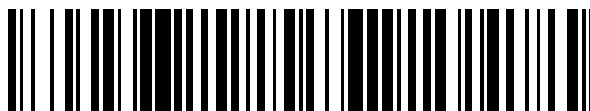


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 368**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2009 PCT/US2009/038624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120995**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09725336 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2280720**

54 Título: **Peptidoglicanos sintéticos de enlace a colágeno, preparación y método de utilización**

30 Prioridad:

18.07.2008 US 81984 P
27.03.2008 US 39933 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2019

73 Titular/es:

PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
1281 Win Hentschel Blvd.
West Lafayette, IN 47906, US

72 Inventor/es:

PANITCH, ALYSSA;
PADERI, JOHN, ERIC;
PARK, KINAM;
STUART, KATHERINE y
HIGBEE, STEVE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 720 368 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

Peptidoglicanos sintéticos de enlace a colágeno, preparación y método de utilización

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] Esta invención se refiere al campo de los peptidoglicanos y métodos de formación y el uso de la misma sintéticos de unión a colágeno.

10 ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INVENCION

[0002] El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo, presenta muchas señales biológicas y mantiene la integridad mecánica de muchos tejidos diferentes. Su organización molecular determina su función, lo que ha hecho de la fibrillogénesis del colágeno un tema de interés en muchos campos de investigación. El colágeno tiene la capacidad de auto-asociarse in vitro, formando geles que pueden actuar como un sustrato tridimensional y proporcionar señales mecánicas y biológicas para el crecimiento celular. La investigación sobre la fibrillogénesis del colágeno con y sin componentes adicionales de la matriz extracelular ha generado muchas preguntas sobre la interacción entre el colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular. Actualmente hay más de 20 tipos de colágeno identificados, siendo el tipo I el más común. Muchos tejidos están compuestos principalmente de colágeno tipo I, que incluye tendón, ligamento, piel y huesos. Si bien cada una de estas estructuras también contiene otros tipos de colágeno, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, y minerales en el caso de los huesos, el componente principal es el colágeno tipo I. La dramática diferencia en la integridad mecánica que exhibe cada una de estas estructuras se debe en gran medida a la intrincada organización del colágeno y la interacción con otros componentes de tipo I que no son colágeno.

[0003] La decorina es un proteoglicano que se sabe que influye en la fibrillogénesis del colágeno, que en consecuencia puede modificar la información mecánica y biológica en un gel de colágeno. Las señales resultantes de los cambios estructurales en la organización del colágeno, así como las señales únicas contenidas en las cadenas de glicosaminoglicanos que forman parte de los proteoglicanos, alteran el comportamiento celular y ofrecen un mecanismo para diseñar matrices de colágeno para proporcionar las respuestas celulares deseadas. En consecuencia, hemos desarrollado peptidoglicanos sintéticos de unión al colágeno que influyen en la organización del colágeno a nivel molecular. Estos peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno se diseñan en base a péptidos de unión a colágeno unidos, por ejemplo, a un glicano, como un glicosaminoglicano o un polisacárido, y se pueden adaptar con respecto a estos componentes para aplicaciones específicas. Los peptidoglicanos sintéticos de unión al colágeno descritos en este documento influyen en las características morfológicas, mecánicas y biológicas de las matrices de colágeno y, por consiguiente, alteran el comportamiento celular, haciendo que estas moléculas sean útiles para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

[0004] En una descripción, se proporciona una matriz de colágeno que comprende una matriz de colágeno y un peptidoglicano sintético de unión a colágeno. En esta descripción, el 1) colágeno puede estar reticulado o no reticulado, 2) el peptidoglicano sintético que se une al colágeno puede tener una homología de aminoácidos con una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína o un proteoglicano que regula la fibrillogénesis del colágeno o el peptidoglicano sintético de enlace de colágeno puede ser un peptidoglicano sintético aberrante que se une al colágeno, 3) la matriz de colágeno diseñada puede comprender además una población exógena de células, 4) la población exógena de células puede seleccionarse de células epiteliales no queratinizadas o queratinizadas o una población de células seleccionadas del grupo que consiste en células endoteliales, células mesodérmicas, células mesoteliales, sinoviocitos, células neurales, células gliales, células de osteoblastos, fibroblastos, condrocitos, tenocitos, células musculares lisas, células musculares esqueléticas, células musculares cardíacas, células progenitoras multipotenciales (P. ej., células madre, incluidas las células progenitoras de la médula ósea) y células osteogénicas, 5) la matriz de colágeno diseñado puede comprender además al menos un polisacárido, 6) el peptidoglicano sintético que se une al colágeno puede ser un compuesto de fórmula P_nG_x en donde n es 1 a 10, en donde x es 1 a 10, en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a alrededor de 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno, y en donde G es un glicano (por ejemplo, un glicosaminoglicano o un polisacárido), 7) el peptidoglicano sintético de enlace a colágeno puede ser un compuesto de fórmula $(P_nL)_xG$ en donde n es 1 a 5, en donde x es 1 a 10, en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprenden una secuencia de un dominio de unión a colágeno, en donde L es un enlazador, y en donde G es un glicano, 8) el peptidoglicano sintético de unión a colágeno puede ser un compuesto de fórmula $P(LG_n)_x$ en donde n es 1 a 5, en donde x es 1 a 10, en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno, en donde L es un enlazador, y en donde G es un glicano, 9) el péptido sintético puede tener homología de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un pequeño proteoglicano rico en leucina o una secuencia del receptor de plaquetas, 10) el péptido sintético puede tener homología de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una secuencia del receptor de colágeno plaquetario, 11) el péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILYGC, RLDGNEIKRGC, AHEEISTTNEGVMGC, NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQGC, CQDSETRTFY, TKKTLRTGC, GLRSKSKFRPDIQYPDATDEDITSHMGC, SQNPVQPGC, SYIRIADTNITGC, SYIRIADTNIT,

KELNLVYT, KELNLVYTGC, GSITTIDVPWNV, y GSITTIDVPWNVGC, 12) el glicano se puede seleccionar del grupo que consiste en alginato, agarosa, dextrano, condroitina, dermatán, sulfato de dermatán, heparán, heparina, queratina y hialuronano, 13) el glucano se puede seleccionar del grupo que consiste en sulfato de dermatán, dextrano y heparina, 14) el colágeno se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV y combinaciones de los mismos, 15) el glicano puede ser un glicosaminoglicano o un polisacárido, o 16) la invención puede incluir cualquier combinación de las características descritas en este párrafo.

[0005] En otra descripción ilustrativa, se proporciona un método de preparación de una matriz de colágeno. El método comprende las etapas de proporcionar una solución de colágeno, proporcionar un peptidoglicano sintético de unión a colágeno y polimerizar el colágeno en presencia del peptidoglicano sintético de unión a colágeno para formar la matriz de colágeno diseñada. Esta descripción puede incluir cualquiera de las características descritas en el párrafo anterior. Además, en esta descripción, la cantidad de colágeno en la solución de colágeno puede ser de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, y la relación molar del colágeno al peptidoglicano sintético que se une al colágeno puede ser de aproximadamente 1:1 a unos 40:1.

[0006] En aún otra realización se proporciona un compuesto de fórmula P_nG_x en la que n es de 1 a 10, en donde x es de 1 a 10, en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILY, y GSITTIDVPWNV, en donde G es un glicano, y en el que la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina cisteína en el punto de unión para el glicano.

[0007] En una realización adicional, se proporciona un compuesto de fórmula $(P_nL)_xG$ en la que n es de 1 a 5, en el que x es de 1 a 10, en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILY, y GSITTIDVPWNV, en donde L es un enlazador, G es un glicano y en donde la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina cisteína en el punto de unión para el glicano.

[0008] En todavía otra realización ilustrativa, se proporciona un compuesto de fórmula $P(LG_n)_x$ en la que n es de 1 a 5, en el que x es de 1 a 10, en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILY y GSITTIDVPWNV, en donde L es un enlazador, en donde G es un glicano, y en donde la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina cisteína en el punto de unión para el glicano. En cualquiera de estas realizaciones, el compuesto enlazador puede comprender la fórmula $-SCH_2CH_2C(O)NH=$, el glicano puede ser un glicosaminoglicano o un polisacárido, y cualquier característica aplicables descritos anteriormente también pueden ser incluidos.

[0009] En otro aspecto, se proporciona un método de alterar la estructura o las características mecánicas de una matriz de colágeno. El método comprende las etapas de proporcionar una solución de colágeno, proporcionar un peptidoglicano sintético de unión a colágeno y polimerizar el colágeno en presencia del peptidoglicano sintético de unión a colágeno para formar la matriz de colágeno alterada, modificada. También se puede incluir cualquier característica aplicable descrita anteriormente.

[0010] En otra descripción, se proporciona un kit. El kit puede comprender cualquiera de las matrices de colágeno diseñadas anteriormente. En esta descripción, la matriz de colágeno manipulada puede esterilizarse, y el kit puede comprender además células en las que las células pueden seleccionarse del grupo que consiste en células mesoteliales, sinoviocitos, células progenitoras, fibroblastos, células neurales, células gliales, células de osteoblastos, condrocitos, tenocitos, células endoteliales y células del músculo liso. La matriz de colágeno diseñada puede comprender cualquiera de los compuestos descritos anteriormente.

[0011] En una realización, se describe un método para inhibir la activación de las plaquetas, comprendiendo el método la etapa de proporcionar un peptidoglicano sintético de unión a colágeno para poner en contacto el colágeno en el que el peptidoglicano sintético de unión a colágeno se une al colágeno y en el que está inhibida la activación de las plaquetas. En otra realización, se describe un método para inhibir la adhesión de plaquetas al colágeno, comprendiendo el método la etapa de proporcionar un peptidoglicano sintético de unión al colágeno para poner en contacto el colágeno en el que el peptidoglicano sintético de unión al colágeno se une al colágeno y en el que se inhibe la adhesión de las plaquetas al colágeno. En otra realización, se proporciona cualquiera de los métodos anteriores en los que el glicano se selecciona del grupo que consiste en hialuronano, heparina y dextrano. En otra realización más, el peptidoglicano sintético de unión a colágeno usado en cualquiera de los métodos anteriores comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILYGC, GSITTIDVPWNV y GSITTIDVPWNVGC.

[0012] En todavía otra descripción, se proporciona una construcción de injerto. El constructo de injerto comprende cualquiera de las matrices de colágeno diseñadas anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013]

- 5 FIGURA 1 muestra una representación esquemática de la interacción entre proteoglicanos vecinos en cadenas de tropocolágeno adyacentes que es importante para determinar las propiedades mecánicas y de alineación de los medicamentos de colágeno.
- 10 FIGURA 2. Imágenes de AFM realizadas en modo de contacto, con una tasa de escaneo de 2 Hz con punta de modo de contacto de nitruro de silicio $k = 0,05$ N/m puntas y punto de ajuste de deflexión: 0-1 voltios, de muestras de gel preparadas como en el EJEMPLO 16 (10:1 colágeno: tratamiento) después de la deshidratación con etanol. Las muestras son para colágeno solo (colágeno) y para colágeno con sulfato de dermatán (DS), con decorina (Decorina), sulfato de dermatán-RRANAALKAGELYKSILYGC conjugado (DS-SILY) y sulfato de dermatán- SYIRIADTNIT conjugado (DS-SYIR).
- 15 FIGURA 3. Exploración de resonancia de plasmón superficial en modo de asociación y modo de disociación del péptido RRANAALKAGELYKSILYGC (SILY) que se une al colágeno unido a las placas CM-3. SILY se disolvió en 1x tampón HBS-EP a concentraciones variables de 100 μ M a 1,5 μ M en diluciones de 2 veces.
- 20 FIGURA 4. Unión del péptido SILY modificado con dansilo al colágeno medido en una placa de alta unión de 96 pocillos (negro con un fondo transparente (Costar)). PBS, solo tampón; BSA, pocillo tratado con BSA; Colágeno, pocillo tratado con colágeno. Las lecturas de fluorescencia se tomaron en un espectrofotómetro M5 Spectramax (Molecular Devices) a longitudes de onda de excitación/emisión de 335nm/490nm, respectivamente.
- FIGURA 5. Curva de unión a péptido SILY de colágeno-dansilo derivado de los datos de fluorescencia descritos en la FIGURA 4.
- 25 FIGURA 6. Una descripción esquemática del reactivo, PDPH y la química de la conjugación en dos etapas de un péptido que contiene cisteína con un glucosilaminoglucósido oxidado que muestra la liberación de 2-piridiltiol en la etapa final.
- FIGURA 7, Medición de la absorbancia a 343 nm antes del tratamiento con DTT de sulfato de dermatán oxidado conjugado a PDPH, y después del tratamiento con DTT, que libera 2-piridiltiol del conjugado. Las mediciones permiten la determinación de la relación de PDPH a sulfato de dermatán oxidado. La medida $\Delta A = 0.35$, corresponde a 1,1 moléculas de PDPH/DS.
- 30 FIGURA 8, Unión del péptido SILY modificado con dansilo conjugado a sulfato de dermatán como se describe en el presente documento al colágeno medido en una placa de alta unión de 96 pocillos (negro con un fondo transparente (Costar)). PBS, solo tampón; BSA, pocillo tratado con BSA; Colágeno, pocillo tratado con colágeno. Las lecturas de fluorescencia se tomaron en un espectrofotómetro M5 Spectramax (Molecular Devices) en longitudes de onda de excitación/emisión de 335nm/490nm respectivamente.
- 35 FIGURA 9, Medición del módulo de corte de las muestras de gel (4mg/mL de colágeno, 10:1 colágeno: tratamiento) en un reómetro AR-G2 con una geometría de placa paralela de acero inoxidable de 20 mm (TA Instruments, New Castle, DE) y el acero inoxidable de 20 mm. la geometría de la placa paralela de acero se redujo a una distancia de separación de 600 μ m usando un control de fuerza normal de 0,25N. Col, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+decorina, colágeno + decorina; Col+DS-SYIR, colágeno + sulfato de dermatán-SYIR; Col+DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY; Col+SILY, colágeno + péptido SILY; Col+SYIR, colágeno + péptido SYIRIADTNIT (SYIR).
- 40 FIGURA 10. Medición del módulo de corte de las muestras de gel (4mg/mL de colágeno, 5:1 colágeno: tratamiento) en un reómetro AR-G2 con 20 mm de geometría de placas paralelas de acero inoxidable (TA Instruments, New Castle, DE) y el acero inoxidable de 20mm la geometría de la placa paralela de acero se redujo a una distancia de separación de 600 μ m usando un control de fuerza normal de 0,25N. Col, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+decorina, colágeno + decorina; Col+DS-SYIR, colágeno + sulfato de dermatán-SYIR; Col+DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY; Col+SILY, péptido SILY; Col+SYIR, colágeno + péptido SYIR.
- 45 FIGURA 11. Medición del módulo de corte de muestras de gel (4mg/mL colágeno, colágeno 30:1: tratamiento) en un reómetro AR-G2 con geometría de placa paralela de acero inoxidable de 20 mm (TA Instruments, New Castle, DE) y acero inoxidable de 20 mm. la geometría de la placa paralela de acero se redujo a una distancia de separación de 600 μ m usando un control de fuerza normal de 0,25N. Col, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+decorina, colágeno + decorina; Col+DS-SYIR, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SYIR; Col+DS-SILY, colágeno + sulfato de dermatán-SILY conjugado; Col+SILY, colágeno + péptido SILY; Col+SYIR, colágeno + péptido SYIR.
- 50 FIGURA 12. Medición del módulo de corte de muestras de gel (1,5mg/mL colágeno III, colágeno 5:1: tratamiento) en un reómetro AR-G2 con geometría de placa paralela de acero inoxidable de 20 mm (TA Instruments, New Castle, DE), y la geometría de la placa paralela de acero inoxidable de 20 mm se redujo a una distancia de separación de 500 μ m usando un control de fuerza normal de 0,25N. \blacklozenge - sin tratamiento, es decir, colágeno III solo; \blacksquare - colágeno + sulfato de dermatán (1:1); $+$ - colágeno + sulfato de dermatán (5:1); \times - conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-KELNLVYTGC (DS-KELN) (1:1); \blacktriangle - colágeno + sulfato de dermatán-KELN conjugado (5:1); \bullet - colágeno + péptido KELNLVYTGC (KELN).
- 55 FIGURA 13. Medición del módulo de corte de las muestras de gel (1,5mg/mL colágeno III, colágeno 5:1: tratamiento) en un reómetro AR-G2 con geometría de placa paralela de acero inoxidable de 20 mm (TA Instruments, New Castle, DE), y La geometría de la placa paralela de acero inoxidable de 20 mm se redujo a una distancia de separación de 500 μ m usando un control de fuerza normal de 0,25N. \blacklozenge - sin tratamiento, es decir,
- 60
- 65

colágeno III solo; ■ - colágeno + sulfato de dermatán (1:1); + - colágeno + sulfato de dermatán (5:1); x - conjugado colágeno + sulfato de dermatán-GSIT (DS-GSIT) (1:1); ▲ - conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-GSIT (5:1); ● - colágeno + péptido GSITTIDVPPWNVGC (GSIT).

FIGURA 14. Medición de la turbidez. Las soluciones de gel se prepararon como se describe en el EJEMPLO 16 (colágeno 4 mg/ml y 10:1 de colágeno para el tratamiento, a menos que se indique lo contrario) y se añadieron 50 ml/pocillo a 4°C a una placa de 384 pocillos. La placa se mantuvo a 4°C durante 4 horas antes de iniciar la formación de fibrillas. Se usó un SpectraMax M5 a 37°C para medir la absorbancia a 313 nm a intervalos de 30 s durante 6 horas. Col, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; DS, colágeno + sulfato de dermatán; decorina, colágeno + decorina; DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY; DS-SYIR, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SYIR.

FIGURA 15. Medición de la turbidez. Las soluciones de gel se prepararon como se describe en el EJEMPLO 16 (colágeno 4 mg/ml y 10:1 de colágeno para el tratamiento, a menos que se indique lo contrario) y se añadieron 50 ml/pocillo a 4°C a una placa de 384 pocillos. La placa se mantuvo a 4°C durante 4 horas antes de iniciar la formación de fibrillas. Se usó un SpectraMax M5 a 37°C para medir la absorbancia a 313 nm a intervalos de 30 s durante 6 horas. Col, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; DS, colágeno + sulfato de dermatán; decorina, colágeno + decorina; DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY.

FIGURA 16. Medición de la turbidez. Las soluciones de gel se prepararon como se describe en el EJEMPLO 16 (colágeno 4 mg/ml y colágeno 1:1 a tratamiento, a menos que se indique lo contrario) y se agregaron 50 ml/pocillo a 4°C a una placa de 384 pocillos. La placa se mantuvo a 4°C durante 4 horas antes de iniciar la formación de fibrillas. Se usó un SpectraMax M5 a 37°C para medir la absorbancia a 313 nm a intervalos de 30 s durante 6 horas. Col, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; DS, colágeno + sulfato de dermatán 10:1; SILY, colágeno + péptido SILY; SYIR, colágeno + péptido SYIR.

FIGURA 17. Vida media de la fibrillogénesis medida a partir de los datos presentados en la FIGURA 14. Col, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; DS, colágeno + sulfato de dermatán; decorina, colágeno + decorina; DS-SILY, conjugado colágeno + sulfato de dermatán-SILY; DS-SYIR, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SYIR.

FIGURA 18. Imágenes de microscopía de reflexión confocal preparadas de acuerdo con el EJEMPLO 16 (4 mg/ml de colágeno, 10:1 colágeno: tratamiento) registradas con un microscopio confocal Olympus FV1000 utilizando una lente de inmersión en agua 60X, 1,4 NA. Las muestras se iluminaron con luz láser de 488 nm y la luz reflejada se detectó con un tubo fotomultiplicador utilizando un filtro de reflexión azul. Se tomaron imágenes de cada gel a 100 µm de la parte inferior del gel, y se tomaron imágenes de tres ubicaciones separadas para garantizar un muestreo representativo. Colágeno, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+Decorina, colágeno + Decorina; Col+DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY; Col+DS-SYIR, conjugado colágeno + sulfato de dermatán-SYIR.

FIGURA 19. Imágenes de microscopía electrónica de crio-barrido de la estructura del gel con un aumento de 5000. Se formaron geles para crio-SEM, como en el EJEMPLO 16 (4mg/mL colágeno, 10:1 colágeno: tratamiento), directamente en la etapa SEM y se incubó a 37°C durante la noche. Cada muestra se evaporó bajo condiciones de sublimación durante 20 min. La muestra se recubrió con recubrimiento de pulverización de platino durante 120 s. Las muestras se transfirieron a la etapa criogénica a -130°C y se tomaron imágenes de las regiones con una orientación similar para la comparación entre los tratamientos. Colágeno, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+Decorina, colágeno + Decorina; Col+DS-SILY, colágeno + sulfato de dermatán-SILY conjugado; Col+DS-SYIR, conjugado colágeno + sulfato de dermatán-SYIR.

FIGURA 20. Imágenes de microscopía electrónica de crio-barrido de la estructura del gel con un aumento de 5000. Se formaron geles para crio-SEM, como se describe en el EJEMPLO 22 (1 mg/ml de colágeno (Tipo III), colágeno 1:1: tratamiento), directamente en la etapa SEM. Se tomaron imágenes de regiones con orientación similar para la comparación entre tratamientos. Panel a, colágeno, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; Panel b, colágeno + sulfato de dermatán; Panel c, conjugado colágeno + sulfato de dermatán-KELN; Panel d, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-GSIT.

FIGURA 21. La fracción de espacio vacío promedio medida a partir de las imágenes Cryo-SEM mostradas en la FIGURA 20. a) Colágeno, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; b) colágeno + sulfato de dermatán; c) conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-KELN; d) conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-GSIT. Todas las diferencias son significativas con $p = 0,05$.

FIGURA 22. El diámetro promedio de las fibrillas medido a partir de las imágenes de Cryo-SEM que se muestran en la FIGURA 19. Colágeno, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+Decorina, colágeno + Decorina; Col+DS-SILY, colágeno + sulfato de dermatán-SILY conjugado; Col+DS-SYIR, conjugado colágeno + sulfato de dermatán-SYIR.

FIGURA 23. La distancia promedio entre láminas de colágeno medida a partir de las imágenes de Cryo-SEM mostradas en la FIGURA 19. Colágeno, sin tratamiento, es decir, solo colágeno; Col+DS, colágeno + sulfato de dermatán; Col+Decorina, colágeno + Decorina; Col+DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY; Col+DS-SYIR, conjugado colágeno + sulfato de dermatán-SYIR.

FIGURA 24. Medición de la absorbancia a 343 nm antes del tratamiento de heparina oxidada conjugada a PDPH, y después del tratamiento con SILY, que libera 2-piridiltiol del conjugado y permite la determinación de la proporción de péptido SILY conjugado con heparina oxidada. El ΔA medido corresponde a 5,44 moléculas SILY/heparina oxidada.

FIGURA 25. Medición de la proliferación de células del músculo liso de la arteria coronaria humana en geles de

colágeno preparados con peptidoglicanos sintéticos que se unen al colágeno. Colágeno, sin tratamiento, es decir, colágeno solo; DS, colágeno + sulfato de dermatán; DS-SILY, conjugado de colágeno + sulfato de dermatán-SILY; DS-SYIR, colágeno + conjugación de sulfato de dermatán-SYIR; SILY, colágeno + péptido SILY; y SYIR, colágeno + péptido SYIR.

5 FIGURA 26. Caracterización de la conjugación DS-SILY. Después de 2 horas, un ΔA 343nm final correspondió a 1,06 moléculas SILY agregadas a cada molécula DS. Tenga en cuenta que $t = 0$ es un punto de tiempo aproximado de cero debido al ligero retraso entre la adición de SILY al DS-PDPH y la medición de la solución a 343 nm.

10 FIGURA 27. Conjugación de Dc13 a DS. La producción de piridina-2-tiona medida por un aumento en la absorbancia a 343 nm indica 0,99 péptidos Dc13 por cadena de polímero DS.

FIGURA 28. Unión de fluorescencia de microplaca de DS-ZDc13 al colágeno. DS-ZDc13 se unió específicamente a la superficie del colágeno de una manera dependiente de la dosis.

15 FIGURA 29. Fibrillogénesis De Colágeno Por Mediciones De Turbidez. DS-Dc13 retrasa la fibrillogénesis y disminuye la absorbancia general de una manera dependiente de la dosis. El péptido Dc13 libre, por el contrario, parece tener poco efecto sobre la fibrillogénesis en comparación con el colágeno solo en la proporción alta de colágeno: molar aditivo de 1:1.

20 FIGURA 30. Diámetro medio de fibrillas de Crio-SEM. A. La decorina y los peptidoglicanos sintéticos disminuyen significativamente el diámetro de las fibrillas sobre el colágeno o el colágeno + DS. B. En comparación con el colágeno solo, el péptido libre Dc13 no afecta el diámetro de las fibrillas, mientras que SILY produce una disminución en el diámetro de las fibrillas.

25 FIGURA 31. Compactación en gel. A. y B. Días 3 y 5, respectivamente: la decorina y los peptidoglicanos son significativos en relación con el colágeno y el DS, * indica que DS-Dc13 y DS no son significativos en el día 3. Las barras no indican significación. C. Día 7: + La decorina es significativa contra todas las muestras, # DS es significativa en comparación con el colágeno. D. Día 10: ++ el colágeno y el DS son significativos, ‡ DS-Dc13 es significativo en comparación con la decorina y el colágeno.

30 FIGURA 32. Estimación de elastina por ensayo Fastin. A. DS-SILY aumentó significativamente la producción de elastina en todas las muestras. DS y DS-Dc13 disminuyeron significativamente la producción de elastina sobre el colágeno. Las muestras de control de geles de colágeno sin células no mostraron producción de elastina. B. Los péptidos libres dieron como resultado una ligera disminución en la producción de elastina en comparación con el colágeno, pero ningún punto fue significativo.

35 FIGURA 33. Imágenes SEM de portaobjetos incubadas con plasma rico en plaquetas. Las flechas en el tratamiento con heparina-SILY indican estructuras similares a las fibrillas únicas de este tratamiento. Barra de escala = 100 μm .

FIGURA 34. Densidad de fibrillas de Crio-SEM. Densidad de fibrillas, definida como la relación entre el área que contiene fibrillas y el espacio vacío. DS-SILY y el péptido SILY libre tenían una densidad de fibrillas significativamente mayor, mientras que el colágeno tenía una densidad de fibrillas significativamente más baja. DS-Dc13 no fue significativo en comparación con el colágeno.

40 FIGURA 35. Módulo de almacenamiento (G') de geles de colágeno. Ensayos mecánicos reológicos de geles de colágeno formados con cada aditivo a A. 5:1 B. 10:1 y C. Relación molar 30:1 de colágeno: aditivo. Se realizaron barridos de frecuencia de 0,1 Hz a 1,0 Hz con una tensión controlada de 1,0 Pa. Se presentan $G'_{\text{avg}} \pm \text{S.E.}$

FIGURA 36. Ensayos de proliferación celular y citotoxicidad. No se encontraron diferencias significativas entre todos los aditivos en A. CyQuant B. Ensayos Vivos y C. Muertos.

45 FIGURA 37. Imágenes crio-SEM para la densidad de la fibrilla. Los geles de colágeno se formaron en presencia de cada aditivo en una proporción molar 10:1 de colágeno: aditivo. A. DS, Decorina, o peptidoglicanos. B. Péptidos libres. Las imágenes se toman a 10.000x, barra de escala = 5 μm .

FIGURA 38. Imágenes de AFM de geles de colágeno. Se formaron geles de colágeno en presencia de cada aditivo en una proporción molar de 10:1 de colágeno: aditivo. Se observa banda D para todos los aditivos. Las imágenes son de 1 μm^2 .

50 FIGURA 39. Inhibición de la activación plaquetaria. Medida determinando la liberación de factores de activación Factor Plaquetario 4 (PF-4) y β -tromboglobulina (Nap-2). El colágeno inmovilizado en la superficie de una placa de 96 pocillos se incubó previamente con cada tratamiento y posteriormente se incubó con plasma rico en plaquetas (PRP). Los valores se informan como un porcentaje del factor de activación liberado por el tratamiento en comparación con la cantidad de factor de activación liberado por el tratamiento de control (solución salina tamponada con fosfato, PBS). El * indica que la diferencia es significativa en comparación con la superficie de colágeno sin tratamiento (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Dex, dextrano; Dex-SILY9, conjugado de dextrano-(SILY)₉; Hep, heparina; Hep-SILY, conjugado de heparina-SILY; HA, hialuronano; HA-SILY, conjugado hialuronano-SILY; Péptido SILY, SILY. Debido a los límites de solubilidad, se incubaron Hep, Hep-SILY, HA y HA-SILY a 25 μM . Todos los demás tratamientos fueron a 50 μM (después de que se retiró el tratamiento, las placas se lavaron con PBS <1 min, antes de la adición de PRP). Los conjugados de Hep y HA (ácido hialurónico) contenían aproximadamente 4 péptidos por polisacárido.

60 FIGURA 40. Inhibición de la activación plaquetaria. Medida determinando la liberación de factores de activación Factor Plaquetario 4 (PF-4) y β -tromboglobulina (Nap-2). El colágeno inmovilizado en la superficie de una placa de 96 pocillos se incubó previamente con cada tratamiento y posteriormente se incubó con plasma rico en plaquetas (PRP). Los valores se informan como un porcentaje del factor de activación liberado por el tratamiento en comparación con la cantidad de factor de activación liberado por el tratamiento de control (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Dex, dextrano; Dex-SILY6, conjugado de dextrano-(SILY)₆; Hep, heparina; Hep-

GSIT, conjugado de heparina-GSIT; GSIT, péptido GSIT; Péptido SILY, SILY. Los valores medidos para todos los tratamientos son significativos frente a PBS. Dex, SILY y Dex-SILY6 están a 25 μm , todos los demás tratamientos son a 50 μm . El ** indica que el valor para el tratamiento con Hep-GSIT fue significativo en comparación con los valores para el tratamiento de Hep, similarmente el valor para el tratamiento con Dex-SILY6 fue significativo en comparación con el valor para el tratamiento con Dex para PF4. (Después de retirar el tratamiento, las placas se enjuagaron durante 20 minutos). Los conjugados de Hep contenían aproximadamente 4 péptidos por polisacárido.

FIGURA 41. Inhibición de la unión de plaquetas al colágeno mediante un ensayo colorimétrico. El colágeno inmovilizado en la superficie de una placa de 96 pocillos se incubó previamente con cada tratamiento y posteriormente se incubó con plasma rico en plaquetas (PRP). El ensayo de microplaca preparado como se describe se preincubó con tratamientos con colágeno, solo PBS; Dextrano; Dex-SILY6, dextrano-(SILY)₆; Péptido SILY, SILY. * Significativo vs. colágeno (sin tratamiento).

FIGURA 42. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Sin tratamiento, es decir, colágeno tratado con PBS.

FIGURA 43. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: dextrano.

FIGURA 44. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: conjugado de dextrano-SILY9

FIGURA 45. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Sin tratamiento, es decir, colágeno tratado con PBS.

FIGURA 46. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: hialuronano.

FIGURA 47. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: conjugado hialurónico-SILY.

FIGURA 48. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Sin tratamiento, es decir, colágeno tratado con PBS.

FIGURA 49. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: heparina.

FIGURA 50. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: conjugado heparina-SILY.

FIGURA 51. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Sin tratamiento, es decir, colágeno tratado con PBS.

FIGURA 52. Imagen de fluorescencia de plaquetas adheridas. Las plaquetas adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y la actina plaquetaria se marcó con faloidina-AlexaFluor 488. Se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas utilizando un microscopio de fluorescencia vertical utilizando un filtro DAPI. Tratamiento: péptido SILY.

FIGURA 53. Degradación del colágeno determinada por hidroxiprolina. Tratamientos: Ctrl, sin células añadidas; Col, colágeno sin tratamiento añadido; DS, sulfato de dermatán; Decorina; DS-SILY, conjugado de dermatán sulfato-SILY; DS-Dc13, conjugado de dermatán sulfato Dc13; SILY, péptido SILY; Dc13, péptido dc13.

FIGURA 54. Inhibición de la activación plaquetaria. Medida determinando la liberación de factores de activación Factor Plaquetario 4 (PF-4) y β -tromboglobulina (Nap-2). Los geles de colágeno tipo I y III en la superficie de una placa de 96 pocillos se preincubaron con cada tratamiento y posteriormente se incubaron con PRP. La activación de las plaquetas se midió mediante la liberación de los factores de activación PF-4 y Nap-2. Tratamientos: PBS, tampón solo; Dex, dextrano; Dex-SILY, conjugado de dextrano-SILY; Dex-GSIT, conjugado de dextrano-GSIT; Dex-KELN, conjugado dextrano-KELN; Dex-Dc13, conjugado de dextrano-Dc13; SILY, péptido SILY; GSIT, péptido GSIT; KELN, péptido KELN; Dc13, péptido Dc13; Dex-SILY + Dex-GSIT; combinación de conjugado

dextrano-SILY y conjugado de dextrano-GSIT; SILY + GSIT; Combinación de péptido SILY y péptido GSIT. * Indica que los resultados son significativos en comparación con la superficie de colágeno sin tratamiento (PBS).

** Indica que los resultados también son significativos en comparación con la superficie de colágeno con Dex. ***

Indica que los resultados también son significativos en comparación con la superficie de colágeno con el control de péptidos correspondiente. Todos los peptidoglicanos causaron una disminución significativa en la liberación de NAP-2 en comparación con ningún tratamiento (PBS) o tratamiento con dextrano, mientras que Dex-GSIT además disminuyó la liberación sobre su control de péptidos (GSIT). Dex-GSIT y Dex-KELN disminuyeron significativamente la liberación de PF-4 en relación con ningún tratamiento (PBS) y el tratamiento con dextrano, mientras que Dex-Dc13 disminuyó significativamente la liberación de PF-4 sobre ningún tratamiento (PBS).

FIGURA 55. Inhibición de la unión de plaquetas al colágeno (adhesión) mediante un ensayo colorimétrico. Tratamientos: PBS, tampón solo; Dex, dextrano; Dex-SILY, conjugado de dextrano-SILY; Dex-GSIT, conjugado de dextrano-GSIT; Dex-KELN, conjugado de dextrano-KELN; Dex-Dc13, conjugado de dextrano-Dc13; SILY, péptido SILY; GSIT, péptido GSIT; KELN, péptido KELN; Dc13, péptido Dc13; Dex-SILY + Dex-GSIT; combinación de conjugado dextrano-SILY y conjugado de dextrano-GSIT; SILY + GSIT; combinación de péptido SILY y péptido GSIT. * Superficie significativa frente a colágeno sin tratamiento (PBS). ** También significativo contra la superficie de colágeno con Dex. *** También significativo contra la superficie de colágeno con el control peptídico correspondiente. Dex-SILY y Dex-KELN tuvieron una disminución significativa de la adherencia de las plaquetas en comparación con el tratamiento sin tratamiento (PBS) o con el tratamiento con Dextran, mientras que Dex-GSIT también disminuyó la adherencia de las plaquetas sobre su tratamiento de control de péptidos (GSIT).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0014] Tal como se utiliza de acuerdo con esta invención, un "peptidoglicano sintético de unión a colágeno" significa un conjugado de un glicano de unión con un péptido sintético colágeno. Los "peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno" pueden tener una homología de aminoácidos con una porción de una proteína o un proteoglicano que normalmente no participa en la fibrillogénesis del colágeno. Estos peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno se denominan en el presente documento "peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno aberrantes". Los peptidoglicanos sintéticos aberrantes que se unen al colágeno pueden o no afectar la fibrillogénesis del colágeno. Otros peptidoglicanos sintéticos de unión al colágeno pueden tener una homología de aminoácidos con una porción de una proteína o con un proteoglicano normalmente involucrado en la fibrillogénesis del colágeno. Estos peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno se denominan en el presente documento "peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno fibrillogénicos".

[0015] Como se usa en el presente documento una "matriz de colágeno" significa una matriz de colágeno en el que el colágeno se polimeriza *in vitro* en combinación con un peptidoglicano sintético de unión a colágeno bajo condiciones predeterminadas que pueden ser variados y se seleccionan del grupo que consiste en, pero no limitado a, pH, concentración de fosfato, temperatura, composición del tampón, fuerza iónica, y composición y concentración del colágeno.

[0016] Como se usa en el presente documento una "construcción de injerto" significa una construcción de injerto que comprende una "matriz de colágeno."

[0017] En una descripción, se proporciona una matriz de colágeno. La matriz de colágeno diseñada comprende colágeno y un peptidoglicano sintético que se une al colágeno. En una descripción, la matriz de colágeno diseñada puede no estar reticulada. En otra descripción, la matriz puede estar reticulada. En diversas descripciones ilustrativas, se pueden agregar agentes de reticulación, tales como carbodiimidias, aldehídos, lisil-oxidasa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres, hidrazidas y maleimidias, así como varios agentes de reticulación naturales, incluyendo genipina y similares, Durante o después de la polimerización del colágeno en solución.

[0018] En diversas revelaciones ilustrativas, el colágeno utilizado en la presente memoria para preparar una matriz de colágeno puede ser cualquier tipo de colágeno, incluyendo colágeno de los tipos I a XXVIII, solo o en cualquier combinación, por ejemplo, colágeno de los tipos I, II, III, y/o IV puede ser utilizado. En una descripción, la matriz de colágeno diseñada se forma utilizando colágeno comercialmente disponible (P. ej., Sigma, St. Louis, MO). En una descripción alternativa, el colágeno se puede purificar a partir de tejido que contiene submucosa, como el tejido intestinal, la vejiga urinaria o el estómago. En una descripción adicional, el colágeno se puede purificar a partir del tendón de la cola. En una descripción adicional, el colágeno se puede purificar de la piel. En diversos aspectos, el colágeno también puede contener proteínas no colágenas endógenas o agregadas exógenamente además de los peptidoglicanos sintéticos de unión al colágeno, como fibronectina o proteínas de la seda, glicoproteínas y polisacáridos, o similares. Las construcciones de injerto diseñadas o las matrices de colágeno preparadas mediante los métodos descritos en este documento pueden servir como construcciones para el recrecimiento de tejidos endógenos en el sitio de implantación (P. ej., remodelación biológica) que pueden asumir las características distintivas de los tejidos con los que están asociados en el lugar de implantación o inyección.

[0019] En varios aspectos ilustrativos, los peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno usados para formar las construcciones de injerto o matrices de colágeno fabricadas de acuerdo con la invención comprenden péptidos

- 5 sintéticos de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos. En algunas realizaciones, estos péptidos tienen homología con la secuencia de aminoácidos de un pequeño proteoglicano rico en leucina o una secuencia del receptor de plaquetas. En diversas realizaciones, el péptido sintético comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RRANAALKAGELYKSILYGC, RLDGNEIKRGC, AHEEISTTNEGVMGC, NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPPLKRFPVQGC, CQDSETRTFY, TKKTLRTGC, GLRSKSKKFRPDIQYDPDATDEDITSHMGC, SQNPVQPGC, SYIRIADTNITGC, SYIRIADTNIT, KELNLVYT, KELNLVYTGC, GSITTIDVPWNV, y GSITTIDVPWNVGC. En otra realización, el péptido sintético puede comprender o puede ser una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RRANAALKAGELYKSILYGC, RLDGNEIKRGC, AHEEISTTNEGVMGC, NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPPLKRFPVQGC, CQDSETRTFY, TKKTLRTGC, GLRSKSKKFRPDIQYDPDATDEDITSHMGC, SQNPVQPGC, SYIRIADTNITGC, SYIRIADTNIT, KELNLVYT, KELNLVYTGC, GSITTIDVPWNV, GSITTIDVPWNVGC, y una secuencia de aminoácidos con 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de homología con cualquiera de estas catorce secuencias de aminoácidos. El péptido sintético también puede ser cualquier péptido de 5 a 40 aminoácidos seleccionados de péptidos que tienen actividad de unión a colágeno y que son 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 100% homólogos con el dominio de unión a colágeno del factor de von Willebrand o un receptor de colágeno plaquetario que se describe en Chiang, et al., J. Biol. Chem. 277: 34896-34901 (2002), Huizinga, et al., Structure 5:1147-1156 (1997), Romijn, et al., J. Biol. Chem. 278: 15035-15039 (2003), y Chiang, et al., Cardio. & Haemato. Disorders-Drug Targets 7: 71-75 (2007), cada uno incorporado aquí como referencia.
- 10
- 15
- 20 **[0020]** El glicano (por ejemplo glicosaminoglicanos, GAG abreviada, o polisacárido) unido al péptido sintético se puede seleccionar del grupo que consiste de alginato, agarosa, dextrano, condroitina, dermatano, sulfato de dermatano, heparano, heparina, queratina, y hialuronano. En una realización, el glicano se selecciona del grupo que consiste en sulfato de dermatán, dextrano y heparina.
- 25 **[0021]** En un aspecto ilustrativo, la matriz de colágeno o la construcción de injerto se pueden esterilizar. Como se usa en este documento, "esterilización" o "esterilizar" o "esterilizado" significa desinfectar la matriz o el injerto mediante la eliminación de contaminantes no deseados que incluyen, entre otros, endotoxinas, contaminantes de ácidos nucleicos y agentes infecciosos.
- 30 **[0022]** En diversas revelaciones ilustrativas, la matriz de colágeno o construcción de injerto se puede desinfectar y/o esterilizar utilizando técnicas de esterilización convencionales, incluyendo curtido con glutaraldehído, el curtido con formaldehído a pH ácido, óxido de propileno o tratamiento con óxido de etileno, esterilización con plasma de gas, radiación gamma, haz de electrones y/o esterilización con un perácido, como el ácido peracético. Se pueden usar técnicas de esterilización que no afecten adversamente la estructura y las propiedades biotrópicas de la matriz o construcción. Técnicas ilustrativas de esterilización son exponer la construcción de injerto o la matriz de colágeno modificada, a ácido peracético, a una irradiación gamma de 1-4 Mrads (o 1-2.5 Mrads de irradiación gamma), a un tratamiento con óxido de etileno o a una esterilización con gas plasma. En una realización, el constructo de injerto diseñado puede someterse a uno o más procesos de esterilización. En las descripciones ilustrativas, el colágeno en solución también se puede esterilizar o desinfectar. La matriz de colágeno diseñada o el constructo de injerto diseñado puede involucrarse en cualquier tipo de contenedor que incluya una envoltura de plástico o una envoltura de lámina, y puede esterilizarse más.
- 35
- 40
- 45 **[0023]** En cualquiera de estas divulgaciones la construcción de injerto o matriz de colágeno puede comprender además una población adicional de células. La población añadida de células puede comprender una o más poblaciones celulares. En diversas descripciones, las poblaciones celulares comprenden una población de células epiteliales no queratinizadas o queratinizadas o una población de células seleccionadas del grupo que consiste en células endoteliales, células derivadas mesodérmicamente, células mesoteliales, células sinoviocíticas, células neuronales, células gliales, osteoblastos, fibroblastos, condrocitos, tenocitos, células de músculo liso, células de músculo esquelético, células de músculo cardíaco, células progenitoras de potencial múltiple (P. ej., células madre, incluidas células progenitoras de médula ósea) y células osteogénicas. En diversas descripciones, el constructo de injerto o la matriz de colágeno puede sembrarse con uno o más tipos de células en combinación.
- 50
- 55 **[0024]** En varios aspectos, las matrices de colágeno o construcciones de injerto de la presente invención se pueden combinar con nutrientes, incluyendo minerales, aminoácidos, azúcares, péptidos, proteínas, vitaminas (tales como ácido ascórbico), o laminina, fibronectina, ácido hialurónico, fibrina, elastina o agregan, o factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento transformante beta o factor de crecimiento de fibroblastos, y glucocorticoides como dexametasona o agentes alteradores viscoelásticos, tales como iónicos y no polímeros solubles en agua iónicos; polímeros de ácido acrílico; polímeros hidrófilos tales como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y alcohol polivinílico; polímeros celulósicos y derivados de polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, metil celulosa, carboximetil celulosa y celulosa eterificada; ácido poli(láctico), ácido poli(glicólico), copolímeros de ácidos láctico y glicólico, u otros agentes poliméricos tanto naturales como sintéticos. En otras descripciones ilustrativas, los agentes de reticulación, tales como carbodiimidias, aldehídos, lisil-oxidasa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres, hidrazidas y maleimidias, así como los agentes de reticulación natural, incluida la genipina, se pueden agregar antes, concurrentes con, o después de la adición de las células.
- 60
- 65

- 5 **[0025]** Como se discutió anteriormente, de acuerdo con una divulgación, las células se pueden añadir a las matrices de colágeno o construcciones de injerto después de la polimerización del colágeno o durante la polimerización de colágeno. Las matrices de colágeno diseñadas que comprenden las células pueden inyectarse o implantarse posteriormente en un huésped para su uso como construcciones de injerto diseñadas. En otra descripción, las células en o dentro de las matrices de colágeno diseñadas pueden cultivarse *in vitro*, durante un período de tiempo predeterminado, para aumentar el número de células o para inducir la remodelación deseada antes de la implantación o inyección en un huésped.
- 10 **[0026]** De acuerdo con una descripción, se proporciona un kit que comprende la matriz de colágeno o construcción de injerto. El kit en sí puede estar dentro de un contenedor de cualquier tipo, y el kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes del kit. En una descripción, las células pueden constituir un componente del kit. En diversas descripciones, pueden variar las características de las matrices de colágeno diseñadas. En diversas realizaciones ilustrativas, la matriz de colágeno modificada o el constructo de injerto manipulado en el kit pueden comprender varios otros componentes, que incluyen proteínas y polisacáridos no colágenos, además del peptidoglicano sintético que se une al colágeno. En una descripción, el kit comprende un recipiente, vial, recipiente, bolsa o envoltura, P. ej., que contiene una matriz de colágeno diseñada o una construcción de injerto diseñada. En otra descripción, el kit comprende vasos separados (P. ej., un vial, recipiente, bolsa o envoltura), cada uno de los cuales contiene uno de los siguientes componentes: una solución de colágeno o colágeno liofilizado y uno o más tipos de peptidoglicanos sintéticos de unión al colágeno. En otra descripción, el kit comprende vasos separados, cada uno de los cuales contiene uno de los siguientes componentes: una solución de colágeno o colágeno liofilizado, un tampón y uno o más tipos de peptidoglicanos sintéticos que se unen al colágeno. En cualquiera de estas descripciones, los kits pueden comprender además un tampón, un agente de esterilización o desinfección, proteínas o polisacáridos no colágenos, y/o materiales de instrucción que describan métodos para usar los reactivos del kit o métodos para usar las matrices de colágeno modificadas o la construcción de injerto. El kit también puede contener uno o más tipos de peptidoglicanos sintéticos que se unen al colágeno para su uso como agentes farmacológicos en ausencia de una matriz de colágeno diseñada o una construcción de injerto diseñada. En esta descripción, el kit puede estar dentro de un contenedor de cualquier tipo, y el kit puede contener instrucciones para el uso de los peptidoglicanos sintéticos que se unen al colágeno.
- 20 **[0027]** En todavía otra descripción, el kit comprende además un recipiente (P. ej., un matraz, una ampolla, un vial, un tubo, o una botella, por ejemplo) de las células, incluyendo, pero no limitado a, una población de células epiteliales no queratinizadas o queratinizadas o una población de células seleccionadas del grupo que consiste en células endoteliales, células derivadas mesodérmicas, células mesoteliales, sinoviocitos, células neurales, células gliales, osteoblastos, fibroblastos, condrocitos, tenocitos, células de músculo liso, células del músculo esquelético, células musculares cardíacas, células progenitoras multipotenciales (P. ej., células madre, incluidas células progenitoras de médula ósea), y células osteogénicas. En otra descripción, las células pueden estar presentes en una placa. En una divulgación, se pueden incluir uno o más contenedores de células y el kit puede comprender uno o más reactivos de cultivo celular y de tipo celular.
- 30 **[0028]** En un aspecto ilustrativo, se proporciona un método de preparación de una matriz de colágeno. El método comprende los pasos de proporcionar una solución de colágeno, proporcionar un peptidoglicano sintético de unión a colágeno y polimerizar el colágeno en presencia del peptidoglicano sintético de unión a colágeno para formar la matriz de colágeno modificada. En diversas formas de realización, el peptidoglicano sintético de unión a colágeno puede ser un peptidoglicano sintético de unión a colágeno aberrante o un peptidoglicano sintético de unión a colágeno aberrante con homología de aminoácidos con una porción de la secuencia de aminoácidos de un proteoglicano que regula normalmente la fibrilgénesis de colágeno.
- 35 **[0029]** En divulgaciones donde el peptidoglicano sintético de unión a colágeno es un peptidoglicano sintético de unión a colágeno aberrante o un peptidoglicano sintético de unión a colágeno fibrilogénico, se proporciona un método de alterar la estructura o las características mecánicas de una matriz de colágeno. Como se usa en este documento, "alterar" significa cambiar las características mecánicas o estructurales de una matriz de colágeno polimerizada *in vitro* en presencia del peptidoglicano sintético de unión al colágeno en relación con la de una matriz de colágeno polimerizada en ausencia del peptidoglicano sintético de unión al colágeno. El método comprende las etapas de proporcionar una solución de colágeno, proporcionar un peptidoglicano sintético de unión a colágeno y polimerizar el colágeno en presencia del peptidoglicano sintético de unión a colágeno (P. ej., peptidoglicano sintético de unión a colágeno aberrante o fibrilogénico) para formar la matriz de colágeno alterada.
- 40 **[0030]** En una descripción ilustrativa, la solución de colágeno proporcionada puede tener una concentración de colágeno que varía de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml. En diversas realizaciones, la concentración de colágeno puede variar de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, y aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml.
- 45 **[0031]** Como se discutió anteriormente, en diversos aspectos ilustrativos, los peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno utilizados para formar las construcciones de injerto o matrices de colágeno fabricadas de acuerdo con la

invención comprenden péptidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos con homología a la secuencia de aminoácido de un pequeño proteoglicano rico en leucina o una secuencia del receptor de plaquetas. En diversas realizaciones, el péptido sintético comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RRANAALKAGELYKSILYGC, RLDGNEIKRGC, AHEEISTTNEGVMGC, CQDSETRTFY, TKKTLRTGC, GLRSKSKKFRPDIQYPDATDEDITSHMGC, SQNPVQPGC, SYIRIADTNITGC, SYIRIADTNIT, KELNLVYT, KELNLVYTGC, GSITTIDVPWNV, NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQGC, y GSITTIDVPWNVGC. En otra realización, el péptido sintético puede comprender o puede ser una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de RRANAALKAGELYKSILYGC, RLDGNEIKRGC, AHEEISTTNEGVMGC, NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPLKRFPVQGC, CQDSETRTFY, TKKTLRTGC, GLRSKSKKFRPDIQYPDATDEDITSHMGC, SQNPVQPGC, SYIRIADTNITGC, SYIRIADTNIT, KELNLVYT, KELNLVYTGC, GSITTIDVPWNV, GSITTIDVPWNVGC y una secuencia de aminoácidos con 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de homología con cualquiera de estas catorce secuencias de aminoácidos. El péptido sintético también puede ser cualquier péptido de 5 a 40 aminoácidos seleccionados de péptidos que tienen actividad de unión a colágeno y que son 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 100% homólogos al dominio de unión de colágeno del factor de von Willebrand o un receptor de colágeno plaquetario como se describe en Chiang, et al., J. Biol. Chem. 277: 34896-34901 (2002), Huizinga, et al., Structure 5:1147-1156 (1997), Romijn, et al., J. Biol. Chem. 278: 15035-15039 (2003), y Chiang, et al., Cardio. & Haemato. Disorders-Drug Targets 7: 71-75 (2007), cada uno incorporado aquí como referencia.

[0032] Los glicanos unidos al péptido sintético se pueden seleccionar del grupo que consiste de alginato, agarosa, dextrano, condroitina, dermatano, sulfato de dermatano, de heparano, heparina, queratina, y hialuronano. En una realización, el glicano se selecciona del grupo que consiste en sulfato de dermatán, dextrano y heparina. El peptidoglicano sintético que se une al colágeno se puede liofilizar antes de la polimerización, P. ej., en un tampón o en agua o en un ácido, como el ácido clorhídrico o el ácido acético. En un aspecto ilustrativo, la relación molar del colágeno al peptidoglicano sintético que se une al colágeno puede ser de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 40:1.

[0033] La etapa de polimerización se puede realizar en condiciones que son variadas donde las condiciones se seleccionan del grupo que consiste en pH, concentración de fosfato, temperatura, composición del tampón, fuerza iónica, los componentes específicos presentes, y la concentración del colágeno o de otros componentes presentes. En un aspecto ilustrativo, el colágeno u otros componentes, incluido el peptidoglicano sintético que se une al colágeno, se pueden liofilizar antes de la polimerización. El colágeno u otros componentes se pueden liofilizar en un ácido, como el ácido clorhídrico o el ácido acético.

[0034] En diversas realizaciones ilustrativas, la reacción de polimerización se lleva a cabo en una solución tamponada usando cualquier tampón biológicamente compatible conocido por los expertos en la técnica. P. ej., el tampón se puede seleccionar del grupo que consiste en solución salina tamponada con fosfato (PBS), clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), piperazina-n,n'-bis (2-ácido etanosulfónico) (PIPES), [n-(2-acetamido)]-2-ácido aminoetanosulfónico (ACES), N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico] (HEPES), y 1,3-bis[tris(hidroximetil) metilamino]propano (Bis Tris propano). En una realización, el tampón es PBS, Tris o MOPS y en una realización el sistema de amortiguación es PBS.

[0035] En diversas realizaciones ilustrativas, la etapa de polimerización se lleva a cabo a un pH seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 11, y en una realización polimerización se realiza a un pH seleccionado de la gama de alrededor de 6,0 a aproximadamente 9,0, y en una realización, la polimerización se realiza a un pH seleccionado del rango de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, y en otra realización la etapa de polimerización se realiza a un pH seleccionado del rango de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5, y en otra realización, la etapa de polimerización se realiza a un pH seleccionado del intervalo de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,4.

[0036] En otros aspectos ilustrativos, es también regulada la fuerza iónica de la solución tamponada. De acuerdo con una realización, la fuerza iónica del tampón se selecciona de un rango de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5 M, en otra realización la fuerza iónica se selecciona de un rango de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,90 M, en otra realización la fuerza iónica se selecciona de un intervalo de aproximadamente 0,14 a aproximadamente 0,30 M y en otra realización, la fuerza iónica se selecciona de un intervalo de aproximadamente 0,14 a aproximadamente 0,17 M.

[0037] En todavía otras realizaciones ilustrativas, la etapa de polimerización se lleva a cabo a temperaturas seleccionadas de la gama de alrededor de 0°C a aproximadamente 60°C. En otras realizaciones, la etapa de polimerización se lleva a cabo a temperaturas superiores a 20°C, y típicamente la polimerización se realiza a una temperatura seleccionada del rango de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, y más típicamente la temperatura se selecciona del rango de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C. En una realización ilustrativa, la polimerización se realiza a aproximadamente 37°C.

[0038] En aún otras realizaciones, la concentración de fosfato del tampón es variada. P. ej., en una realización, la concentración de fosfato se selecciona de un rango de aproximadamente 0,005 M a aproximadamente 0,5 M. En

otra realización ilustrativa, la concentración de fosfato se selecciona de un intervalo de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,2 M. En otra realización, la concentración de fosfato se selecciona de un rango de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,1 M. En otra realización ilustrativa, la concentración de fosfato se selecciona de un rango de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,03 M.

[0039] Las matrices de colágeno, incluyendo peptidoglicanos sintéticos de unión de colágeno, de la presente invención pueden combinarse, antes de, durante, o después de la polimerización, con nutrientes, incluyendo minerales, aminoácidos, azúcares, péptidos, proteínas, vitaminas (tales como ácido ascórbico), u otros compuestos tales como laminina y fibronectina, ácido hialurónico, fibrina, elastina y agrecano, o factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento endotelial vascular, o factor de crecimiento de fibroblastos y glucocorticoides tales como dexametasona, o agentes alteradores viscoelásticos, tales como polímeros iónicos y no iónicos solubles en agua; polímeros de ácido acrílico; polímeros hidrófilos tales como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y alcohol polivinílico; polímeros celulósicos y derivados poliméricos celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, metil celulosa, carboximetilcelulosa y celulosa eterificada; ácido poli(láctico), ácido poli(glicólico), copolímeros de ácidos láctico y glicólico, u otros agentes poliméricos tanto naturales como sintéticos.

[0040] De acuerdo con una divulgación, las células se pueden añadir en el último paso antes de la polimerización o después de la polimerización de la matriz de colágeno. En otras descripciones ilustrativas, se pueden añadir agentes de reticulación, tales como carbohidrimidas, aldehídos, lisil-oxidasa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres, hidrazidas y maleimidadas, y similares antes, durante o después de la polimerización.

[0041] En una descripción, la matriz de colágeno se forma usando colágeno comercialmente disponible (P. ej., Sigma, St. Louis, MO). En una descripción alternativa, el colágeno se puede purificar a partir de tejido que contiene submucosa, como el tejido intestinal, la vejiga urinaria o el estómago. En una descripción adicional, el colágeno se puede purificar a partir del tendón de la cola. En una realización adicional, el colágeno se puede purificar a partir de la piel.

[0042] En una descripción, los peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno con homología de aminoácidos con una porción de la secuencia de aminoácidos de un proteoglicano que normalmente regula la fibrillogénesis de colágeno o con homología de aminoácidos con una porción de una proteína o un péptido que normalmente no regula la fibrillogénesis se puede regular para formar una matriz de colágeno diseñada con las características mecánicas o estructurales deseadas. En otra descripción, los peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno aberrantes o los peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno fibrillogénicos se pueden usar para formar una matriz de colágeno diseñada con estructura o características mecánicas deseadas pero alteradas.

[0043] Las características deseadas estructurales, microestructurales, nanoestructurales, o mecánicas pueden, de manera ilustrativa, incluir longitud de fibrilla, diámetro de las fibrillas, la densidad de fibrillas, fracción de volumen de fibrillas, organización de fibrillas, la forma 3-dimensional o forma, y comportamiento viscoelástico, de tracción, de cizalladura, o compresivo (p . ej ., estrés por falla, tensión de falla y módulo), permeabilidad, tasa de degradación, hinchazón, propiedades de hidratación (P. ej., tasa e hinchazón) y propiedades de remodelación tisular *in vivo*, y respuestas celulares *in vitro* e *in vivo* deseadas. Las construcciones de injerto diseñadas y las matrices de colágeno diseñadas aquí descritas pueden tener biocompatibilidad deseable y propiedades de remodelación *in vitro* e *in vivo*, entre otras propiedades deseables.

[0044] Como se usa en el presente documento, un "módulo" puede ser un módulo elástico o lineal (definido por la pendiente de la región lineal de la curva tensión-deformación obtenida usando protocolos de ensayo mecánico convencional; es decir, rigidez), un módulo de compresión, un módulo complejo, o un módulo de almacenamiento de corte.

[0045] Como se usa en este documento, una "fracción de volumen de fibrilla" se define como el porcentaje de área de la superficie total ocupada por las fibrillas en una superficie de la sección transversal de la matriz en 3 dimensiones y "fracción de espacio vacío" se define como el porcentaje de área del área total no ocupada por fibrillas en una superficie de la sección transversal de la matriz en 3 dimensiones.

[0046] Las matrices de colágeno descritas en este documento comprenden fibrillas de colágeno que normalmente se empaquetan en un patrón escalonado dando la fibrilla un aspecto estriado característico o patrón de bandas a lo largo de su eje. En varias descripciones ilustrativas, las características microestructurales cualitativas y cuantitativas de las matrices de colágeno diseñadas se pueden determinar mediante microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, microscopía confocal, microscopía multifotónica de fotónica de segunda generación armónica. En otra realización, las propiedades de tracción, compresión y viscoelástica pueden determinarse mediante reometría o pruebas de tracción. Todos estos métodos son conocidos en la técnica o se describen con más detalle en la sección de Ejemplos de esta solicitud o en Roeder et al., J. Biomech. Ing., Vol. 124, pp. 214-222 (2002), en Pizzo et al., J. Appl. Physiol., Vol. 98, pp. 1-13 (2004), Fulzele et al., Eur. J. Pharm. Sci., Vol. 20, pp. 53-61 (2003), Griffey et al., J. Biomed. Mater. Res., Vol. 58, pp. 10-15 (2001), Hunt et al., Enm. J. Surg., Vol.

114, pp. 302-307 (1967), y Schilling et al., Surgery, vol. 46, pp. 702-710 (1959).

[0047] En cualquiera de la matriz de colágeno anteriormente descrita, construcción de injerto, kit, o revelaciones del método, el peptidoglicano sintético de unión a colágeno puede ser un compuesto de cualquiera de las siguientes fórmulas

5 A) P_nG_x en donde n es 1 a 10;
 en donde x es 1 a 10;
 en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno; y
 en donde G es un glicano.
 O

15 B) $(P_nL)_xG$ en donde n es 1 a 5;
 en donde x es 1 a 10;
 en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno;
 en donde L es un enlazador; y
 en donde G es un glicano.
 O

20 C) $P(LG_n)_x$ en donde n es 1 a 5;
 en donde x es 1 a 10;
 en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno;
 en donde L es un enlazador; y
 en donde G es un glicano.
 O

[0048] En realizaciones alternativas, se proporciona un compuesto de cualquiera de las siguientes fórmulas

30 A) P_nG_x en donde n es 1 a 10;
 en donde x es 1 a 10;
 en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno; y
 en donde G es un glicano.
 O

35 B) $(P_nL)_xG$ en donde n es 1 a 5;
 en donde x es 1 a 10;
 en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno;
 en donde L es un enlazador; y
 en donde G es un glicano.
 O

45 C) $P(LG_n)_x$ en donde n es 1 a 5;
 en donde x es 1 a 10;
 en donde P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de un dominio de unión a colágeno;
 en donde L es un enlazador; y
 en donde G es un glicano.
 O

[0049] En otra realización, un peptidoglicano sintético de unión a colágeno que comprende un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos con homología de secuencia de aminoácidos a un péptido de unión a colágeno (P. ej., una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión a colágeno o proteoglicano) conjugada a heparina, dextrano o hialuronano puede usarse para inhibir la activación de las plaquetas, para inhibir la unión de plaquetas al colágeno, o para limitar la trombosis o para formar una matriz de colágeno diseñada. En cualquiera de estas realizaciones, se puede usar cualquiera de los compuestos descritos anteriormente.

[0050] En otra realización, un peptidoglicano sintético de unión a colágeno que comprende un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de homología con un péptido de unión a colágeno (P. ej., una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína o proteoglicano de unión a colágeno) conjugado con heparina, dextrano o hialuronano se puede usar para inhibir la unión de las plaquetas al colágeno, la activación de las plaquetas o ambos. En cualquiera de estas realizaciones, se puede usar cualquiera de los compuestos descritos anteriormente.

[0051] En otra realización, los péptidos sintéticos descritos en este documento pueden ser modificados mediante la inclusión de una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Como es bien sabido por los expertos en la técnica, la alteración de cualquier aminoácido no crítico de un péptido mediante una sustitución conservadora no debería alterar significativamente la actividad de ese péptido porque la cadena lateral del aminoácido de reemplazo debería poder formar enlaces similares y contactos como la cadena lateral del aminoácido que ha sido reemplazada.

[0052] Las sustituciones no conservativas son posibles a condición de que no afecten excesivamente la actividad de unión de colágeno del péptido y/o reducen su eficacia en la alteración de la estructura o características mecánicas de una matriz de colágeno, en la inhibición de la activación de plaquetas, o en la inhibición de la adhesión de plaquetas (P. ej., unión) al colágeno.

[0053] Como es bien conocido en la técnica, una "sustitución conservadora" de un aminoácido o una "variante de sustitución conservadora" de un péptido se refiere a una sustitución de aminoácidos que mantiene: 1) la estructura secundaria del péptido; 2) la carga o hidrofobicidad del aminoácido; y 3) el volumen de la cadena lateral o una o más de estas características. Ilustrativamente, las terminologías bien conocidas "residuos hidrófilos" se refieren a serina o treonina. Los "residuos hidrófobos" se refieren a leucina, isoleucina, fenilalanina, valina o alanina, o similares. Los "residuos cargados positivamente" se refieren a lisina, arginina, ornitina o histidina. Los "residuos cargados negativamente" se refieren al ácido aspártico o al ácido glutámico. Los residuos que tienen "cadenas laterales voluminosas" se refieren a fenilalanina, triptófano o tirosina, o similares. En la Tabla 1 se proporciona una lista de sustituciones de aminoácidos conservativas ilustrativas.

TABLA 1

Para el aminoácido	Reemplazar con
Alanina	D-Ala, Gly, Aib, β-Ála, L-Cys, D-Cys
Arginina	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Asparagina	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β-Ála
Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Prolina	D-Pro
Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, alo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, alo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0054] En otra realización, un peptidoglicano sintético de unión a colágeno que comprende un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de homología con una porción de un péptido de unión a colágeno conjugado con la heparina se puede usar para inhibir la activación de las plaquetas, inhibir la unión de las plaquetas (P. ej., la adhesión) al colágeno, o para limitar la trombosis o para formar una matriz de colágeno diseñada. En otra realización, el peptidoglicano sintético de unión a colágeno conjugado a dextrano se puede usar para inhibir la activación plaquetaria, inhibir la unión de plaquetas al colágeno, o para limitar la trombosis o para formar una matriz de colágeno diseñada. En otra realización más, el peptidoglicano sintético de unión a colágeno conjugado con hialuronano puede usarse para inhibir la activación de plaquetas, inhibir la unión de plaquetas al colágeno, o para limitar la trombosis o para formar una matriz de colágeno diseñada. En cualquiera de estas realizaciones, se puede usar cualquiera de los compuestos descritos anteriormente.

[0055] En otra realización, un peptidoglicano sintético de unión a colágeno que comprende un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de homología con un péptido de unión a colágeno (P. ej., una porción de una secuencia de aminoácidos de un colágeno unión o se puede usar un proteoglicano conjugado con cualquier glicano, como por ejemplo heparina, dextrano o hialuronano para inhibir la unión de las plaquetas al colágeno, para inhibir la activación de las plaquetas o para limitar la trombosis. En cualquiera de estas realizaciones, se puede usar cualquiera de los compuestos descritos anteriormente.

5 [0056] En una realización, el péptido sintético se sintetiza de acuerdo con los protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida que son bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, un precursor peptídico se sintetiza sobre un soporte sólido de acuerdo con el protocolo de Fmoc bien conocido, se escinde del soporte con ácido trifluoroacético y se purifica por cromatografía de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

10 [0057] En otra realización, el péptido sintético se sintetiza utilizando los métodos de la biotecnología que son bien conocidos para las personas expertas en la técnica. En una realización, una secuencia de ADN que codifica la información de la secuencia de aminoácidos para el péptido deseado se liga mediante técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos en la técnica en un plásmido de expresión (P. ej., un plásmido que incorpora una etiqueta de afinidad para la purificación por afinidad de péptido), el plásmido se transfecta en un organismo huésped para su expresión, y el péptido se aísla luego del organismo huésped o del medio de crecimiento de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica (P. ej., mediante purificación por afinidad). Los métodos de tecnología de ADN recombinante se describen en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001), incorporados aquí como referencia, y son bien conocidos por el experto en la materia.

20 [0058] En una realización, el péptido sintético se conjuga con un glicano por reacción de un grupo amino libre del péptido con una función aldehído de los glicanos en presencia de un agente reductor, utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, para producir el péptido glicano conjugado. En una realización, se forma una función aldehído del glicano (P. ej., polisacárido o glicosaminoglicano) haciendo reaccionar el glicano con metaperyodato de sodio de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

25 [0059] En otra realización, el péptido sintético se conjuga con un glicano por reacción de una función aldehído del glicano con 3-(2-piridilditio)hidrazida de propionilo (PDPH) para formar un glicano intermedio y hacer reaccionar adicionalmente glicano el intermedio con una péptido que contiene un grupo tiol libre para producir el péptido glicano conjugado. En otra realización más, la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina-cisteína para proporcionar un punto de unión para un glicano o un conjugado de enlace de glicano.

30 [0060] Aunque las realizaciones específicas se han descrito en los párrafos anteriores, los peptidoglicanos sintéticos de unión de colágeno descritos en este documento pueden realizarse mediante el uso de cualquier método reconocido en la técnica para la conjugación del péptido al glicano (P. ej., polisacárido o glicosaminoglicano). Esto puede incluir enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno, ya sea directa o indirectamente a través de un grupo de enlace, como un enlazador divalente. El conjugado se forma típicamente mediante un enlace covalente del péptido al glicano a través de la formación de los enlaces amida, éster o imino entre los grupos ácido, aldehído, hidroxilo, amino o hidrazo en los componentes respectivos del conjugado. Todos estos métodos son conocidos en la técnica o se describen con más detalle en la sección de Ejemplos de esta solicitud o en Hermanson GT, Bioconjugate Techniques, Academic Press, pp.169-186 (1996). El enlazador comprende típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Típicamente se emplean enlazadores de bajo peso molecular (es decir, aquellos que tienen un peso molecular aproximado de aproximadamente 20 a aproximadamente 500).

45 [0061] Además, las modificaciones estructurales de la porción de ligador de los conjugados se contemplan en el presente documento. P. ej., los aminoácidos pueden incluirse en el enlazador y se pueden hacer varias sustituciones de aminoácidos en la porción enlazadora del conjugado, que incluyen, entre otros, aminoácidos de origen natural, así como los disponibles en los métodos sintéticos convencionales. En otro aspecto, pueden usarse aminoácidos beta, gamma y de cadena más larga en lugar de uno o más aminoácidos alfa. En otro aspecto, el enlazador puede acortarse o alargarse, ya sea cambiando el número de aminoácidos incluidos en el mismo, o incluyendo más o menos aminoácidos beta, gamma o de cadena más larga. De manera similar, la longitud y la forma de otros fragmentos químicos de los enlazadores descritos en este documento pueden modificarse.

55 [0062] En un aspecto, el enlazador puede incluir uno o más fragmentos bivalentes seleccionados independientemente en cada caso entre el grupo que consiste en alquileo, heteroalquileo, cicloalquileo, cicloheteroalquileo, arileno y heteroarileno, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. Como se usa en este documento, heteroalquileo representa un grupo resultante de la sustitución de uno o más átomos de carbono en un grupo alquileo lineal o ramificado con un átomo seleccionado independientemente en cada caso del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre.

60 [0063] En un aspecto, un peptidoglicano sintético de unión a colágeno se puede administrar a un paciente (P. ej., un paciente en necesidad de tratamiento para inhibir la activación de las plaquetas tales como la implicada en la trombosis). En diversas realizaciones, el peptidoglicano sintético de unión al colágeno se puede administrar por vía intravenosa, o en el músculo, o un órgano interno, por ejemplo. Las vías adecuadas para la administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial e intramuscular. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluidas las microagujas) y técnicas de infusión.

65 [0064] En una realización ilustrativa, las formulaciones farmacéuticas para su uso con peptidoglicanos sintéticos de

unión a colágeno para la administración parenteral que comprenden: a) una cantidad farmacéuticamente activa del peptidoglicano sintético de unión a colágeno; b) un agente tamponador de pH farmacéuticamente aceptable para proporcionar un pH en el intervalo de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 9; c) un agente modificador de la fuerza iónica en el rango de concentración de aproximadamente 0 a aproximadamente 300 milimolar; y d) se proporciona un agente modificador de la viscosidad soluble en agua en el rango de concentración de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 10% del peso total de la fórmula o cualquier combinación de a), b), c) y d).

[0065] En diversas realizaciones ilustrativas, los agentes tamponadores del pH para su uso en las composiciones y métodos aquí descritos son aquellos agentes conocidos por el experto en la técnica e incluyen, P. ej., acetato, borato, carbonato, citrato y tampones de fosfato, así como ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, óxido de magnesio, fosfato monopotásico, bicarbonato, amoníaco, ácido carbónico, ácido clorhídrico, citrato de sodio, ácido cítrico, ácido acético, fosfato de hidrógeno disódico, bórax, ácido bórico, hidróxido de sodio, ácido dietil-bárbaro, y proteínas, así como diversos tampones biológicos, P. ej., TAPS, Bicina, Tris, Tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, o MES.

[0066] En otra realización ilustrativa, los agentes de resistencia en la modulación iónicos incluyen aquellos agentes conocidos en la técnica, P. ej., glicerina, propilenglicol, manitol, glucosa, dextrosa, sorbitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, y otros electrolitos.

[0067] Agentes de modulación de viscosidad útiles incluyen pero no se limitan a, polímeros solubles en agua iónicos y no iónicos; polímeros de ácido acrílico reticulados tales como la familia de polímeros "carbómero", P. ej., carboxipolialquilenos que pueden obtenerse comercialmente bajo la marca registrada Carbopol®; polímeros hidrófilos tales como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y alcohol polivinílico; polímeros celulósicos y derivados de polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y celulosa eterificada; gomas tales como tragacanto y goma xantana; alginato de sodio; gelatina, ácido hialurónico y sus sales, quitosanos, gelán o cualquier combinación de los mismos. Típicamente, se emplean agentes mejoradores de la viscosidad no ácidos, tales como un agente neutro o básico para facilitar el logro del pH deseado de la formulación.

[0068] En un aspecto ilustrativo, las formulaciones parenterales se pueden formular adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse en conjunción con un vehículo adecuado tal como agua estéril, libre de pirógenos. La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, P. ej., mediante liofilización, puede realizarse fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la materia.

[0069] En una realización, la solubilidad de un peptidoglicano sintético de unión a colágeno utilizado en la preparación de una formulación parenteral se puede incrementar por el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad.

[0070] En diversas realizaciones, las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen formulaciones de liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. Por lo tanto, un peptidoglicano sintético de unión a colágeno puede formularse como un sólido, semisólido o líquido tixotrópico para administración como un depósito implantado que proporciona una liberación modificada del compuesto activo. Los ejemplos ilustrativos de tales formulaciones incluyen endoprótesis recubiertas con fármaco y microsferas de ácido copolímero (dl-láctico, glicólico) (PGLA). En otra realización, los peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno o las composiciones que comprenden peptidoglicano sintético de unión a colágeno pueden administrarse continuamente, cuando sea apropiado.

[0071] En otras realizaciones, peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno y composiciones que los contienen se pueden administrar por vía tópica. Se puede aplicar una variedad de formas de dosis y bases a las preparaciones tópicas, tales como una pomada, crema, gel, pomada en gel, yeso (P. ej., cataplasma), solución, polvos y similares. Estas preparaciones pueden prepararse por cualquier método convencional con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales como se describe a continuación.

[0072] P. ej., en la preparación de una pomada, vaselina, alcoholes superiores, cera de abeja, aceites vegetales, polietilenglicol, etc. pueden ser utilizados. En la preparación de una formulación de crema, se pueden usar grasas y aceites, ceras, ácidos grasos superiores, alcoholes superiores, ésteres de ácidos grasos, agua purificada, agentes emulsionantes, etc. En la preparación de formulaciones de gel, se utilizan materiales gelificantes convencionales, como poliacrilatos (P. ej., poliacrilato de sodio), hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metil celulosa, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, agua purificada, alcoholes inferiores, alcoholes polihídricos, polietilenglicol y similares. En la preparación de una preparación de pomada en gel, se utilizan un agente emulsionante (preferiblemente surfactantes no iónicos), una sustancia oleosa (P. ej., parafina líquida, triglicéridos y similares), etc., además de los materiales gelificantes como se mencionó anteriormente. Se puede preparar un emplasto tal como cataplasma extendiendo una preparación de gel como se mencionó anteriormente sobre un soporte (P. ej., telas, telas no tejidas). Además de los

ingredientes mencionados anteriormente, pueden usarse opcionalmente parafinas, escualano, lanolina, ésteres de colesterol, ésteres de ácidos grasos superiores y similares. Además, también se pueden incorporar antioxidantes tales como BHA, BHT, galato de propilo, pirogalol, tocoferol, etc. Además de las preparaciones y componentes mencionados anteriormente, se puede usar opcionalmente cualquier otra formulación convencional para incorporar con cualquier otro aditivo.

[0073] También se contempla que cualesquiera de las formulaciones descritas en este documento pueden usarse para administrar el peptidoglicano sintético de unión a colágeno (P. ej., uno o más tipos), ya sea en ausencia o presencia de las matrices de colágeno descritas en este documento.

[0074] En varias formas de realización, la dosis del peptidoglicano sintético de unión al colágeno, con o sin una matriz de colágeno ingerida, puede variar significativamente dependiendo de la condición del paciente, el estado de la enfermedad que se esté tratando, la vía de administración y la distribución tisular y la posibilidad de uso conjunto de otros tratamientos terapéuticos. La cantidad efectiva que debe administrarse a un paciente se basa en el área de la superficie corporal, el peso o la masa del paciente y la evaluación médica del estado del paciente. En varias realizaciones ejemplares, una dosis efectiva puede variar de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg, 100 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg, o desde aproximadamente 100 µg/kg hasta aproximadamente 400 µg/kg. En cada una de estas realizaciones, dosis/kg se refiere a la dosis por kilogramo de masa corporal o peso corporal del paciente. En otros aspectos ilustrativos, las dosis efectivas pueden variar desde aproximadamente 0,01 µg hasta aproximadamente 1.000 mg por dosis, 1 µg hasta aproximadamente 100 mg por dosis, o desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 50 mg por dosis, o desde aproximadamente 500 µg a aproximadamente 10 mg por dosis o de aproximadamente 1 mg a 10 mg por dosis.

[0075] Cualquier régimen eficaz para la administración del peptidoglicano sintético de unión a colágeno puede ser utilizado. P. ej., el peptidoglicano sintético de unión a colágeno se puede administrar como una dosis única o como un régimen diario de dosis múltiples. Además, se puede usar un régimen escalonado, p. ej., de uno a cinco días por semana como alternativa al tratamiento diario.

[0076] En una realización de la invención, el paciente es tratado con múltiples inyecciones del peptidoglicano sintético de unión a colágeno. En una realización, el paciente se inyecta varias veces (P. ej., alrededor de 2 hasta alrededor de 50 veces) con el peptidoglicano sintético de unión a colágeno, p. ej., a intervalos de 12-72 horas o a intervalos de 48-72 horas. Se pueden administrar al paciente inyecciones adicionales del peptidoglicano sintético de unión al colágeno en un intervalo de días o meses después de las inyecciones iniciales y las inyecciones adicionales previenen la recurrencia de la enfermedad. Alternativamente, la(s) inyección(es) inicial(es) del peptidoglicano sintético que se une al colágeno puede prevenir la recurrencia de la enfermedad.

[0077] En cualquiera de las realizaciones aquí descritas, es de entenderse que una combinación de dos o más peptidoglicanos sintéticos de unión a colágeno, que difieren en la parte de péptido, la porción glicano, o ambos, puede ser utilizado en lugar de un solo peptidoglicano sintético de unión al colágeno.

[0078] También se apreciará que en las realizaciones anteriores, ciertos aspectos de los compuestos, composiciones y métodos se presentan en la alternativa en listas, tales como, de manera ilustrativa, las selecciones para uno cualquiera o más de G y P. Por tanto, debe entenderse que varias realizaciones alternativas de la invención incluyen miembros individuales de esas listas, así como los diversos subconjuntos de esas listas. Cada una de esas combinaciones debe entenderse como se describe en el presente documento a través de las listas.

[0079] En los siguientes ejemplos ilustrativos, los términos "peptidoglicano sintético" y "conjugado" se usan sinónimamente con el término "peptidoglicano sintético de unión a colágeno."

EJEMPLO 1

Síntesis de péptidos

[0080] Todos los péptidos se sintetizaron utilizando un sintetizador de péptidos Symphony (Protein Technologies, Tucson, AZ), utilizando un protocolo de Fmoc en una resina de Knorr. El péptido crudo se liberó de la resina con TFA y se purificó por cromatografía de fase inversa en un AKTAexplorer (GE Healthcare, Piscataway, NJ) utilizando una columna de fase inversa Grace-Vydac 218TP C-18 y un gradiente de agua/acetonitrilo al 0,1% de TFA. Los péptidos modificados con dansilo se prepararon añadiendo una etapa de acoplamiento adicional con dansil-Gly (Sigma) antes de la liberación de la resina. Las estructuras peptídicas fueron confirmadas por espectrometría de masas. Los siguientes péptidos se prepararon como se describe anteriormente: RRANAALKAGELYKSILYGC, SYIRIADTNIT, Dansyl-GRRANAALKAGELYKSILYGC, y Dansyl-GSYIRIADTNIT. Estos péptidos se abrevian SILY, SYIR, Z-SILY y Z-SYIR. Se prepararon péptidos adicionales, KELNLVYTGC (abreviado KELN) y GSITTIDVWPNVGC (abreviado GSIT) como se describe anteriormente o se compraron (Genescript, Piscataway, NJ).

EJEMPLO 2Conjugación del péptido SYIR con sulfato de dermatán

5 **[0081]** SYIR se conjugó a oxDS mediante un método adaptado de Hermanson con ligeras modificaciones (Hermanson, 1996). El péptido SYIR se disolvió en carbonato de sodio 0,05 M, tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 9,5, a una concentración de 0,4 mg/ml para un volumen final de 5 ml. Para reaccionar en un exceso molar de péptidos de 10 veces, se disolvieron 29 mg de oxDS MW 41,000 (sulfato de dermatán oxidado, que contiene 1,1 aldehídos/molécula DS de 41 kDa de Celsus Laboratories, Cincinnati, OH) en la solución peptídica. Bajo agitación
10 suave, se agregaron 50 ml de cianoborohidruro de sodio y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante la noche.

[0082] El exceso de péptido se separó por filtración en gel en un purificador Akta utilizando una columna XK 26-40 rellena con Medio Sephadex G-25 (GE Health) y equilibrado con agua desionizada (MilliQ). El eluyente se controló a 215 nm, 254 nm y 280 nm. El primer pico de elución que contenía DS-SYIR se recogió y se liofilizó para pruebas
15 adicionales.

EJEMPLO 3Conjugación de SILY a Sulfato de Dermatán

Adjunto PDPH a oxDS

[0083] El reticulante bifuncional PDPH (Pierce), reactivo frente a grupos sulfhidrilo y amina, se usó para conjugar SILY a oxDS. En el primer paso de la reacción, se disolvió oxDS en un tampón de acoplamiento (fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,25 M, pH 7,2) hasta una concentración final de 1,2 mM. Se añadió PDPH en un exceso molar de 10 veces, y la reacción procedió a temperatura ambiente durante 2 horas. El exceso de PDPH (MW 229Da) se separó por filtración en gel en un Purificador Akta utilizando una columna XK 26-40 empaquetada con medio Sephadex G-25 y equilibrada con agua MilliQ. El eluyente se controló a 215 nm, 254 nm y 280 nm. El primer pico de elución que contenía DS-PDPH se recogió y se liofilizó para conjugarlo con SILY.
25
30

Determinación del contenido de PDPH

[0084] Para determinar el número de moléculas de PDPH conjugadas con oxDS. El DS-PDPH se disolvió en un tampón de acoplamiento a 1,6 mg/ml. Se añadieron 10 ml de DTT a 15 mg/ml a la solución DS-PDPH, y la reacción procedió a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reducción del enlace disulfuro en el lado reactivo de cisteína de PDPH libera piridina-2-tiona, que es visible a 313 nm. La absorbancia a 313 nm se midió antes y después de la adición de DTT, y la diferencia se usó para calcular el número de moléculas de PDPH/molécula DS utilizando el coeficiente de extinción de piridina-2-tiona. Los resultados en la FIGURA 7 muestran $\Delta A = 0,35$, correspondiente a 1,1 moléculas de PDPH/DS.
35
40

Conjugación de SILY

[0085] El péptido se disolvió en una mezcla 5:1 exceso molar en tampón de acoplamiento a una concentración final de péptido de aproximadamente 1 mM (limitada por la solubilidad del péptido). La reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante la noche, y se separó el péptido en exceso y se aisló el conjugado DS-SILY por filtración en gel como se describe anteriormente. Consulte la FIGURA 26 que muestra una relación SILY/DS de 1,06 después del acoplamiento.
45
50

EJEMPLO 4Conjugación de Z-SILY a sulfato de dermatán

[0086] El sulfato de dermatán se conjugó con Z-SILY de acuerdo con el método del EJEMPLO 3.
55

EJEMPLO 5Conjugación de KELN a sulfato de dermatán

[0087] El sulfato de dermatán se conjugó a KELN de acuerdo con el método del EJEMPLO 3.
60

EJEMPLO 6Conjugación del GSIT a sulfato de dermatán

[0088] El sulfato de dermatán se conjugó a GSIT de acuerdo con el método del EJEMPLO 3.
65

EJEMPLO 7Conjugación de Z-SYIR a sulfato de dermatán

5 **[0089]** El sulfato de dermatán se conjugó con Z-SYIR de acuerdo con el método del EJEMPLO 2.

EJEMPLO 8Conjugación de SILY a heparina

10 **[0090]** Heparina oxidada (oxHep) (MW = 19,7kDa) que contiene 1 aldehído por molécula (adquirido de Celsus Laboratories, Cincinnati, OH). Se formaron aldehídos adicionales mediante oxidación adicional en meta-periodato de sodio como sigue. oxHep se disolvió en acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5, a una concentración de 10 mg/ml. Luego se agregó metaestadato de sodio a una concentración de 2 mg/ml y se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente protegida de la luz. El exceso de meta-periodato de sodio se eliminó mediante desalinización utilizando una columna de exclusión de tamaño HiTrap (GE Healthcare) y el oxHep se liofilizó protegido de la luz hasta la conjugación con PDPH.

15 **[0091]** El oxHep se conjugó a PDPH mediante el método descrito para la conjugación DS-PDPH, EJEMPLO 3. Se hizo reaccionar PDPH en un exceso molar de 50 veces. Para lograr una mayor concentración de PDPH, se disolvieron 10 mg de PDPH en 75 ml de DMSO y se mezclaron con 1 ml de tampón de acoplamiento que contenía oxHep. La reacción procedió a temperatura ambiente durante 2,5 horas y se eliminó el exceso de PDPH por desalinización. La heparina que contenía PDPH (Hep-PDPH) se almacenó como un polvo liofilizado hasta que reaccionó con SILY.

20 **[0092]** Se hizo reaccionar SILY en un exceso molar de 10 veces con Hep-PDPH como se describe para la conjugación DS-SILY en el EJEMPLO 3. La reacción se controló como se describe para DS-SILY en el EJEMPLO 3 y mostró 5,44 péptidos SILY conjugados por molécula de heparina como se ha mostrado en la FIGURA 24.

EJEMPLO 9Conjugación de GSIT con heparina

25 **[0093]** La heparina se conjugó con GSIT de acuerdo con el método del Ejemplo 8 (abreviado Hep-GSIT).

EJEMPLO 10Conjugación de SILY a dextrano

30 **[0094]** El dextrano se conjugó con SILY de acuerdo con el método del Ejemplo 8 que reemplaza a la heparina con dextrano. Modificación de las condiciones para la oxidación de dextrano con meta-periodato de sodio en el primer paso para permitir la preparación de conjugados con diferentes relaciones molares de SILY a dextrano. P. ej., se prepararon conjugados dextrano-SILY con una relación molar de SILY a dextrano de aproximadamente 6 y un conjugado de dextrano-SILY con una relación molar de SILY a dextrano de aproximadamente 9 (abreviado Dex-SILY6 y Dex-SILY9).

EJEMPLO 11Conjugación de SILY a hialuronano

35 **[0095]** El hialuronano se conjugó a SILY de acuerdo con el método del Ejemplo 8 (abreviado HA-SILY).

EJEMPLO 12Unión SILY a Colágeno (Biacore)

40 **[0096]** Se realizaron estudios Biacore en un Biacore 2000 usando un chip CM-3 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). El chip CM-3 está recubierto con dextrano carboximetilado covalentemente unido, que permite la unión del colágeno del sustrato a través de grupos de aminas libres. Se utilizaron células de flujo (FCs) 1 y 2, con FC-1 como célula de referencia y FC-2 como célula inmovilizada con colágeno. Cada FC se activó con EDC-NHS, y se inmovilizaron 1500 RU de colágeno sobre FC-2 haciendo fluir 1 mg/ml de colágeno en acetato de sodio, pH 4, tampón a 5 μ L/min durante 10 min. Los sitios de éster de NHS sin reaccionar se cubrieron con etanolamina; el control FC-1 se activó y se cubrió con etanolamina.

45 **[0097]** Para determinar la afinidad de unión de péptidos, SILY se disolvió en tampón 1x HBS-EP (Biacore) en diferentes concentraciones de 100 μ M a 1,5 μ M en diluciones de 2 veces. El caudal se mantuvo a 90 μ L/min, que

está en el rango sugerido por Myska para determinar la cinética de unión (Myska, 1997). Las primeras 10 inyecciones fueron inyecciones de tampón, que ayudan a cebar el sistema, seguidas de inyecciones de muestra aleatorias, que se realizan por triplicado. El análisis se realizó con el software BIAevaluation (Biacore). Las curvas de asociación/disociación representativas se muestran en la Figura 3, demostrando que el péptido SILY se une reversiblemente con colágeno. $K_D = 1,2 \mu\text{M}$ se calculó a partir de la cinética de unión encendido-apagado.

EJEMPLO 13

Unión de Z-SILY al colágeno

[0098] Los ensayos de unión se realizaron en una placa de alta unión de 96 pocillos, negra con un fondo transparente (Costar). El colágeno se comparó con los pocillos no tratados y los pocillos recubiertos con BSA. El colágeno y BSA se inmovilizaron a 37°C durante 1 hora incubando 90 ml/pocillo a concentraciones de 2 mg/ml en HCl 10 mM y 1xPBS, respectivamente. Cada pocillo se lavó 3x con 1xPBS después de incubarse. Z-SILY se disolvió en 1 x PBS a concentraciones de 100 μM a 10 nM en diluciones de 10 veces. Los pocillos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y se enjuagaron 3X con PBS y luego se llenaron con 90 μl de 1xPBS. Las lecturas de fluorescencia se tomaron en un espectrofotómetro M5 Spectramax (Molecular Devices) en longitudes de onda de excitación/emisión de 335nm/490nm respectivamente. Los resultados se muestran en las FIGURAS 4 y 5. $K_D = 0,86 \mu\text{M}$ se calculó a partir de la cinética de equilibrio.

EJEMPLO 14

Caracterización DS-SILY

[0099] Para determinar el número de moléculas SILY conjugadas con DS, la producción de piridina-2-tiona se midió utilizando un protocolo modificado proporcionado por Pierce. Se disolvió sulfato de dermatán con 1,1 moléculas de PDPH unidas en un tampón de acoplamiento (fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,25 M) a una concentración de 0,44 mg/ml y se midió la absorbancia a 343 nm utilizando un SpectraMax M5 (Molecular Devices). SILY se hizo reaccionar en un exceso molar de 5 veces y las mediciones de absorbancia se repitieron inmediatamente después de la adición de SILY y después de dejarse reaccionar durante 2 horas. Para asegurarse de que SILY no se absorba a 343 nm, se midió el tampón de acoplamiento que contenía 0,15 mg/ml de SILY y se comparó con la absorbancia del tampón solo.

[0100] El número de moléculas SILY conjugadas con DS se calculó mediante el coeficiente de extinción de piridina-2-tiona usando la siguiente ecuación $(\text{Abs}_{343}/8080) \times (\text{MW}_{\text{DS}}/\text{DS}_{\text{mg/ml}})$. Los resultados se muestran en la FIGURA 26.

EJEMPLO 15

Enlace de colágeno, datos de fluorescencia - DS-SILY

[0101] Con el fin de determinar si el conjugado de péptido mantuvo su capacidad de unirse a colágeno después de su conjugación con DS, se realizó un ensayo de unión fluorescente. Se sintetizó una versión marcada con fluorescencia de SILY, Z-SILY, agregando dansilglicina al término amina. Este péptido se conjugó con DS y se purificó utilizando los mismos métodos descritos para SILY.

[0102] Los ensayos de unión se realizaron en una placa de alta unión de 96 pocillos, negra con un fondo transparente (Costar). El colágeno se comparó con los pocillos no tratados y los pocillos recubiertos con BSA. El colágeno y BSA se inmovilizaron a 37°C durante 1 hora incubando 90 ml/pocillo a concentraciones de 2 mg/ml en HCl 10 mM y 1xPBS respectivamente. Cada pocillo se lavó 3x con 1xPBS después de incubarse.

[0103] Los pocillos se preincubaron con DS a 37°C durante 30 minutos para eliminar la unión no específica de DS a colágeno. Los pocillos se enjuagaron 3x con 1xPBS antes de incubarse con DS-Z-SILY. DS-Z-SILY se disolvió en 1 x PBS a concentraciones de 100 μM a 10 nM en diluciones de 10 veces. Los pocillos se incubaron durante 30 min a 37°C y se enjuagaron 3x y luego se llenaron con 90 μl de 1xPBS. Las lecturas de fluorescencia se tomaron en un espectrofotómetro M5 Spectramax (Molecular Devices) en longitudes de onda de excitación/emisión de 335nm/490nm respectivamente.

[0104] La fluorescencia de unión de DS-Z-SILY en colágeno inmovilizado, BSA, y pocillos no tratados se comparan en FIGURA 8, Los resultados muestran que DS-Z-SILY se une específicamente a los pocillos tratados con colágeno sobre BSA y los pocillos no tratados. Los pocillos no tratados de la placa de alta unión se diseñaron para ser un control positivo, aunque se observó poca unión en relación con los pocillos tratados con colágeno. Estos resultados sugieren que SILY mantiene su capacidad de unirse al colágeno después de su conjugación con DS. La preincubación con DS no impidió la unión, lo que sugiere que el conjugado se une por separado a la DS sola.

EJEMPLO 16Preparación de geles de colágeno tipo I

5 **[0105]** Los geles se hicieron con colágeno de Nutragen (Inamed, Fremont, CA) a una concentración final de 4 mg/ml de colágeno. La reserva de Nutragen es 6,4mg/mL en HCl 10 mM. La preparación del gel se realizó en hielo y se hicieron muestras frescas antes de cada prueba. La solución de colágeno se ajustó a pH fisiológico y concentración de sal, agregando volúmenes apropiados de 10x PBS (solución salina tamponada con fosfato), 1xPBS y NaOH 1M. Para la mayoría de los experimentos, muestras de DS, Decorina, DS-SILY, o DS-SYIR se
 10 agregaron a una relación molar de colágeno: muestra 10:1 mediante una adición final de 1xPBS (volúmenes iguales a través de los tratamientos) en los que las muestras de prueba se disolvieron en concentraciones apropiadas. De esta manera, las muestras se mantienen constantemente a pH 7,4 y la concentración de sal fisiológica. Las muestras de colágeno solo recibieron una adición de 1xPBS sin ninguna muestra disuelta. La fibrillogénesis se inducirá incubando soluciones de colágeno neutralizadas a 37°C durante la noche en una cámara humidificada para evitar la deshidratación. Las soluciones de gel con colágeno: proporciones molares de muestra distintas de 10:1 se
 15 prepararon de manera similar.

EJEMPLO 17Caracterización viscoelástica de geles.

[0106] Geles de colágeno se prepararon como se describe en el Ejemplo 16 y antes del calentamiento, 200 µL de cada tratamiento se pipetearon sobre la superficie humectable de portaobjetos hidrofólicamente impresos (Tekdon). La impresión de PTFE restringió los geles a la región humectable de 20 mm de diámetro. Los geles se formaron en
 25 una incubadora humidificada a 37°C durante la noche antes de las pruebas mecánicas.

[0107] Los portaobjetos se sujetaron a la etapa del reómetro de un reómetro AR-G2 con una geometría de placa paralela de acero inoxidable de 20 mm (TA Instruments, New Castle, DE), y la geometría de la placa paralela de
 30 acero inoxidable de 20 mm se redujo a una distancia de separación de 600 µM usando un control de fuerza normal de 0,25N para evitar una cizalladura excesiva en el gel formado. Se realizó un proceso iterativo de barridos de tensión y frecuencia en geles de colágeno solo para determinar el rango lineal. Todas las muestras también se analizaron en un rango de frecuencia de 0,1Hz a 1,0Hz y una tensión controlada de 1,0 Pa. El análisis estadístico utilizando el software Design Expert (StatEase, Minneapolis, MN) se realizó en cada frecuencia y se utilizó un ANOVA de 5 vías para comparar muestras. Los resultados mostrados en la FIGURA 9, 10:1; FIGURA 10, 5:1; y la
 35 FIGURA 11, 30:1 demuestra que el tratamiento con peptidoglicanos sintéticos puede modificar el comportamiento viscoelástico de los geles de colágeno tipo I.

EJEMPLO 18Caracterización viscoelástica de geles que contienen colágeno III

[0108] Los geles que contenían colágeno tipo III se prepararon como en el EJEMPLO 16 con las siguientes modificaciones: las soluciones de gel tratadas y sin tratar se prepararon utilizando una concentración de colágeno de
 45 1,5 mg/ml (90% de colágeno III (Millipore), 10% de colágeno I), las muestras de 200 µl se pipetearon en superficies humectables de 20 mm de diámetro de portaobjetos impresos hidrófobos. Estas soluciones se dejaron gelificar a 37°C durante 24 horas. Los geles se formaron a partir de colágeno solo, colágeno tratado con sulfato de dermatán (relación molar 1:1 y 5:1) y colágeno tratado con péptidos de unión a colágeno III solo (GSIT y KELN, relación molar 5:1) sirvieron como controles. Los geles tratados contenían los peptidoglicanos (DS-GSIT o DS-KELN a proporciones molares 1:1 y 5:1. Todas las proporciones son proporciones colágeno:compuesto de tratamiento. Los geles se caracterizaron como en el Ejemplo 17, excepto que las muestras se analizaron durante rango de frecuencia de 0,1Hz a 1,0Hz a una tensión controlada de 1,0 Pa. Como se muestra en las FIGURAS 12 y 13, el conjugado de sulfato de dermatán-GSIT y el conjugado de sulfato de dermatán-KELN (peptidoglicanos sintéticos) pueden influir en las propiedades viscoelásticas de los geles formados con colágeno tipo III.

EJEMPLO 19Fibrillogénesis

[0109] La fibrillogénesis del colágeno se monitorizó midiendo la absorbancia relacionada con la turbidez a 313 nm, proporcionando información sobre la tasa de fibrillogénesis y el diámetro de la fibrilla. Las soluciones de gel se prepararon como se describe en el EJEMPLO 16 (4 mg/ml de colágeno, 10:1 de colágeno:tratamiento, a menos que se indique lo contrario) y se agregaron 50 µl/pocillo a 4°C a una placa de 384 pocillos. La placa se mantuvo a 4°C durante 4 horas antes de iniciar la formación de fibrillas. Se usó un SpectraMax M5 a 37°C para medir la absorbancia a 313 nm a intervalos de 30 s durante 6 horas. Los resultados se muestran en las FIGURAS 14, 15 y
 65 16. La $T_{1/2}$ para la formación de gel de las muestras con una relación molar de 10:1 se muestra en la FIGURA 17. El sulfato de dermatán-SILY disminuye la tasa de fibrillosemia.

EJEMPLO 20Microscopia de reflexión confocal

5 **[0110]** Los geles se formaron e incubaron durante la noche como se describió anteriormente en el EJEMPLO 16, los geles se tomaron imágenes con un microscopio confocal Olympus FV1000 usando una lente de inmersión en agua 60X, 1,4 NA. Las muestras se iluminaron con luz láser de 488 nm y la luz reflejada se detectó con un tubo fotomultiplicador utilizando un filtro de reflexión azul. Se tomaron imágenes de cada gel a 100 μm de la parte inferior del gel, y se tomaron imágenes de tres ubicaciones separadas para garantizar un muestreo representativo. Los resultados se muestran en la FIGURA 18.

EJEMPLO 21Mediciones Crio-SEM en colágeno I

15 **[0111]** Se formaron geles para crio-SEM, como en el EJEMPLO 16, directamente en la etapa de SEM y se incubaron a 37°C durante la noche. Las etapas se aseguraron luego en un criogénico y se sumergieron en una solución de nitrógeno líquido. Las muestras se transfirieron luego a una precámara de Gatan Alto 2500 enfriada a -170°C al vacío. Se creó una superficie de rotura libre con un bisturí enfriado y cada muestra se evaporó en condiciones de sublimación durante 20 min. La muestra se recubrió con recubrimiento de pulverización de platino durante 120 s. Las muestras se transfirieron a la etapa criogénica a -130°C y se tomaron imágenes de las regiones con una orientación similar para la comparación entre los tratamientos. Las muestras representativas tomadas a 5,000x se muestran en la FIGURA 19. El análisis de las imágenes se realizó para determinar el diámetro promedio de la fibrilla, FIGURA 22; y la distancia promedio entre las hojas de colágeno, FIGURA 23. El diámetro de las fibrillas se calculó utilizando el software ImageJ (NIH) midiendo las fibrillas individuales a mano (trazando una línea a través de las fibrillas y midiendo su longitud después de establecer la escala correctamente). Hubo 3 observadores, 3 imágenes separadas por tratamiento, 10 fibrillas registradas por imagen, dando un total de 90 mediciones por tratamiento. La distancia de la hoja se calculó usando ImageJ, de nuevo midiendo a mano. Un observador y 15 medidas por tratamiento. El diámetro de la fibrilla y la distancia entre las láminas de colágeno disminuyeron en los geles tratados con el peptidoglicano sintético sulfato de dermatán-SILY.

EJEMPLO 22Mediciones Crio-SEM en colágeno III

35 **[0112]** Se formaron geles para crio-SEM, como en el Ejemplo 16, directamente en la etapa de SEM y se incubaron a 37°C durante la noche con las siguientes modificaciones. La concentración de colágeno fue de 1 mg/ml (90% de colágeno III, 10% de colágeno I). La proporción de colágeno:DS fue de 1:1 y la proporción de colágeno:peptidoglicano fue de 1:1. Las imágenes se registraron como en el EJEMPLO 21. La proporción de volumen de vacío a volumen de fibrillas se midió usando una variación del método en el EJEMPLO 21. Los resultados se muestran en las FIGURAS 20 y 21. Sulfato de dermatán-KELN y sulfato de dermatán-GSIT disminuyen el espacio vacío (aumentar el diámetro de la fibrilla y la ramificación) en los geles de colágeno tratados.

EJEMPLO 23Confirmación AFM de banda D

45 **[0113]** Las soluciones de gel se prepararon como se describe en el EJEMPLO 16 y 20 μL de cada muestra se pipetearon sobre un cubreobjetos de vidrio y se dejó gelificar durante la noche en un incubador humidificado. Los geles se deshidrataron por tratamiento con soluciones de etanol graduadas (35%, 70%, 85%, 95%, 100%), 10 min en cada solución. Las imágenes de AFM se realizaron en modo de contacto, con una tasa de escaneo de 2 Hz (multimodo SPM, Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, EE.UU., puntas de AFM punta de modo de contacto de nitruro de silicio $k = 0,05\text{N/m}$, Veeco Instruments) Punto de ajuste de deflexión: 0-1 voltios. La banda D se confirmó en todos los tratamientos como se muestra en las FIGURAS 2 y 38.

EJEMPLO 24Remodelación de colágeno

60 Preparación de muestras de tejido

[0114] Siguiendo un método de Grassl, et al. (Grassl, et al., Journal of Biomedical Materials Research 2002, 60, (4), 607-612), que se incorpora aquí en su totalidad, se formaron geles de colágeno con o sin imitadores de PG sintéticos tal como se describe en el Ejemplo 16. las células del músculo liso aórtico (Cascade Biologics, Portland, OR) se sembraron dentro de geles de colágeno añadiendo 4×10^6 células/ml a la solución de colágeno neutralizada antes de la incubación. Las soluciones de células de colágeno se pipetearon en un portaobjetos Lab-Tek con

cámara de 8 pocillos y se incubaron en una atmósfera humidificada con 37°C y 5% de CO₂ incubadora. Después de la gelificación, los geles de colágeno celular se cubrirán con 1 ml de Medio 231 según lo prescrito por Cascade. Cada 3-4 días, se eliminó el medio de las muestras y se midió el contenido de hidroxiprolina mediante un ensayo de hidroxiprolina estándar (Reddy, 1996).

5

Contenido de hidroxiprolina

[0115] Para medir el colágeno degradado en el medio sobrenadante, la muestra se liofilizó, la muestra se hidrolizó en NaOH 2M a 120°C durante 20 min. Después de enfriarse, la hidroxiprolina libre se oxidó agregando cloramina-T (Sigma) y reaccionando durante 25 minutos a temperatura ambiente. El reactivo de aldehído de Ehrlich (Sigma) se añadió y se dejó reaccionar durante 20 minutos a 65°C y luego se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro M-5 (Molecular Devices). El contenido de hidroxiprolina en el medio es una medida indirecta del potencial de remodelado de colágeno y tejido degradado. Los cultivos se incubaron hasta 30 días y se midieron tres muestras de cada tratamiento. Se usaron geles incubados sin células añadidas como control. Los péptidos libres SILY y Dc13 dieron como resultado una mayor degradación del colágeno en comparación con el colágeno solo medido por el contenido de hidroxiprolina en medio celular como se muestra en la FIGURA 53.

10

15

Viabilidad celular

[0116] La viabilidad celular se determinó usando un kit de viabilidad/vitalidad vivo/muerto violeta (Molecular Probes). El kit contiene una mancha calceína-violeta (células vivas) y colorante reactivo aqua-fluorescente (células muertas). Las muestras se lavaron con 1 x PBS y se incubaron con 300 µl de solución de colorante durante 1 hora a temperatura ambiente. Para eliminar el colorante no unido, las muestras se enjuagaron con 1 x PBS. Las células vivas y muertas se contaron después de obtener imágenes de una porción 2-D con filtros 400/452 y 367/526 en un microscopio confocal Olympus FV1000 con un objetivo de 20x. Los geles se escanearon en busca de regiones representativas y se tomaron 3 conjuntos de imágenes a distancias iguales en el gel para todas las muestras.

20

25

EJEMPLO 25

30 Proliferación celular en geles

[0117] Las muestras de gel se prepararon como en el EJEMPLO 16 (4 mg de colágeno/ml, 10:1 de colágeno:tratamiento) Las células se sembraron a 1,5 x 10⁴ células/cm² y se incubaron en medio de crecimiento durante 4 horas para adherir las células al gel. A continuación, se aspiró el medio de crecimiento y se trataron las células durante 24 horas. Las concentraciones de tratamiento fueron iguales a las de los geles con una relación molar de 10:1 colágeno:tratamiento. Las células se incubaron en medio de crecimiento durante 4 horas para adherirse al gel. El medio de crecimiento se eliminó por aspiración y se reemplazó con medio de crecimiento fresco. Las muestras se incubaron durante 24 h. El número de células en cada muestra se midió utilizando el ensayo de proliferación celular CyQuant (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los resultados mostrados en la FIGURA 25 indican que los peptidoglicanos y péptidos sintéticos no afectan adversamente la proliferación celular.

35

40

EJEMPLO 26

Preparación de DS-Dc13

45

[0118] La secuencia del péptido DC13 es SYIRIADTNITGC y su forma marcada con fluorescencia es ZSYIRIADTNITGC, donde Z designa dansilglicina. La conjugación con sulfato de dermatán utilizando el reticulante heterobifuncional PDPH se realiza como se describe para DS-SILY en el EJEMPLO 3. Como se muestra en la FIGURA 27, la relación molar de Dc13 a sulfato de dermatán en el conjugado (DS-Dc13) fue de aproximadamente 1,

50

EJEMPLO 27

Ensayo de unión de fluorescencia para DS-ZSILY

[0119] Los ensayos de unión a fluorescencia descritos para DS-ZSILY se realizaron con la secuencia de péptido ZSYIRIADTNITGC (ZDc13). Los resultados aparecen en la FIGURA 28, mostrando que DS-ZDc13 se une específicamente a la superficie del colágeno de una manera dependiente de la dosis, aunque no se logró la saturación a la tasa más alta ensayada.

60

EJEMPLO 28

Ensayo de fibrillogénesis para DS-Dc13

[0120] Un ensayo de la fibrillogénesis como se describe para DS-SILY, EJEMPLO 19, realizado con el conjugado DS-DC13. Los resultados mostrados en la FIGURA 29 indican que el DS-Dc13 retrasa la fibrillogénesis y disminuye la absorbancia general de una manera dependiente de la dosis. El péptido Dc13 libre, en contraste, tiene poco

65

efecto sobre la fibrillogénesis en comparación con el colágeno solo en la proporción molar alta de colágeno:aditivo de 1:1.

EJEMPLO 29

5

Uso de Crio-SEM para medir diámetros de fibrillas.

[0121] Usando una modificación del EJEMPLO 21, los diámetros de las fibrillas se midieron mediante crio-SEM. Los diámetros de las fibrillas de las imágenes crio-SEM tomadas a 20,000x se midieron utilizando el software ImageJ (NIH). Se midieron al menos 45 fibrillas para cada tratamiento. Los resultados se presentan como promedio \pm S.E. El análisis estadístico se realizó utilizando el software DesignExpert (StatEase) con $\alpha = 0,05$. Los resultados se muestran en la FIGURA 30. La decorina y los peptidoglicanos sintéticos disminuyen significativamente el diámetro de las fibrillas sobre el colágeno o colágeno + sulfato de dermatán. En comparación con el colágeno solo, el péptido libre Dc13 no afecta el diámetro de la fibrilla, mientras que el SILY libre produce una disminución del diámetro de la fibrilla.

15

EJEMPLO 30

Cultivo celular y compactación de gel

20

[0122] Las células musculares lisas de la arteria coronaria humana (HCA SMC) (Cascade Biologics) se cultivaron en medio de crecimiento (Medio 231 suplementado con factor de crecimiento de músculo liso). Se usaron células del paso 3 para todos los experimentos. Se utilizó medio de diferenciación (Medio 231 complementado con 1% de FBS y 1x pluma/estreptococo) para todos los experimentos, a menos que se indique lo contrario. Este medio difiere del protocolo del fabricante en que no contiene heparina.

25

[0123] Los geles de colágeno se prepararon con cada aditivo como se ha descrito con la excepción de que la adición de 1x PBS se omitió para dar cabida a la adición de las células en medios. Después de incubarse en hielo durante 30 minutos, se añadieron HCA SMC en medio de diferenciación a las soluciones de gel hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml. Los geles se formaron por cuadruplicado en placas tratadas con cultivo sin tejido de 48 pocillos (Costar) durante 6 horas antes de agregar 500 μ L/medio de diferenciación de pocillo. Los geles se liberaron de los bordes del pozo después de 24 horas. El medio se cambió cada 2-3 días y las imágenes para compactación se tomaron en los mismos puntos de tiempo utilizando un Gel Doc System (Bio-Rad). El área de la sección transversal de los geles circulares que se correlaciona con el grado de compactación se determinó utilizando el software ImageJ (NIH). Los geles que no contenían células se utilizaron como control negativo y las células en geles de colágeno sin aditivos se utilizaron como control positivo. Los resultados se muestran en la FIGURA 31. El día 10, todos los geles se habían compactado hasta aproximadamente el 10% del área del gel original, y las diferencias entre los aditivos eran pequeñas. Los geles tratados con DS-Dc13 fueron leves, pero significativamente menos compactos que los geles tratados con decorina o colágeno, pero la compactación fue estadísticamente equivalente a la observada con los geles tratados con DS y SIL-SILY.

30

35

40

EJEMPLO 31

Medición de elastina

45

[0124] Los geles de colágeno sembrados con HCA SMC se prepararon como se describe en el Ejemplo 30. El medio de diferenciación se cambió cada tres días y los geles se cultivaron durante 10 días. Se usaron geles de colágeno que no contenían células como control. Los geles se enjuagaron en 1xPBS durante la noche para eliminar la proteína sérica y los geles se analizaron para determinar el contenido de elastina utilizando el análisis de elastina Fastin según el protocolo de los fabricantes (Biocolor, County Atrim, Reino Unido). Brevemente, los geles se solubilizaron en ácido oxálico 0,25 M incubando a 100°C durante 1 h. La elastina se precipitó y las muestras se centrifugaron a 11.000 x g durante 10 min. El sobrenadante de colágeno solubilizado se eliminó y el sedimento de elastina se tiñó con reactivo de tinte Fastin durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 11.000 x g durante 10 minutos y se eliminó el tinte no unido en el sobrenadante. El colorante de los gránulos de elastina fue liberado por el reactivo de disociación Fastin Dye, y las muestras de 100 μ l se transfirieron a una placa de 96 pocillos (Costar). La absorbancia se midió a 513 nm y el contenido de elastina se calculó a partir de una curva patrón de α -elastina. Los resultados de estos ensayos se muestran en la FIGURA 32. El tratamiento con DS-SILY aumentó significativamente la producción de elastina en todas las muestras. El tratamiento con DS y DS-Dc13 redujo significativamente la producción de elastina sobre el colágeno no tratado. Las muestras de control de geles de colágeno sin células no mostraron producción de elastina.

50

55

60

EJEMPLO 32

Efecto de la heparina o heparina-SILY sobre la interacción plaquetaria

65

[0125] El colágeno se inmovilizó sobre portaobjetos de cubierta de vidrio (18 mm) mediante la incubación de

portaobjetos con colágeno a 2 mg/ml en HCl 10 mM durante 1 hora a 37°C. Luego, los portaobjetos se lavaron con 1x PBS y se almacenaron a 4°C en 1x PBS durante 24 horas hasta pruebas adicionales. Se utilizaron portaobjetos de cubierta de vidrio sin tratar como control negativo. Los portaobjetos se colocaron en una placa no tratada con cultivo de tejidos de 48 pocillos (Costar) con la superficie de colágeno hacia arriba. La heparina o la heparina-SILY se disolvieron en 1x PBS a una concentración de 100 µM y se incubaron a 100 µL/pocillo durante 30 min a 37°C. Se aspiraron heparina no unida o heparina-SILY y las superficies se lavaron con 1 ml de 1x PBS. Los portaobjetos inmovilizados con colágeno incubados con 1x PBS que no contiene aditivos se utilizaron como control positivo.

[0126] La sangre humana total se centrifugó a 800 x g durante 15 min y 100 µL de plasma rico en plaquetas se retira de la capa leucocítica y se añadió a cada pocillo. Después de incubarse durante 1 hora a 37°C, se extrajo plasma rico en plaquetas de los pocillos y los pocillos se lavaron suavemente con 1x PBS para eliminar las células no unidas. Los portaobjetos se fijaron con glutaraldehído al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, se enjuagaron y se liofilizaron antes de la obtención de imágenes. Los portaobjetos se recubrieron por pulverización de oro durante 3 min y se tomaron imágenes a 200x en un JEOL 840 SEM. Los resultados se muestran en la FIGURA 33. Estas imágenes muestran que el tratamiento con el conjugado heparina-SILY afecta la unión de las plaquetas al colágeno.

EJEMPLO 33

Medición crio-SEM de la densidad fibrilar

[0127] Geles de colágeno se formaron en presencia de cada aditivo en una proporción de 10:1 molar, tal como se describe en el Ejemplo 16, directamente en la etapa de SEM, se procesaron, y se realizaron imágenes como se ha descrito. Las imágenes a 10.000x se analizaron para los cálculos de densidad de fibrillas. Las imágenes se convirtieron a 8 bits en blanco y negro, y los valores de umbral para cada imagen se determinaron utilizando el software ImageJ (NIH). El umbral se definió como el valor donde todas las fibrillas visibles son blancas y todo el espacio vacío es negro. La proporción de área blanca a negra se calculó utilizando el software MatLab. Todas las mediciones se tomaron por triplicado y los umbrales fueron determinados por un observador cegado al tratamiento. Las imágenes de los geles se muestran en la FIGURA 37 y las densidades medidas se muestran en la FIGURA 34.

EJEMPLO 34

Caracterización viscoelástica de geles que contienen Dc13 o DS-Dc13

[0128] Se prepararon geles de colágeno, como en el Ejemplo 16. La caracterización viscoelástica se realizó como se describe en el Ejemplo 17 en geles formados con relaciones variables de colágeno para aditivo (tratamiento). El tratamiento con sulfato de dermatán o conjugado de dermatán-Dc13 aumenta la rigidez del gel de colágeno resultante sobre el colágeno no tratado, como se muestra en la FIGURA 35.

EJEMPLO 35

Ensayo de proliferación celular y citotoxicidad

[0129] Las SMC de HCA, preparadas como en el EJEMPLO 30, se sembraron a $4,8 \times 10^4$ células/ml en medio de crecimiento en una placa de fondo negro/transparente de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar) y se dejaron adherir durante 4 horas. Se aspiró el medio de crecimiento y se agregaron a cada pocillo 600 µl de medio de diferenciación que contenía cada aditivo a una concentración equivalente a la concentración dentro de los geles de colágeno ($1,4 \times 10^{-6}$ M). Las células se incubaron durante 48 horas y luego se analizaron la citotoxicidad y la proliferación utilizando los ensayos vivo-muerto y CyQuant (Invitrogen), respectivamente, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usaron células en medio de diferenciación que no contenía aditivo como control. Los resultados se muestran en la FIGURA 36 que indica que ninguno de los tratamientos demostró efectos citotóxicos significativos.

EJEMPLO 36

Inhibición de la unión plaquetaria y la activación plaquetaria al colágeno tipo I

Preparación de la microplaca

[0130] El colágeno fibrilar de tipo I (Chronolog, Havertown, PA) se diluyó en glucosa isotónica a una concentración de 20-100 µg/ml. Se añadieron 50 µE de solución de colágeno a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de alta unión. La placa se incubó durante la noche a 4°C y luego se enjuagó 3X con IX PBS.

[0131] El peptidoglicano se diluyó en PBS IX a concentraciones de 25 µM a 50 µM y solución 50 µL se añadió a los pocillos recubiertos de colágeno. Los controles de GAG, péptido o PBS también se agregaron a los pocillos recubiertos con colágeno como controles. Los tratamientos se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 30 min. Luego, los pocillos se enjuagaron 3X con IX PBS, incluido un enjuague de 20 minutos con agitación a 200 rpm

para eliminar la molécula de tratamiento no unida.

Preparación y activación de las plaquetas

5 **[0132]** Se extrajo sangre humana completa de voluntarios sanos mediante venopunción siguiendo el protocolo de IRB de Purdue aprobado y con consentimiento informado. Los primeros 5 ml de sangre se descartaron, ya que se pueden contaminar con colágeno y otras proteínas, y luego se recogieron aproximadamente 15 ml en tubos con vacío de vidrio citratado (BD Bioscience). La sangre se centrifugó en el tubo de vidrio durante 20 minutos a 200 x g a 20°C. La capa superior de la sangre centrifugada, el plasma rico en plaquetas (PRP), se utilizó para experimentos de plaquetas. Se añadió PRP (50 ml/pocillo) a la microplaca y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente sin agitación.

15 **[0133]** Después de 1 hora de incubación, el PRP se retiró de cada pocillo y se añadió a un tubo de microcentrífuga que contiene 5 µL ETP (EDTA 107 mM, teofilina 12 mM, y prostaglandina E1 2,8 µM) para inhibir aún más la activación de plaquetas. Estos tubos se hicieron girar a 4°C durante 30 minutos a 1.900 x g para sedimentar las plaquetas. El sobrenadante (suero plaquetario) se recolectó para estudios ELISA para ensayar la presencia de marcadores de activación plaquetaria PF-4 y Nap-2.

20 Adherencia plaquetaria

[0134] Después de que el PRP se retiró de los pocillos de las placas de colágeno/tratamiento recubiertos, se enjuagaron los pocillos 3 veces con NaCl al 0,9% durante 5 min cada agitación a 200 rpm. La adherencia de las plaquetas se cuantificó colormétricamente o se visualizó por fluorescencia.

25 Ensayo Colormétrico

30 **[0135]** Se añadieron 140 µl de un tampón de citrato de sodio/ácido cítrico (0,1 M, pH 5,4) que contenía Triton X-100 al 0,1% y 1 mg/ml de fosfato de p-nitro-fenilo a cada pocillo. La absorbancia de fondo se midió a 405 nm. La placa se incubó luego durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación a 200 rpm. El Triton X-100 crea poros en las células, permitiendo que el p-nitrofenil fosfato interactúe con la fosfatasa ácida en las plaquetas para producir p-nitrofenol. Después de 40 minutos de incubación, se agregaron 100 µl de NaOH 2M a cada pocillo. El cambio de pH detiene la reacción al inactivar la fosfatasa ácida y también transforma el p-nitrofenol en un compuesto ópticamente activo. Luego se leyó la absorbancia a 405 nm y se correlacionó con el número de plaquetas adheridas. Los resultados se muestran en la FIGURA 41.

35 Ensayo de fluorescencia

40 **[0136]** Las plaquetas adheridas se fijaron mediante incubación con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las plaquetas se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% durante 5 min. La actina plaquetaria se marcó mediante incubación con faloidina-AlexaFluor 488 (Invitrogen) que contenía BSA al 1% durante 30 min. Los pocillos se enjuagaron 3X con IX PBS, y se tomaron imágenes de las plaquetas adheridas usando un microscopio de fluorescencia vertical usando un filtro DAPI.

45 **[0137]** Ver las FIGURAS 42 a 52 para los resultados. La agregación de plaquetas en las superficies de colágeno no tratadas se indica mediante imágenes borrosas que resultan de las plaquetas agrupadas. Sin estar limitado por la teoría, se cree que el agrupamiento de plaquetas en la dirección z (perpendicular a la superficie de la placa) evita la captura de imágenes en un plano focal. En las superficies tratadas, la agregación plaquetaria reducida da como resultado menos aglomeraciones (menos plaquetas en la dirección z) y las imágenes enfocadas se pueden capturar en la superficie de la placa. Estas imágenes muestran que el tratamiento con los peptidoglicanos sintéticos reduce la adhesión de las células plaquetarias al colágeno, la detección de marcadores de activación plaquetaria.

50 **[0138]** Se utilizó el sobrenadante (suero de plaquetas) obtenido después de la granulación de las plaquetas para determinar los factores de activación liberados. El Factor Plaquetario 4 (PF-4) y la β-tbromboglobulina (Nap-2) son dos proteínas contenidas en los gránulos alfa de plaquetas que se liberan tras la activación de las plaquetas. ELISA Sandwich se utilizaron para detectar cada proteína. Los componentes para ambos ELISA Sandwich se adquirieron en (R&D Systems) y se siguieron los protocolos proporcionados. Las muestras de suero de plaquetas se diluyeron 1:10.000 - 1:40.000 en BSA al 1% en IX PBS, por lo que los valores cayeron dentro de un rango lineal. Los resultados mostrados en las Figuras 39 y 40 muestran que el tratamiento con peptidoglicanos sintéticos disminuye la activación de las plaquetas por el colágeno I.

60 EJEMPLO 37

Inhibición de la unión de las plaquetas y la activación de las plaquetas al colágeno tipo III y tipo I

65 **[0139]** Se utilizó el método de acuerdo con el Ejemplo 36 con la siguiente modificación.

Preparación de microplacas

5 **[0140]** El colágeno de tipo I (colágeno de cola de rata, BD Biosciences) y colágeno de tipo III (Millipore) se combinaron en hielo con NaOH, IX PBS, y 10X PBS a las condiciones fisiológicas. La concentración total de colágeno fue de 1 mg/ml con 70% de colágeno tipo I y 30% de colágeno tipo III. Se pipetearon 30 μ l de la solución de colágeno en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37°C en una incubadora humidificada durante una hora, permitiendo que se formara un gel compuesto de colágeno fibrilar en los pocillos. Los pocillos se enjuagaron 3X con IX PBS.

10 **[0141]** El peptidoglicano diluido en PBS IX a concentraciones de 25 μ M y 50 μ L de solución se añadió a los pocillos recubiertos de colágeno. Los controles de GAG, péptido o PBS también se agregaron a los pocillos recubiertos con colágeno como controles. Las combinaciones de peptidoglicano o péptido estaban compuestas por 25 μ M de cada molécula en IX PBS. Los tratamientos se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 30 min. Los pocillos se enjuagaron luego 3X con IX PBS, incluido un enjuague de 10 minutos con agitación a 200 rpm para eliminar la molécula de tratamiento no unida.

15 **[0142]** Los resultados de las mediciones de inhibición de la activación de plaquetas que se muestran en la Figura 54 demuestran que los peptidoglicanos sintéticos inhiben la activación de células de plaquetas por una mezcla de colágeno de tipo I y tipo III.

20 **[0143]** Los resultados mostrados en la Figura 55 demuestran que los peptidoglicanos inhiben la unión de células de plaquetas a mezclas de colágeno tipo 1 y tipo III.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula P_nG_x en donde n es 1 a 10;
x es 1 a 10
5 P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILY y GSITTIDVPWNV; y
G es un glicano;
10 en donde la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina-cisteína en el punto de unión para el glicano.
2. Un compuesto de fórmula $(P_nL)_xG$ en donde n es de 1 a 5;
x es 1 a 10;
15 P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILY y GSITTIDVPWNV;
L es un enlazador; y
G es un glicano;
20 en donde la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina-cisteína en el punto de unión para el glicano.
3. Un compuesto de fórmula $P(LG_n)_x$ en donde n es 1 a 5;
x es 1 a 10;
25 P es un péptido sintético de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RRANAALKAGELYKSILY y GSITTIDVPWNV;
L es un enlazador; y
G es un glicano;
30 en donde la secuencia del péptido puede modificarse para incluir un segmento de glicina-cisteína en el punto de unión para el glicano.
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el glicano es un glicosaminoglicano o un polisacárido.
- 35 5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el péptido sintético tiene una homología de aminoácidos con la secuencia de aminoácido de un pequeño proteoglicano rico en leucina o una secuencia del receptor de colágeno plaquetario.
- 40 6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el péptido sintético tiene homología de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una secuencia del receptor de colágeno plaquetario.
7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el glicano se selecciona del grupo que consiste en alginato, agarosa, dextrano, condroitina, dermatán, sulfato de dermatán, heparán, heparina, queratina y hialuronano.
- 45 8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el glicano se selecciona del grupo que consiste en sulfato de dermatán, dextrano y heparina.
9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el enlazador comprende la fórmula -
50 $SCH_2CH_2C(O)NHN=$.
10. El compuesto de la reivindicación 8, en el que el glicano es sulfato de dermatano.
11. El compuesto de la reivindicación 8, en el que el glicano es heparina.
- 55 12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o las reivindicaciones 10 y 11 cuando depende de las reivindicaciones 1 a 3, en donde P comprende RRANAALKAGELYKSILY.
13. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y uno o más excipientes, o diluyentes farmacéuticamente aceptables, o una combinación de los mismos.
- 60 14. La composición de la reivindicación 13 en una forma adaptada para uso tópico.
15. La composición de la reivindicación 14, en la que la forma tópica se selecciona del grupo que consiste en un
65 polvo, un gel, una crema, ungüento, yeso y un líquido tópico.

16. La composición de la reivindicación 13 adaptada para administración parenteral.

17. La composición de la reivindicación 16, en la que la administración parenteral es intravenosa o intraarterial.

5 **18.** El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso en un método *in vivo* para inhibir la activación de plaquetas.

19. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso en un método *in vivo* de contacto y unión al colágeno e inhibición de la activación plaquetaria.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

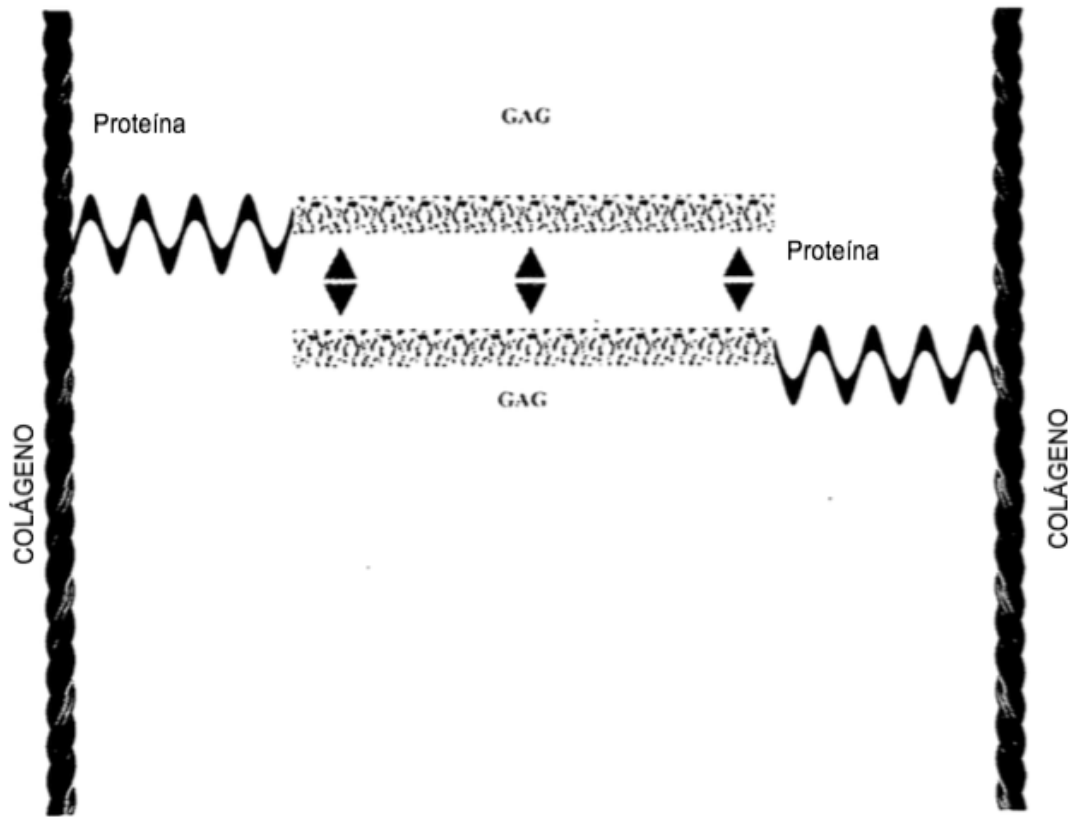
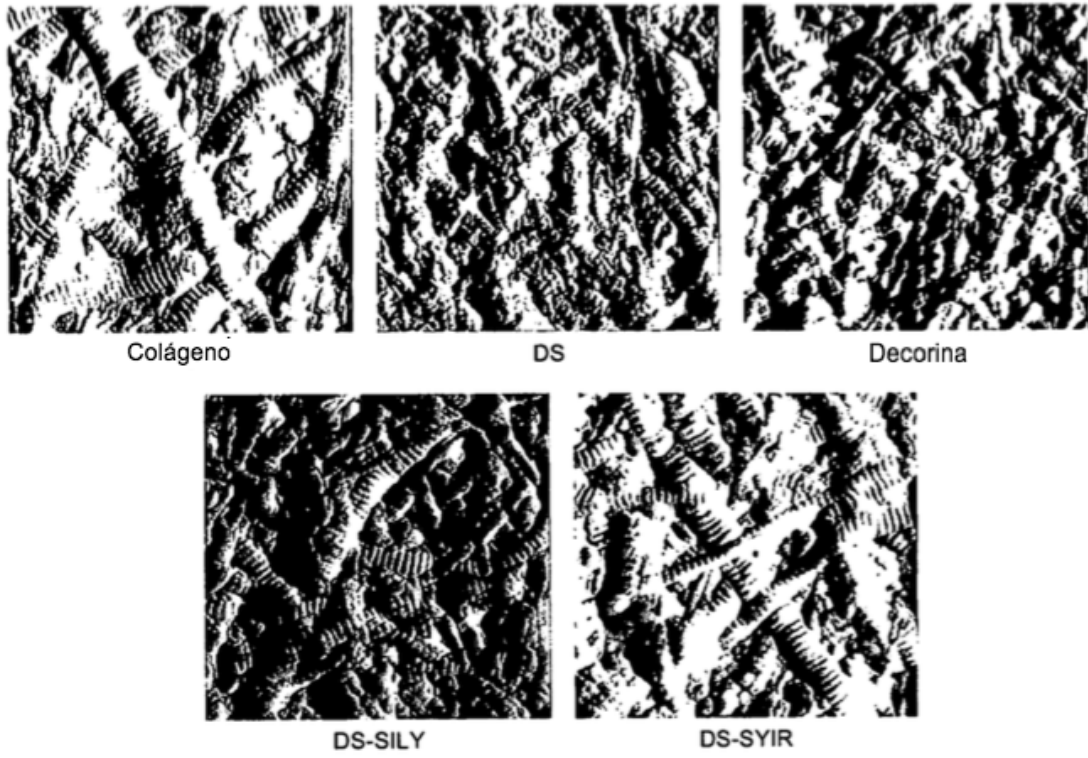


FIGURA 1



Ancho de imagen = 3 μ m

FIGURA 2

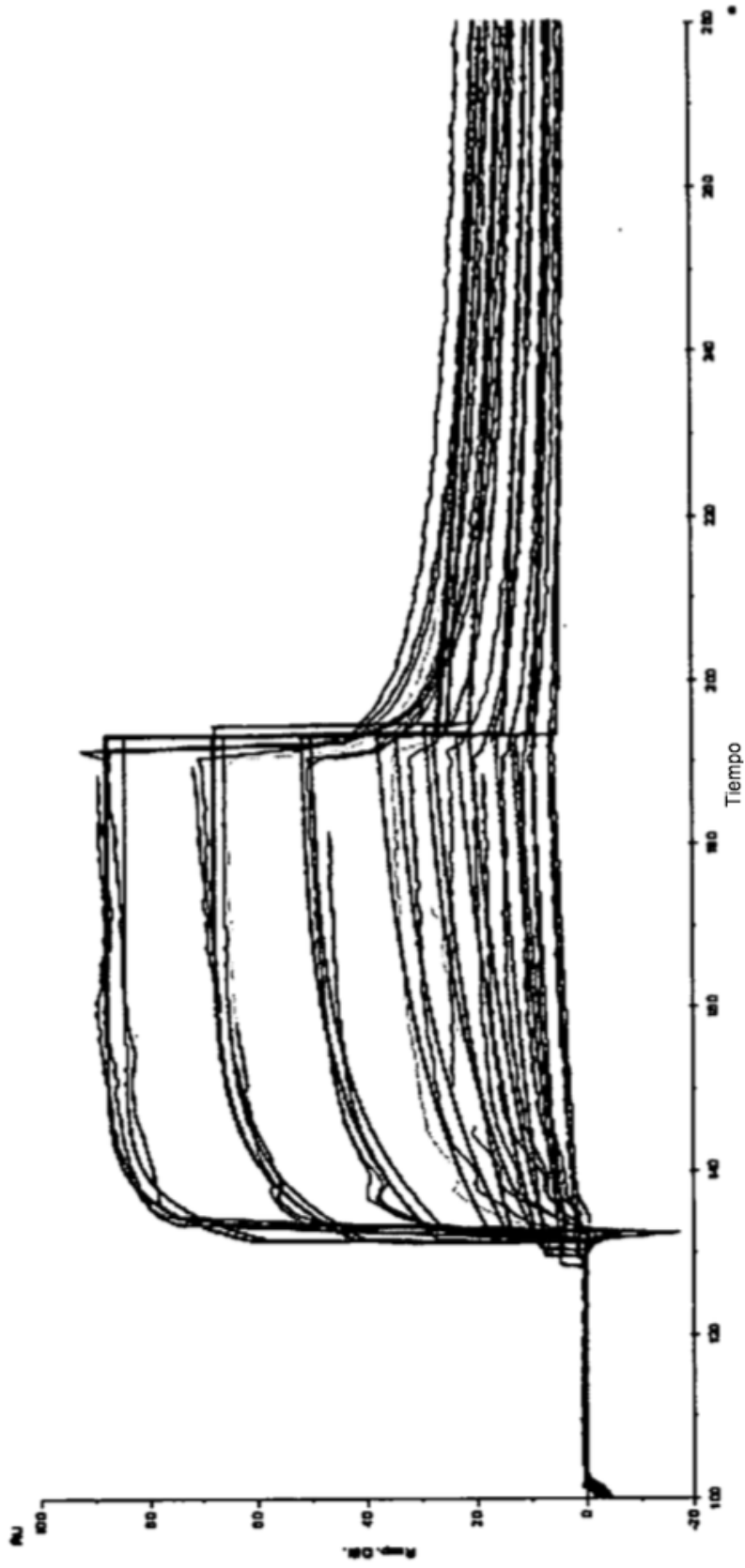


FIGURA 3

Enlace de fluorescencia de colágeno ZSILY

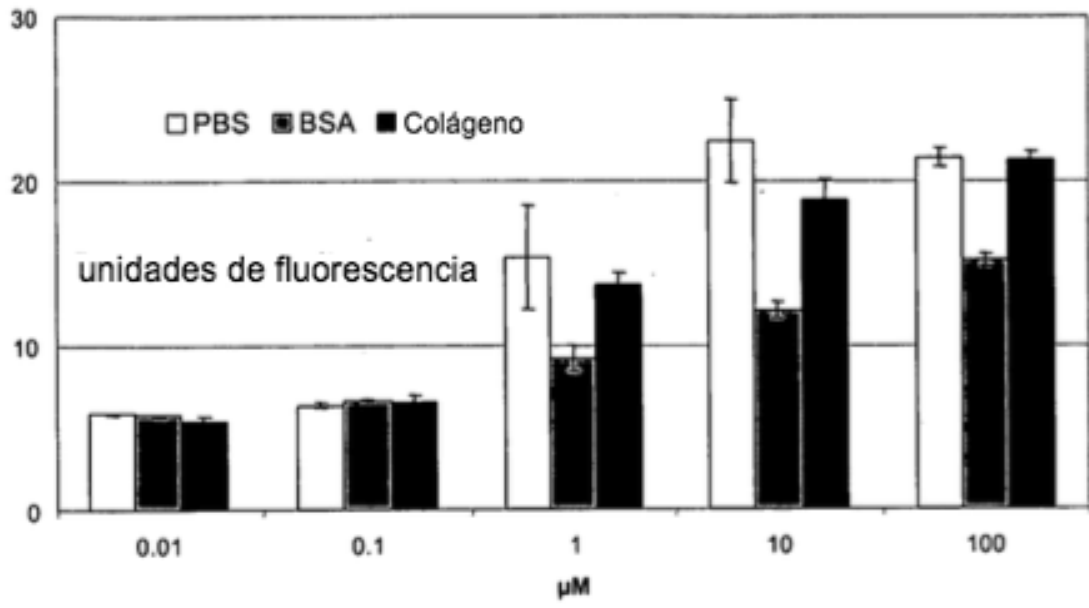


FIGURA 4

Enlace de fluorescencia de colágeno ZSILY

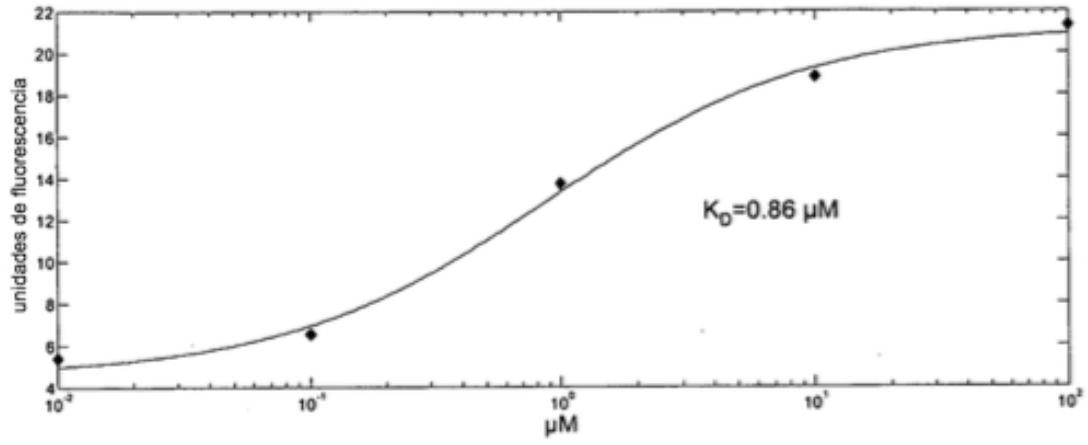
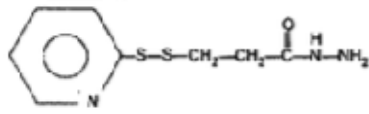
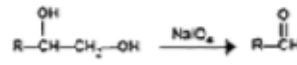


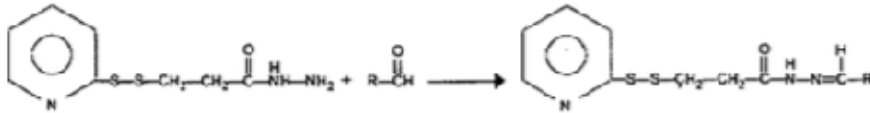
FIGURA 5



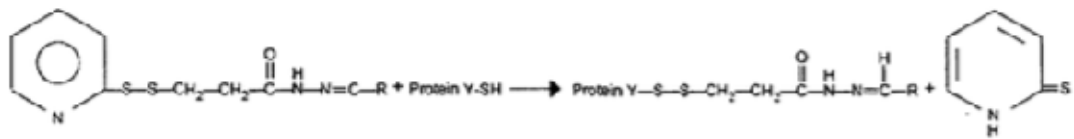
Hidrazida PDP
3-(2-piridilil)hidrazida de propionilo
MW 229.31



1. La oxidación de un cis-diol en un aldehído



2. La reacción de un aldehído con hidrazida PDP



3. La reacción de una hidrazida PDP modificada con aldehído con una proteína que contiene sulfhidrilo

FIGURA 6

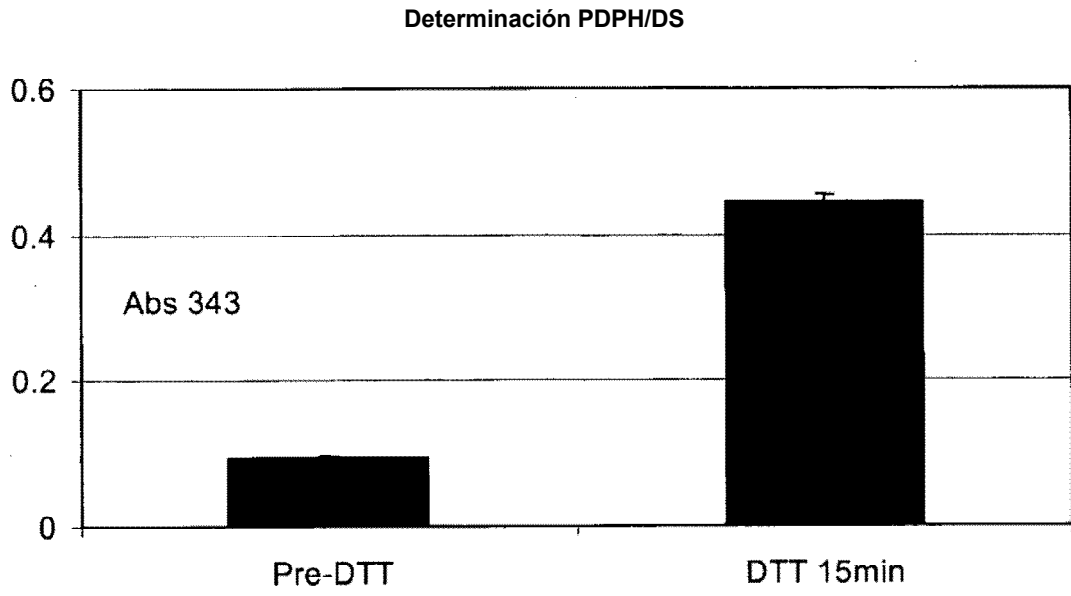


FIGURA 7

Enlace DS-ZSILY
preincubado con DS

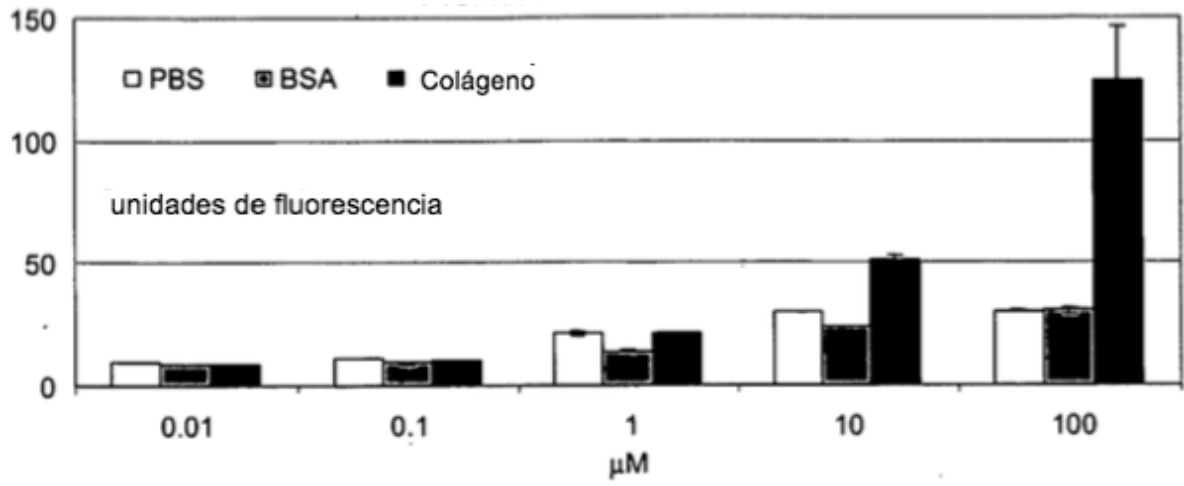


FIGURA 8

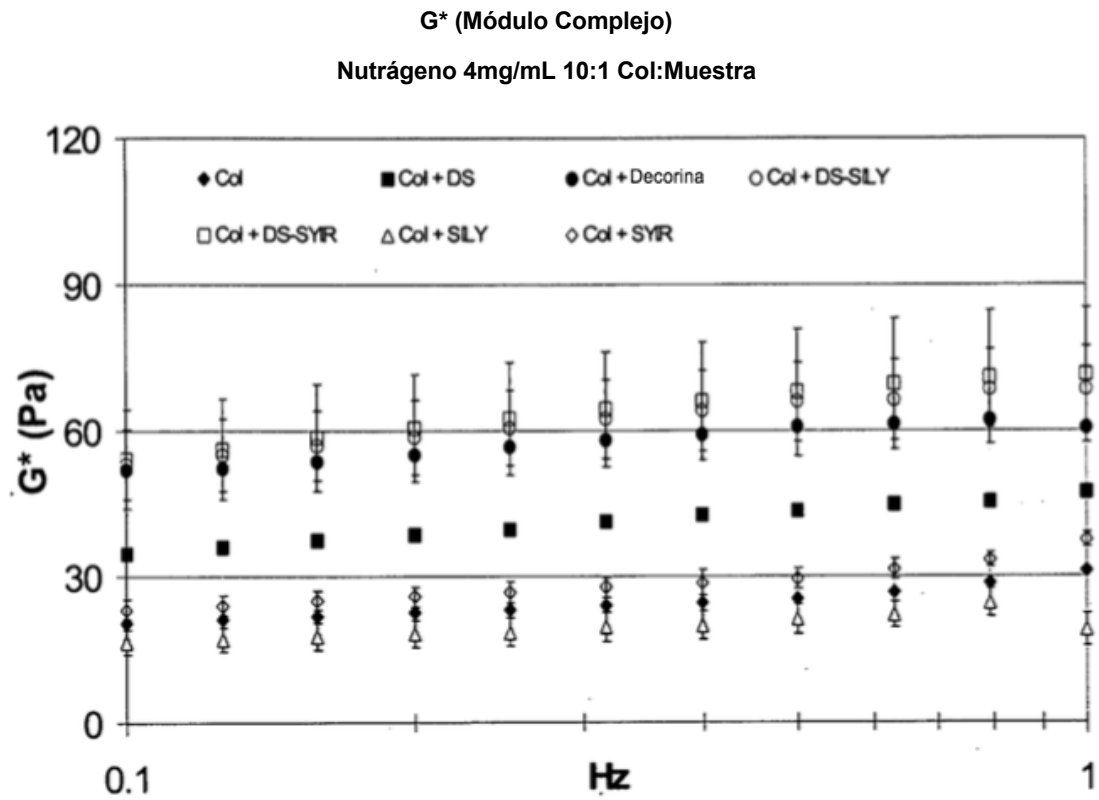


FIGURA 9

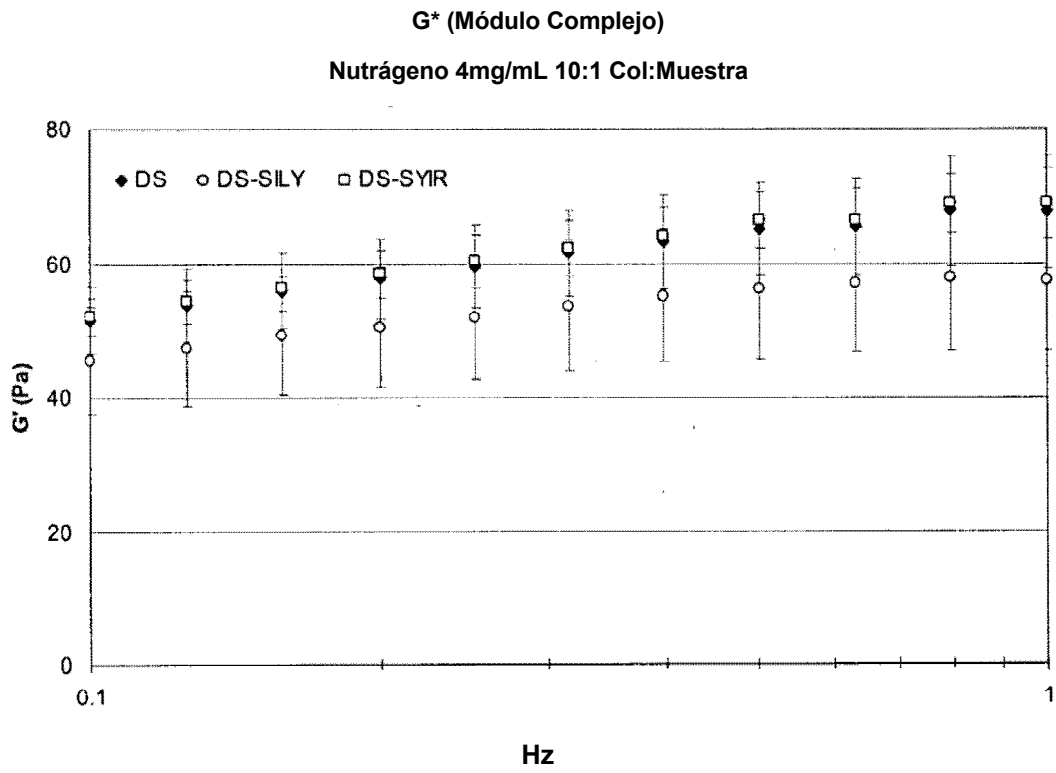


FIGURA 10

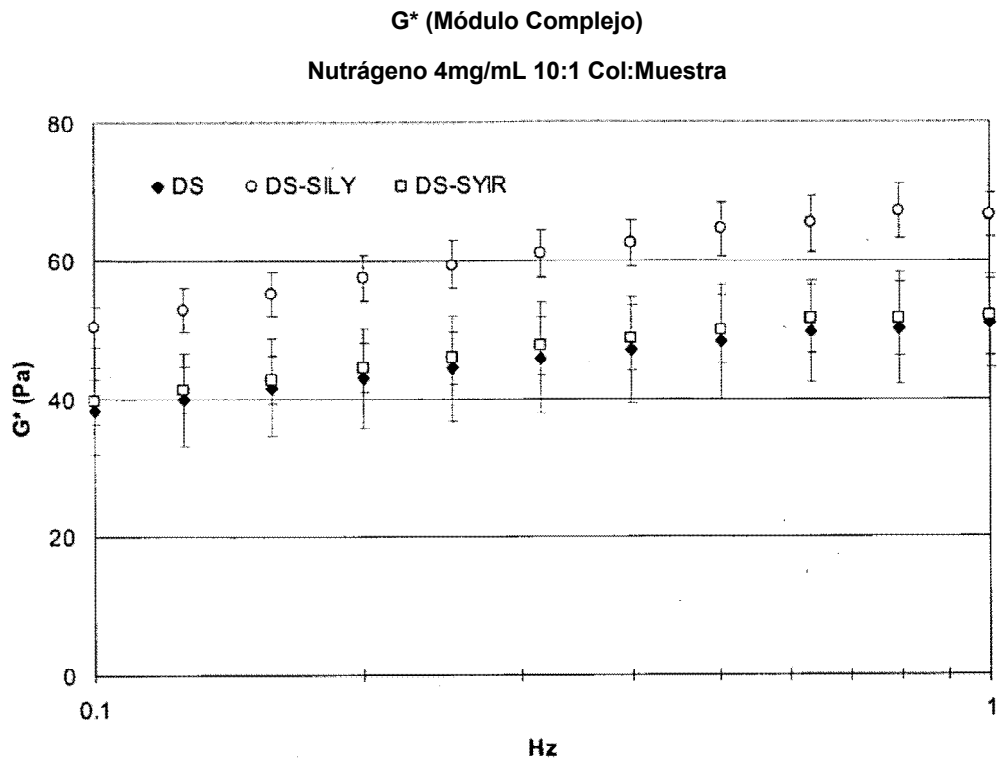


FIGURA 11

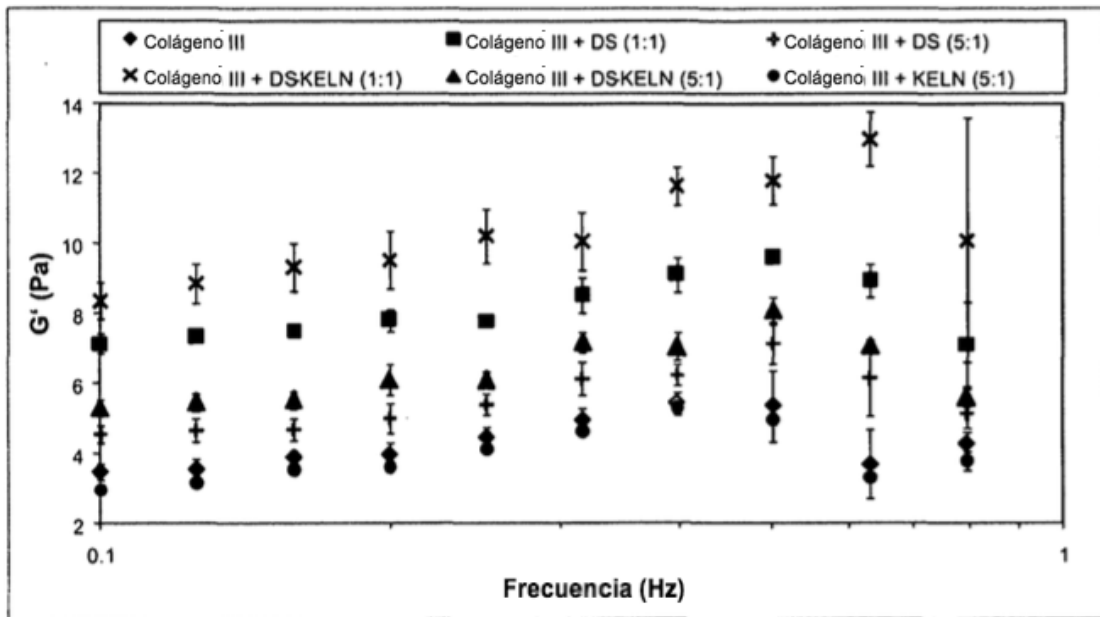


FIGURA 12

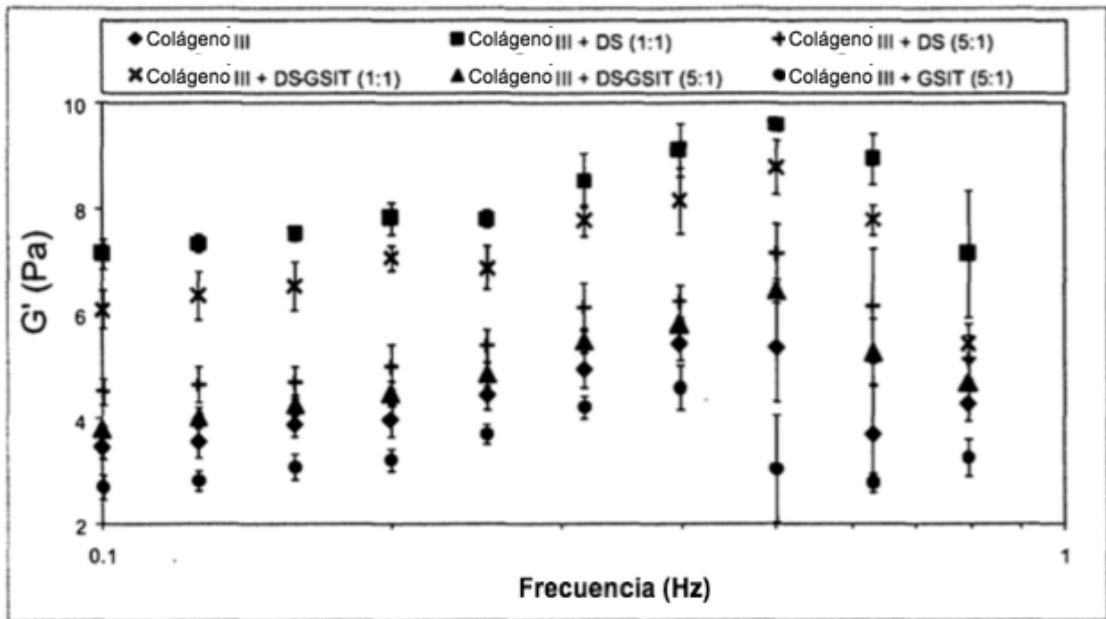


FIGURA 13

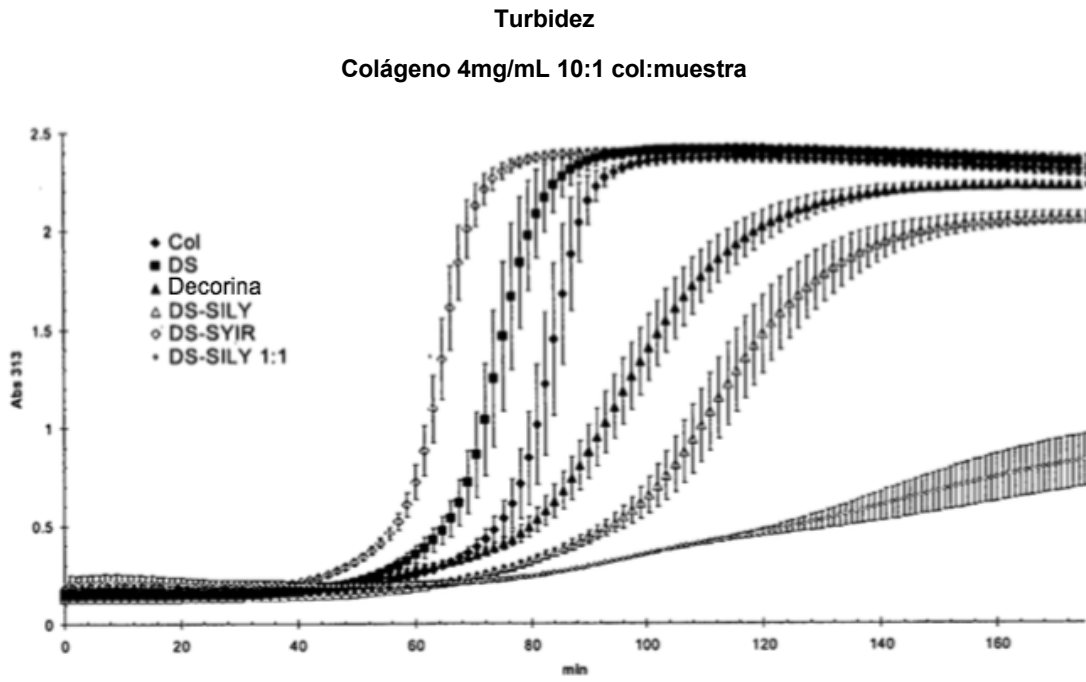


FIGURA 14

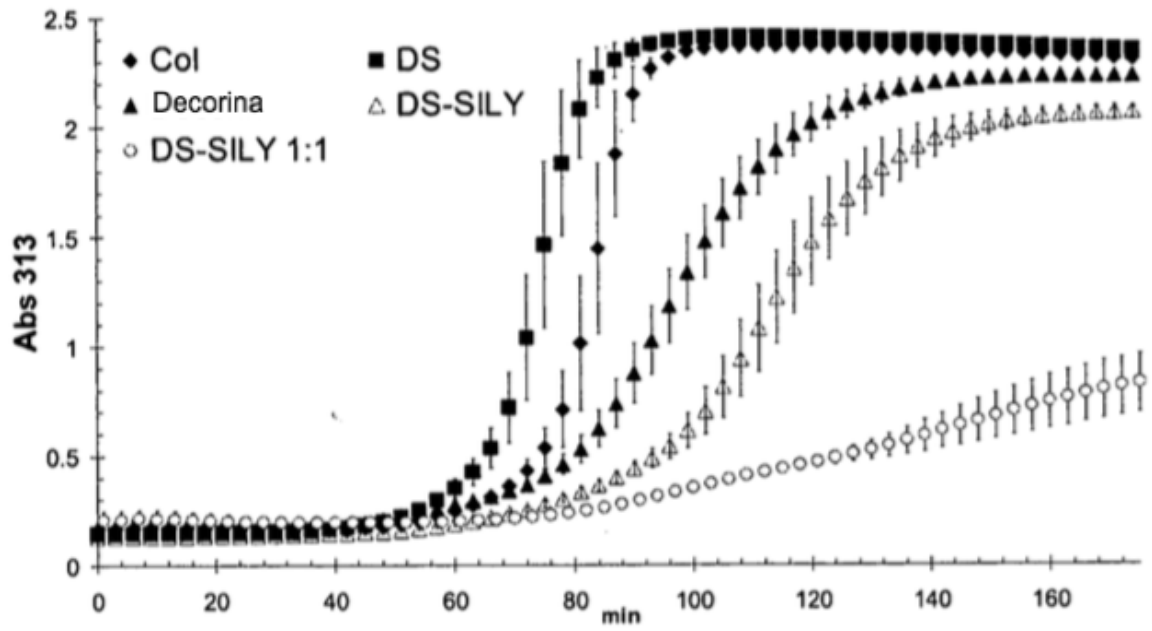


FIGURA 15

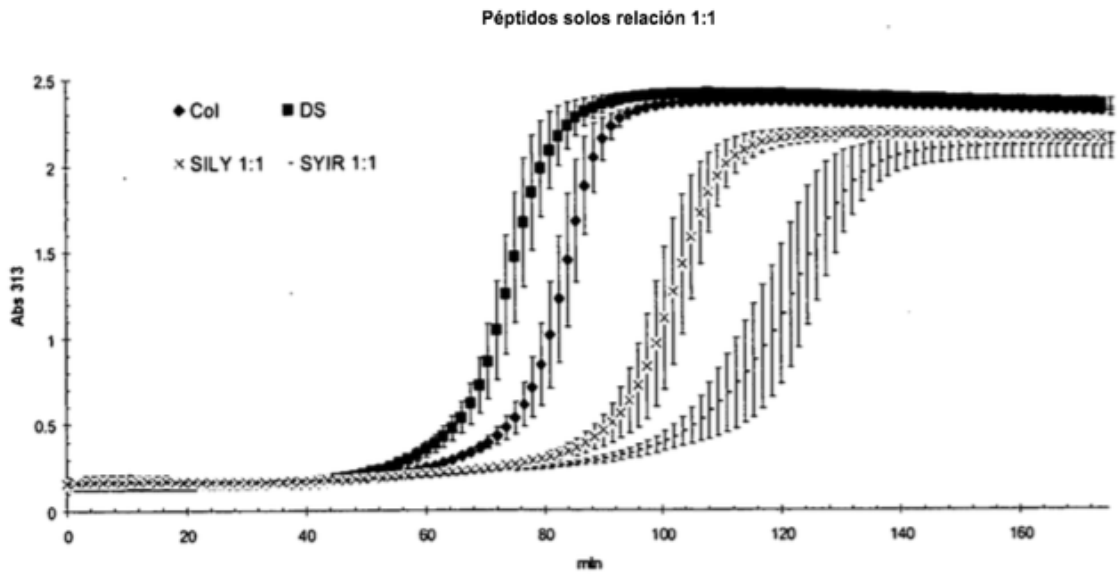


FIGURA 16

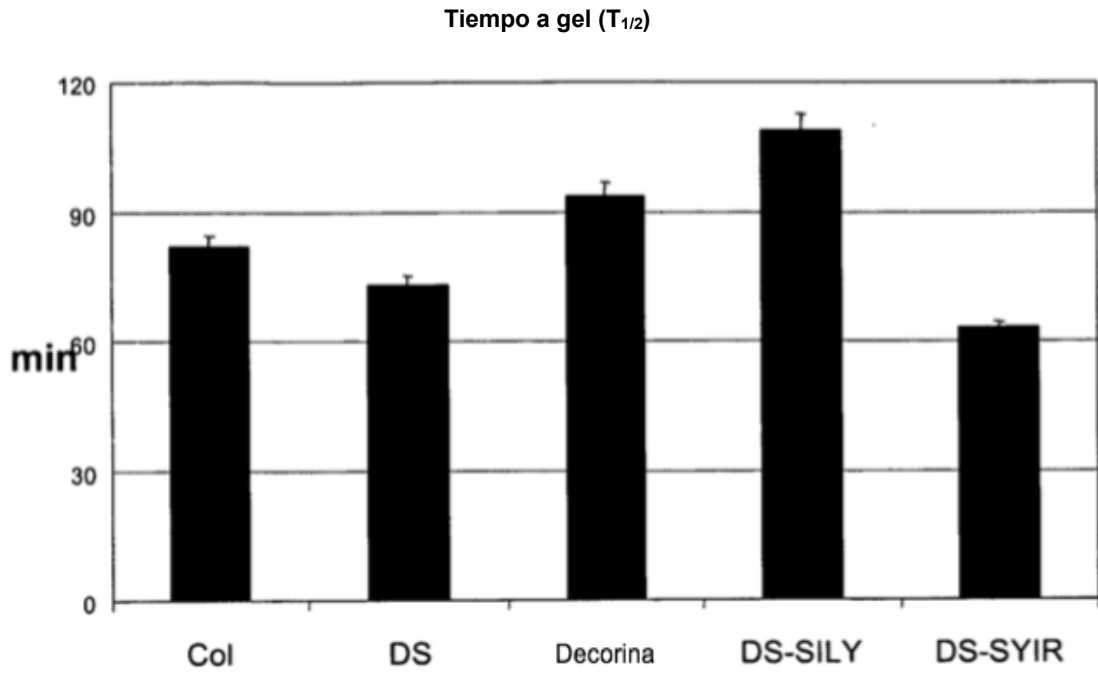


FIGURA 17

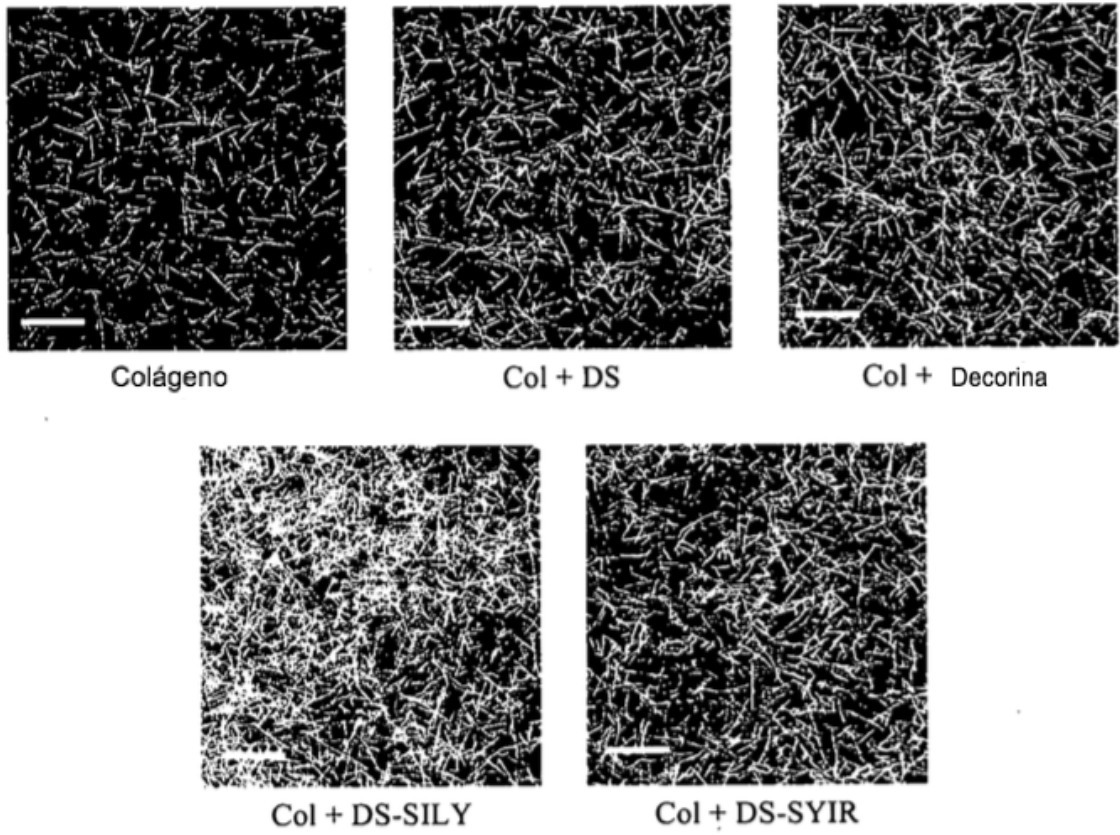


FIGURA 18

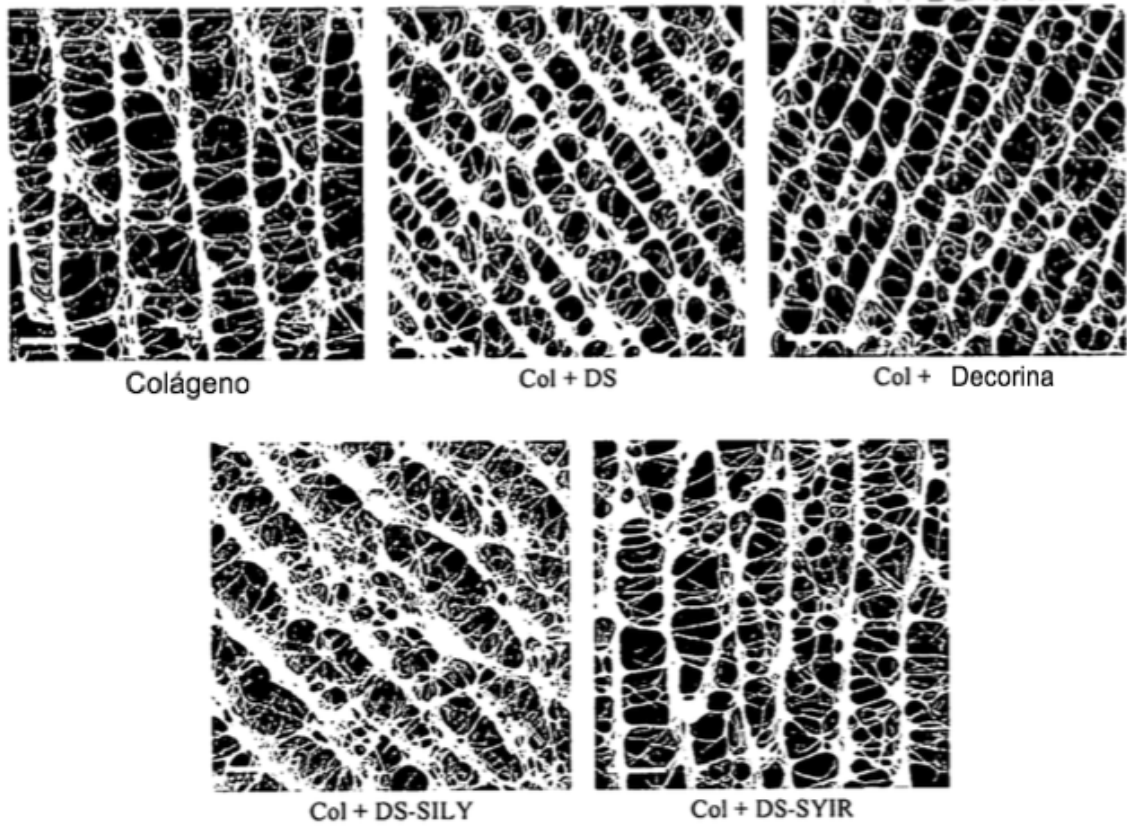


FIGURA 19

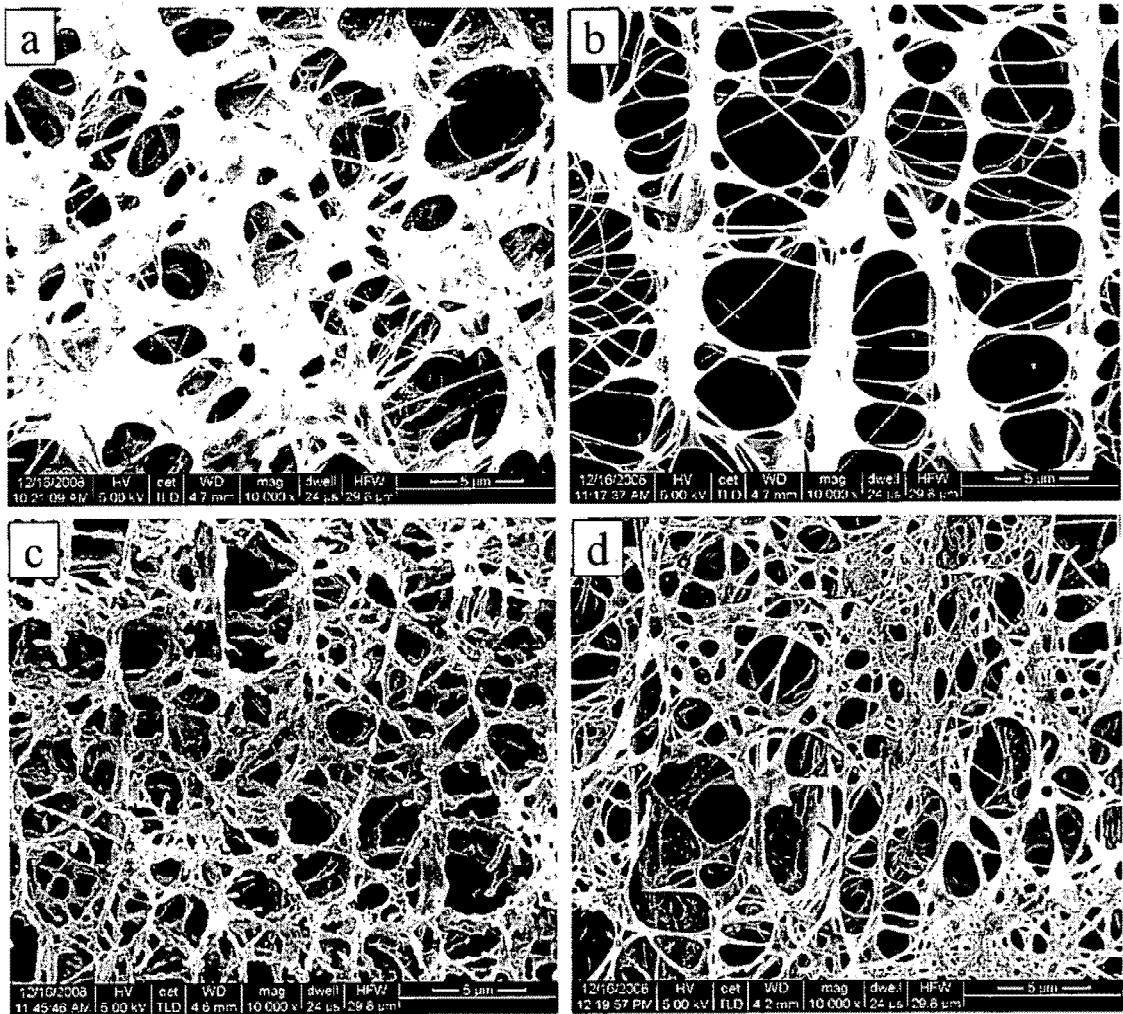


FIGURA 20

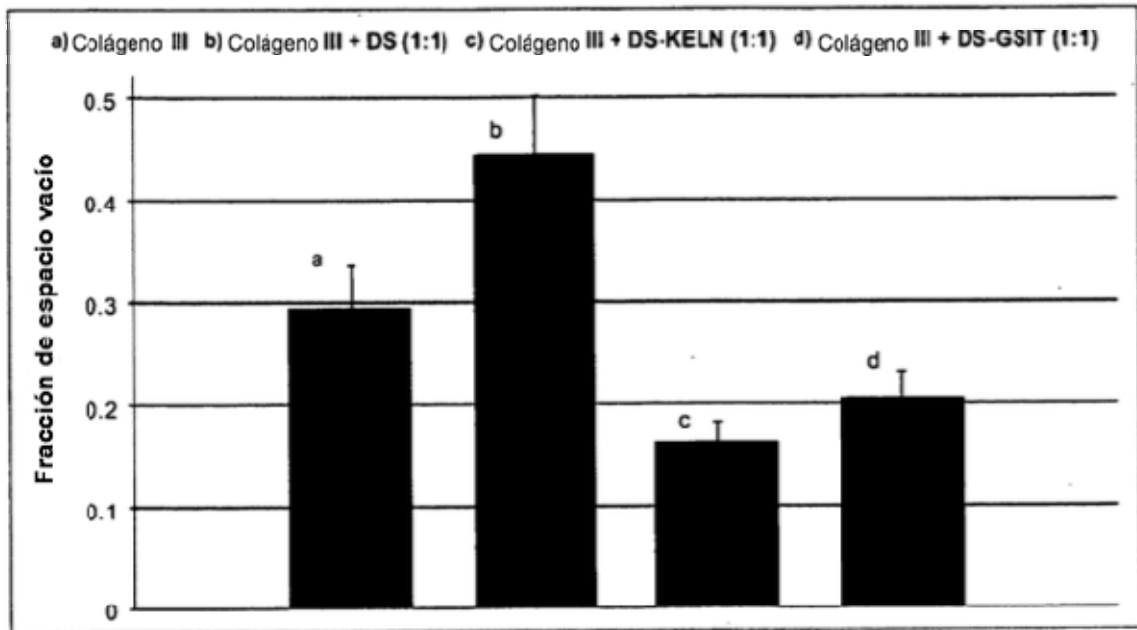


FIGURA 21

Diámetro de fibrilo promedio (Crio-SEM)

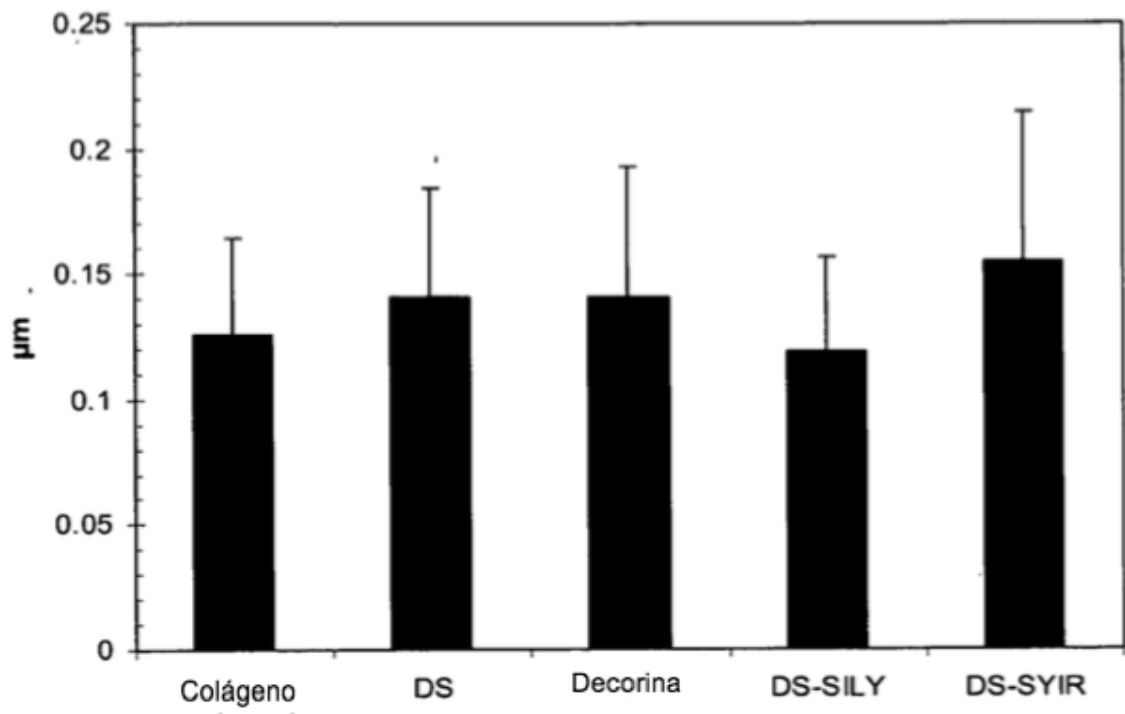


FIGURA 22

Distancia de hoja (Crio-SEM)

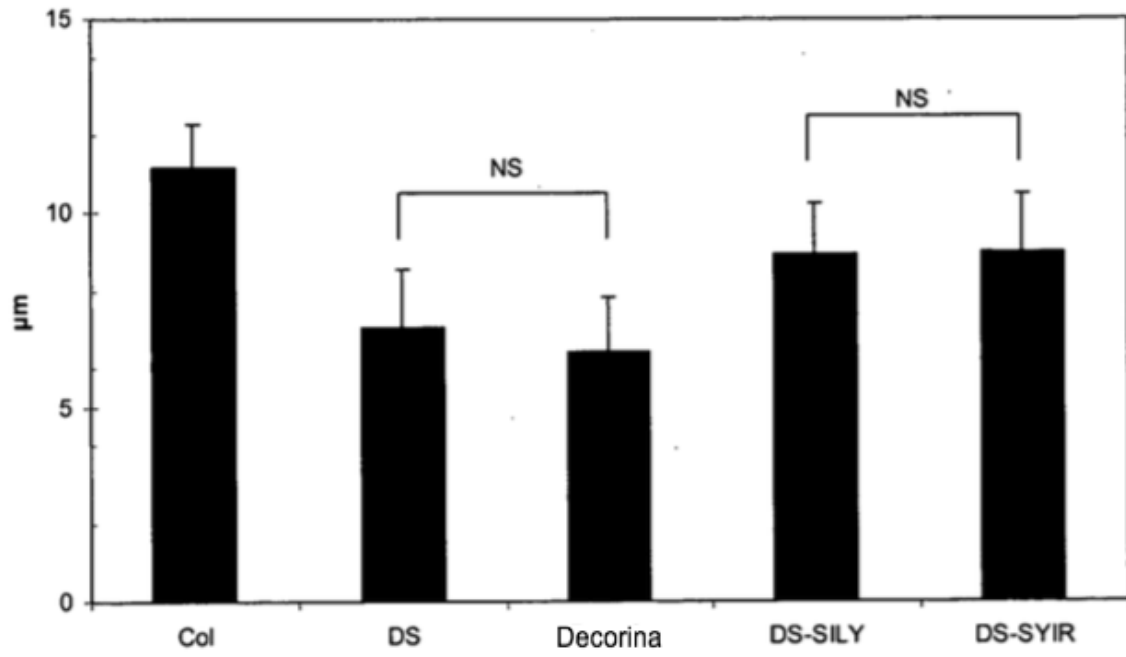


FIGURA 23

Caracterización Heparina/SILY

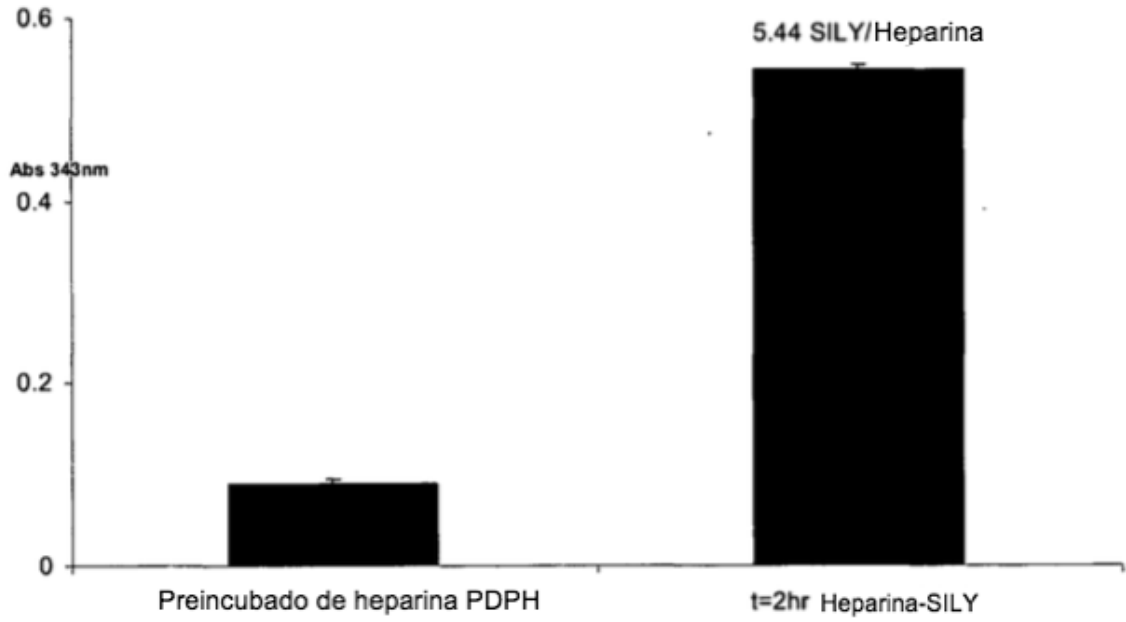


FIGURA 24

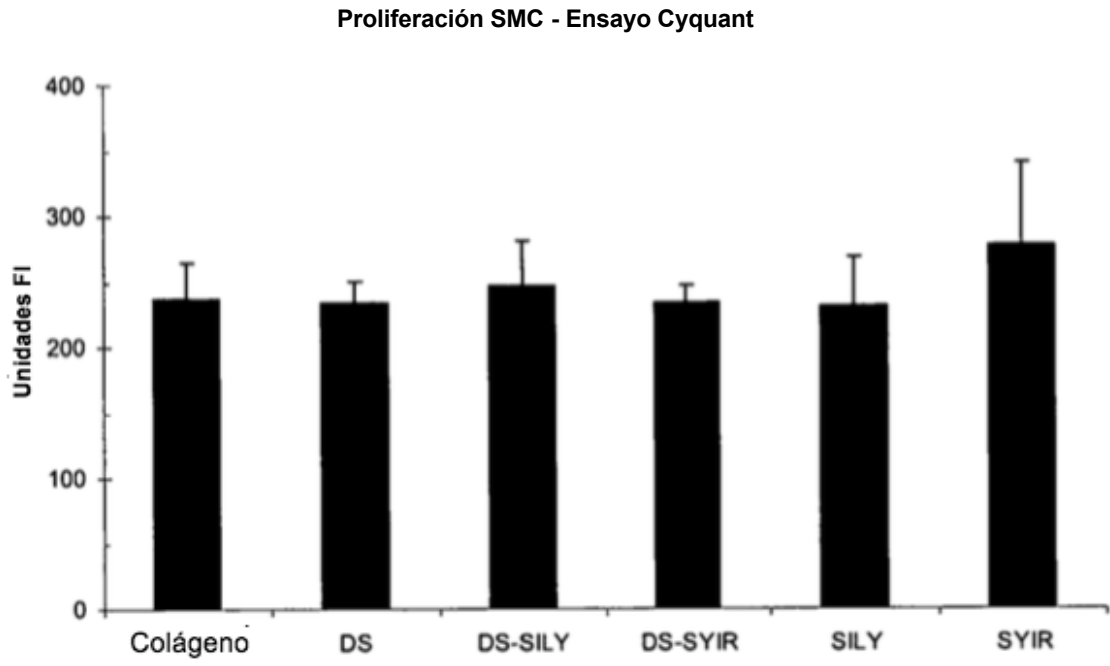


FIGURA 25

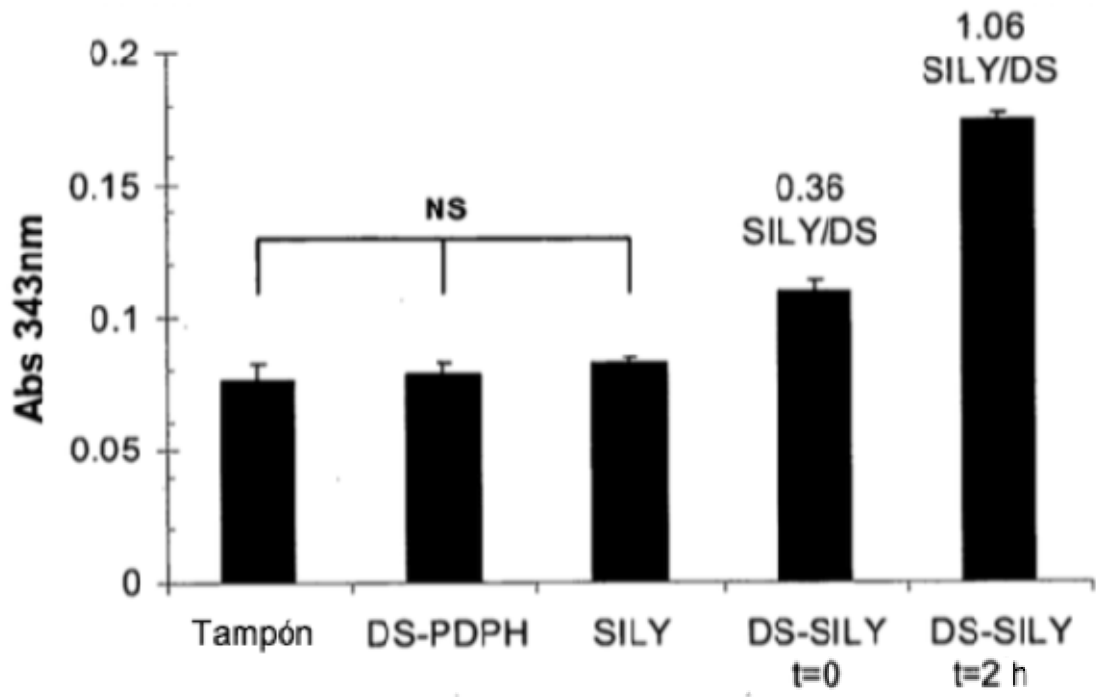


FIGURA 26

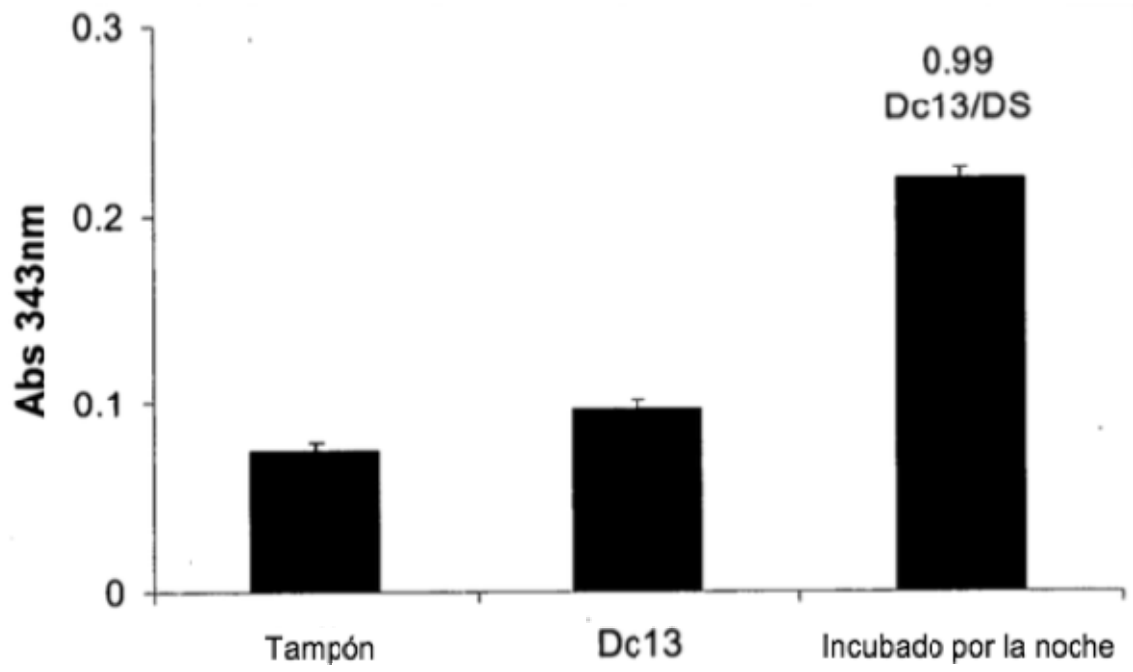


FIGURA 27

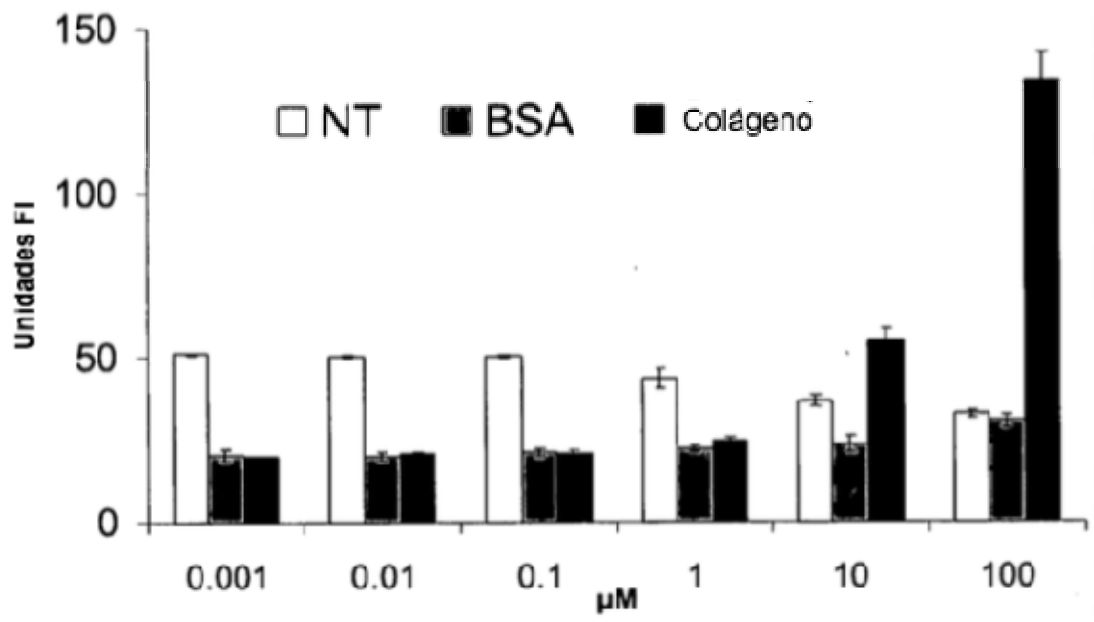


FIGURA 28

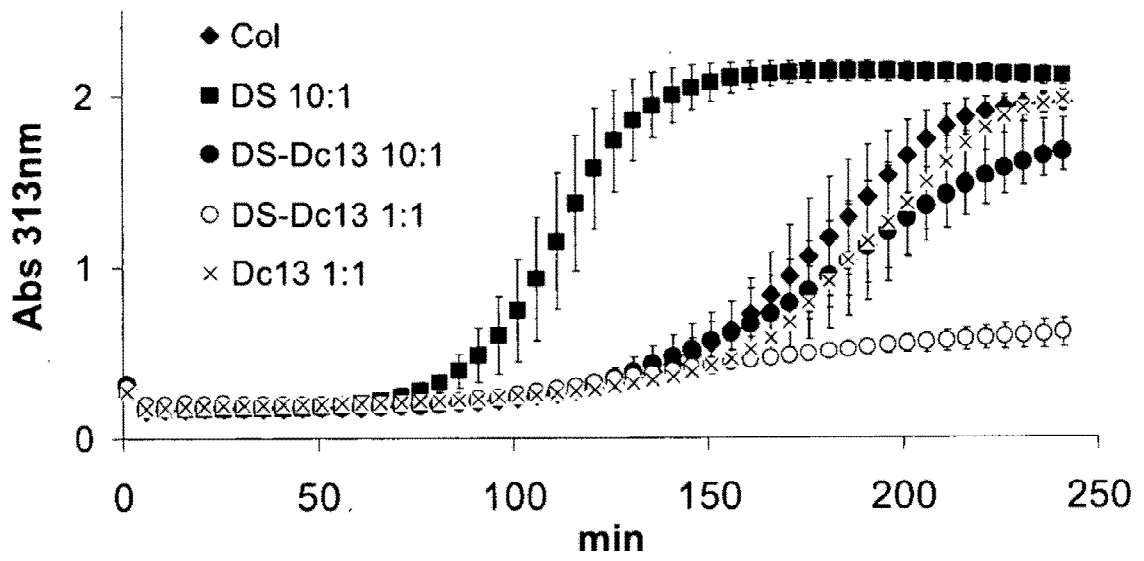


FIGURA 29

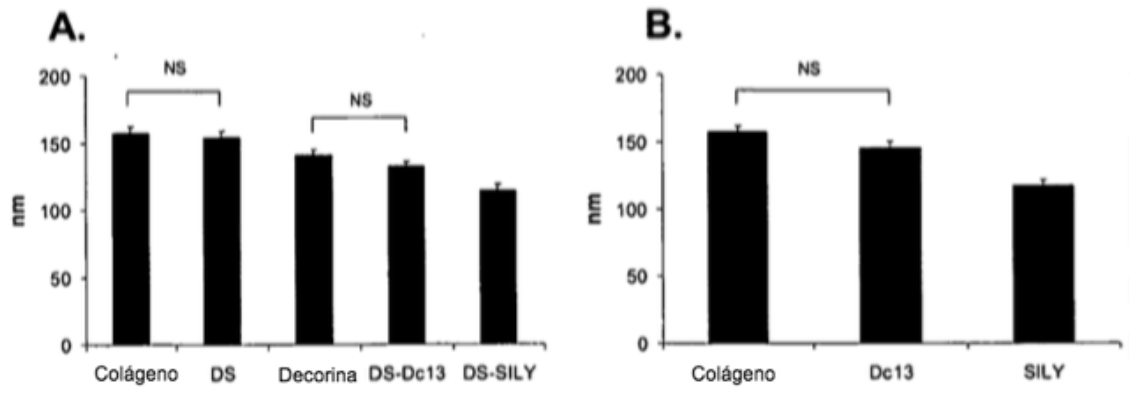


FIGURA 30

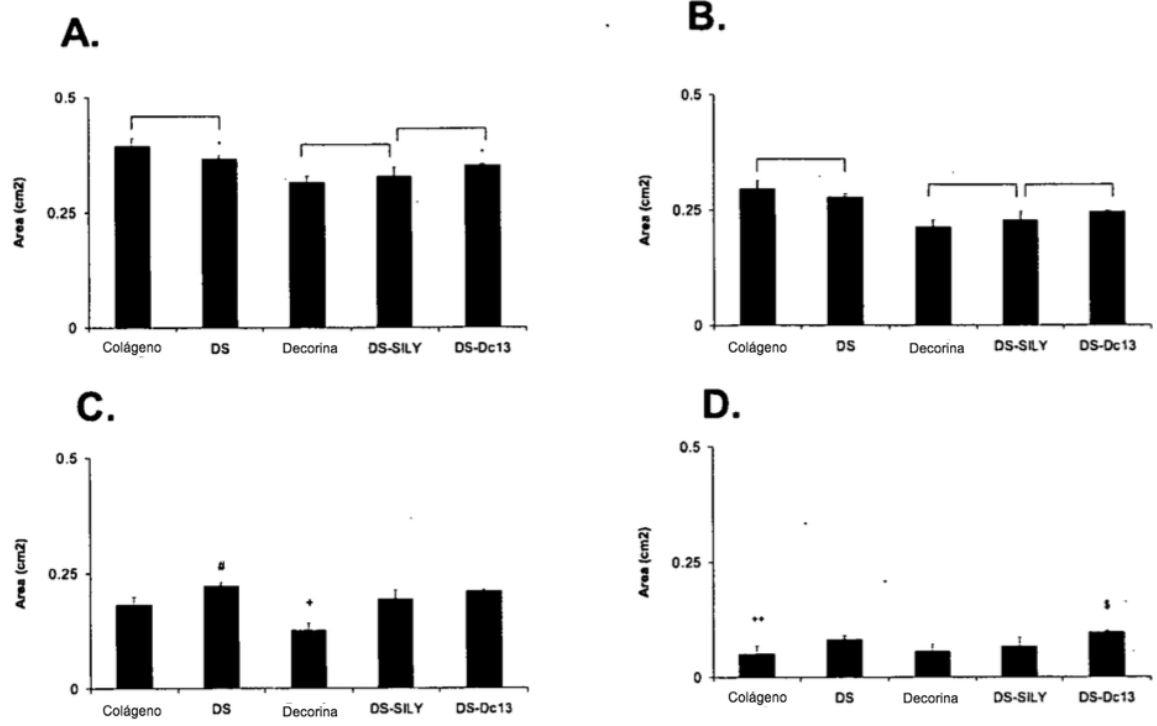


FIGURA 31

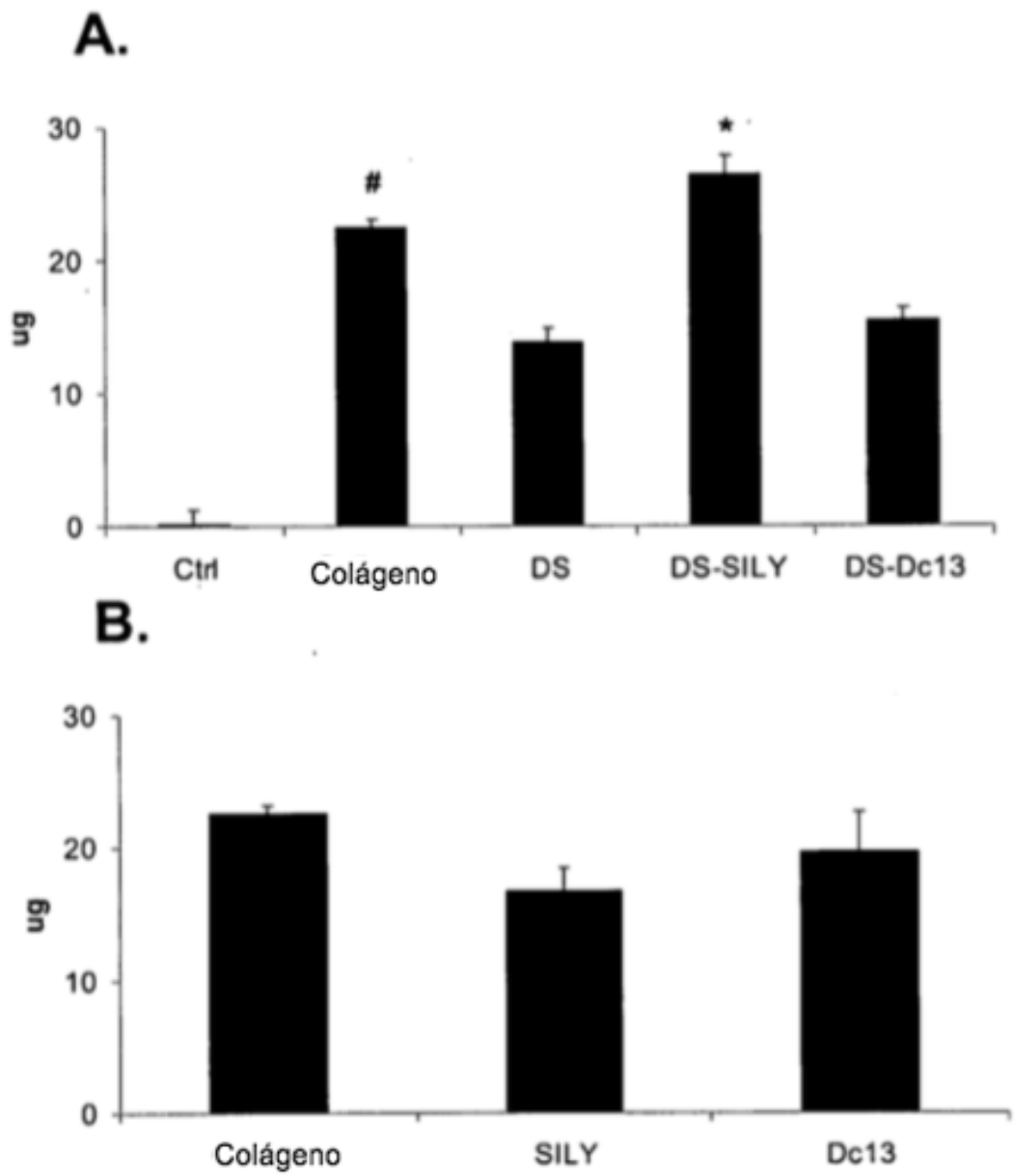


FIGURA 32

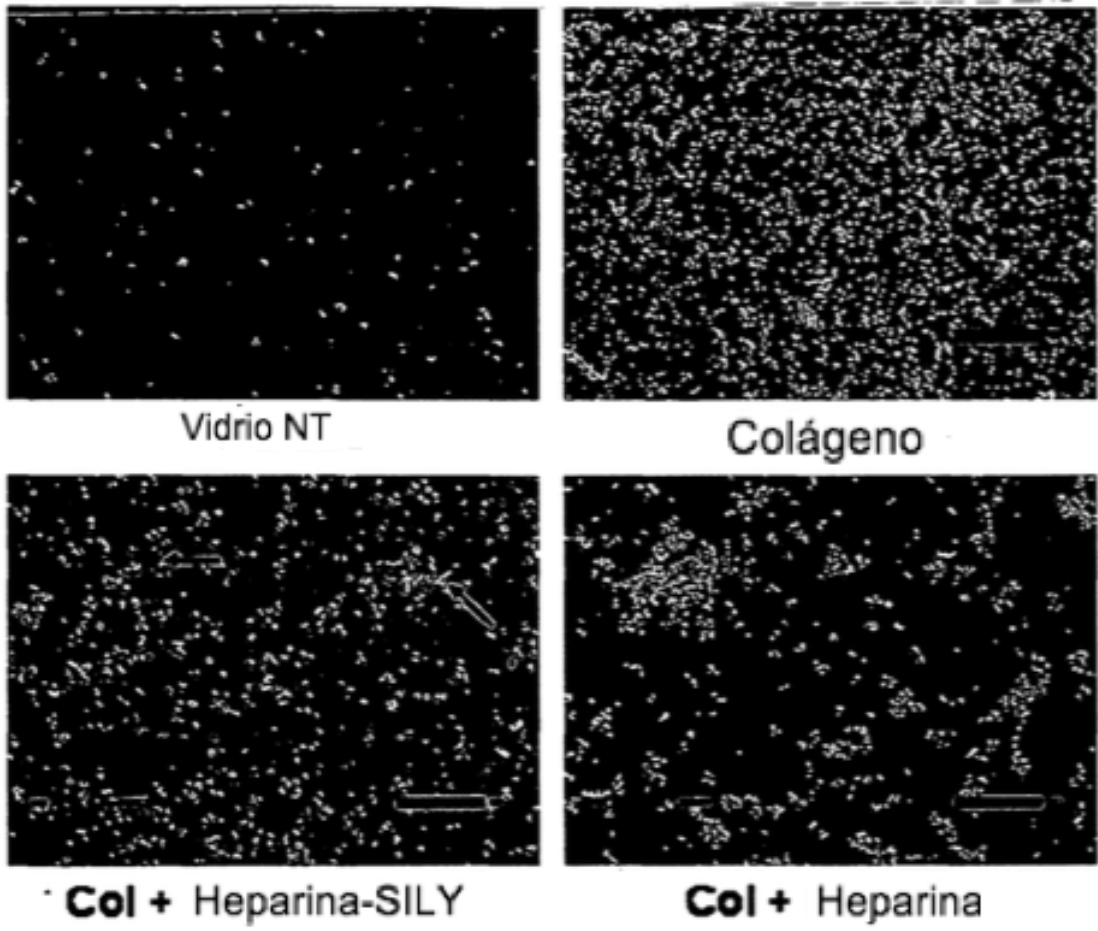


FIGURA 33

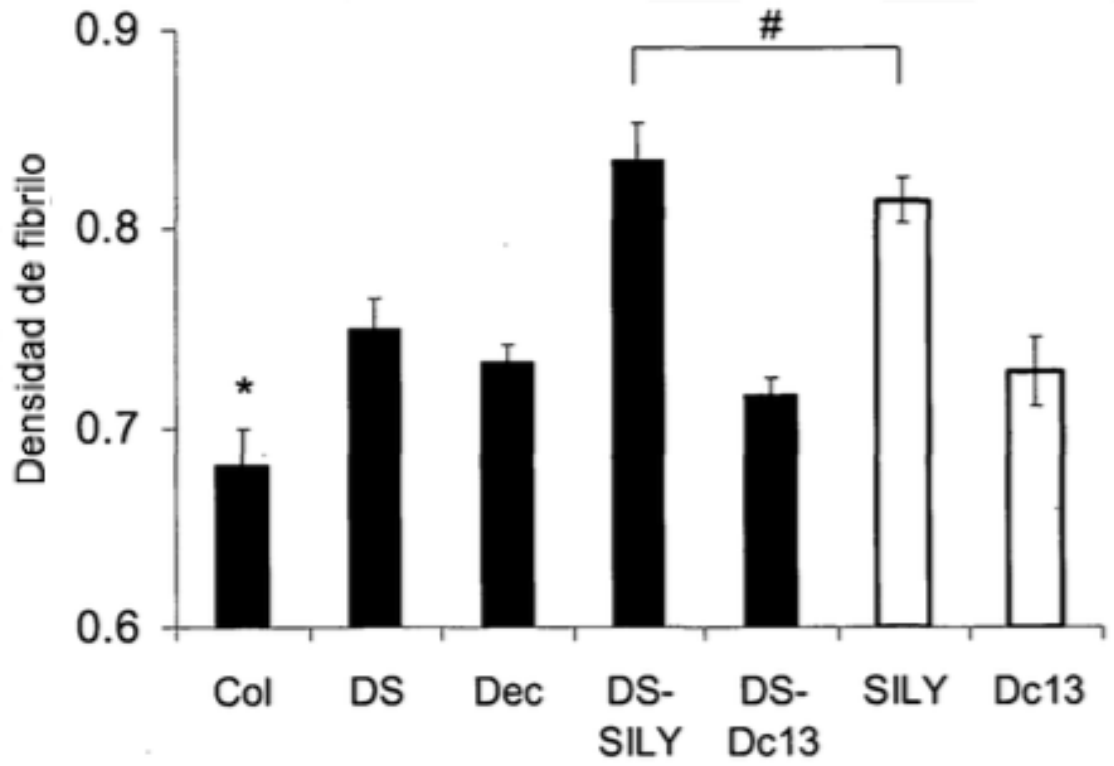


FIGURA 34

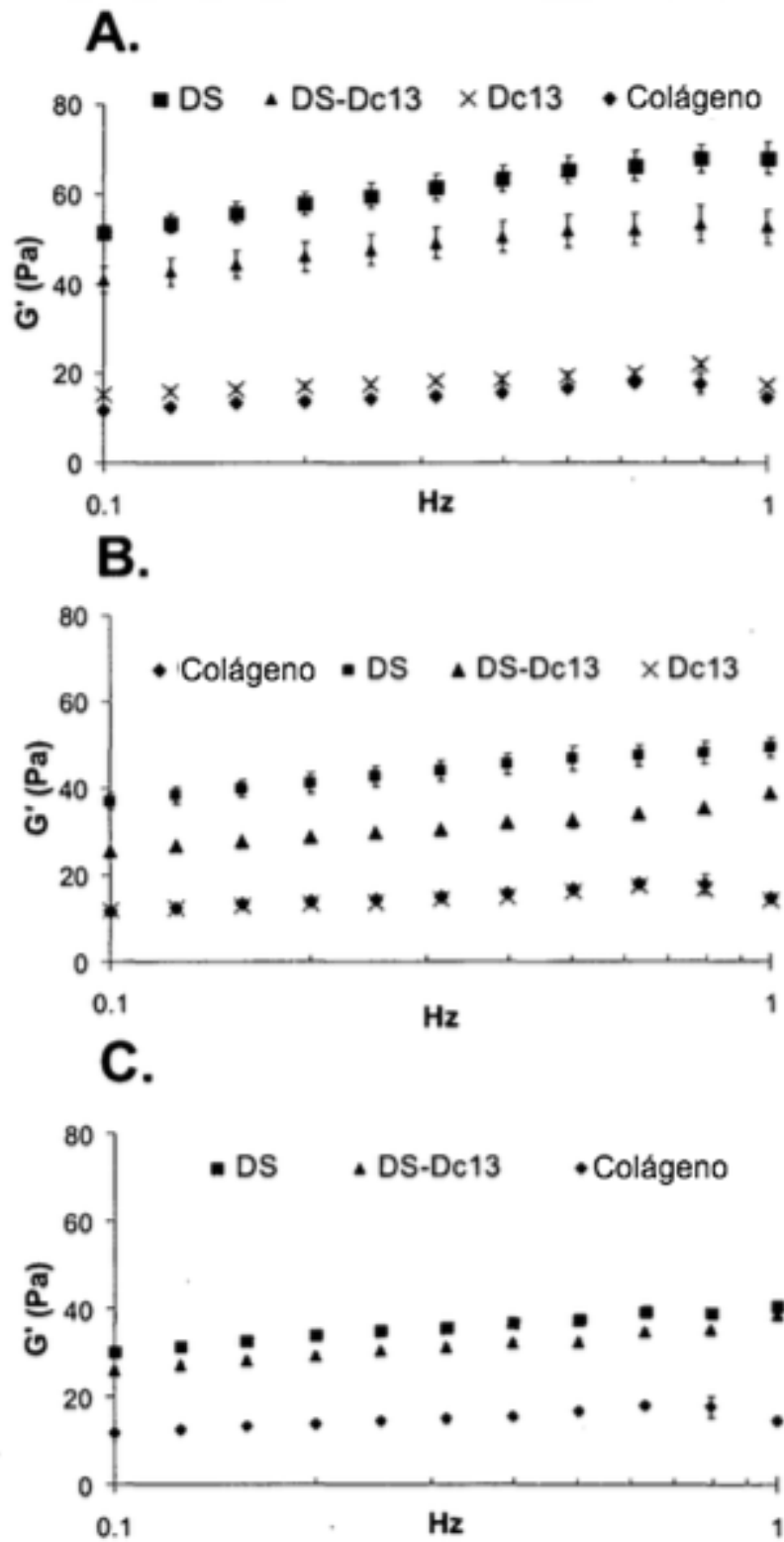


FIGURA 35

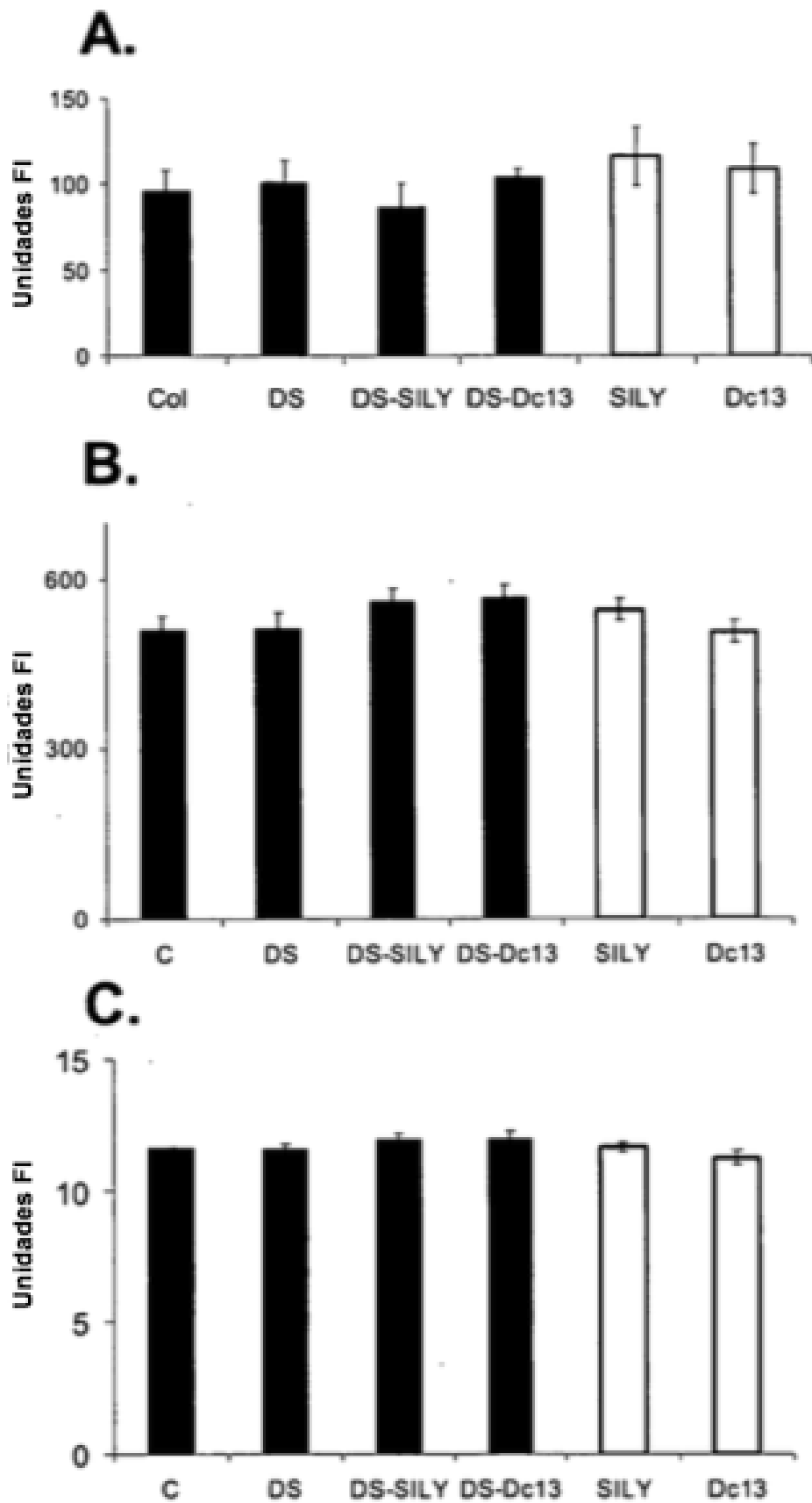


FIGURA 36

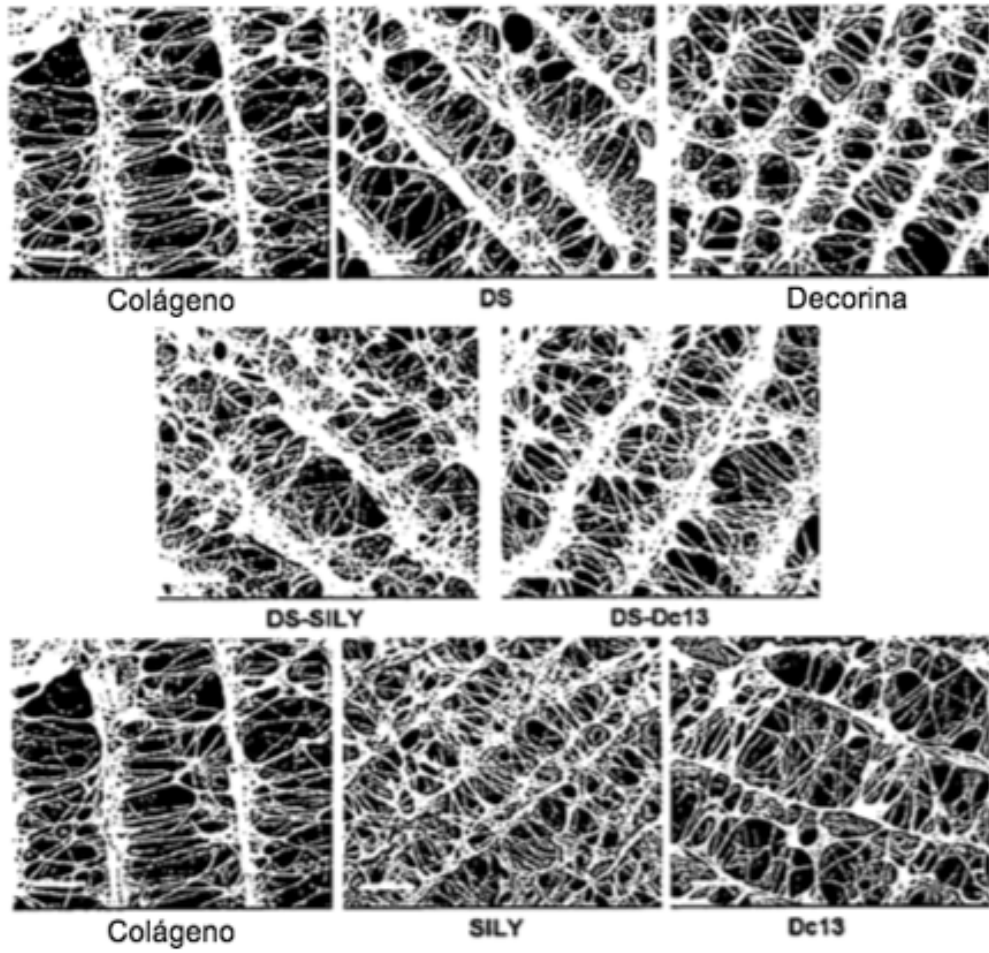


FIGURA 37

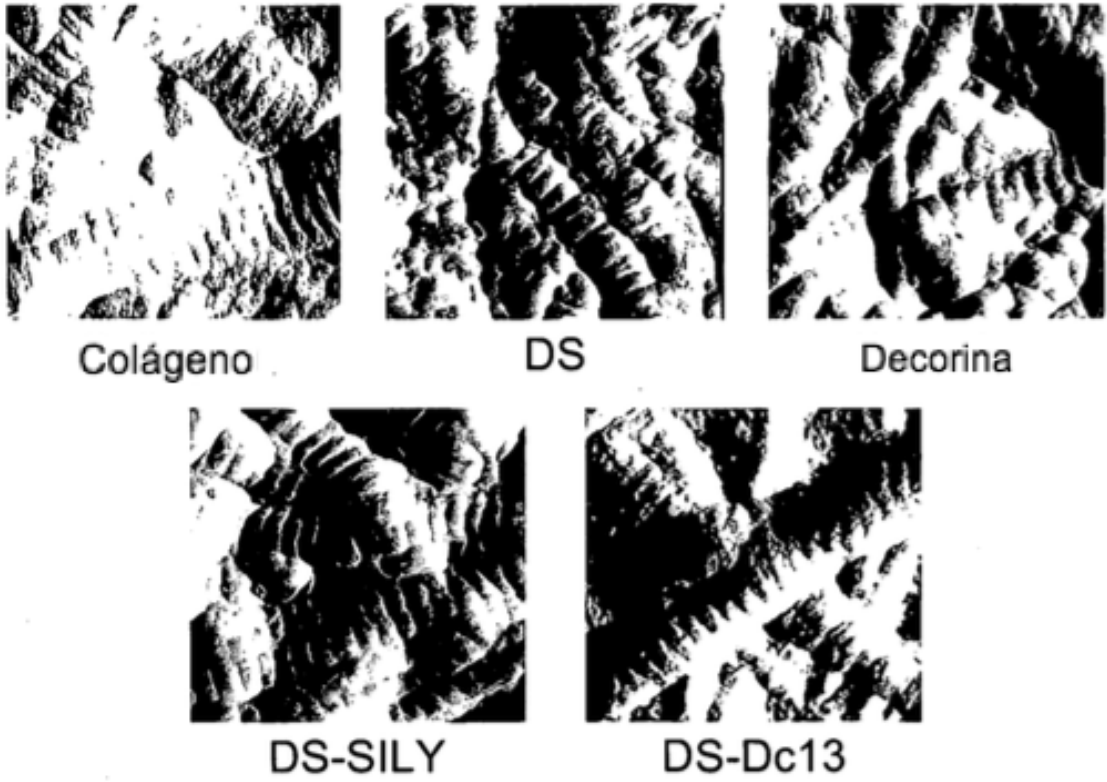


FIGURA 38

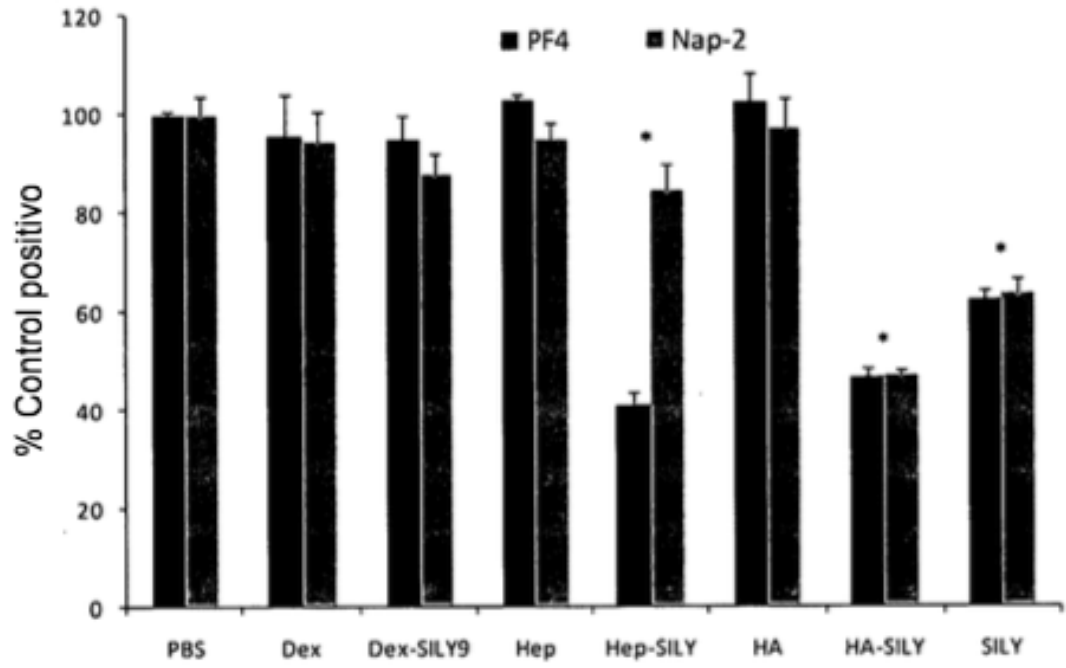


FIGURA 39

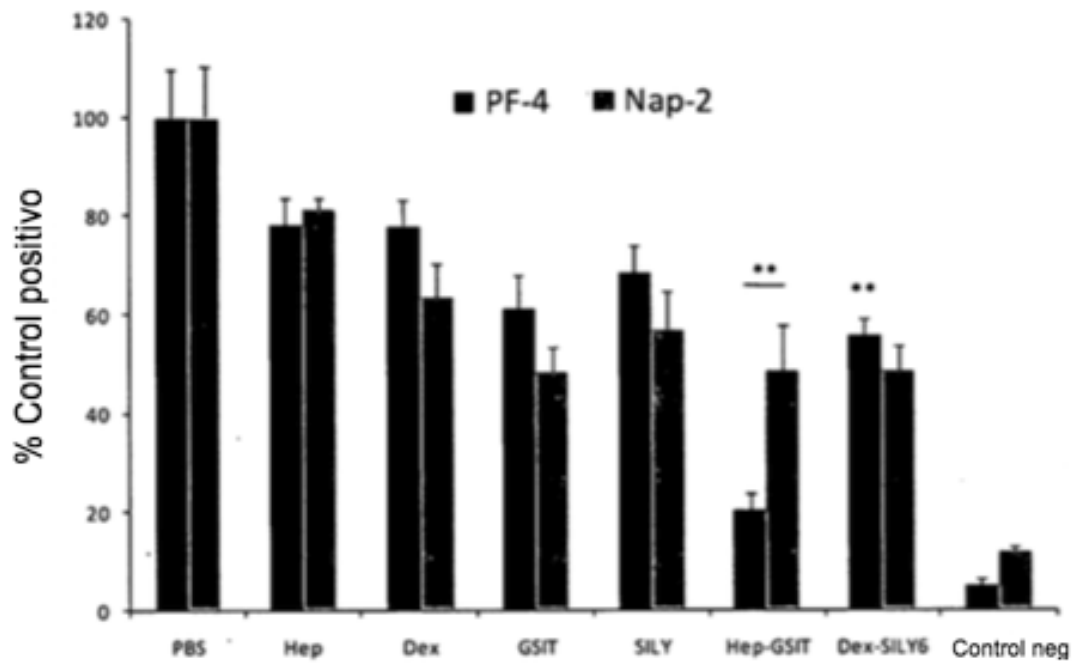


FIGURA 40

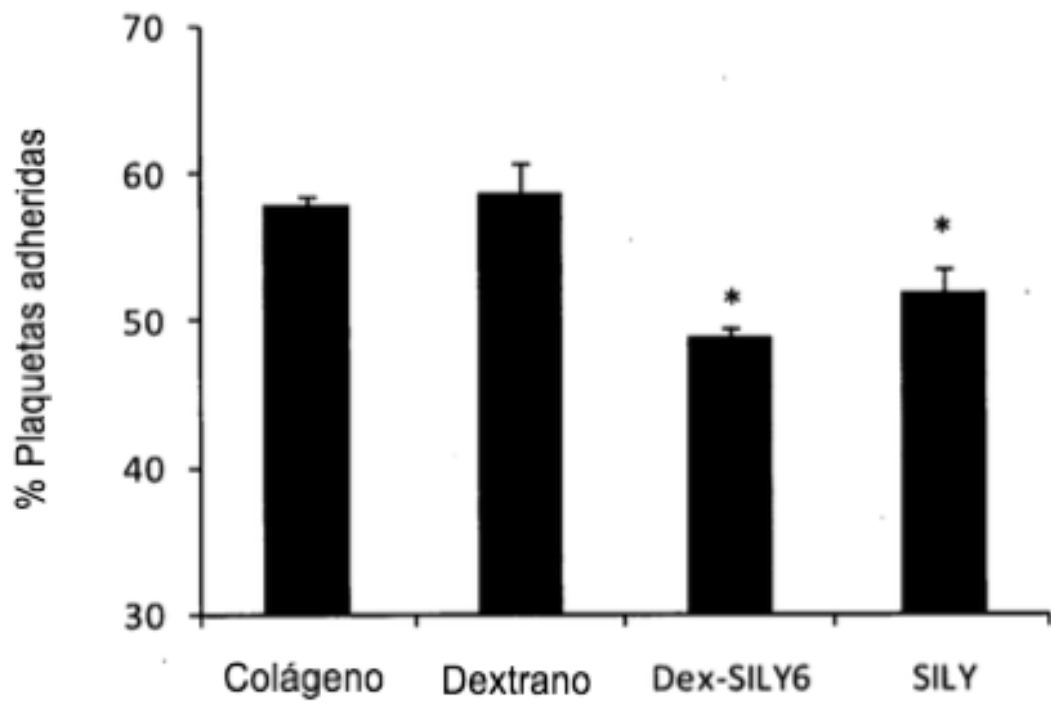


FIGURA 41

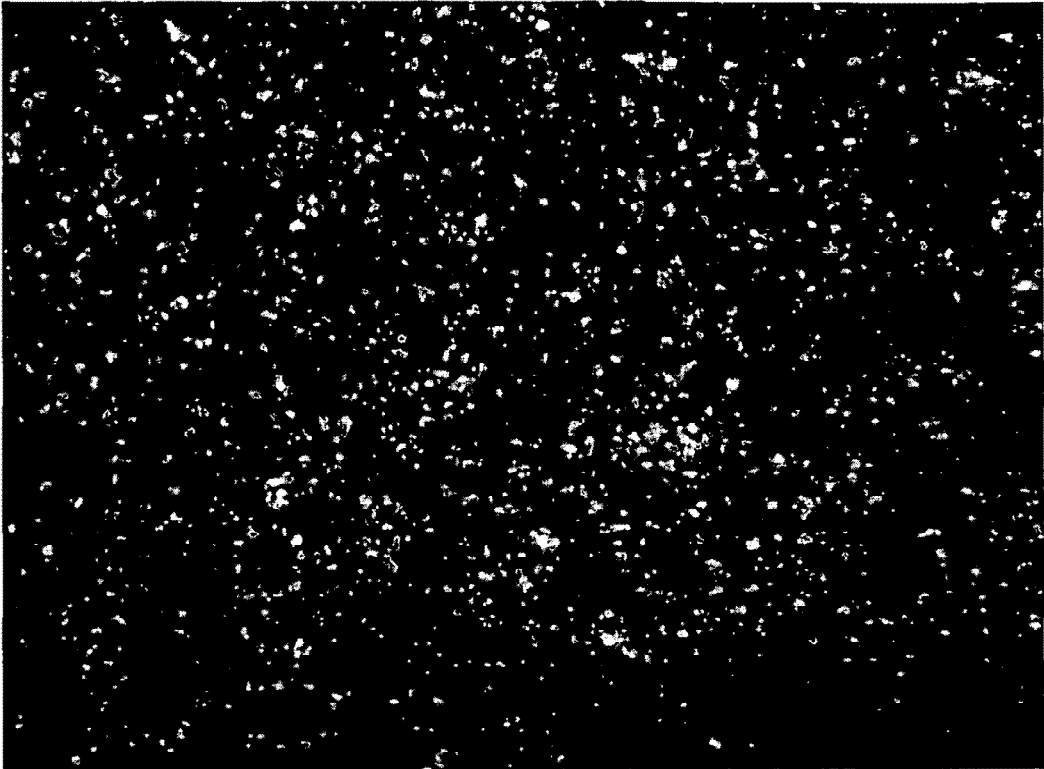


FIGURA 42

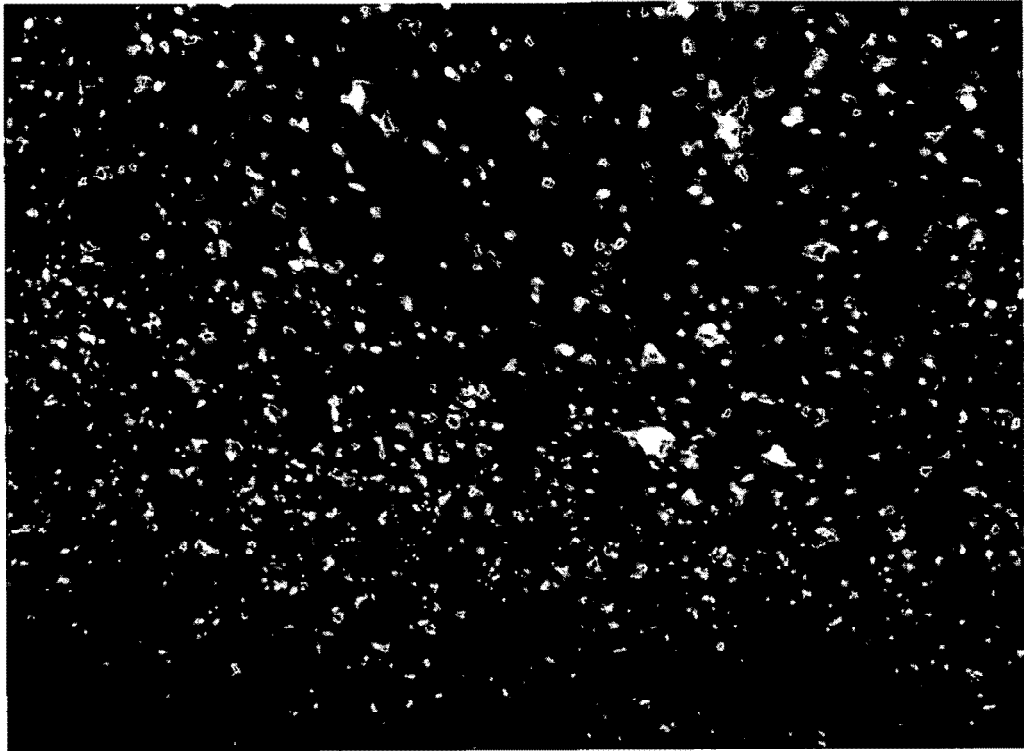


FIGURA 43

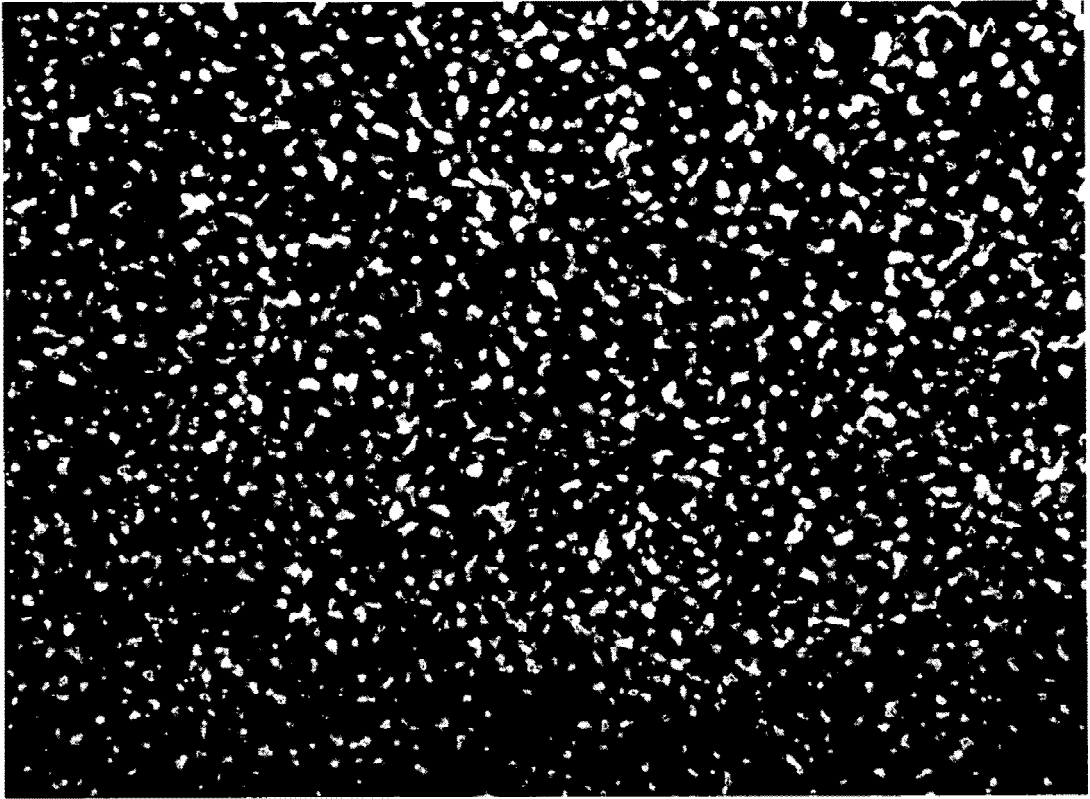


FIGURA 44

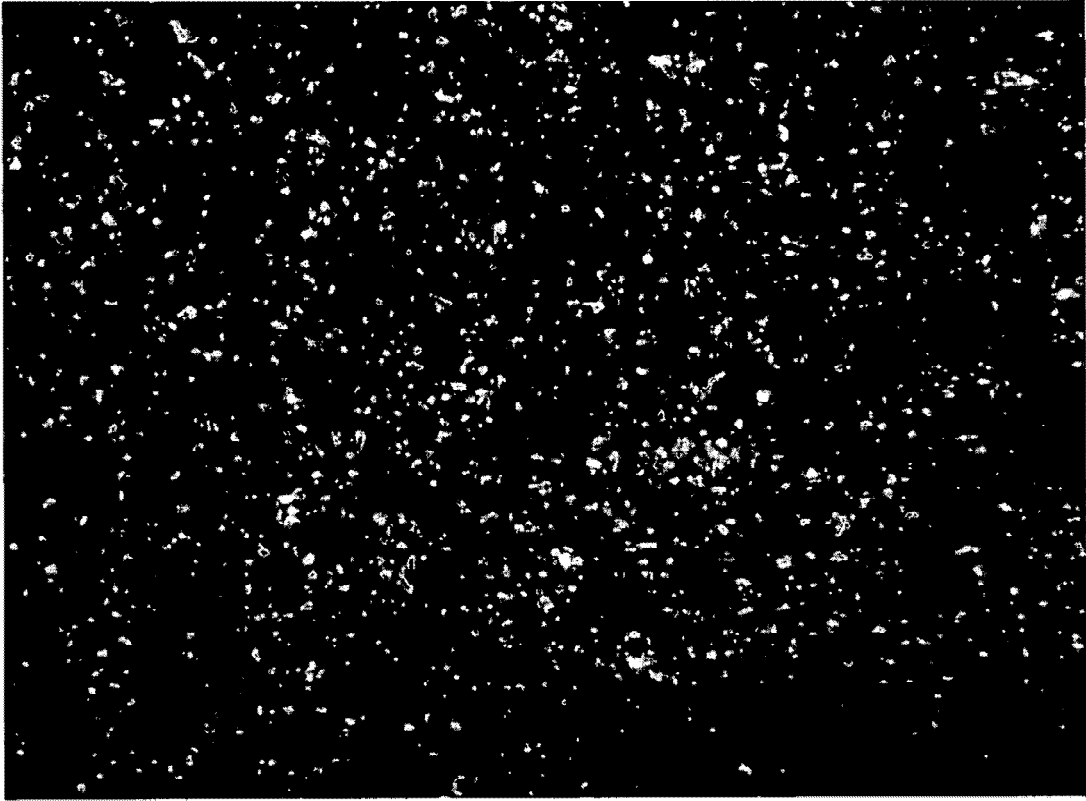


FIGURA 45

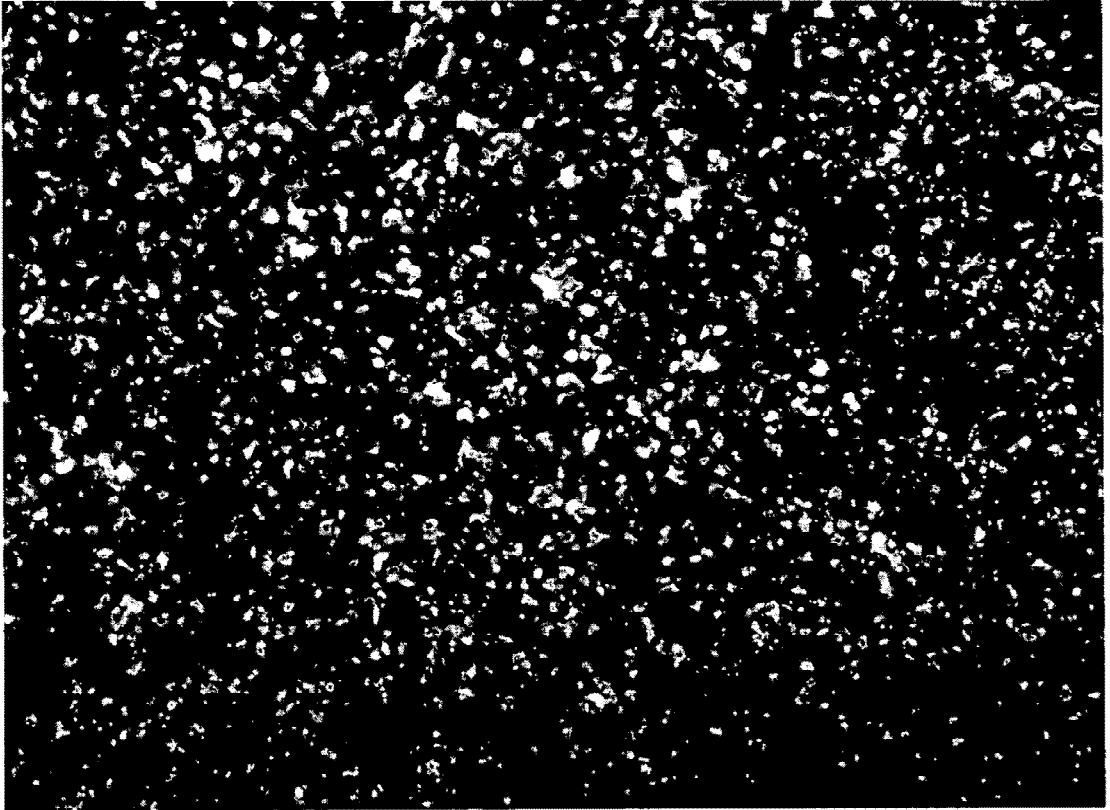


FIGURA 46

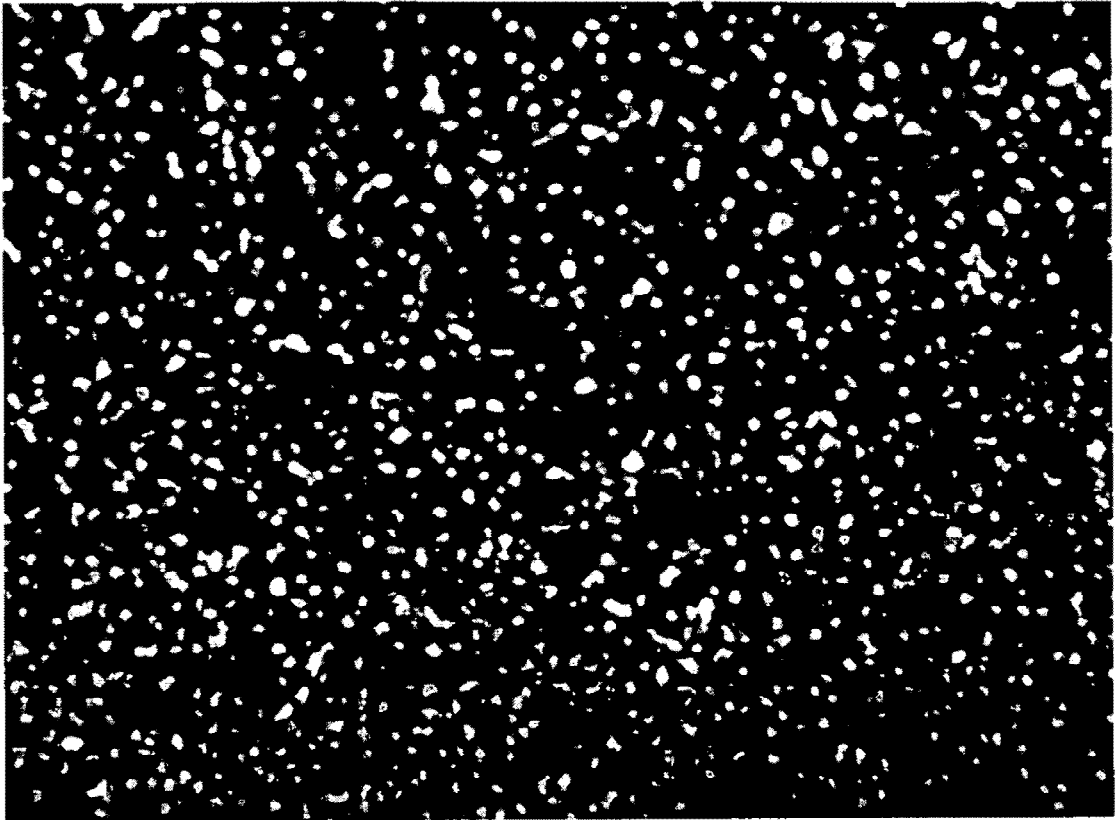


FIGURA 47

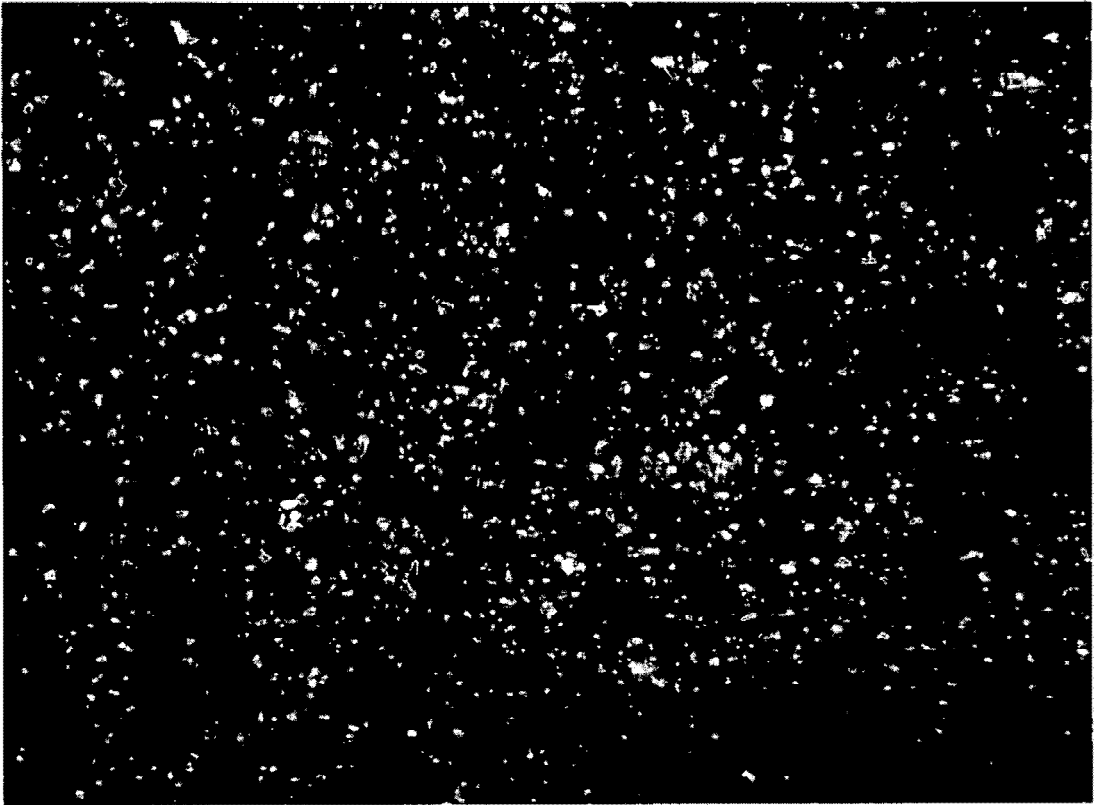


FIGURA 48

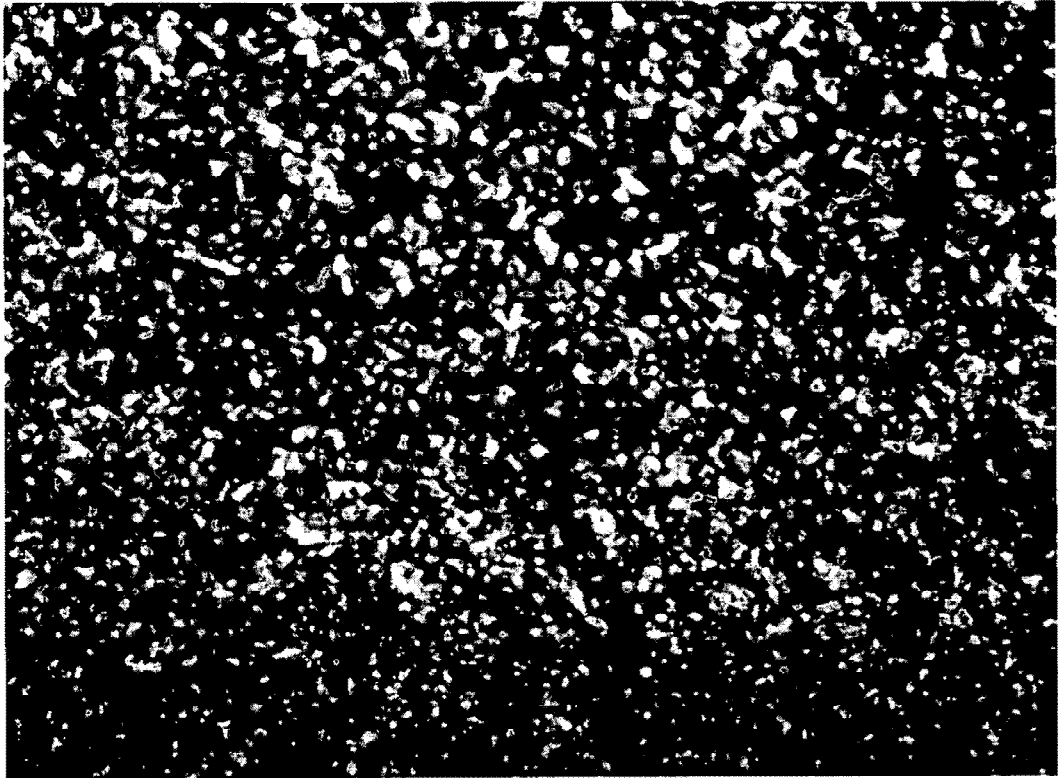


FIGURA 49

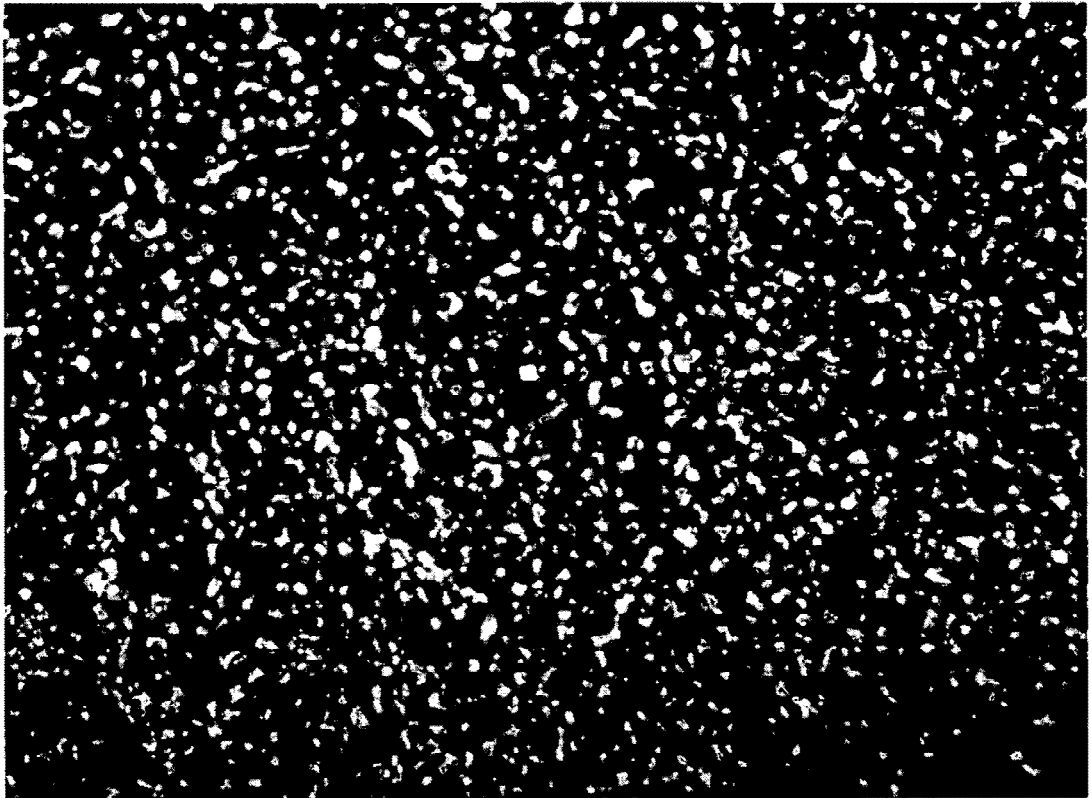


FIGURA 50

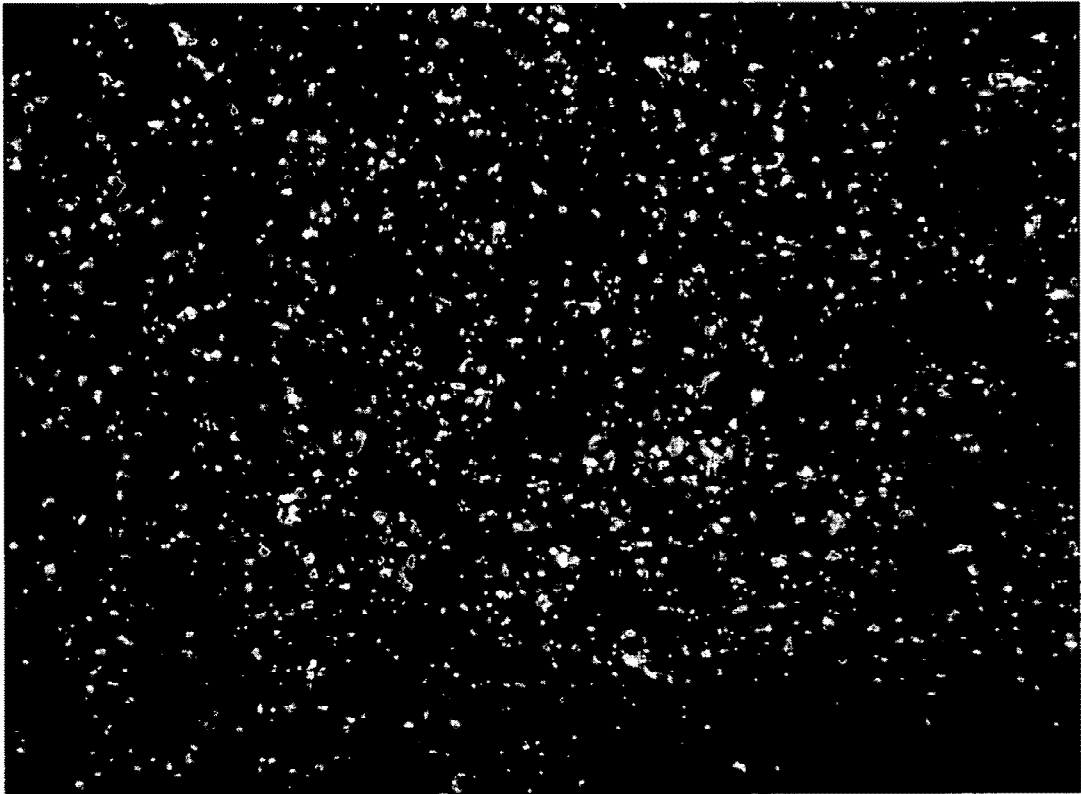


FIGURA 51

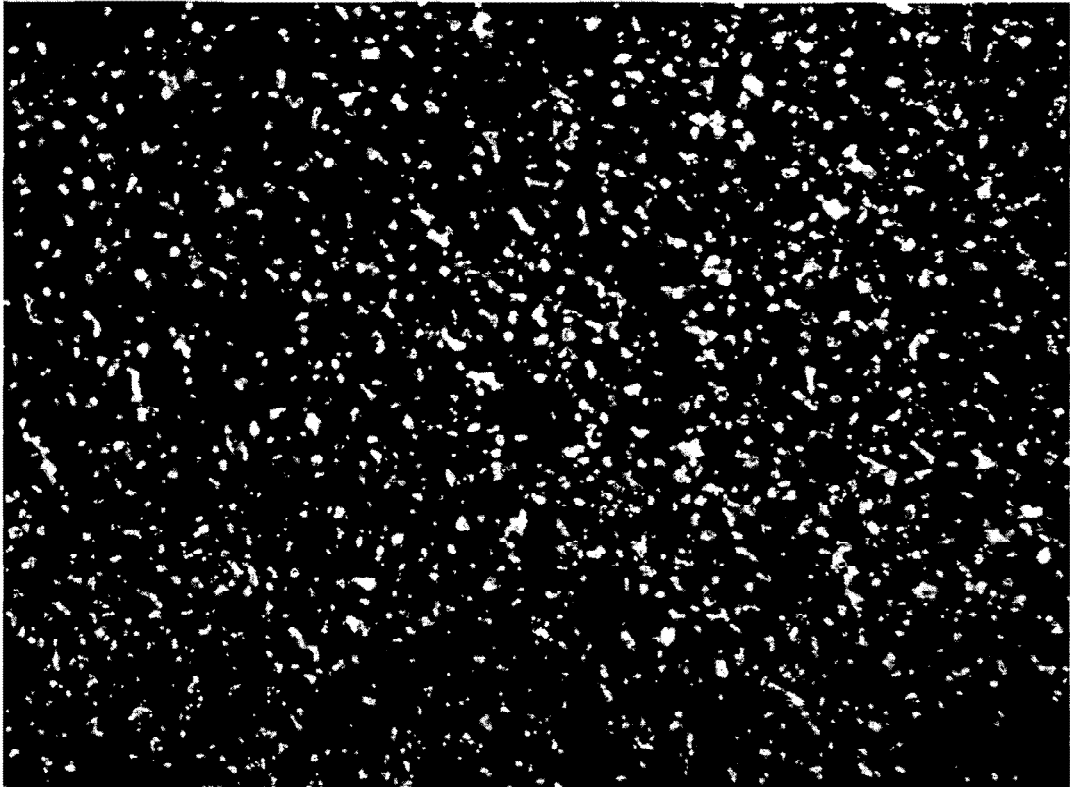


FIGURA 52

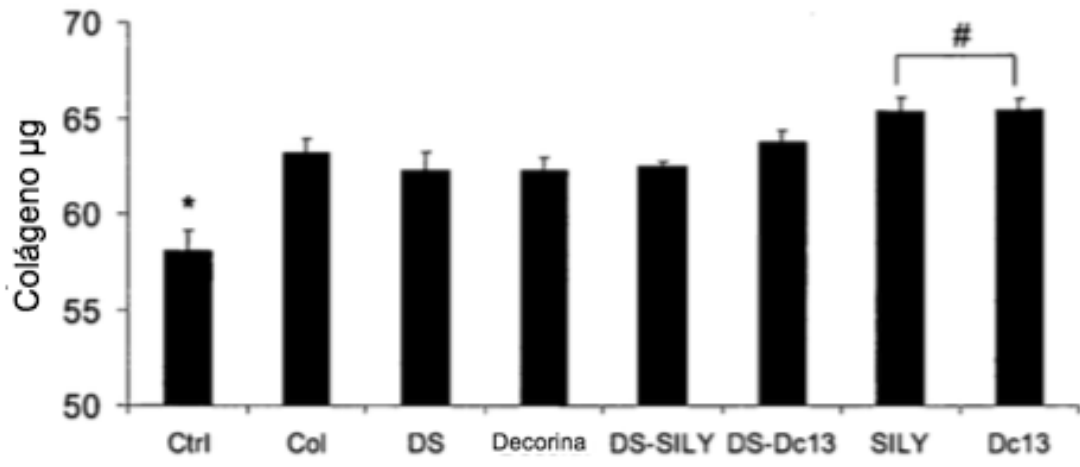


FIGURA 53

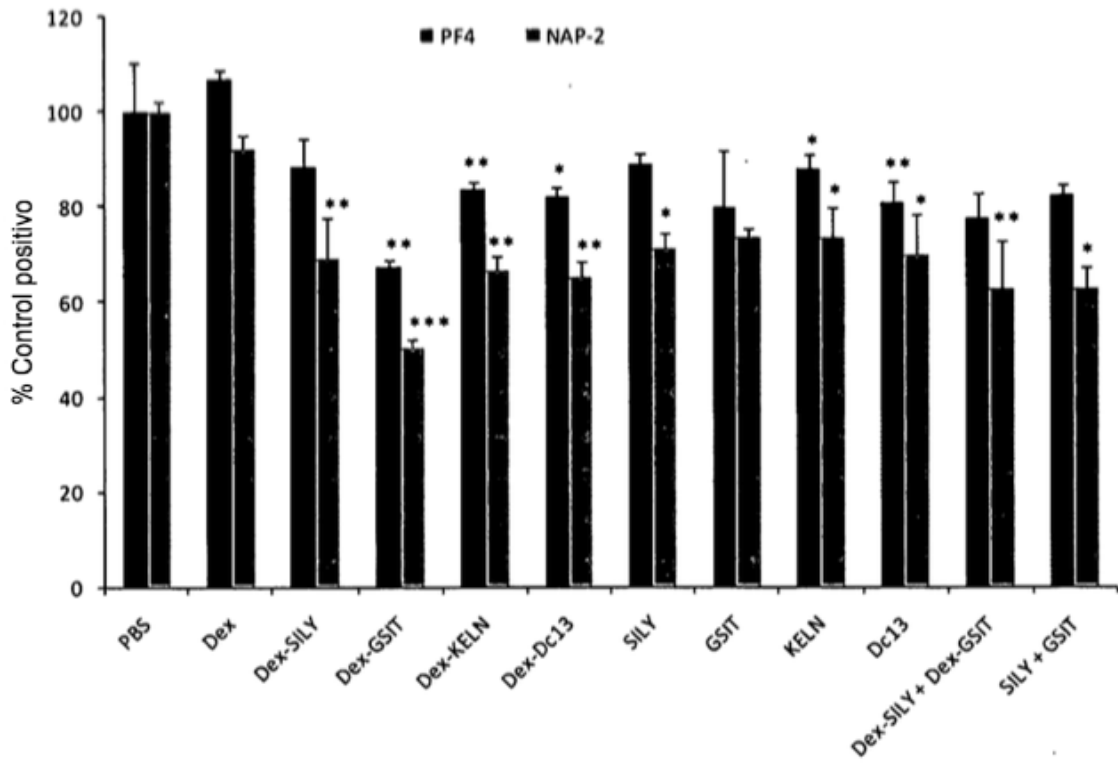


FIGURA 54

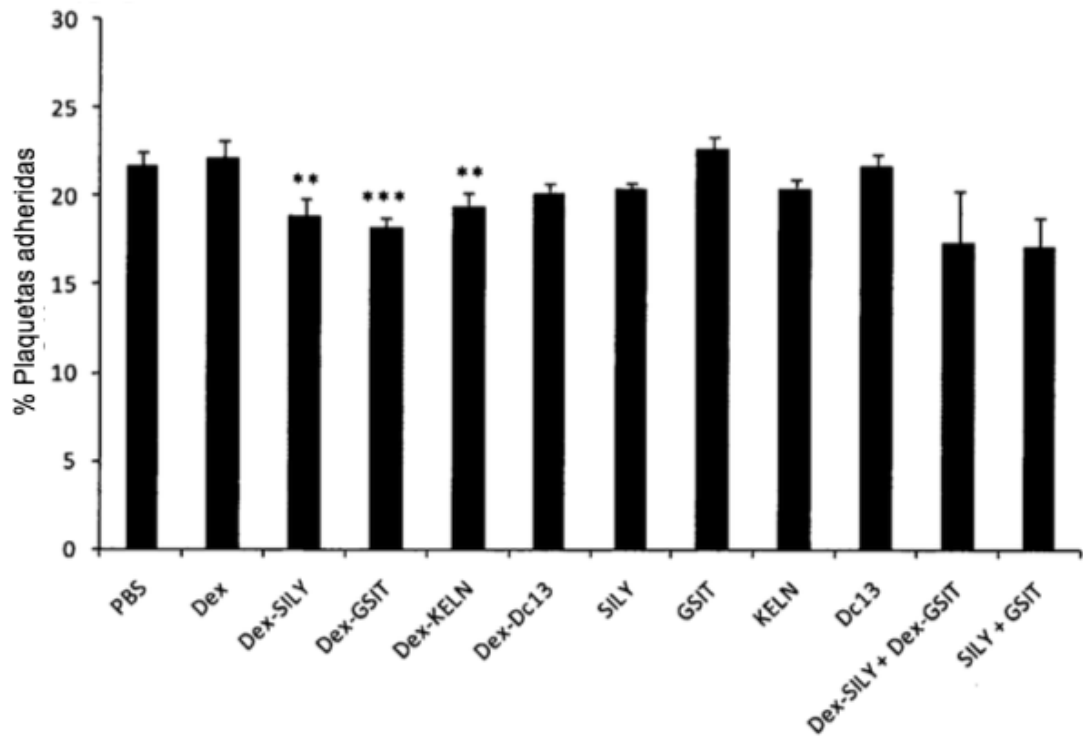


FIGURA 55