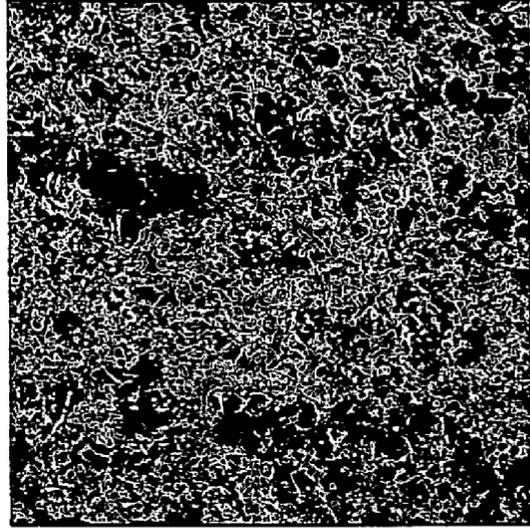


FIG. 12

VISTA SUPERIOR

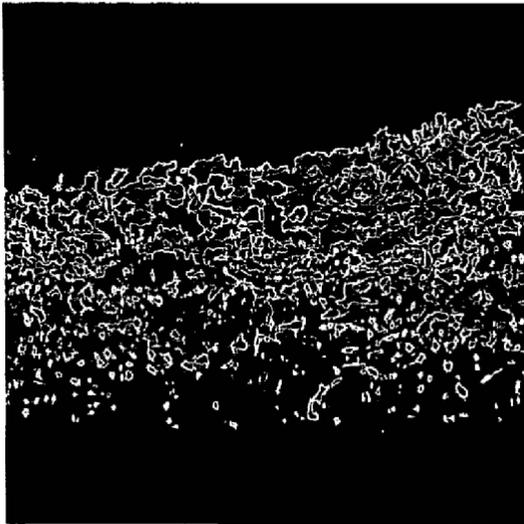


(A) RAD16-1  
FIG. 13A



(B) FHR  
FIG. 13B

VISTA LATERAL



(C) RAD16-1

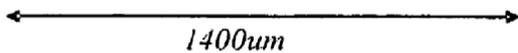
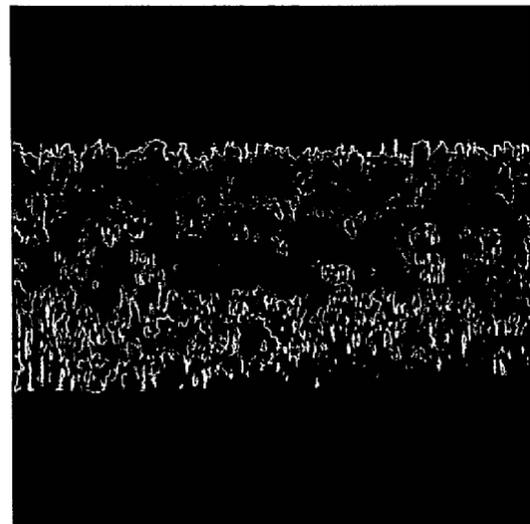


FIG. 13C



(D) FHR

FIG. 13D

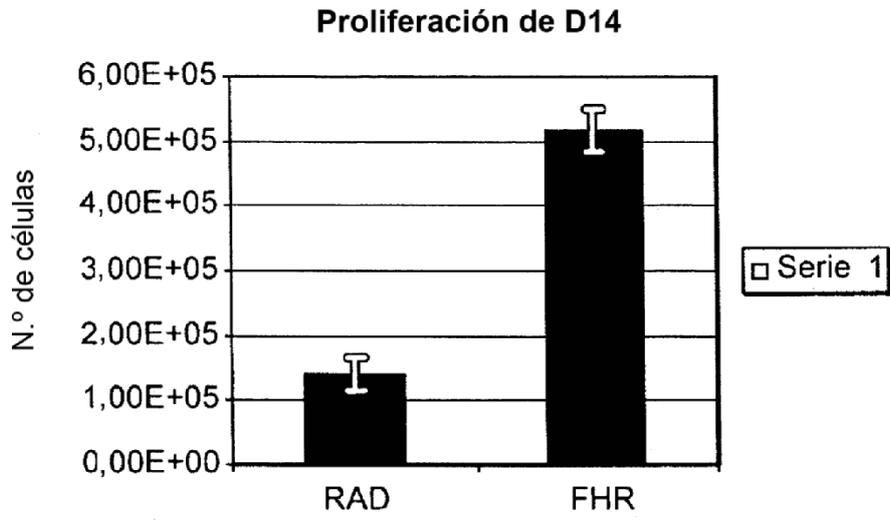


FIG. 14

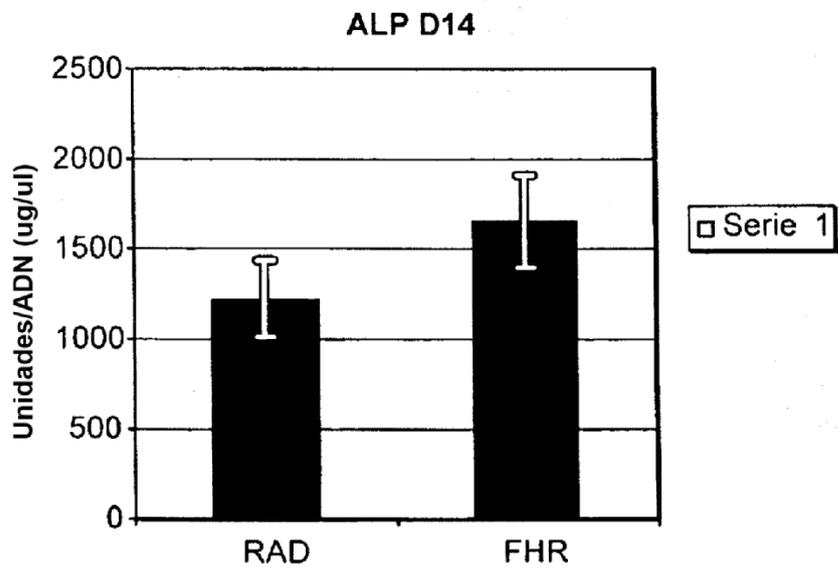
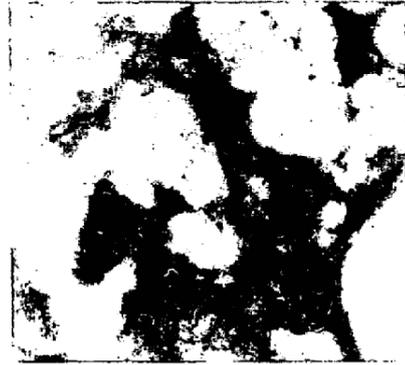


FIG. 15



(A) RAD

FIG. 16A



(B) FHR

FIG. 16B

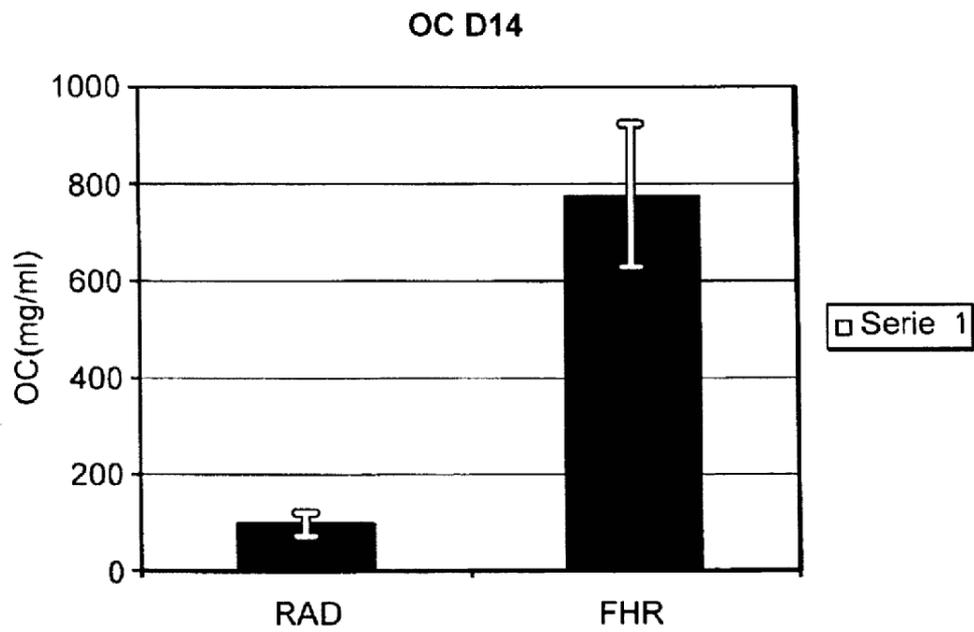


FIG. 17

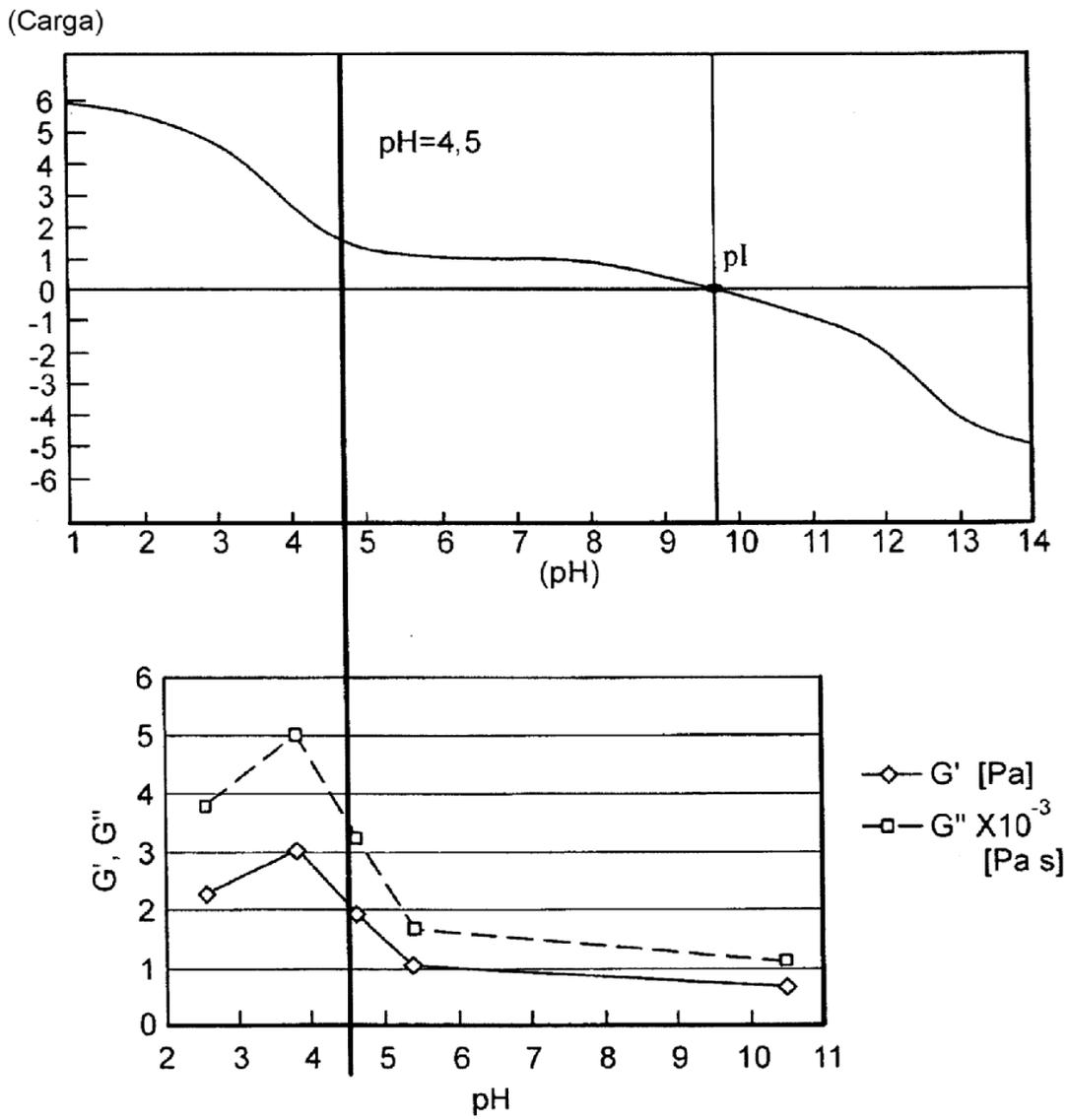


FIG. 18

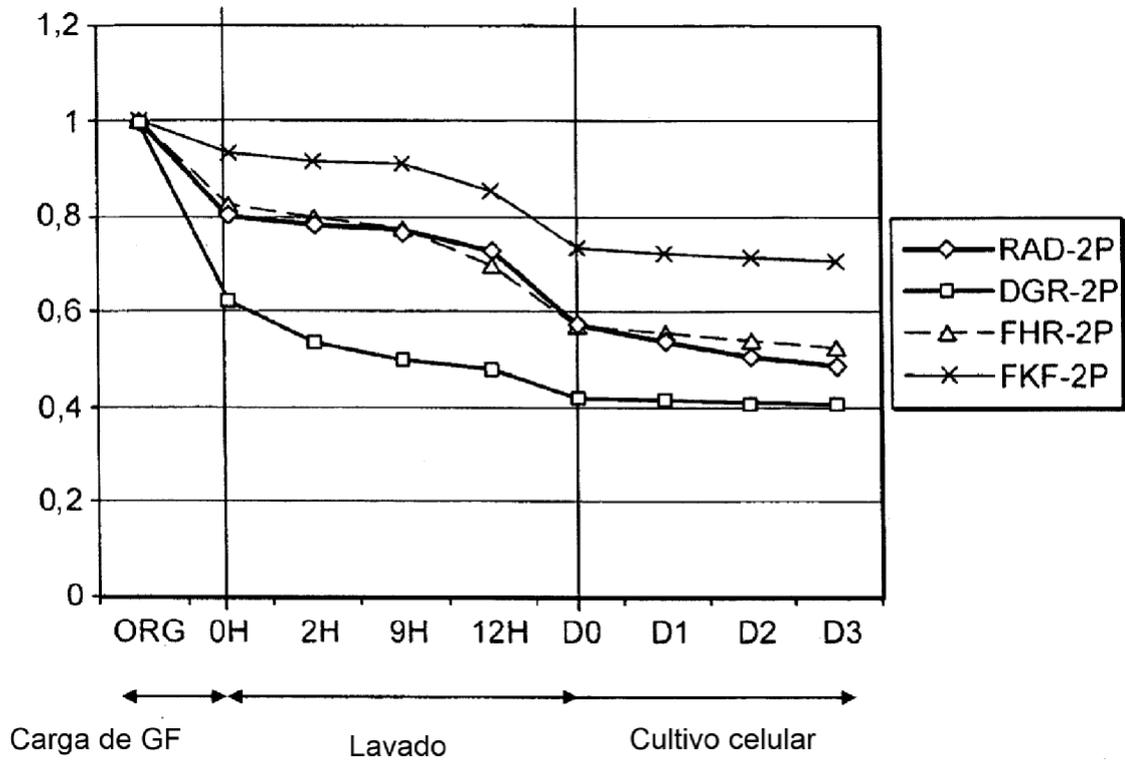
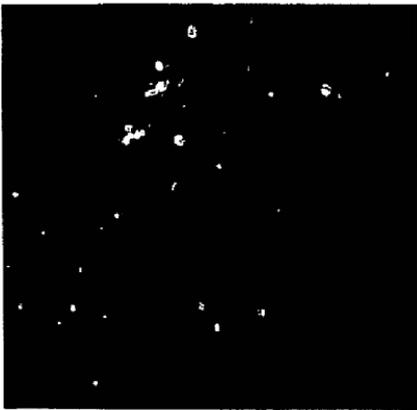


FIG. 19



FIG. 20

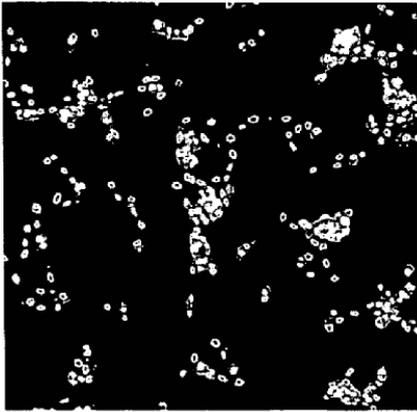
Control negativo



(RAD-2P)

FIG. 21A

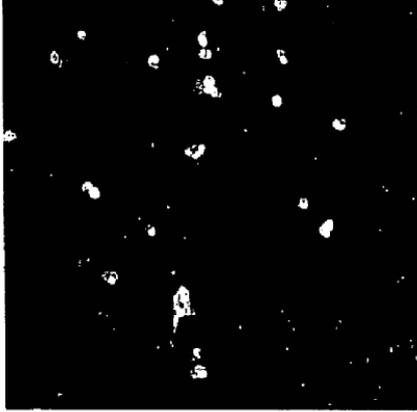
Carga de factor de crecimiento



(RAD-2P)

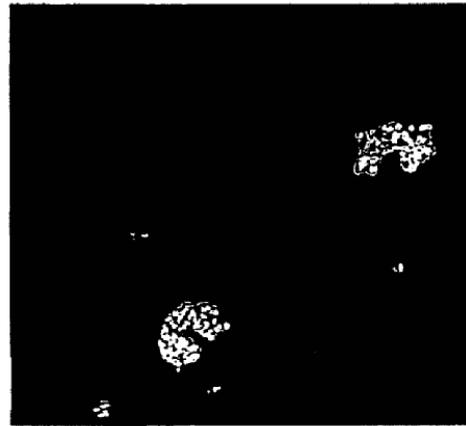
FIG. 21B

Control positivo



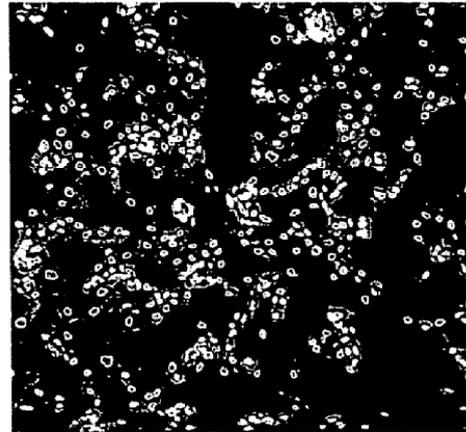
(RAD-2P)

FIG. 21C



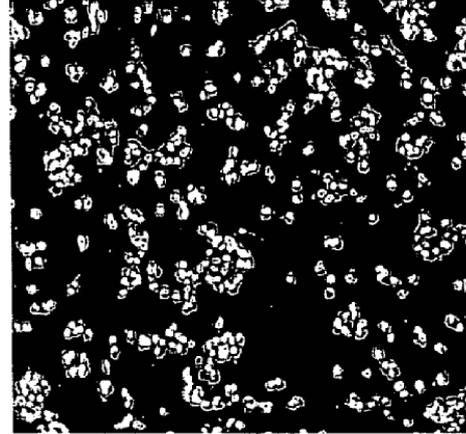
(DGR-2P)

FIG. 21D



(DGR-2P)

FIG. 21E



(DGR-2P) Escala=200µm

FIG. 21F

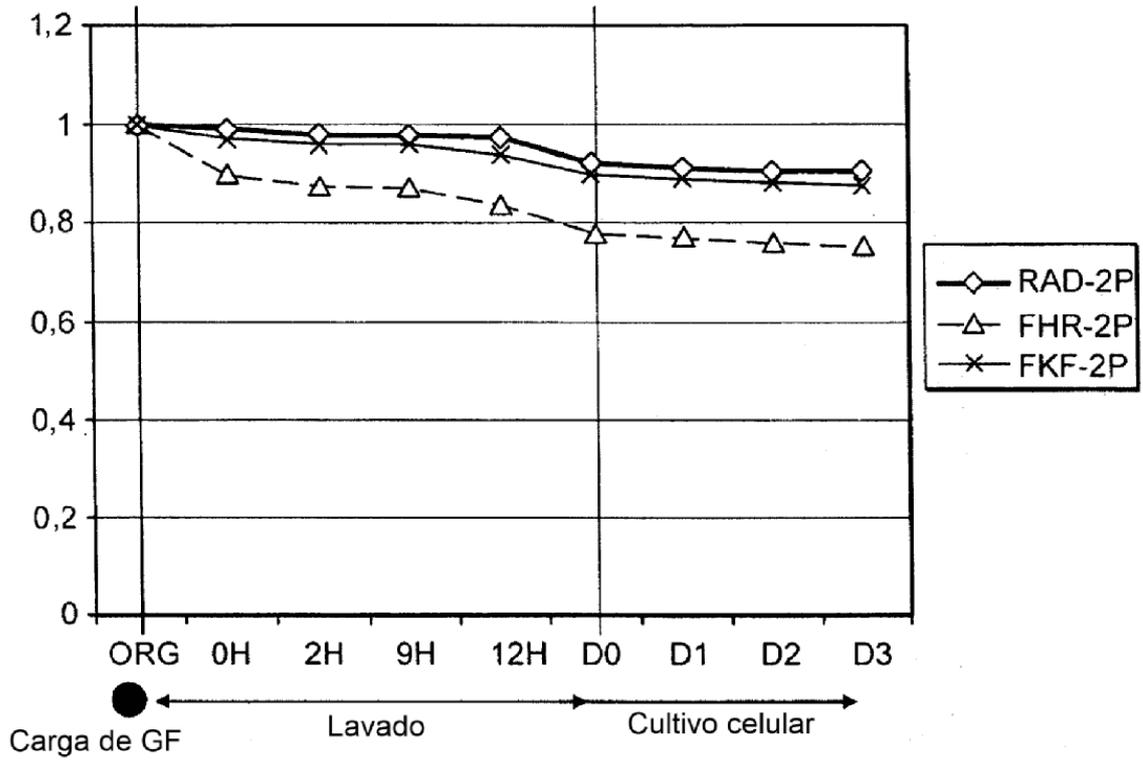


FIG. 22

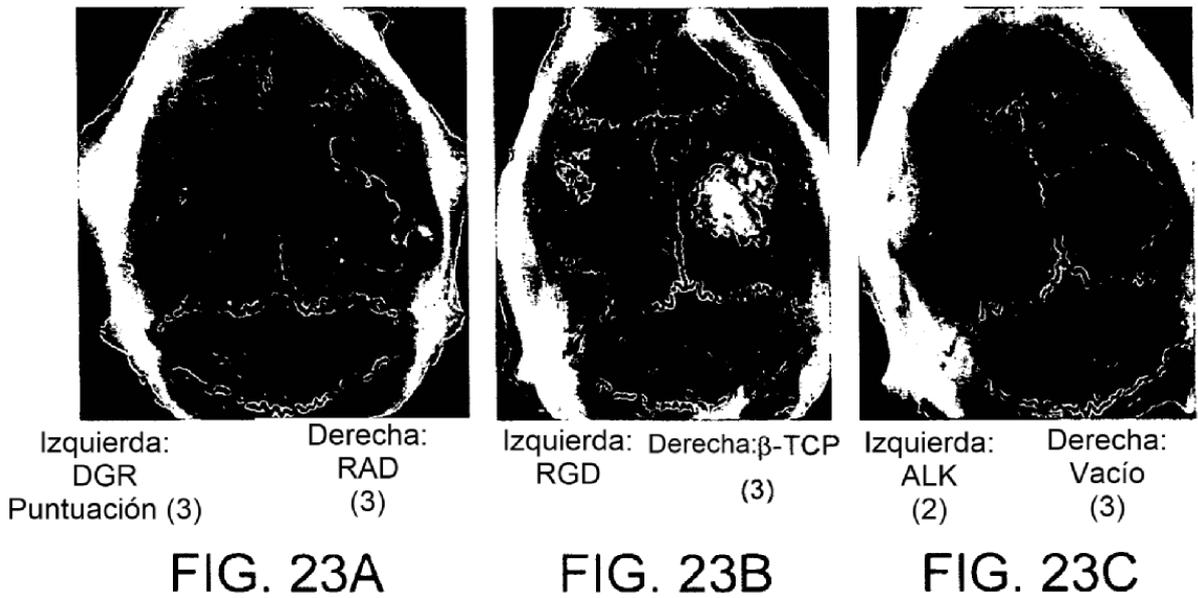
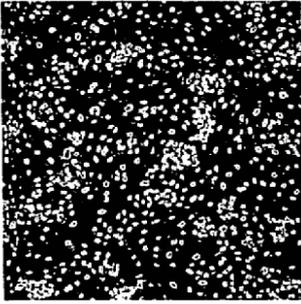


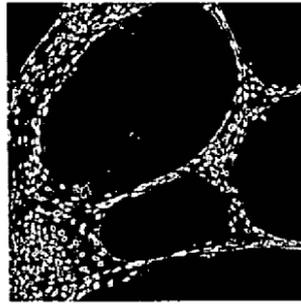
FIG. 23A

FIG. 23B

FIG. 23C



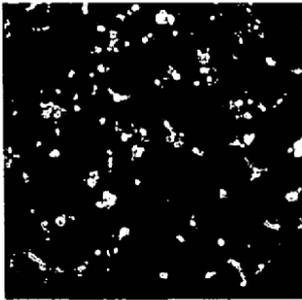
COLÁGENO  
FIG. 24A



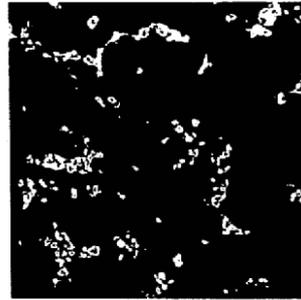
MATRIGEL  
FIG. 24B



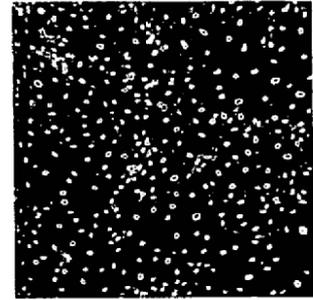
RAD  
FIG. 24C



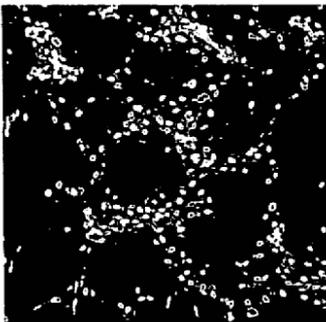
LKKmx  
FIG. 24D



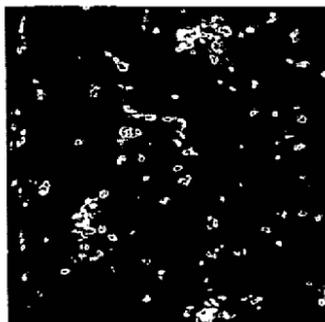
REDmx  
FIG. 24E



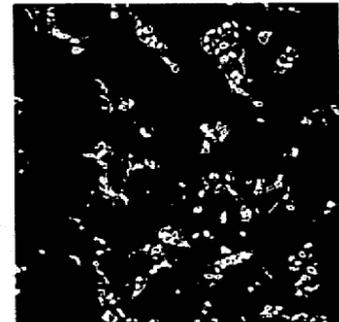
PRGmx  
FIG. 24F



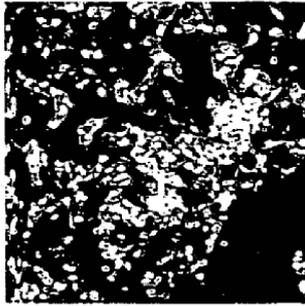
KLTmx  
FIG. 24G



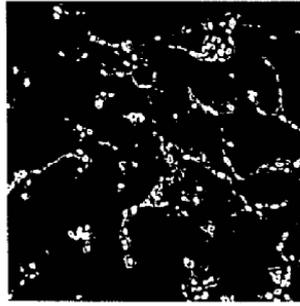
RAD  
FIG. 24H



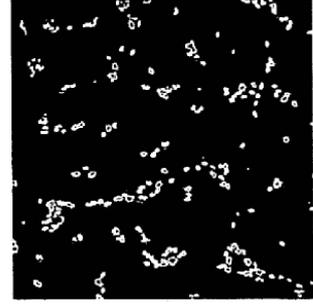
FHR  
FIG. 24I



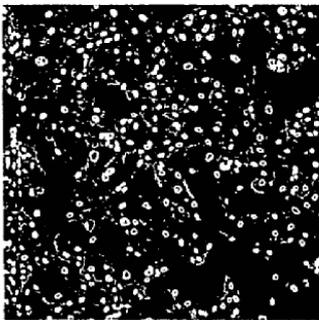
FHRmx  
FIG. 24J



SKPmx  
FIG. 24K



PFS  
FIG. 24L



PFSmx  
FIG. 24M

200µm

Cultivo de 3 días de HUVEC en armazones de nanofibras de péptido

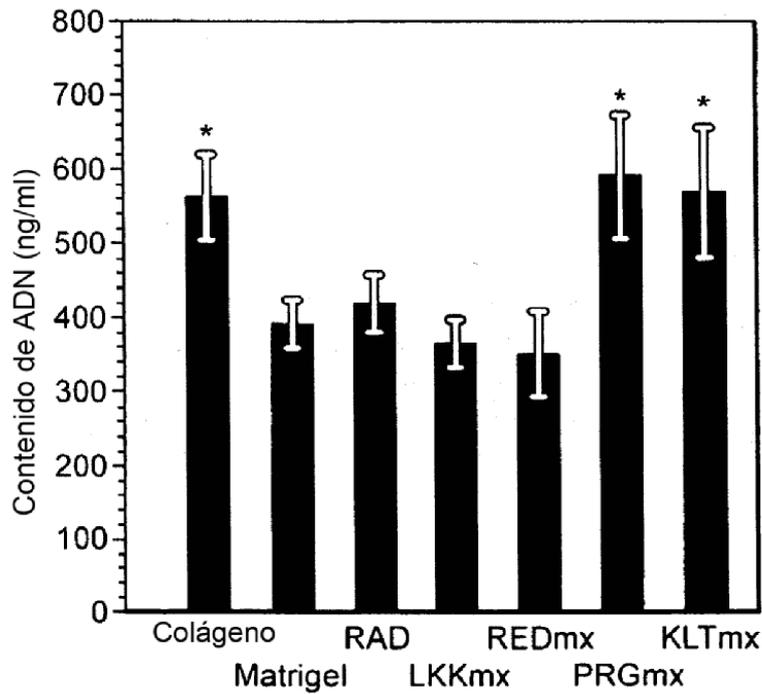
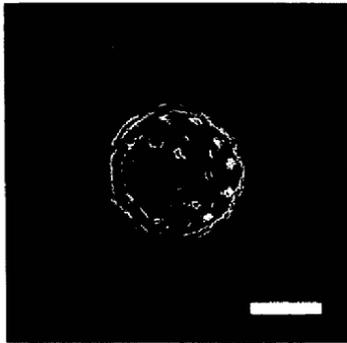


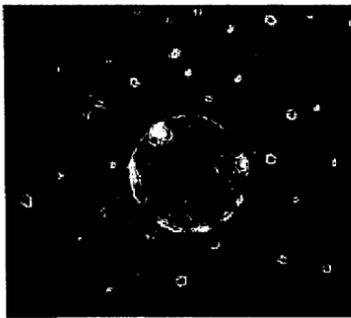
FIG. 25



Escala=100μm

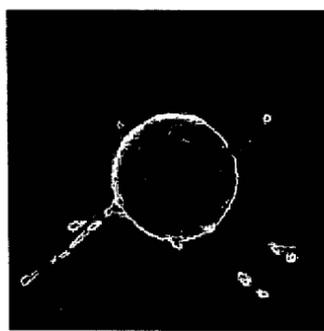
Día 1

**FIG. 26A**



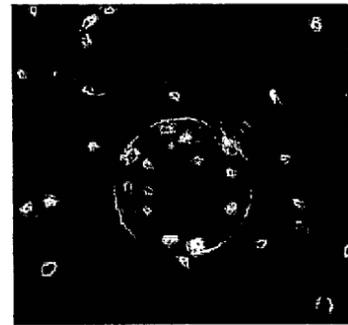
Colágeno, Día 2

**FIG. 26B**



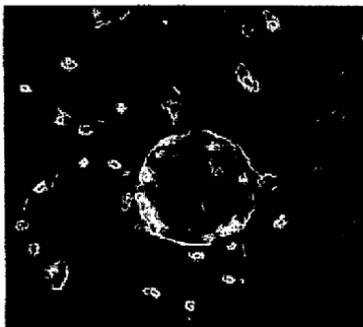
MatriGel, Día 2

**FIG. 26C**



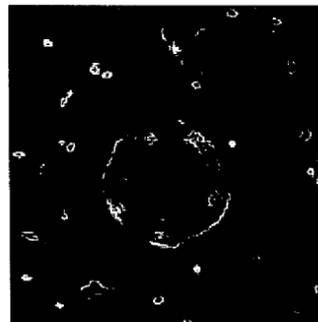
RAD, Día 2

**FIG. 26D**



PRGmx, Día 2

**FIG. 26E**



KLTmx, Día 2

**FIG. 26F**

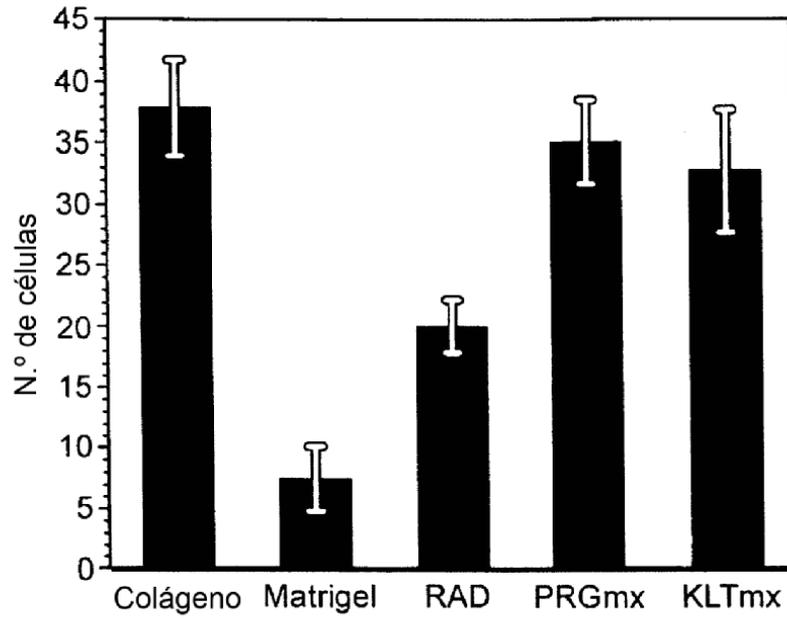
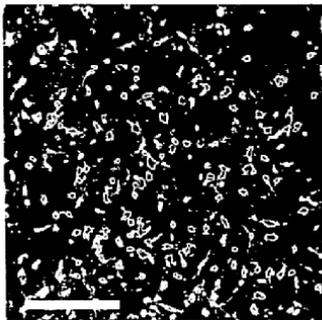
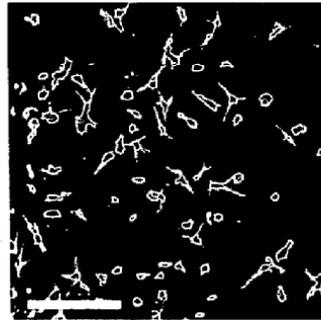


FIG. 27



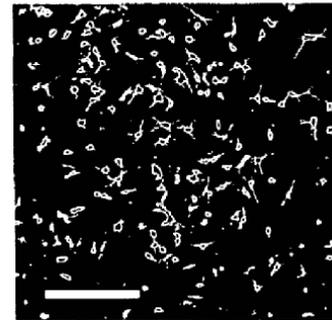
RAD

FIG. 28A



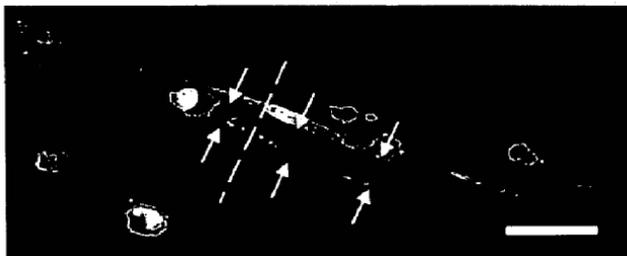
PRGmx

FIG. 28B



KLTmx  
Escala=100µm

FIG. 28C



Escala=50µm

FIG. 29A



FIG. 29B

RAD

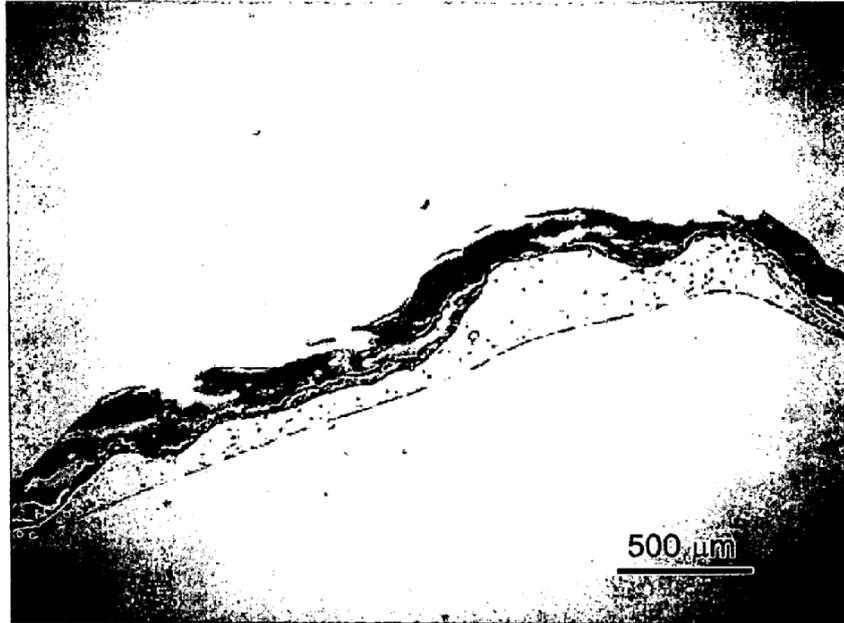


FIG. 30A

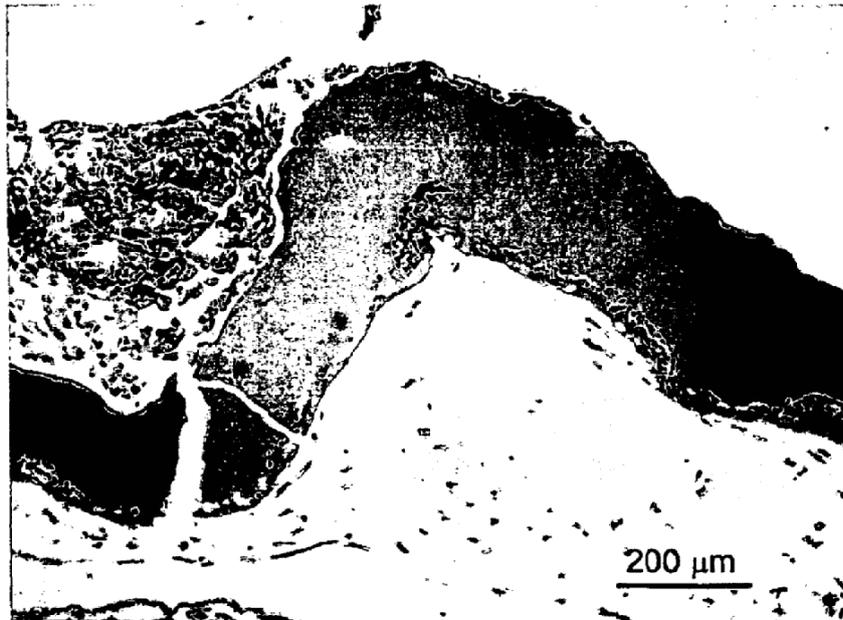


FIG. 30B



FIG. 30C

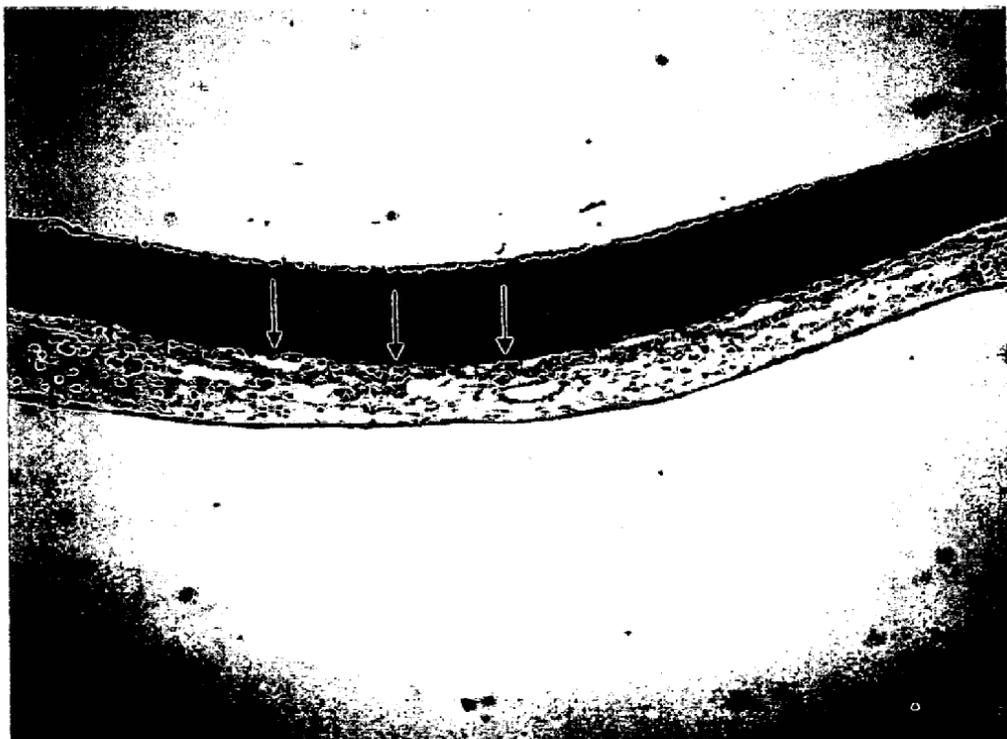


FIG. 30D

PRGmx

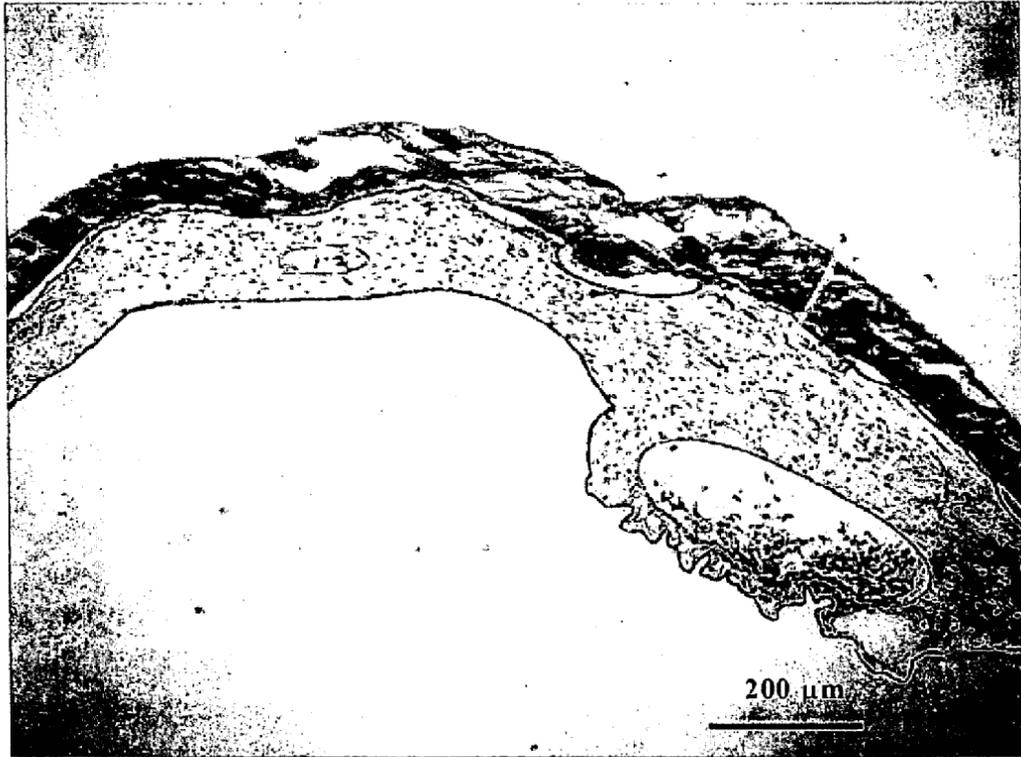


FIG. 30E

COLÁGENO

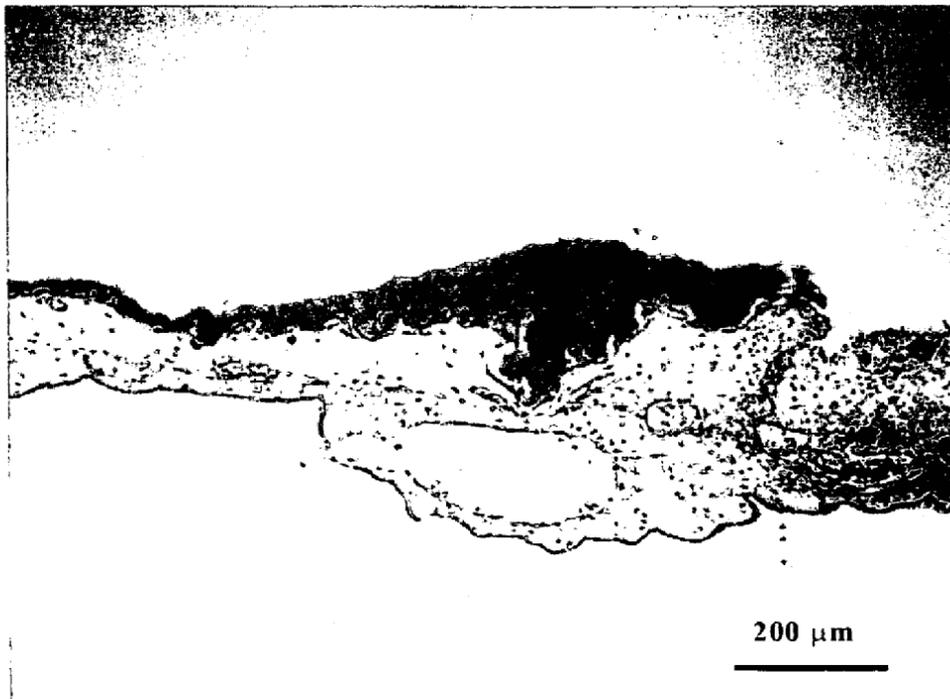
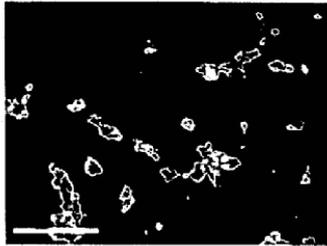


FIG. 30F

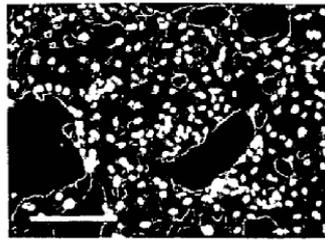
MATRIGEL



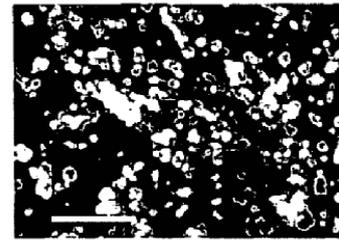
FIG. 30G



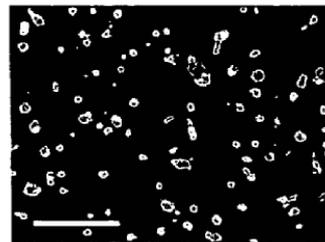
EIK  
FIG. 31A



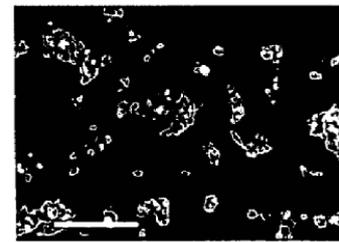
EPRG  
FIG. 31B



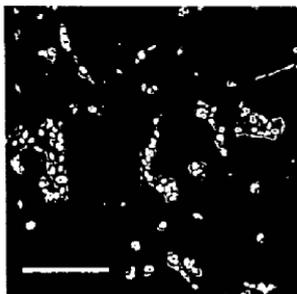
EPRGmx  
FIG. 31C



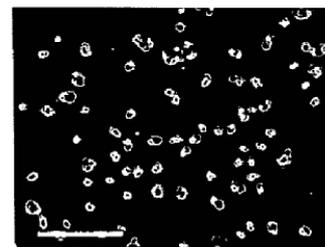
EPFS  
FIG. 31D



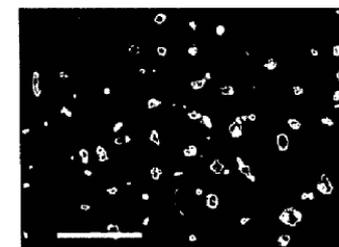
EPFSmx  
FIG. 31E



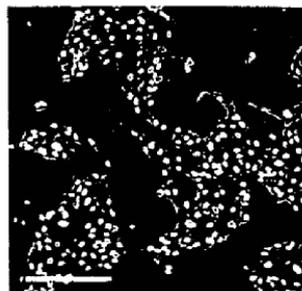
FKF  
FIG. 31H



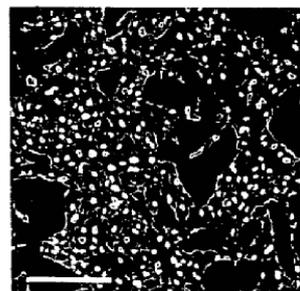
ESKP  
FIG. 31F



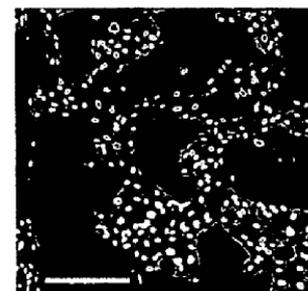
ESKPmx  
FIG. 31G



KFHRmx  
FIG. 31I

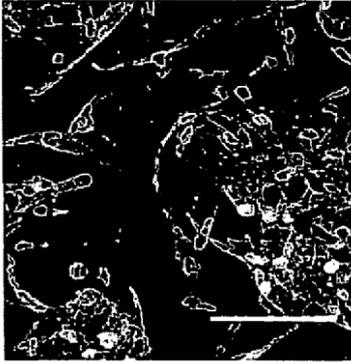


KPRG  
FIG. 31J

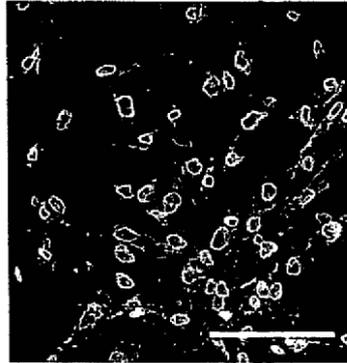


KPRGmx  
escala=200 μm  
FIG. 31K

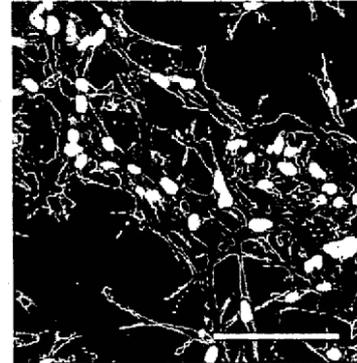
VISTA VERTICAL



RAD  
FIG. 32A



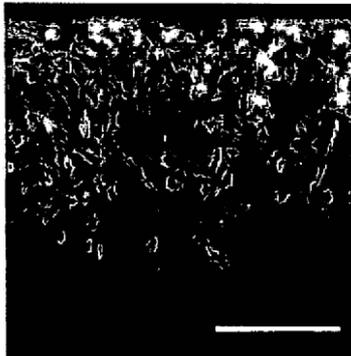
PRGmx  
FIG. 32B



FHRmx  
FIG. 32C

VISTA HORIZONTAL

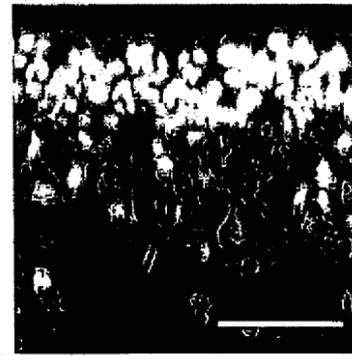
escala=100µm



RAD  
FIG. 32D

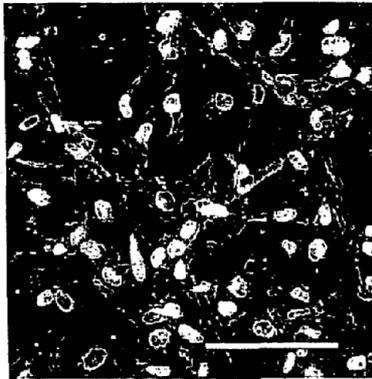


PRGmx  
FIG. 32E



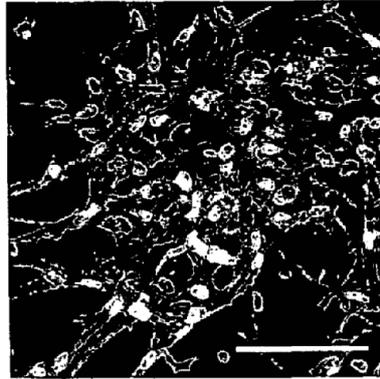
FHRmx  
FIG. 32F

VISTA VERTICAL



PFSmx

FIG. 32G



SKPmx

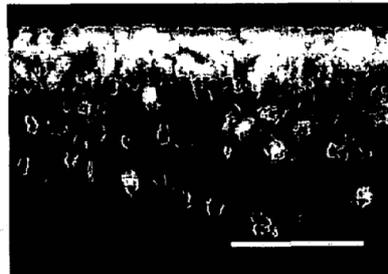
FIG. 32H

VISTA HORIZONTAL Escala=100 μm



PFSmx

FIG. 32I



SKPmx

FIG. 32J

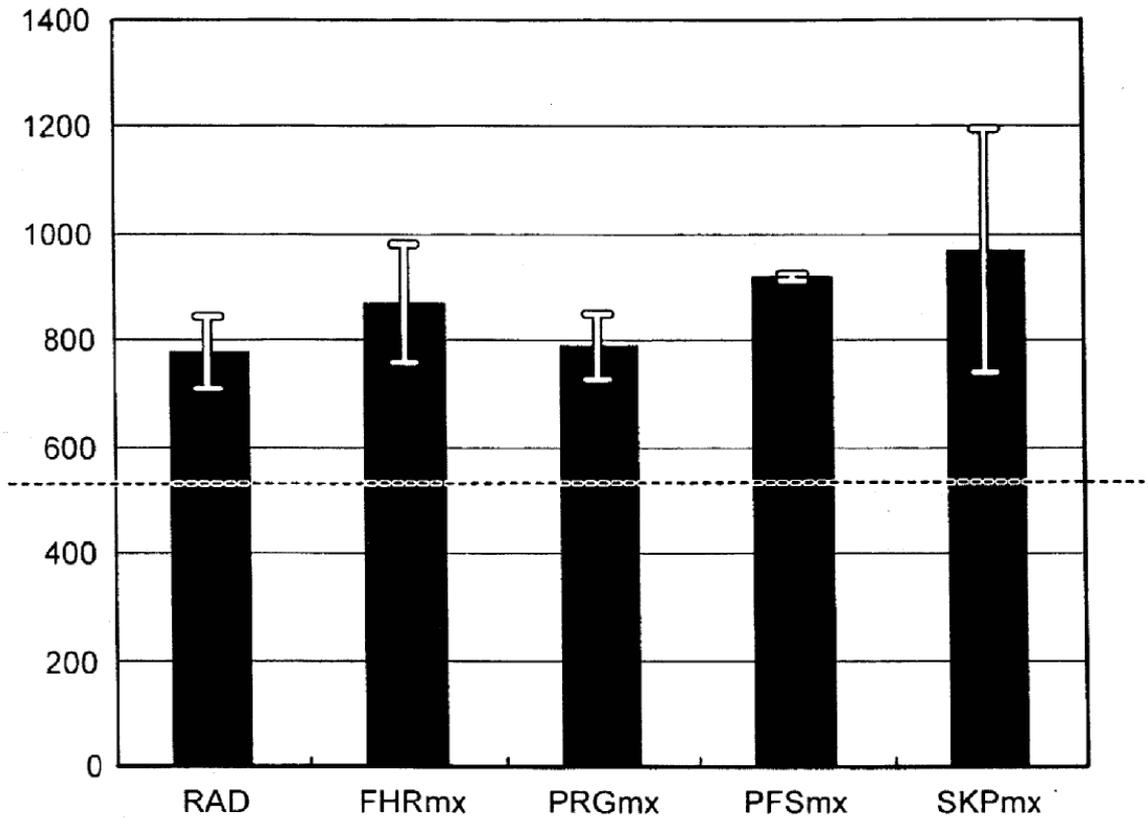


FIG. 33

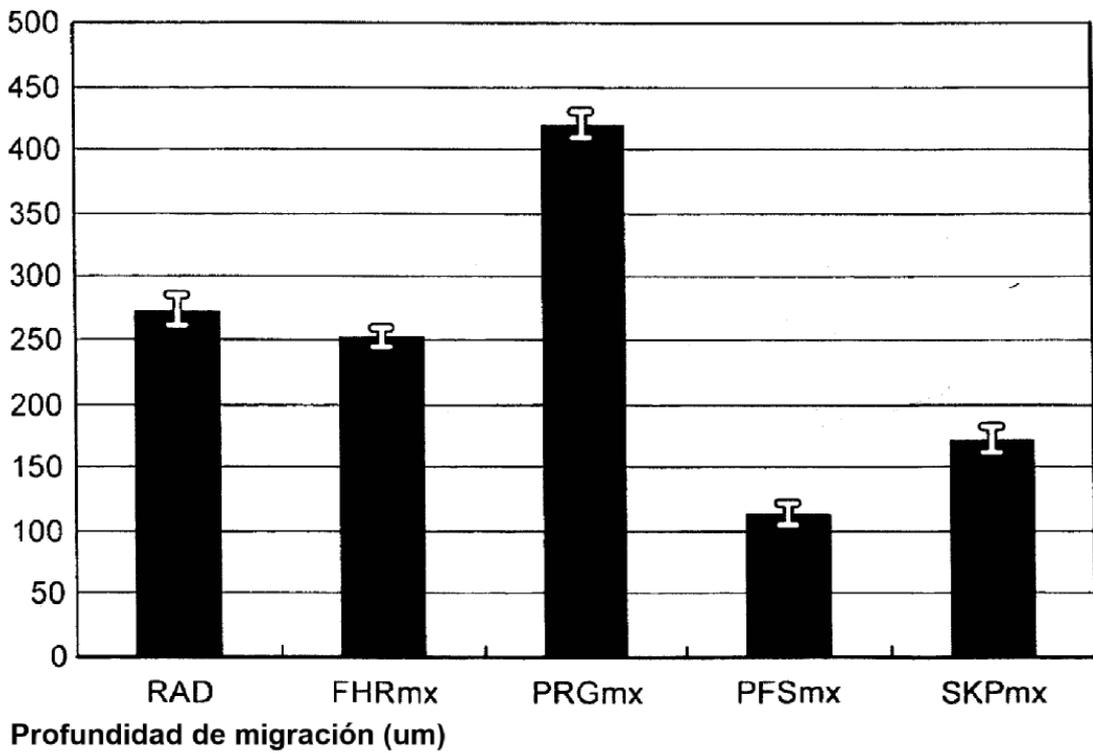


FIG. 34

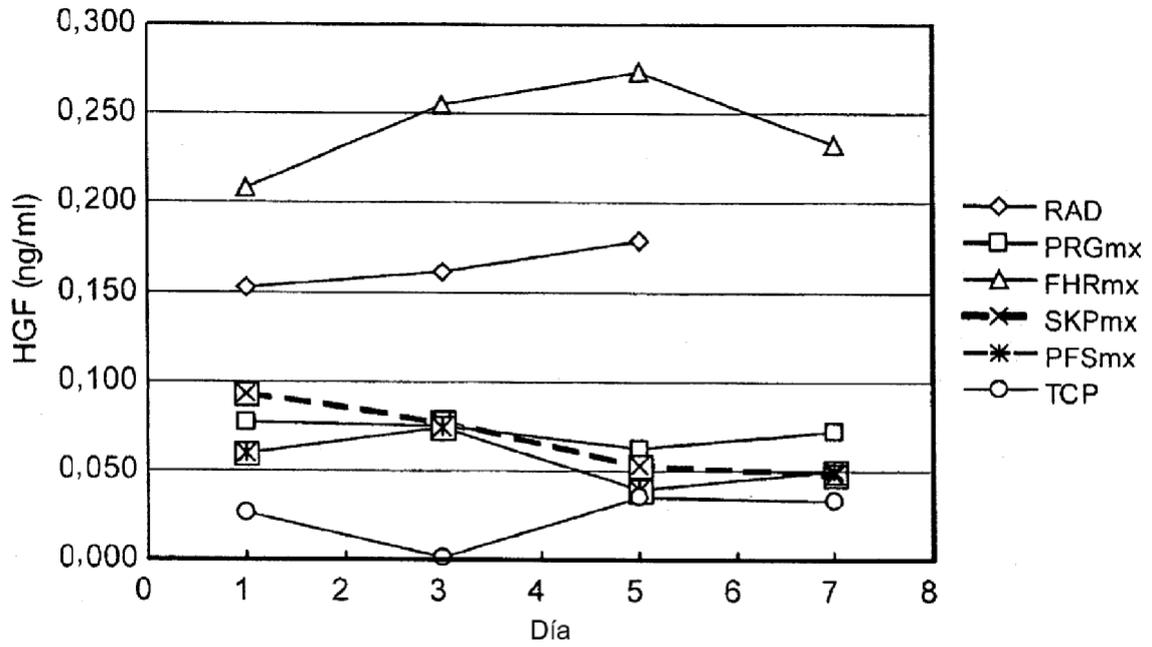


FIG. 35A

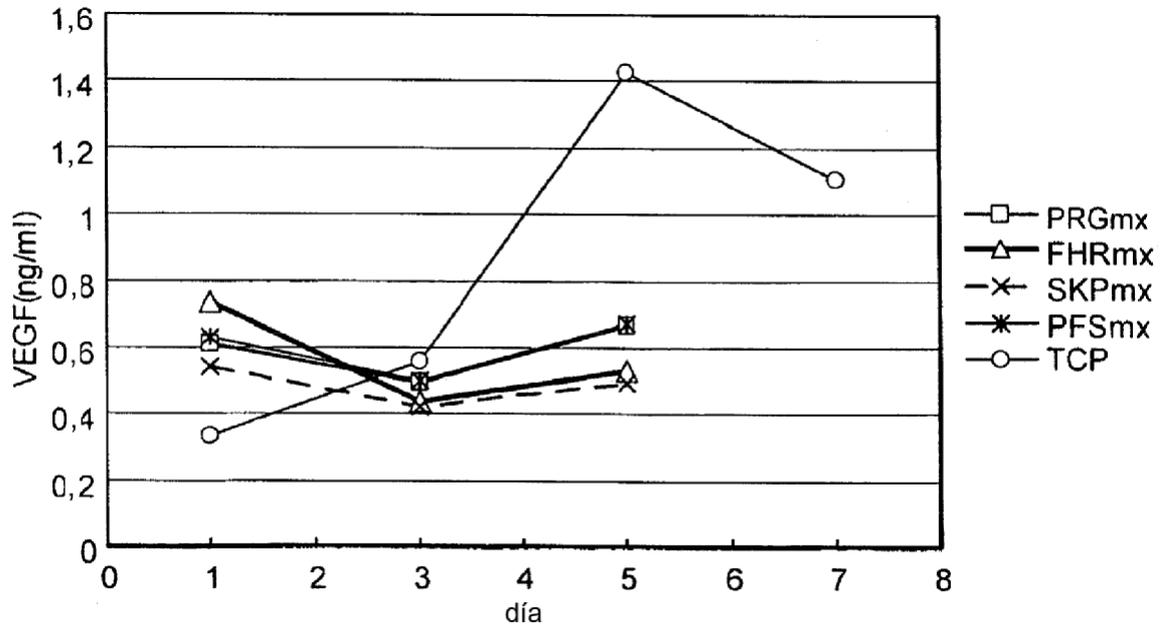


FIG. 35B

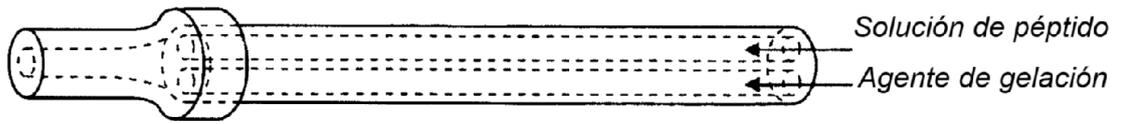


FIG. 36A

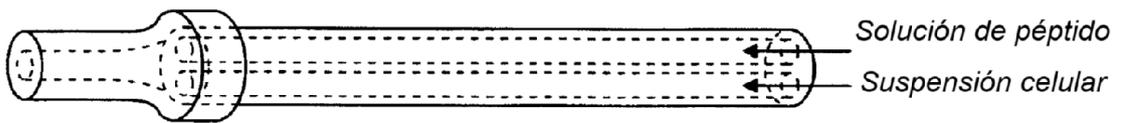


FIG. 36B