

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 214**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/US2015/019738**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138473**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15712231 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3116522**

54 Título: **Péptidos de autoensamblaje para el tratamiento de la fuga pulmonar**

30 Prioridad:

10.03.2014 US 201461950529 P
14.03.2014 US 201461953221 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

73 Titular/es:

3-D MATRIX LTD. (100.0%)
Kojimachi-HF Bldg. 7F, 3-2-4 Kojimachi,
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0083, JP

72 Inventor/es:

MEHTA, MANAV;
TSUKADA, HISASHI;
GIL, EUN SEOK;
GILBERT, KARL PATRICK y
KOBAYASHI, SATORU

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 729 214 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de autoensamblaje para el tratamiento de la fuga pulmonar

5 Sumario

En las realizaciones, se proporciona un método para tratar una fuga pulmonar en un sujeto. El método comprende la introducción de un dispositivo de administración en un área diana de la fuga pulmonar del sujeto. El método también comprende colocar un extremo del dispositivo de administración en el área diana en el que se desea el tratamiento de una fuga pulmonar. El método también comprende administrar a través del dispositivo de administración una solución que comprende un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y 32 aminoácidos en una cantidad eficaz y en una concentración eficaz en el área diana para formar una barrera de hidrogel en las condiciones fisiológicas del área diana para tratar la fuga pulmonar. El método también comprende retirar el dispositivo de administración del área diana. El documento W02013030673 desvela el uso de péptidos anfifílicos similares o idénticos a los de las presentes reivindicaciones para la oclusión de fuga de aire torácica. El documento EP2345433 desvela lo mismo para utilizarse como un tapón biológico *in vivo*.

Se proporciona un kit para tratar una fuga pulmonar en un sujeto. El kit comprende un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 32 aminoácidos en una cantidad eficaz para formar una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para permitir el tratamiento de una fuga pulmonar. El kit también comprende instrucciones para administrar el péptido de autoensamblaje a un área diana de la fuga pulmonar del sujeto.

Se proporciona una composición que comprende un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y 32 aminoácidos en una cantidad eficaz y en una concentración eficaz para utilizar en la formación de una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para tratar una fuga pulmonar. En las realizaciones, se proporciona un método para facilitar la prevención de una fuga pulmonar en un sujeto. El método comprende proporcionar una solución que comprende un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 32 aminoácidos en una cantidad eficaz y en una concentración eficaz para formar una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para permitir la prevención de la fuga pulmonar. El método también comprende proporcionar instrucciones para administrar la solución a un área diana de la fuga pulmonar a través de la introducción de la solución a través de un dispositivo de administración ubicado en la fuga pulmonar.

Se proporciona un armazón macroscópico que consiste esencialmente en una pluralidad de péptidos de autoensamblaje. Cada uno de los péptidos de autoensamblaje comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 32 aminoácidos en una cantidad eficaz que es capaz de posicionarse dentro de un área diana de una fuga pulmonar.

40 Descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B presentan datos discutidos en el Ejemplo 1;

Las Figuras 2-4 presentan datos discutidos en el Ejemplo 3;

Las Figuras 5A-5B presentan datos discutidos en el Ejemplo 3;

Las Figuras 6A-6B presentan datos discutidos en el Ejemplo 4;

Las Figuras 7A-7B presentan datos discutidos en el Ejemplo 5;

Las Figuras 8A-8B presentan datos discutidos en el Ejemplo 5;

Las Figuras 9A-9B presentan datos discutidos en el Ejemplo 6;

Las Figuras 10-12 presentan datos discutidos en el Ejemplo 8;

Las Figuras 13-14 presentan datos discutidos en el Ejemplo 9;

Las Figuras 15-16 presentan datos discutidos en el Ejemplo 10;

Las Figuras 17-18 presentan datos discutidos en el Ejemplo 11;

La Figura 19 presenta datos discutidos en el Ejemplo 12;

La Figura 20 presenta datos discutidos en el Ejemplo 13;

La Figura 21 presenta datos discutidos en el Ejemplo 14;

La Figura 22 presenta datos discutidos en el Ejemplo 15;

5 Las Figuras 23A-23B presentan datos discutidos en el Ejemplo 16;

Las Figuras 24A-24C presentan datos discutidos en el Ejemplo 18.

10 La Figura 25 presenta datos discutidos en el Ejemplo 19. La Figura 25 desvela "IEIK" como la SEQ ID NO: 5.

La Figura 26 presenta datos discutidos en el Ejemplo 19.

La Figura 27 presenta datos discutidos en el Ejemplo 19.

15 La Figura 28 presenta datos discutidos en el Ejemplo 19;

La Figura 29 presenta datos discutidos en el Ejemplo 19; y

20 las Figuras 30A-30C presentan datos discutidos en el Ejemplo 19. La Figura 30 desvela "IEIK" como la SEQ ID NO: 5.

Descripción detallada

25 Los sistemas y métodos de la presente divulgación pueden facilitar la prevención de la fuga pulmonar, por ejemplo, de defectos pleurales o fugas anastomóticas bronquiales. Los defectos pleurales, por ejemplo, los defectos pleuroparenquimales a menudo se crean mediante segmentectomía, sinectomía o transección interlobar. La fuga de aire postoperatoria persistente, más de 7 días, se ha informado en hasta el 25 % de los pacientes. El control intraoperatorio de estas fugas de aire reducirá la morbilidad y la duración de la hospitalización.

30 La fuga anastomótica bronquial se observa generalmente después de la operación durante el examen. Puede causar complicaciones graves y puede requerir una operación o procedimiento adicional. Convencionalmente, se realiza una sutura directa del sitio de anastomosis, seguida de una inmovilización con un colgajo epiploico, un colgajo de músculo intercostal o un colgajo de grasa pericárdico para evitar la fuga anastomótica bronquial. Actualmente, no hay materiales aprobados para uso clínico para la prevención de fugas anastomóticas bronquiales.

35 De acuerdo con una o más realizaciones, un péptido de autoensamblaje puede tratar fugas pulmonares, por ejemplo, defectos pleurales o fugas anastomóticas bronquiales. La fuga se puede crear después de la operación. Los materiales, sistemas y métodos desvelados en el presente documento pueden facilitar la formación de epitelio de la mucosa en algunas realizaciones no limitantes.

40 Los péptidos de autoensamblaje de la presente divulgación pueden incluir la aplicación, por ejemplo, la administración de los péptidos de autoensamblaje a un área diana predeterminada o deseada. El péptido de autoensamblaje se puede administrar a un área diana en forma de una solución peptídica, hidrogel, membrana u otra forma. Un área diana puede ser un área predeterminada de un sujeto que requiere un tratamiento particular. En algunas realizaciones, el área
45 diana puede relacionarse con un sitio quirúrgico, tal como un sitio quirúrgico para el trastorno del sueño y la respiración (SBD, de sus siglas en inglés).

50 Durante el autoensamblaje, el péptido puede formar nanofibras. El autoensamblaje puede causar la gelificación del péptido en solución. La gelificación puede proporcionar o formar un hidrogel. El péptido puede formar una lámina beta espontáneamente en la solución a un nivel de pH neutro. El péptido puede formar una lámina beta espontáneamente en la solución en condiciones fisiológicas y/o en presencia de un catión y/o anión.

55 Los métodos y materiales de la presente divulgación pueden utilizarse después de un procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje se puede administrar después de un procedimiento quirúrgico.

60 Los métodos de la presente divulgación pueden comprender la introducción de un dispositivo de administración en un área diana de la fuga pulmonar de un sujeto. El método puede proporcionar colocar un extremo del dispositivo de administración en el área diana en la que se desea el tratamiento de la fuga pulmonar.

65 El método de la presente divulgación también puede comprender administrar los péptidos de autoensamblaje a una diana predeterminada o deseada. El péptido de autoensamblaje se puede administrar a un área diana en forma de una solución peptídica, hidrogel, membrana u otra forma. Un área diana puede ser un área predeterminada de un sujeto que requiere un tratamiento particular. En algunas realizaciones, el área diana puede relacionarse con un sitio quirúrgico o el sitio de una fuga pulmonar. La fuga pulmonar puede ser el resultado de un defecto pleural o puede ser una fuga anastomótica bronquial. Por ejemplo, un sitio quirúrgico puede ser un sitio donde se realizó una cirugía, como

una cirugía relacionada con el pulmón o donde se ha desarrollado un defecto pleural o una fuga anastomótica bronquial. El defecto pleural puede asociarse con pinchazos de aguja, líneas de grapas o líneas de sutura. El defecto pleural puede ser inferior a aproximadamente 5x5 mm.

- 5 La administración puede ocurrir a través del dispositivo de administración al área diana para formar una barrera de hidrogel. Esto puede ocurrir en condiciones fisiológicas del área diana para tratar la fuga pulmonar.

Los materiales y métodos pueden comprender tratamiento, prevención u oclusión de una fuga pulmonar.

- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" pretende incluir oclusión o bloqueo parcial o completo de un área en la que se produce una fuga, por ejemplo, una fuga de aire. En general, la fuga no es deseada y, por lo tanto, el tratamiento remedia la fuga y proporciona la curación del área diana del tratamiento. El tratamiento de un sujeto puede incluir uno o más de curar, aliviar, mitigar o mejorar un sujeto con un trastorno, por ejemplo, una fuga, más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. El tratamiento puede ser un tratamiento mínimamente invasivo, que incluye la aplicación o administración mínimamente invasiva de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje.

- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir seres humanos y animales no humanos, por ejemplo, vertebrados, animales grandes y primates. En determinadas realizaciones, el sujeto es un sujeto mamífero, y en realizaciones particulares, el sujeto es un sujeto humano. Aunque las aplicaciones con seres humanos están claramente previstas, las aplicaciones veterinarias, por ejemplo, con animales no humanos, también se contemplan en el presente documento. La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados, por ejemplo, no mamíferos (tales como pájaros, por ejemplo, pollos; anfibios; reptiles) y mamíferos, tales como primates no humanos, animales domesticados y de utilidad agrícola, por ejemplo, oveja, perro, gato, vaca, cerdo, rata, entre otros.

- 30 El tratamiento, prevención u oclusión puede ser parcial o completo. Los materiales y métodos pueden incluir abordar una fuga pulmonar, tal como un defecto pleural o una fuga anastomótica bronquial. Los materiales y métodos pueden incluir la administración, aplicación o inyección de un péptido de autoensamblaje, o una solución que comprende un péptido de autoensamblaje, o una composición que comprende un péptido de autoensamblaje, a un área diana predeterminada o deseada.

- 35 El método para tratar una fuga pulmonar puede comprender además retirar el dispositivo de administración del área diana. El método puede comprender además visualizar una región que comprende el área diana antes de introducir el dispositivo de administración. La visualización de la región que comprende el área diana puede ocurrir después de retirar el dispositivo de administración del área diana. El monitoreo del área diana también puede ocurrir durante el procedimiento y después del procedimiento, por ejemplo, después de retirar el dispositivo de administración.

- 40 El método de tratamiento puede comprender además preparar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje. En algunas realizaciones, el método de tratamiento puede comprender además evaluar al sujeto para determinar la necesidad de tratar una fuga pulmonar y preparar la solución basándose en la etapa de evaluación.

- 45 La expresión "péptido de autoensamblaje" puede referirse a un péptido que puede exhibir una estructura de lámina beta en solución acuosa en presencia de condiciones específicas para inducir la estructura de lámina beta. Estas condiciones específicas pueden incluir ajustar el pH de una solución peptídica de autoensamblaje. El ajuste puede ser un aumento o una disminución en el pH de la solución peptídica de autoensamblaje. El aumento del pH puede ser un aumento del pH a un pH fisiológico. Las condiciones específicas también pueden incluir agregar un catión, tal como un catión monovalente o un catión divalente, a una solución peptídica de autoensamblaje. Las condiciones específicas también pueden incluir agregar un anión, tal como un anión monovalente o un anión divalente, a una solución peptídica de autoensamblaje. Las condiciones específicas pueden incluir condiciones relacionadas con el sitio de una cirugía o un sitio diana de fuga pulmonar. Los péptidos de autoensamblaje pueden denominarse o ser parte de una composición, solución peptídica, polvo peptídico, hidrogel o armazón.

- 55 La expresión "péptido de autoensamblaje" puede referirse a un péptido que comprende un motivo de autoensamblaje. Los péptidos de autoensamblaje son péptidos que son capaces de autoensamblarse en estructuras que incluyen, pero no se limitan a, membranas macroscópicas o nanoestructuras.

- 60 El término "hidrogel" puede referirse a un material que comprende un polímero y un alto porcentaje de agua, por ejemplo, al menos el 90 % de agua.

- 65 El péptido de autoensamblaje puede ser un péptido de autoensamblaje anfifílico. Por "anfifílico" se entiende que el péptido comprende porciones hidrófobas y porciones hidrófilas. En algunas realizaciones, un péptido anfifílico puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en alternar aminoácidos hidrófobos y aminoácidos hidrófilos. Por alternar, se pretende incluir una serie de tres o más aminoácidos que se alternan entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo, y no es necesario que incluya todos y cada uno de los aminoácidos en la secuencia peptídica alternando entre un aminoácido hidrófobo y un hidrófilo. El péptido de autoensamblaje, también denominado en el

presente documento como "péptido", puede administrarse al área diana predeterminada o deseada en forma de una solución, composición, hidrogel, membrana, armazón u otra forma peptídica de autoensamblaje. El hidrogel también se puede referir a una membrana o armazón a lo largo de esta divulgación. El área diana predeterminada o deseada puede estar en o cerca de la ubicación de una fuga pulmonar, por ejemplo, un defecto pleural o una fuga anastomótica bronquial. El área diana predeterminada o deseada se puede establecer en función del sitio u otra área que pueda haber sido sometida a un procedimiento quirúrgico, o un trauma no intencional o intencional.

La solución que comprende un péptido de autoensamblaje, también denominada solución peptídica de autoensamblaje, puede ser una solución peptídica de autoensamblaje acuosa. El péptido de autoensamblaje se puede administrar, aplicar o inyectar en una solución que está sustancialmente libre de células o libre de células. En determinadas realizaciones, el péptido de autoensamblaje se puede administrar, aplicar o inyectar en una solución sin células o libre de células.

El péptido de autoensamblaje también se puede administrar, aplicar o inyectar en una solución que está sustancialmente libre de fármacos o libre de fármacos. En determinadas realizaciones, el péptido de autoensamblaje se puede administrar, aplicar o inyectar en una solución sin fármacos o libre de fármacos. En algunas otras realizaciones, el péptido de autoensamblaje se puede administrar, aplicar o inyectar en una solución que está sustancialmente libre de células y sustancialmente libre de fármacos. Aún en otras determinadas realizaciones adicionales, el péptido de autoensamblaje se puede administrar, aplicar o inyectar en una solución libre de células y medicamentos.

La solución peptídica de autoensamblaje puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en el péptido de autoensamblaje. El péptido de autoensamblaje puede estar en una forma modificada o no modificada. Por modificado, se entiende que el péptido de autoensamblaje puede tener uno o más dominios que comprenden uno o más aminoácidos que, cuando se proporcionan en solución por sí mismos, no se autoensamblan. Por no modificado, se entiende que el péptido de autoensamblaje puede no tener otros dominios distintos de los que proporcionan el autoensamblaje del péptido. Es decir, un péptido no modificado consiste en alternar aminoácidos hidrófobos e hidrófilos que pueden autoensamblarse en una lámina beta, y una estructura macroscópica, tal como un hidrogel.

A través de la administración de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, se puede formar una barrera de hidrogel. La barrera de hidrogel se puede formar en el área diana para tratar la fuga pulmonar. El tratamiento se puede proporcionar mediante la oclusión o sellado de la fuga pulmonar, al menos parcialmente. Esto se logra a través de la formación de la barrera de hidrogel. A lo largo de esta divulgación, la referencia a un hidrogel, también puede referirse o ser aplicable a la barrera de hidrogel.

En determinadas realizaciones, se desea tener una barrera de hidrogel que pueda proporcionar un bloqueo o sellado adecuado o deseado en el área diana. La barrera de hidrogel puede tener propiedades específicas para lograr el bloqueo o sellado adecuado o deseado. Por ejemplo, la barrera de hidrogel puede tener una o más propiedades predeterminadas, por ejemplo, resistencia mecánica (módulo de almacenamiento), rigidez, viscosidad, cinética de gelificación, fuerza iónica, pH o presión de rotura (tolerancia a la presión de rotura). Las propiedades pueden ajustarse o adaptarse en función de la adición, al péptido de autoensamblaje o solución que comprende el péptido de autoensamblaje, de los componentes desvelados en el presente documento en cantidades y/o concentraciones específicas.

En determinadas realizaciones, el tratamiento puede proporcionar una presión de rotura de al menos 20 cm de H₂O, al menos 25 cm de H₂O, al menos 30 cm de H₂O y, en ciertos casos, al menos 35 cm de H₂O.

Por ejemplo, en relación con el tratamiento de una fuga pulmonar, puede desearse proporcionar una barrera de hidrogel que tenga una alta resistencia mecánica, rigidez y alta presión de rotura. También puede desearse proporcionar una barrera de hidrogel que se gelifique rápidamente, es decir, las cinéticas de gelificación sean tales que, tras la administración, la barrera de hidrogel se forme dentro de un corto período de tiempo para tratar la fuga. El corto período de tiempo puede ser instantáneo o, por ejemplo, menos de 5 minutos, menos de 3 minutos, menos de 2 minutos, menos de 1 minuto o menos de 30 segundos, u otros periodos desvelados en el presente documento.

La administración de una solución puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en la administración de una solución que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en un péptido de autoensamblaje que comprende, consiste en, o consiste esencialmente de al menos aproximadamente 7 aminoácidos. La administración de una solución puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en la administración de una solución que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en un péptido de autoensamblaje que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en entre aproximadamente 7 aminoácidos y 32 aminoácidos. Esta divulgación puede contemplar otros péptidos que no comprenden, consisten en o consisten esencialmente en al menos aproximadamente 7 aminoácidos.

El péptido de autoensamblaje puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en entre aproximadamente 7 y aproximadamente 32 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido de autoensamblaje puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente entre aproximadamente 12 y aproximadamente 16 aminoácidos.

Por alternar, se pretende incluir una serie de tres o más aminoácidos que se alternan entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo, y no es necesario que incluya todos y cada uno de los aminoácidos en la secuencia peptídica alternando entre un aminoácido hidrófobo y un hidrófilo.

5 Los métodos para tratar una fuga pulmonar pueden comprender administrar un péptido de autoensamblaje a un área diana. El péptido puede administrarse como un hidrogel o formar un hidrogel tras la administración. Los métodos para tratar una fuga pulmonar pueden comprender administrar una solución que comprende un péptido de autoensamblaje a un área diana.

10 El término "administrar", se pretende que incluya, pero sin limitación, aplicar, introducir o inyectar el péptido de autoensamblaje, en una o más de varias formas que incluyen, pero sin limitación, por sí mismo, a modo de solución, como una solución acuosa, o por medio de una composición, hidrogel o armazón, con o sin componentes adicionales.

15 El método puede comprender la introducción de un dispositivo de administración en un área diana de la fuga pulmonar del sujeto. El método puede comprender la introducción de un dispositivo de administración que comprende al menos uno de una jeringa, tubo, pipeta, catéter, jeringa de catéter u otro dispositivo basado en agujas en el área diana de un sujeto. El péptido de autoensamblaje se puede administrar por medio de una jeringa, tubo, pipeta, catéter, jeringa de catéter u otro dispositivo basado en agujas en el área diana de un sujeto. La medida de la aguja de la jeringa se puede seleccionar para proporcionar un flujo adecuado de una composición, una solución, un hidrogel o un líquido desde la
20 jeringa hasta el área diana. Esto puede basarse en algunas realizaciones en al menos una de la cantidad de péptido de autoensamblaje en una composición, solución peptídica o un hidrogel que se administra, la concentración de la solución peptídica, en la composición o el hidrogel y la viscosidad de la solución peptídica, composición o hidrogel. El dispositivo de administración puede ser un dispositivo convencional o diseñado para lograr al menos uno de alcanzar un área diana específica, lograr un régimen de dosificación específico, administrar un volumen, cantidad o
25 concentración diana específica, y administrar con precisión a un área diana.

El método para tratar una fuga pulmonar puede comprender colocar un extremo del dispositivo de administración en el área diana en la que se desea el tratamiento de una fuga pulmonar. . El área diana puede ser un área como se describe en el presente documento, tal como una porción de un sitio quirúrgico, un sitio de un defecto pleural o un sitio
30 de fuga anastomótica bronquial. El péptido de autoensamblaje se puede administrar por medio de un dispositivo de administración al área diana en el que se desea el tratamiento de una fuga. El péptido de autoensamblaje se puede administrar en una solución por medio del dispositivo de administración al área diana. En algunas realizaciones, la administración puede ocurrir por vía tópica, ya que el dispositivo de administración se coloca muy cerca del área diana o de la fuga para proporcionar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje a una superficie del área
35 diana o la ubicación de la fuga. En otras realizaciones, la administración puede ocurrir directamente en la fuga, en el sentido de que el dispositivo de administración está colocado en el área diana o en la fuga para proporcionar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, por ejemplo, directamente, al área diana o ubicación de la fuga. En otras realizaciones, la administración puede ocurrir dentro o a través de la fuga, hacia el área diana o la fuga, para llenar un volumen predeterminado del área diana con la solución que comprende el péptido de autoensamblaje. La
40 administración de la solución puede comprender la aplicación tópica de la solución en el área diana. La administración de la solución puede comprender inyectar la solución en el área diana, con un desbordamiento para cubrir el área diana de forma tópica.

45 El uso de un dispositivo de administración puede proporcionar una administración más selectiva del péptido para proporcionar una administración más precisa al área diana. La administración selectiva del péptido puede permitir una administración mejorada y más dirigida de la solución, la composición o el hidrogel peptídico, de manera tal que tenga éxito y se coloque en la ubicación deseada de una manera precisa. La administración selectiva puede proporcionar una administración mejorada y dirigida que mejore notablemente la posición y la eficacia del tratamiento sobre el uso de otro dispositivo de administración. Los dispositivos de administración que pueden utilizarse en los sistemas,
50 métodos y kits de la divulgación pueden incluir una jeringa, tubo, aguja, pipeta, catéter de jeringa, otro dispositivo basado en aguja o catéter.

El uso de un dispositivo de administración, tal como un catéter, puede incluir el uso de dispositivos que lo acompañan, como una aguja guía utilizada para guiar el catéter a su posición, o un endoscopio que permita la colocación correcta
55 de un catéter u otro dispositivo y la visualización del área diana y/o la ruta al área diana. El endoscopio puede ser un tubo que puede comprender al menos uno de una luz y una cámara u otro dispositivo de visualización para permitir la visualización de imágenes del cuerpo del sujeto. La aguja guía o el endoscopio puede introducirse en el sujeto, por ejemplo, a través de una incisión en la piel. El endoscopio puede introducirse en el área diana antes de introducir el dispositivo de administración en el área diana.
60

El uso del dispositivo de administración, tal como una jeringuilla, tubo, aguja, pipeta, catéter de jeringa, otro dispositivo basado en aguja, catéter o endoscopio puede requerir la determinación del diámetro o tamaño de la abertura en la que hay un área diana, tal como al menos una parte de la jeringa, tubo, aguja, pipeta, catéter de jeringa, otro dispositivo
65 basado en aguja, catéter o endoscopio puede entrar en la abertura para administrar el péptido, solución peptídica, composición o hidrogel en el área diana.

En determinadas realizaciones, el hidrogel puede formarse *in vitro* y administrarse a la ubicación deseada *in vivo*. En determinados ejemplos, esta ubicación puede ser el área diana. En otros ejemplos, esta ubicación puede estar por detrás, por delante del área o sustancialmente cerca del área. Puede desearse permitir una migración del hidrogel al área en la que se desea. Como alternativa, otro procedimiento puede colocar el hidrogel en el área en la que se desea.

5 La ubicación deseada o el área diana puede ser al menos una parte de un área en la que se desea tratar una fuga pulmonar en un sujeto.

En determinados aspectos de la divulgación, el hidrogel puede formarse *in vivo*. Una solución que comprende el péptido de autoensamblaje, tal como una solución acuosa, puede insertarse en una ubicación o área *in vivo* de un sujeto para tratar la fuga pulmonar en un sujeto. En determinados ejemplos, el hidrogel se puede formar *in vivo* en una ubicación y se le permite migrar al área en la que se desea promover o proporcionar un tratamiento a la fuga pulmonar, por ejemplo, un bloqueo o una oclusión en o cerca de la fuga pulmonar, por ejemplo, el defecto pleural o la fuga anastomótica bronquial en un sujeto. Como alternativa, otro procedimiento puede colocar el hidrogel en el área en la que se desea promover o proporcionar tratamiento de la fuga pulmonar. Los péptidos de la presente divulgación pueden estar en forma de polvos, una solución, un gel o similar. Dado que el péptido de autoensamblaje se gelifica en respuesta a los cambios en el pH de la solución y la concentración de sal, se puede distribuir como un líquido que gelifica al entrar en contacto con un sujeto durante la aplicación o administración.

10
15

En determinados entornos, la solución peptídica puede ser un hidrogel débil y, como resultado, puede administrarse por medio de un dispositivo de administración como se describe en el presente documento.

20

De acuerdo con algunas realizaciones, los péptidos de autoensamblaje pueden ser anfífilicos, alternando entre aminoácidos hidrófobos y aminoácidos hidrófilos.

De acuerdo con una o más realizaciones, un sujeto puede evaluarse para determinar la necesidad de tratar una fuga pulmonar en un sujeto. Una vez que se ha completado la evaluación, puede prepararse una solución peptídica para administrar al sujeto basándose en la etapa de evaluación. En otras realizaciones, una solución peptídica puede prepararse sin la etapa de evaluación.

25

En algunas realizaciones, se puede utilizar un agente biológicamente activo con los materiales y métodos de la presente divulgación. Un agente biológicamente activo puede comprender un compuesto, incluido un péptido, secuencia de ADN, compuesto químico o compuesto orgánico o inorgánico que puede impartir cierta actividad, regulación, modulación o ajuste de una condición u otra actividad en un sujeto o en un entorno de laboratorio. El agente biológicamente activo puede interactuar con otro componente para proporcionar dicha actividad. El agente biológicamente activo puede denominarse como un fármaco de acuerdo con algunas realizaciones en el presente documento. En determinadas realizaciones, uno o más agentes biológicamente activos pueden liberarse gradualmente al exterior del sistema peptídico. Por ejemplo, uno o más agentes biológicamente activos pueden liberarse gradualmente desde el hidrogel. Tanto las pruebas *in vitro* como *in vivo* han demostrado esta liberación gradual de un agente biológicamente activo. El agente biológicamente activo puede agregarse a la solución o composición peptídica de autoensamblaje antes de la administración a un sujeto, o puede administrarse junto con el péptido de autoensamblaje o por separado del péptido de autoensamblaje al sujeto. El uno o más agentes biológicamente activos se pueden encapsular dentro del sistema, por ejemplo, se pueden encapsular en el hidrogel, la solución, la composición o las nanofibras.

30
35
40

Esta divulgación se refiere a soluciones acuosas, hidrogeles, armazones, composiciones y membranas que comprenden péptidos de autoensamblaje, a veces denominados oligopéptidos de autoensamblaje. Los péptidos de autoensamblaje pueden exhibir una estructura de lámina beta en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o cationes y/o aniones, como un catión monovalente y/o anión monovalente, u otras condiciones aplicables a un sitio quirúrgico o en o cerca del sitio de una fuga pulmonar. Los péptidos pueden ser anfífilicos y alternar entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo. En determinadas realizaciones, el péptido puede comprender una primera porción que puede ser anfífilica, alternando entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo, y otra porción o región que no es anfífilica.

45
50

Los péptidos pueden ser generalmente estables en soluciones acuosas y autoensamblarse en grandes estructuras macroscópicas, armazones o matrices cuando se exponen a condiciones seleccionadas. Las condiciones pueden ser condiciones fisiológicas, pH neutro, concentraciones seleccionadas de sales, soluciones tampón o niveles fisiológicos de sal. Una vez que se forma el hidrogel, puede no descomponerse, o puede descomponerse o biodegradarse después de un período de tiempo. La velocidad de descomposición puede basarse, al menos en parte, en al menos una de las secuencias de aminoácidos y las condiciones de su entorno. La tasa de descomposición puede estar relacionada con la tasa de curación o crecimiento en el sitio objetivo, a fin de proporcionar un tratamiento adecuado de la fuga pulmonar.

55
60

Por "macroscópico" se entiende que tiene dimensiones lo suficientemente grandes como para ser visibles con un aumento de 10 veces o menos. En realizaciones preferidas, una estructura macroscópica es visible a simple vista. Una estructura macroscópica puede ser transparente y puede ser bidimensional o tridimensional. Normalmente, cada dimensión es de al menos 10 μm , en tamaño. En determinadas realizaciones, al menos dos dimensiones tienen al menos 100 μm , o al menos 1000 μm de tamaño. Con frecuencia, al menos dos dimensiones tienen al menos 1-10 mm

65

de tamaño, 10-100 nm de tamaño o más.

En determinadas realizaciones, el tamaño de los filamentos puede ser de aproximadamente 10 nanómetros (nm) a aproximadamente 20 nm. La distancia interfilamentosa puede ser de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 80 nm.

La estructura macroscópica puede ser un armazón macroscópico. El armazón macroscópico puede consistir esencialmente en una pluralidad de péptidos de autoensamblaje. Cada uno de los péptidos de autoensamblaje puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 32 aminoácidos en una cantidad eficaz que es capaz de colocarse dentro de un área diana de un sistema pulmonar para evitar una fuga pulmonar. Los péptidos de autoensamblaje del armazón pueden comprender entre aproximadamente 12 y aproximadamente 16 aminoácidos. Los péptidos de autoensamblaje del armazón pueden comprender entre aproximadamente 12 y aproximadamente 16 aminoácidos que se alternan entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo. El péptido de autoensamblaje puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (IEIK)₃I (SEQ ID NO: 2), (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3).

Las "condiciones fisiológicas" pueden ocurrir en la naturaleza para un organismo, sistema celular o sujeto en particular que puede estar en contraste con las condiciones de laboratorio artificial. Las condiciones pueden comprender una o más propiedades tales como una o más propiedades particulares o uno o más intervalos de propiedades. Por ejemplo, las condiciones fisiológicas pueden incluir una temperatura o intervalo de temperaturas, un pH o intervalo de pH, una presión o intervalo de presiones y una o más concentraciones de compuestos particulares, sales y otros componentes. Las sales pueden comprender uno o más de aniones monovalentes, cationes monovalentes, aniones divalentes o cationes divalentes.

En algunos ejemplos, las condiciones fisiológicas pueden incluir una temperatura en un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 grados centígrados. En algunos ejemplos, la presión atmosférica puede ser de aproximadamente 1 atm. El pH puede estar en el intervalo de un pH neutro. Por ejemplo, el pH puede estar en un intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. Las condiciones fisiológicas pueden incluir cationes y/o aniones tales como cationes metálicos monovalentes y/o aniones monovalentes que pueden inducir la formación de membranas o hidrogeles. Estos pueden incluir cloruro de sodio (NaCl). Las condiciones fisiológicas también pueden incluir una concentración de glucosa, una concentración de sacarosa u otra concentración de azúcar, de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 20 mM. La solución peptídica de autoensamblaje puede comprender glucosa, sacarosa u otro azúcar, o se puede agregar un azúcar o solución de azúcar a la solución peptídica de autoensamblaje.

En determinadas realizaciones, los péptidos de autoensamblaje pueden ser péptidos de al menos aproximadamente 7 aminoácidos. En determinadas realizaciones adicionales, los péptidos de autoensamblaje pueden ser péptidos de al menos aproximadamente 7 aminoácidos a aproximadamente 32 aminoácidos. En determinadas realizaciones adicionales, los péptidos de autoensamblaje pueden ser péptidos de entre aproximadamente 7 a aproximadamente 17 aminoácidos. En determinados otros ejemplos, los péptidos de autoensamblaje pueden ser péptidos de al menos 8 aminoácidos, al menos aproximadamente 12 aminoácidos o al menos aproximadamente 16 aminoácidos.

Las mezclas homogéneas y heterogéneas de péptidos caracterizadas por las propiedades mencionadas anteriormente pueden formar filamentos, hidrogeles y membranas macroscópicas estables. Los péptidos que son autocomplementarios y autocompatibles pueden formar membranas, filamentos e hidrogeles en una mezcla homogénea. Los péptidos heterogéneos, incluidos aquellos que no pueden formar membranas, filamentos e hidrogeles en soluciones homogéneas, que son complementarios y/o estructuralmente compatibles entre sí también pueden autoensamblarse en membranas macroscópicas, filamentos e hidrogeles.

Las membranas, filamentos e hidrogeles pueden no ser citotóxicos. Los hidrogeles de la presente divulgación pueden digerirse y metabolizarse en un sujeto. Los hidrogeles pueden ser biodegradados en 30 días o menos. Tienen una composición simple, son permeables y su producción en grandes cantidades es fácil y relativamente económica. Las membranas y filamentos, hidrogeles o armazones también pueden producirse y almacenarse en condiciones estériles. Las longitudes óptimas para la formación de membranas pueden variar con al menos una de las composiciones de aminoácidos, las condiciones de la solución y las condiciones en el área diana.

Los aminoácidos de los péptidos de autoensamblaje o anfífilos pueden seleccionarse de d-aminoácidos, l-aminoácidos o combinaciones de los mismos. Los aminoácidos hidrófobos pueden incluir Ala, Val, Ile, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr y Gly. Los aminoácidos hidrófilos pueden ser aminoácidos básicos, por ejemplo, Lys, Arg, His, Orn; aminoácidos ácidos, por ejemplo, Glu, Asp; o aminoácidos que forman enlaces de hidrógeno, por ejemplo, Asn, Gln. Los aminoácidos ácidos y básicos pueden agruparse en un péptido. Los grupos carboxilo y amino de los restos terminales pueden estar protegidos o no protegidos. Las membranas o hidrogeles pueden formarse en una mezcla homogénea de péptidos autocomplementarios y autocompatibles o en una mezcla heterogénea de péptidos que son complementarios y estructuralmente compatibles entre sí. Los péptidos que se ajustan a los criterios anteriores pueden autoensamblarse en membranas macroscópicas en condiciones adecuadas, descritas en el presente documento.

En determinadas realizaciones, se pueden utilizar de aproximadamente 8 a aproximadamente 32 restos en los péptidos de autoensamblaje, mientras que en otras realizaciones, los péptidos de autoensamblaje pueden tener aproximadamente de 7 a aproximadamente 17 restos. Los péptidos pueden tener una longitud de aproximadamente 5 nm.

5 Los péptidos de la presente divulgación pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en péptidos que tienen la secuencia de repetición de arginina, alanina, ácido aspártico y alanina (Arg-Ala-Asp-Ala (RADA) (SEQ ID NO: 4)).

10 Otras secuencias peptídicas pueden representarse por péptidos de autoensamblaje que comprenden, que consisten esencialmente en, o consisten en la secuencia de repetición de isoleucina, ácido glutámico, isoleucina y lisina (Ile-Glu-Ile-Lys (IEIK) (SEQ ID NO: 5). Otras secuencias peptídicas pueden representarse por péptidos de autoensamblaje que comprenden, consistentes esencialmente en, o consisten en la secuencia de repetición de lisina, leucina, ácido aspártico y leucina (Lys-Leu- Asp-Leu (KLDL) (SEQ ID NO: 6). Como ejemplos específicos de péptidos de autoensamblaje de acuerdo con la invención, puede haber un péptido de autoensamblaje denominado "RADA 16" que tiene la secuencia Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg -Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala (SEQ ID NO: 1) ((RADA)₄ (SEQ ID NO: 1)) (también denominada "Puramatrix" a lo largo de la divulgación), un péptido de autoensamblaje denominado "IEIK13" que tiene la secuencia Ile-Glu-Ile-Lys-Ile-Glu-Ile-Lys-Ile-Glu-Ile-Lys-Ile (SEQ ID NO: 2) ((IEIK)₃l (SEQ ID NO: 2)), o un péptido de autoensamblaje denominado "KLDL12" (que también puede denominarse "KLD12" a lo largo de esta divulgación) que tiene la secuencia Lys-Leu-Asp-Leu- Lys-Leu-Asp-Leu-Lys-Leu-Asp-Leu (SEQ ID NO: 3) ((KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3)).

25 Cada una de las secuencias peptídicas desveladas en el presente documento puede proporcionar péptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, y consisten en las secuencias de aminoácidos enumeradas.

La presente divulgación proporciona materiales, métodos y kits para soluciones, hidrogeles, composiciones y armazones que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en los péptidos enumerados en el presente documento.

30 Se encuentra disponible un 1 por ciento de solución acuosa (agua) en peso por volumen (p/v) y un 2,5 por ciento p/v de (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) p/v como el producto hidrogel peptídico PuraMatrix™ por 3- D Matrix Co., Ltd.

35 El autoensamblaje de los péptidos puede atribuirse a enlaces de hidrógeno y enlaces hidrófobos entre las moléculas peptídicas mediante los aminoácidos que componen los péptidos.

40 Los péptidos de autoensamblaje de la presente divulgación pueden tener un diámetro de nanofibra en un intervalo de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 20 nm y un tamaño de poro promedio en un intervalo de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 200 nm. En determinadas realizaciones, el diámetro de la nanofibra, el tamaño de poro y la densidad de la nanofibra pueden controlarse mediante al menos una de la concentración de la solución peptídica utilizada y la cantidad de solución peptídica utilizada, tal como el volumen de la solución peptídica.

45 Como tal, se puede seleccionar al menos uno de una concentración específica de péptido en solución y una cantidad específica de solución peptídica para proporcionar al menos uno de un diámetro de nanofibra, tamaño de poro y densidad deseados para proporcionar adecuadamente el tratamiento de una fuga pulmonar, por ejemplo, proporcionando una oclusión. La concentración específica y la cantidad específica de solución peptídica pueden denominarse "concentración eficaz" y "cantidad eficaz".

50 Tal como se utiliza en el presente documento, una cantidad de un péptido, una solución peptídica o un hidrogel eficaz para tratar una fuga pulmonar en un sujeto, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del péptido, solución peptídica, composición o hidrogel, lo que es eficaz, tras la administración única o múltiple (aplicación o inyección) a un sujeto, en el tratamiento, o en la curación, alivio, mitigación o mejora de un sujeto con un trastorno más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Esto puede incluir una concentración o intervalo de concentraciones de péptido en la solución, composición o hidrogel peptídico y adicionalmente, o en la alternativa, un volumen o intervalo de volúmenes particulares de la solución, composición o hidrogel peptídico. El método de facilitación puede comprender proporcionar instrucciones para preparar al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz.

60 La dosificación, por ejemplo, el volumen o la concentración, administrada (por ejemplo, aplicada o inyectada) puede variar dependiendo de la forma del péptido (por ejemplo, en una solución peptídica, hidrogel o en una forma seca, tal como una forma liofilizada) y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración, el volumen y la concentración se pueden elegir en vista de la condición del sujeto y en vista del área o ubicación diana particular en la que se administrará la solución peptídica, hidrogel u otra forma de péptido. Se pueden utilizar o requerir dosis más bajas o más altas que las mencionadas en el presente documento. La dosificación y los regímenes de tratamiento específicos para cualquier paciente en particular pueden depender de una variedad de factores, que pueden incluir el péptido o péptidos específicos empleados, la dimensión del área que se está tratando, el grosor deseado del hidrogel resultante que se puede colocar en el área diana deseada, y la duración del tratamiento. Otros

factores que pueden afectar la dosificación específica y los regímenes de tratamiento incluyen la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, el tiempo de administración, la velocidad de degradación, la gravedad y la evolución de la enfermedad, afección o síntomas y el juicio del médico tratante. En determinadas realizaciones, se puede administrar la solución peptídica en una dosis única. En otras realizaciones, la solución peptídica puede administrarse en más de una dosis o dosis múltiples. Se puede administrar la solución peptídica en al menos dos dosis.

Se puede seleccionar una cantidad eficaz y una concentración eficaz de la solución peptídica para tratar al menos parcialmente una fuga pulmonar, por ejemplo, para promover o proporcionar una oclusión en, o cerca de, un defecto pleural o una fuga anastomótica bronquial en un sujeto. En algunas realizaciones, al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz puede basarse en parte en una dimensión o diámetro del área diana. En otras realizaciones, al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz se basa en parte en el caudal de uno o más fluidos en, o cerca del, área diana. En otras realizaciones más, al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz puede basarse en parte en una dimensión o diámetro del área diana de la fuga pulmonar o el sitio de una cirugía.

En otras realizaciones más, al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz puede basarse en parte en al menos una de una dimensión o diámetro del área diana, y el caudal de uno o más fluidos en, o cerca del, área diana, y una dimensión o diámetro de un área diana de la fuga pulmonar, por ejemplo, el defecto pleural o la fuga anastomótica bronquial, o el sitio de una cirugía.

La cantidad eficaz puede incluir volúmenes de aproximadamente 0,1 mililitros (ml) a aproximadamente 100 ml de una solución peptídica. La cantidad eficaz puede incluir volúmenes de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml de una solución peptídica. La cantidad eficaz puede incluir volúmenes de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 ml. En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 0,4 ml. En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 0,5 ml. En otras realizaciones, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 1,0 ml. En otras realizaciones más, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 1,5 ml. En aún otras realizaciones, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 2,0 ml. En algunas realizaciones más, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 3,0 ml.

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 0,1 ml por 1 cm² a aproximadamente 5 ml por 1 cm² de área diana. La cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 0,1 ml por 1 cm² a aproximadamente 3 ml por 1 cm². En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 1 ml por 1 cm² de área diana. Esta cantidad eficaz puede utilizarse en relación con una concentración, tal como un 1,5 por ciento en peso por volumen o un 2,5 por ciento en peso por volumen de una solución peptídica de la presente divulgación.

La concentración eficaz puede ser, como se describe en el presente documento, una cantidad que puede tratar la fuga pulmonar. Varias propiedades en o cerca del sitio diana pueden contribuir a la selección o determinación de la concentración eficaz, incluyendo al menos una dimensión o diámetro del área diana, y el caudal de uno o más fluidos en o cerca del área diana.

La concentración eficaz puede incluir concentraciones peptídicas en la solución en un intervalo de aproximadamente 0,1 por ciento en peso por volumen (p/v) a aproximadamente 10 por ciento p/v. La concentración eficaz puede incluir concentraciones peptídicas en la solución en un intervalo de aproximadamente 0,1 por ciento p/v a aproximadamente 3,5 por ciento p/v. En determinadas realizaciones, la concentración eficaz puede ser de aproximadamente 1 por ciento p/v. En algunas otras realizaciones, la concentración eficaz puede ser de aproximadamente 1,5 por ciento p/v. En otras realizaciones, la concentración eficaz puede ser de aproximadamente 2,5 por ciento p/v. En otras realizaciones más, la concentración eficaz puede ser de aproximadamente 3,0 por ciento p/v.

En determinadas realizaciones, una solución peptídica que tiene una mayor concentración de péptido puede proporcionar un hidrogel más eficaz que tiene la capacidad de permanecer en su lugar y proporcionar un tratamiento eficaz. Para los fines de administrar la solución peptídica, las concentraciones más altas de soluciones peptídicas pueden volverse demasiado viscosas para permitir una administración eficaz y selectiva de la solución. Es posible que si no se selecciona una concentración lo suficientemente alta, el hidrogel puede no ser eficaz en el área diana durante el período de tiempo deseado.

La concentración eficaz puede seleccionarse para proporcionar una solución que puede administrarse mediante inyección u otros medios utilizando un diámetro o un calibre de catéter o aguja particular.

Los métodos de la divulgación contemplan administraciones únicas y múltiples de una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos, composiciones, soluciones peptídicas, membranas, filamentos e hidrogeles como se describe en el presente documento. Los péptidos como se describen en el presente documento pueden administrarse a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, la gravedad y el alcance de la afección del sujeto. En algunas realizaciones, un péptido, composición, solución peptídica, membrana, filamento o hidrogel se puede administrar en una administración única. En algunas realizaciones, un péptido, composición, solución peptídica o hidrogel descrito en el presente documento se administra en múltiples administraciones. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido, composición, solución peptídica, membrana, filamento o hidrogel se puede

administrar periódicamente en intervalos regulares. Los intervalos regulares seleccionados pueden basarse en una cualquiera o más de la concentración peptídica inicial de la solución administrada, la cantidad administrada y la velocidad de degradación del hidrogel formado. Por ejemplo, después de una administración inicial, una administración de seguimiento puede ocurrir después de, por ejemplo, 30 segundos, 1 minuto, dos minutos, 5 minutos, 10 minutos, 1 día, 2 días, 5 días, una semana, dos semanas, cuatro semanas, seis semanas u ocho semanas. La administración de seguimiento puede comprender la administración de una solución que tiene la misma concentración peptídica y volumen que la administración inicial, o puede comprender la administración de una solución de menor o mayor concentración peptídica y volumen. La selección de la administración de seguimiento apropiada de la solución peptídica puede basarse en la obtención de imágenes del área diana y el área que rodea el área diana y determinar las necesidades basadas en la condición del sujeto. Los intervalos predeterminados pueden ser los mismos para cada administración de seguimiento, o pueden ser diferentes. En algunas realizaciones, un péptido, una solución peptídica o un hidrogel pueden administrarse crónicamente a intervalos predeterminados para mantener al menos una oclusión parcial de un defecto pleural o la prevención de una fuga anastomótica bronquial en un sujeto durante la vida del sujeto. Los intervalos predeterminados pueden ser los mismos para cada administración de seguimiento, o pueden ser diferentes. Esto puede depender de si el hidrogel formado a partir de la administración anterior está parcial o totalmente interrumpido o degradado. La administración de seguimiento puede comprender la administración de una solución que tiene la misma concentración peptídica y volumen que la administración inicial, o puede comprender la administración de una solución de menor o mayor concentración peptídica y volumen. La selección de la administración de seguimiento apropiada de la solución peptídica puede basarse en la obtención de imágenes o visualización del área diana y el área que rodea el área diana y determinar las necesidades basadas en la condición del sujeto.

La administración del péptido de autoensamblaje puede comprender aplicar una solución que comprende el péptido de autoensamblaje a la superficie del área diana. En otras realizaciones, la solución puede aplicarse a través o dentro del área diana. Por ejemplo, un dispositivo de administración puede colocarse dentro del área de fuga para administrar, por ejemplo, inyectar la solución en el área de fuga, en lugar de aplicar la solución a la superficie del área diana.

Estos procedimientos de administración pueden llevarse a cabo mediante la colocación apropiada del dispositivo de administración. Como se discutió anteriormente, el dispositivo de administración puede ser una jeringa. La jeringa puede tener una medida particular para permitir el flujo adecuado de la solución sobre o hacia el área diana para lograr el tratamiento de la fuga pulmonar.

Los procedimientos adicionales relacionados con el tratamiento pueden comprender administrar una solución salina al área diana después de aplicar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje. Esto puede proporcionar un tratamiento superior de la fuga pulmonar debido al aumento de la resistencia mecánica de la barrera de hidrogel resultante, por ejemplo, un mayor módulo de almacenamiento de la barrera de hidrogel resultante en comparación con una barrera de hidrogel que no incluye un tratamiento adicional con una solución salina.

Los péptidos de autoensamblaje de la presente divulgación, tal como RADA 16, pueden ser secuencias peptídicas que carecen de un motivo o secuencia fisiológicamente o biológicamente activo distinto y, por lo tanto, pueden no alterar la función celular intrínseca. Los motivos fisiológicamente activos pueden controlar numerosos fenómenos intracelulares, tal como la transcripción, y la presencia de motivos fisiológicamente activos puede conducir a la fosforilación de proteínas intracitoplásmicas o de la superficie celular mediante enzimas que reconocen los motivos. Cuando un motivo fisiológicamente activo está presente en un péptido, la transcripción de proteínas con varias funciones puede activarse o suprimirse. Los péptidos de autoensamblaje, de la presente divulgación, pueden carecer de dichos motivos fisiológicamente activos y, por lo tanto, no conllevan este riesgo.

Se puede agregar un azúcar a la solución peptídica de autoensamblaje para mejorar la presión osmótica de la solución desde la hipotonicidad a la isotonicidad sin reducir el tratamiento de la fuga pulmonar, lo que permite aumentar la seguridad biológica. En determinados ejemplos, el azúcar puede ser sacarosa o glucosa.

Las longitudes óptimas para la formación de membrana pueden variar con la composición de aminoácidos. Un factor de estabilización contemplado por los péptidos de la presente divulgación es que los péptidos complementarios mantienen una distancia constante entre las cadenas principales peptídicas. Los péptidos que pueden mantener una distancia constante en el emparejamiento se denominan en el presente documento como estructuralmente compatibles. La distancia interpeptídica se puede calcular para cada par ionizado o de enlaces de hidrógeno mediante la suma del número de átomos no ramificados en las cadenas laterales de cada aminoácido en el par. Por ejemplo, la lisina tiene 5 y el ácido glutámico tiene 4 átomos no ramificados en sus cadenas laterales, respectivamente. Los péptidos se pueden sintetizar químicamente o se pueden purificar a partir de fuentes naturales y recombinantes. El uso de péptidos sintetizados químicamente puede permitir que las soluciones peptídicas sean deficientes en componentes no identificados, tales como componentes no identificados procedentes de la matriz extracelular de otro animal o microorganismo. Por lo tanto, esta propiedad puede eliminar los problemas de infección, incluido el riesgo de infección viral en comparación con los biomateriales procedentes de tejidos convencionales. Esto puede eliminar los problemas de infección, incluidas infecciones como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), lo que hace que el péptido sea altamente seguro para el tratamiento de la fuga pulmonar.

La concentración inicial del péptido puede ser un factor en el tamaño y el grosor de la membrana, el hidrogel o el

armazón formado. En general, cuanto mayor sea la concentración de péptidos, mayor será el grado de formación de membrana o hidrogel. Los hidrogeles o los armazones formados a concentraciones de péptido iniciales más altas (aproximadamente 10 mg/ml) (alrededor de 1,0 por ciento p/v) pueden ser más gruesos y, por lo tanto, probablemente más fuertes.

5 La formación de membranas, hidrogeles, composiciones o armazones puede ser muy rápida, del orden de unos pocos segundos o unos pocos minutos. La formación de las membranas o hidrogeles puede ser irreversible. En determinadas realizaciones, la formación puede ser reversible. El hidrogel puede formarse instantáneamente tras la administración a un área diana. La formación del hidrogel puede ocurrir dentro de aproximadamente uno a dos minutos de la administración. En otros ejemplos, la formación del hidrogel puede ocurrir dentro de aproximadamente tres a cuatro minutos de la administración. En determinadas realizaciones, el tiempo que lleva formar el hidrogel puede basarse, al menos en parte, en una o más de la concentración de la solución peptídica, el volumen de solución peptídica aplicado y las condiciones en el área de aplicación o inyección, por ejemplo, la concentración de cationes y/o aniones metálicos monovalentes en el área de aplicación, el pH del área y la presencia de uno o más fluidos en o cerca del área, componentes adicionales que se agregan a la solución antes o después de la administración en el área diana). El proceso puede no verse afectado por un pH inferior o igual a 12, y por la temperatura. Las membranas o hidrogeles pueden formarse a temperaturas en el intervalo de 1 a 99 grados centígrados.

20 Los hidrogeles pueden permanecer en posición en el área diana durante un período de tiempo suficiente para proporcionar un efecto deseado utilizando los métodos y kits de la presente descripción. El efecto deseado utilizando los materiales, composiciones, métodos y kits de la presente divulgación puede ser tratar áreas o ayudar a curar áreas en las que se realizó un procedimiento quirúrgico o cerca del sitio de una cirugía o el sitio de una fuga anastomótica bronquial. Por ejemplo, el efecto deseado utilizando los materiales, composiciones, métodos y kits de la presente divulgación puede ser tratar áreas o ayudar a curar áreas en las que se realiza una cirugía pulmonar.

25 Los materiales y métodos de la presente divulgación, incluido el uso de una solución, hidrogel, composición o membrana que comprende un péptido de autoensamblaje como se describe en el presente documento para tratar una fuga pulmonar, se proporcionan para producir una barrera de hidrogel en un área diana de la fuga pulmonar. Una propiedad de la barrera de hidrogel que puede determinar la idoneidad del éxito del tratamiento es la presión de rotura o la tolerancia de presión de rotura. La presión de rotura puede referirse a la presión a la cual la barrera de hidrogel fallará. Por ejemplo, esta puede ser la presión a la que la barrera de hidrogel ya no funciona como se desea para proporcionar un tratamiento adecuado al área diana. La presión de rotura puede ser la presión a la que el bloqueo u oclusión provisto por la barrera de hidrogel permite que el aire pase a través de ella.

35 En algunas realizaciones, puede ser deseable proporcionar, a través del uso de los materiales y métodos de la divulgación, una presión de rotura que sea similar o superior a la que se logra con el tejido normal (por ejemplo, tejido sin dañar o tejido sin fugas). Puede ser deseable proporcionar, a través del uso de los materiales y métodos de la divulgación, una presión de rotura que sea similar a las presiones exhibidas a través de la función pulmonar normal o promedio. Para tejidos normales y sanos, generalmente se puede observar una presión de rotura de aproximadamente 20 a aproximadamente 20 cm de H₂O. En determinadas realizaciones, una presión de ruptura de 35 cm de H₂O o superior es una presión de rotura deseable o aceptable para la barrera de hidrogel para tratar una fuga pulmonar, por ejemplo, un defecto pleural o una fuga anastomótica bronquial. En determinadas realizaciones, la presión de rotura puede aumentar después de la administración de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje. Por ejemplo, puede haber un aumento en la presión de rotura de un minuto a dos minutos, a 10 minutos. En algunas realizaciones, puede desearse tener una presión de rotura de al menos 35 cm de H₂O entre aproximadamente 0 y 1 minuto, 1 minuto a 2 minutos, o 2 minutos a cinco minutos. En determinadas realizaciones, la presión de rotura de al menos 35 cm de H₂O se puede lograr en un periodo de tiempo adecuado para permitir el tratamiento de la fuga pulmonar. El período de tiempo también puede ser adecuado para el tratamiento adecuado por parte del médico. La presión de rotura de al menos 35 cm de H₂O se puede lograr en menos de aproximadamente 5 minutos, menos de aproximadamente 3 minutos, menos de aproximadamente 2 minutos, menos de aproximadamente 1 minuto o menos de aproximadamente 30 segundos.

55 Hay un efecto del tiempo de gelación, post-aplicación. La presión de rotura aumenta con el aumento del tiempo, entre 1 minuto, 2 minutos y 10 minutos. Dos minutos pueden ser preferibles para proporcionar el sello. La barrera de hidrogel puede ser adecuada para proporcionar una presión de rotura eficaz de al menos 35 cm de H₂O, independientemente del tamaño del área diana. Por ejemplo, los defectos creados mediante la perforación de una superficie con una aguja de 14 g, 16 g, 18 g o 22 g no afectan drásticamente la presión de rotura de 35 cm de H₂O.

60 El período de tiempo que las membranas o hidrogeles pueden permanecer en el área deseada puede ser de aproximadamente 10 minutos. En determinados ejemplos, puede permanecer en el área deseada durante aproximadamente 35 minutos. En determinados ejemplos adicionales, puede permanecer en el área deseada durante uno o más días, hasta una o más semanas. En otros ejemplos, puede permanecer en el área deseada durante hasta 30 días o más. Puede permanecer indefinidamente en el área deseada. En otros ejemplos, puede permanecer en el área deseada durante un periodo de tiempo más largo, hasta que se degrade de forma natural o elimine intencionalmente. Si el hidrogel se degrada de forma natural durante un período de tiempo, se puede realizar la aplicación o inyección subsiguiente del hidrogel en la misma o diferente ubicación.

En determinadas realizaciones, el péptido de autoensamblaje puede prepararse con uno o más componentes que pueden proporcionar una eficacia mejorada del péptido de autoensamblaje o pueden proporcionar otra acción, tratamiento, terapia o interactuar de otro modo con uno o más componentes del sujeto. El uno o más componentes adicionales pueden proporcionar una mayor resistencia mecánica, medida por el módulo de almacenamiento, G' y cinética de gelificación mejorada, por ejemplo, la gelificación más rápida en un hidrogel o una barrera de hidrogel.

Por ejemplo, el pH del péptido de autoensamblaje, por ejemplo, en forma de una solución o composición de péptidos de autoensamblaje, puede ajustarse. El pH del péptido de autoensamblaje, en forma de una solución o composición de péptidos de autoensamblaje, puede aumentar o disminuir. Esto se puede hacer mediante el ajuste del pH de la solución peptídica de autoensamblaje, mediante la adición de un regulador de pH. El regulador de pH puede ser, por ejemplo, sales, una solución salina o una solución tampón. El regulador de pH puede seleccionarse basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido de autoensamblaje, el tipo de sal o sales, la concentración de una o más sales y el pH del regulador de pH. En determinadas realizaciones, el pH de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje está entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,0.

Las soluciones y composiciones que comprenden unos péptidos de autoensamblaje que se proporcionan mediante la presente divulgación pueden prepararse con componentes adicionales, por ejemplo, una o más sales. La preparación de la solución puede comprender agregar el péptido de autoensamblaje, por ejemplo, en forma de un polvo peptídico o una solución peptídica, a una solución salina. En otras realizaciones, la preparación de la solución puede comprender añadir una sal o una solución de sal a un péptido de autoensamblaje, en forma de un polvo peptídico o una solución peptídica. En otras realizaciones, la preparación de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje comprende añadir agua a un polvo peptídico del péptido de autoensamblaje para proporcionar una solución peptídica acuosa. El agua puede ser agua desionizada o cualquier agua purificada adecuada para la preparación de la solución peptídica. El agua puede ser de un dispositivo médico de grado aceptable o farmacéuticamente aceptable. El polvo peptídico y el agua pueden mezclarse opcionalmente. Luego se puede agregar una sal o una solución salina a la solución peptídica acuosa. La sal o la solución salina y la solución peptídica acuosa pueden mezclarse luego.

Se pueden proporcionar soluciones salinas para utilizar en la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, para agregar a la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, o para agregar al hidrogel o la composición que comprende el péptido de autoensamblaje. Las soluciones salinas pueden proporcionarse con aniones y cationes específicos, y en concentraciones específicas para impartir una propiedad deseada a la solución que comprende el péptido de autoensamblaje o el hidrogel resultante o barrera de hidrogel. Por ejemplo, la solución salina puede proporcionarse para tener una resistencia mecánica (módulo de almacenamiento), rigidez, viscosidad, cinética de gelificación, fuerza iónica, pH o presión de rotura (tolerancia a la presión de rotura).

Las soluciones salinas pueden comprender cationes y/o aniones monovalentes y/o divalentes. La solución salina puede comprender al menos un catión seleccionado del grupo que consiste en amonio, hierro, magnesio, potasio, pirimidio, amonio cuaternario, sodio, potasio y calcio. La solución salina puede comprender al menos un anión seleccionado del grupo que consiste en cloruro, sulfato, acetato, carbonato, cloruro, citrato, cianuro, fluoruro, sulfato, nitrato, nitrito y fosfato.

En algunas realizaciones, la solución salina comprende al menos uno de cloruro de calcio, cloruro de sodio y cloruro de potasio.

En determinadas realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede comprender (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) a una concentración de aproximadamente 0,5 por ciento p/v. Esta solución puede comprender además una concentración de cloruro de calcio de aproximadamente 0,125 M. Esta solución puede proporcionar además un módulo de almacenamiento de aproximadamente 25 Pa.

En determinadas realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede comprender (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) a una concentración de aproximadamente 0,5 por ciento p/v. Esta solución puede comprender además una concentración de cloruro de calcio de aproximadamente 0,250 M. Esta solución puede proporcionar además un módulo de almacenamiento de aproximadamente 44 Pa.

En determinadas realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede comprender (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) a una concentración de aproximadamente 0,5 por ciento p/v. Esta solución puede comprender además una concentración de cloruro de calcio de aproximadamente 0,500 M. Esta solución puede proporcionar además un módulo de almacenamiento de aproximadamente 52 Pa.

En determinadas realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede comprender (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) a una concentración de aproximadamente 2,5 por ciento p/v. Esta solución puede comprender además una concentración de cloruro de calcio de aproximadamente 0,125 M. Esta solución puede proporcionar además un módulo de almacenamiento de aproximadamente 600 Pa.

En las realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede tener una concentración de sal de entre aproximadamente 0,005 M y aproximadamente 1 M. En determinadas realizaciones, la solución que

comprende el péptido de autoensamblaje puede tener una concentración de sal de entre aproximadamente 0,125 M y aproximadamente 0,500 M. En determinadas realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede tener una concentración de sal de entre aproximadamente 0,25 M.

5 En las realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede comprender o puede haber añadido una solución isotónica. La solución isotónica puede ser relativa a un sujeto, por ejemplo, fluidos corporales del sujeto o las condiciones fisiológicas locales en el área diana. La solución isotónica puede comprender al menos uno de cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y agua. La solución puede contener ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, que puede utilizarse para ajustar el pH. Para preparar esta solución, se pueden disolver 8,6 g de NaCl, 0,3 g de KCl y 0,33 g de CaCl₂ en un litro de agua destilada. El pH de esta solución puede ser de aproximadamente 5,4. El pH de la solución se puede ajustar con un ácido o una base, o un regulador de pH. El regulador de pH puede ser bicarbonato de sodio. La solución puede ser denominada como la solución de Ringer.

15 En las realizaciones, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje puede comprender o puede haber añadido un agente de contraste. El agente de contraste puede utilizarse para la visualización de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje o el hidrogel o la barrera de hidrogel. El agente de contraste puede proporcionar o asegurar a un profesional la ubicación de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje o el hidrogel o la barrera de hidrogel. El agente de contraste puede comprender al menos uno de los iones sulfato e iones sodio.

20 En las realizaciones, las propiedades de varios péptidos de autoensamblaje, que incluyen pero no se limitan a (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (IEIK)₃ (SEQ ID NO: 2), (KI.1)₁ (SEQ ID NO: 3) pueden mejorarse mediante el mantenimiento de su concentración de sal a un nivel inferior a su nivel de fuerza iónica crítica antes de que comiencen a precipitar. El nivel crítico de fuerza iónica de las sales varía según las características y la composición intrínseca de aminoácidos de cada péptido. Los péptidos pueden disolverse en agua con varias sales en lugar de agua pura para mantener su fuerza iónica salina a menos que su nivel de fuerza iónica crítica antes de que comiencen a precipitar.

30 Esto puede conferir beneficiosamente propiedades relativamente más rígidas o una mayor resistencia mecánica a la solución peptídica de autoensamblaje e hidrogeles a diversas concentraciones de sal, haciéndolos adecuados para un intervalo más amplio de aplicaciones en comparación con hidrogeles peptídicos mantenidos a un nivel de concentración de sal cero. Esto también puede proporcionar beneficiosamente una cinética de gelificación rápida de solución peptídica a hidrogeles peptídicos tras el cambio de la fuerza iónica de la sal ambiental sobre su fuerza iónica crítica antes de la precipitación, como la fuerza iónica fisiológica, que puede ocurrir cuando la solución peptídica se administra a condiciones fisiológicas, por ejemplo, un área diana del sujeto.

35 De acuerdo con uno o más aspectos, las propiedades de varios hidrogeles peptídicos, que incluyen pero no se limitan a (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (IEIK)₃ (SEQ ID NO: 2), (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3), se pueden mejorar mediante el mantenimiento de su nivel de pH a un valor elevado de aproximadamente 3,5 o menos y al mismo tiempo, su concentración de sal a menos de su nivel de fuerza iónica crítica antes de que precipiten.

40 En algunas realizaciones, la solución que comprende (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) tiene un pH de aproximadamente 3,5. En algunas realizaciones, la solución que comprende (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3), tiene un pH de aproximadamente 3,5. En algunas realizaciones, la solución que comprende (IEIK)₃ (SEQ ID NO: 2), tiene un pH de aproximadamente 3,7.

45 En algunas realizaciones, puede añadirse un tampón, tal como una solución tampón, a la solución peptídica de autoensamblaje o al péptido de autoensamblaje.

50 Un tampón puede ser una solución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, o viceversa. El pH del tampón cambia muy poco cuando se le agrega una cantidad pequeña o moderada de ácido o base fuerte y, por lo tanto, se utiliza para evitar cambios en el pH de una solución. Las soluciones tampón se utilizan como un medio para mantener el pH en un valor casi constante en una amplia variedad de aplicaciones químicas, y es aplicable a los péptidos de autoensamblaje y a las soluciones y composiciones peptídicas de autoensamblaje desveladas en el presente documento.

55 Un tampón puede comprender al menos dos sales. Un tampón puede tener un pH de aproximadamente 7,4, como el tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato). Un tampón puede tener un pH de aproximadamente 7,2, como el tampón DMEM. En algunas realizaciones, el tampón puede ser un tampón alcalino.

60 En algunas realizaciones, una solución o composición del péptido de autoensamblaje puede tamponarse con aproximadamente 0,15 M de al menos uno de cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio. Cuando el péptido de autoensamblaje es (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), el tampón puede comprender entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 1,2 M de una sal. Cuando el péptido de autoensamblaje es (IEIK)₃ (SEQ ID NO: 2), el tampón puede comprender entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 1,2 M de una sal. Cuando el péptido de autoensamblaje es (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), el tampón puede comprender entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 0,04 M de una sal. Cuando el péptido de autoensamblaje es (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3), el tampón puede comprender entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 M de una sal.

- En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento que comprenden además seleccionar una sal para proporcionar una resistencia mecánica predeterminada a la solución. El método puede comprender además seleccionar la concentración de la sal para proporcionar la resistencia mecánica predeterminada a la solución. El método puede comprender seleccionar una sal para proporcionar una fuerza iónica predeterminada a la solución. El método puede comprender además seleccionar la concentración de la sal para proporcionar la fuerza iónica predeterminada a la solución. El método puede comprender además seleccionar una sal para proporcionar un pH predeterminado a la solución. El método puede comprender además seleccionar la concentración de la sal para proporcionar el pH predeterminado a la solución.
- Los péptidos adicionales que comprenden una o más secuencias o motivos de aminoácidos biológicamente o fisiológicamente activos pueden incluirse como uno de los componentes junto con el péptido de autoensamblaje. Otros componentes pueden incluir compuestos biológicamente activos, como un fármaco u otro tratamiento que puede proporcionar algún beneficio al sujeto. Por ejemplo, un fármaco para tratar el cáncer o fármaco anticancerígeno puede administrarse con el péptido de autoensamblaje, o puede administrarse por separado.
- El péptido, la solución peptídica o el hidrogel pueden comprender pequeños fármacos moleculares para tratar al sujeto o para evitar la hemólisis, la inflamación y la infección. Los fármacos moleculares pequeños pueden seleccionarse del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, sacarosa purificada, lactosa, maltosa, trehalosa, dextrano, yodo, cloruro de lisozima, dimetilisoprilazululeno, tretinoín tocoferil, povidona yodada, alprostadiil alfadex, alcohol de anís, salicilato de isoamilo, α,α - dimetilfeniletil alcohol, bacdanol, helional, plata de sulfazina, bucladesina sódica, alprostadiil alfadex, sulfato de gentamicina, clorhidrato de tetraciclina, fusidato de sodio, mupirocina hidrato de calcio y benzoato de isoamilo. Se pueden contemplar otros fármacos moleculares pequeños. Los fármacos basados en proteínas pueden incluirse como un componente a administrar, y pueden incluir eritropoyetina, activador de plasminógeno de tipo tisular, hemoglobina sintética e insulina.
- Se puede incluir un componente para proteger el péptido de autoensamblaje, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, o la composición contra la formación rápida o inmediata en un hidrogel. Esto puede incluir un sistema de administración encapsulado que puede degradarse con el tiempo para permitir una liberación controlada en tiempo de la solución peptídica en el área diana para formar el hidrogel durante un período de tiempo deseado, predeterminado. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico.
- Cualquiera de los componentes descritos en el presente documento puede incluirse en el péptido de autoensamblaje, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, la composición o el kit, o puede administrarse por separado del péptido de autoensamblaje, la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, la composición o el kit. Adicionalmente, cualquiera de los métodos y métodos de facilitación que se proporcionan en el presente documento pueden realizarse por una o más partes.
- Se puede proporcionar un péptido, solución peptídica, composición o hidrogel de la divulgación en un kit para tratar una fuga pulmonar, por ejemplo un defecto pleural o una fuga anastomótica bronquial. El kit puede ser para tratar una fuga pulmonar en un sujeto. Las instrucciones para administrar el péptido de autoensamblaje de la solución a un área diana de una fuga pulmonar del sujeto también se pueden proporcionar en el kit. El péptido de autoensamblaje puede comprender entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 32 aminoácidos en una cantidad eficaz para formar una barrera de hidrogel para permitir el tratamiento de la fuga pulmonar. En algunas realizaciones, el péptido de autoensamblaje puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente entre aproximadamente 12 y aproximadamente 16 aminoácidos. El péptido de autoensamblaje puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (IEIK)₃ (SEQ ID NO: 2), (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3). Las concentraciones del péptido de autoensamblaje en solución pueden ser cualquiera de las concentraciones desveladas en el presente documento.
- Las instrucciones para administrar la solución pueden comprender métodos para administrar el péptido, la solución peptídica o el hidrogel proporcionado en el presente documento, por ejemplo, mediante una vía de administración descrita en el presente documento, a una dosis, volumen o concentración, o programa de administración. El péptido puede ser anfifílico y al menos una parte del péptido puede alternar entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo.
- El kit puede proporcionar el péptido de autoensamblaje como uno de una solución que comprende un péptido de autoensamblaje y un polvo para prepararse como una solución que comprende un péptido de autoensamblaje. También se pueden proporcionar instrucciones para preparar una solución que comprende un péptido de autoensamblaje que tiene una concentración eficaz para formar una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para permitir el tratamiento de la fuga pulmonar.
- El kit también puede comprender material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de marketing u otro material que se relaciona con los métodos descritos en el presente documento. En una realización, el material informativo puede incluir información sobre la producción del péptido, solución peptídica o hidrogel descritos en el presente documento, propiedades físicas del péptido, composición, solución peptídica o hidrogel, concentración,

volumen, tamaño, dimensiones, fecha de caducidad y lote o sitio de producción.

El kit también puede incluir opcionalmente un dispositivo o materiales para permitir la administración del péptido o solución peptídica al área deseada. Por ejemplo, se puede incluir en el kit una jeringa, pipeta, catéter u otro dispositivo basado en aguja. Además, o como alternativa, el kit puede incluir una aguja guía, endoscopio u otro equipo que lo acompañe para proporcionar la administración selectiva de la solución peptídica al área diana.

El kit puede comprender, además o como alternativa, otros componentes o ingredientes, tales como componentes que pueden ayudar en el posicionamiento de la solución peptídica, hidrogel o armazón. Se pueden proporcionar instrucciones en el kit para combinar una cantidad o volumen suficiente de la solución peptídica con una solución de sacarosa, que puede proporcionarse, o no, con el kit. Se pueden proporcionar instrucciones para diluir la solución peptídica para administrar una concentración eficaz de la solución en el área diana. La instrucción puede describir la dilución de la solución peptídica con un diluyente o disolvente. El diluyente o disolvente puede ser agua. Además, se pueden proporcionar instrucciones para determinar al menos una de la concentración eficaz de la solución y la cantidad eficaz de la solución en el área diana. Esto puede basarse en varios parámetros discutidos en este documento, y puede incluir el diámetro de la lesión o el sitio de una fuga anastomótica bronquial o herida en el área diana.

Otros componentes o ingredientes pueden incluirse en el kit, en la misma o diferente composición o recipiente que el péptido, soluciones peptídicas o hidrogel. El uno o más componentes que pueden incluir componentes que pueden proporcionar una mayor eficacia del péptido de autoensamblaje o pueden proporcionar otra acción, tratamiento, terapia o interactuar de otro modo con uno o más componentes del sujeto. Por ejemplo, los péptidos adicionales que comprenden una o más secuencias o motivos de aminoácidos biológicamente o fisiológicamente activos pueden incluirse como uno de los componentes junto con el péptido de autoensamblaje. Otros componentes pueden incluir compuestos biológicamente activos, como un fármaco u otro tratamiento que puede proporcionar algún beneficio al sujeto. Por ejemplo, un fármaco para tratar el cáncer o fármaco anticancerígeno puede administrarse con el péptido de autoensamblaje, o puede administrarse por separado. El péptido, la solución peptídica o el hidrogel pueden comprender pequeños fármacos moleculares para tratar al sujeto o para evitar la hemólisis, la inflamación y la infección, como se divulga en el presente documento. Una solución de azúcar tal como una solución de sacarosa puede proporcionarse con el kit. La solución de sacarosa puede ser una solución de sacarosa al 20 %.

Otros componentes que se desvelan en el presente documento a lo largo de esta divulgación también pueden incluirse en el kit. Por ejemplo, el kit puede comprender además soluciones de sal separadas, o en combinación con el péptido de autoensamblaje. El kit puede comprender además, por ejemplo, un azúcar o solución de azúcar, por ejemplo, sacarosa, que se proporciona por separado del péptido de autoensamblaje o junto con el péptido de autoensamblaje. Se pueden proporcionar instrucciones para combinar una solución de sal y una de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje, o el polvo peptídico. El kit puede comprender además una solución isotónica o un agente de contraste para agregarse a la solución o el polvo peptídico de autoensamblaje, o como parte de la solución peptídica de autoensamblaje.

En algunas realizaciones, un componente del kit se almacena en un vial sellado, por ejemplo, con un cierre de goma o silicona (por ejemplo, un cierre de polibutadieno o poliisopreno). En algunas realizaciones, un componente del kit se almacena en condiciones inertes (por ejemplo, en nitrógeno u otro gas inerte como el argón). En algunas realizaciones, un componente del kit se almacena en condiciones anhidras (por ejemplo, con un desecante). En algunas realizaciones, un componente del kit se almacena en un recipiente de bloqueo de luz tal como un vial de color ámbar.

Como parte del kit o separado de un kit, las jeringas o pipetas pueden precargarse con un péptido, solución peptídica o hidrogel como se desvela en el presente documento. Se proporcionan métodos para indicar a un usuario que suministre una solución peptídica de autoensamblaje a una jeringa o pipeta, con o sin el uso de otros dispositivos, y administrándola al área diana a través de la jeringa o pipeta, con o sin el uso de otros dispositivos. Otros dispositivos pueden incluir, por ejemplo, un catéter con o sin una aguja guía.

El péptido de autoensamblaje del kit puede ser cualquier péptido proporcionado en la presente divulgación y cualquier componente descrito en la presente divulgación, por ejemplo, varias sales, reguladores de pH, tampones, tampones alcalinos puede proporcionarse en el kit, con el péptido de autoensamblaje en el kit o por separado del péptido de autoensamblaje en el kit.

En las realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y 32 aminoácidos en una cantidad eficaz y en una concentración eficaz para utilizar en la formación de una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para tratar una fuga pulmonar. La barrera de hidrogel de la composición puede proporcionar una tolerancia a la presión de rotura de al menos 35 de H₂O. El péptido de autoensamblaje de la composición se puede seleccionar del grupo que consiste en (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (EIK)₃I (SEQ ID NO: 2) y (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3). La concentración eficaz para permitir el tratamiento de la fuga pulmonar comprende una concentración de péptido de autoensamblaje en un intervalo de aproximadamente 0,1 por ciento en peso por volumen (p/v) a aproximadamente 3 por ciento p/v. La composición puede estar sustancialmente libre de células. La composición puede estar sustancialmente libre de fármacos. La composición puede comprender además uno o más de los componentes desvelados en el presente documento. Por ejemplo, la composición puede

comprender uno o más de los cationes, aniones, sales, tampones, agentes de contraste, soluciones isotónicas, reguladores de pH y azúcares desvelados en el presente documento, y en las diversas concentraciones desveladas en el presente documento. Las composiciones pueden tener propiedades tales como resistencia mecánica, pH, cinética de gelificación y fuerza iónica como se desvela en el presente documento. Las composiciones pueden utilizarse en el tratamiento de fugas pulmonares, tales como defectos pleurales o fugas anastomóticas bronquiales, y pueden ser tratamientos para un sujeto, como un mamífero o un ser humano.

También se puede proporcionar un método para facilitar el tratamiento de una fuga pulmonar en un sujeto. Los métodos pueden comprender proporcionar una solución que comprende un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y aproximadamente 32 aminoácidos en una cantidad eficaz y en una concentración eficaz para formar una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para permitir la prevención de la fuga pulmonar; y proporcionar instrucciones para administrar la solución a un área diana del sistema pulmonar a través de la introducción de la solución a través de un dispositivo de administración ubicado en la fuga pulmonar.

Los métodos pueden comprender además proporcionar instrucciones para visualizar una región que comprende al menos una parte de la fuga pulmonar, como se divulga en el presente documento. También pueden proporcionarse instrucciones para visualizar la región que comprende al menos una parte de la fuga pulmonar, en la que las instrucciones comprenden al menos una de identificación del área diana del sistema pulmonar; introducción del dispositivo de administración; ubicación de un extremo del dispositivo de administración en el área diana; administración de la solución; retirada del dispositivo de suministro de la fuga pulmonar; y control de la fuga pulmonar después de retirar el dispositivo de administración. Se pueden proporcionar instrucciones para visualizar la región en un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos después de la etapa de administración de la solución. El método puede comprender además proporcionar instrucciones para preparar al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz basada en parte en una dimensión del área diana de la fuga pulmonar, como se discute en la divulgación.

El péptido de autoensamblaje se selecciona del grupo que consiste en (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (EIK)₃I (SEQ ID NO: 2) y (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3). El método puede comprender además proporcionar instrucciones para controlar el área que rodea el área diana. El método puede comprender además proporcionar la solución e instrucciones de uso después de un procedimiento quirúrgico. El método que comprende proporcionar una solución que comprende un péptido de autoensamblaje puede comprender proporcionar instrucciones para preparar una solución peptídica, como se desvela en el presente documento, que tiene una concentración eficaz para formar una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas para permitir la prevención de la fuga pulmonar.

Ejemplos

Ejemplo 1: Impacto del nivel de pH en las propiedades reológicas de los hidrogeles peptídicos

Los efectos del medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, de sus siglas en inglés) (pH 7,4) sobre las propiedades reológicas de IEIK13, KLD12 y PuraMatrix® se evaluaron en un reómetro (AR500, TA Instruments) con placas de 40 mm. El DMEM es generalmente un medio de cultivo celular que contiene 6,4 g/l de NaCl, 3,4 g/l de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio), cantidades menores de otras sales, varios aminoácidos y 4,5 g/l de glucosa. El nivel de pH de DMEM es generalmente 7.2±0.2 y la osmolaridad es 335±30 mOsm/kg de H₂O; ambas medidas están cerca de los fluidos fisiológicos humanos, como la sangre.

Las soluciones peptídicas (1 %) se mantuvieron a 4 °C durante al menos 48 horas antes del ensayo. Para realizar el experimento, se pipeteó suavemente 1 ml de solución peptídica y se colocó en la placa del reómetro. Se añadieron suavemente 2 ml de solución DMEM alrededor de la solución peptídica. La solución peptídica se trató con DMEM durante dos minutos, luego se eliminó el medio y las placas se colocaron en un espacio de medición de geometría de aproximadamente 450 μm. Las mediciones se realizaron a 37 °C después de 2 minutos de tiempo de relajación. Las pruebas de frecuencia se realizaron desde 1 rad/s hasta 100 rad/s a 1 Pa de tensión de oscilación.

Las propiedades reológicas de los péptidos (1 %) se compararon antes y después del tratamiento con DMEM durante 2 minutos, como se muestra en la Figura 1A. El aumento de veces de los módulos de almacenamiento después del tratamiento con DMEM durante 2 minutos se muestra en la Figura 1B. Cada uno de los péptidos mostró grandes aumentos de los módulos de almacenamiento después del tratamiento con DMEM. La diferencia de veces entre los módulos de almacenamiento después del tratamiento con DMEM entre PuraMatrix®, KLD12 e IEIK13 fue relativamente leve en comparación con la anterior al tratamiento con DMEM. De forma similar, las soluciones peptídicas más rígidas (es decir, IEIK13) mostraron un aumento menor del módulo de almacenamiento que las soluciones peptídicas más débiles (es decir, PuraMatrix®) después del tratamiento con DMEM. Esta observación sugiere que se produce una interacción intermolecular crítica después del tratamiento con DMEM, que determina la rigidez final después del tratamiento con DMEM.

Ejemplo 2: Optimización del nivel de pH de las soluciones peptídicas

Para ajustar el nivel de pH de las soluciones peptídicas a modo de ejemplo, se añadió NaOH 0,1 N a 2 ml de soluciones

peptídicas al 2,5 % y se midieron su pH y aspecto. Los resultados se muestran en la Tabla 1. De forma destacable, un aumento de pH de aproximadamente 3,5 o menos no cambió el color claro de las soluciones PuraMatrix®, IEIK13 y KLD12, mientras que su rigidez aparente aumentó.

5 **Tabla 1** Aspecto de las soluciones peptídicas a diversos niveles de pH

Péptidos	NaOH 0,1 N añadido en una solución al 2,5 % (pi./ml.)	Conc. (%)	pH de solución peptídica	Aspecto
PuraMatrix®	0	2,5	2,2	Gel claro y espeso
	50	2,38	2,3	Gel claro y espeso
	100	2,27	2,4	Gel claro y espeso
	150	2,17	2,7	Gel claro, espeso, más rígido
	200	2,08	2,9	Gel claro, espeso, más rígido
	250	2,0	3,2	Gel claro, espeso, más rígido
	275	1,96	3,4	Gel claro, espeso, más rígido
	300	1,92	3,6	Gel ligeramente turbio y quebradizo
	350	1,85	4,5	Turbio, separado por fases
				7,0
IEIK13	0	2,5	1,8	Gel claro y espeso
	50	2,38	2,1	Gel claro y espeso
	100	2,27	2,2	Gel claro y espeso
	150	2,17	2,7	Gel claro, espeso, gel más rígido
	200	2,08	3,0	Gel claro, espeso, gel más rígido
	250	2,0	3,3	Gel claro, espeso, gel más rígido
	275	1,96	3,7	Gel claro, espeso, más rígido
	300	1,92	4,0	Gel ligeramente turbio y quebradizo
	350	1,85	4,5	Gel turbio y quebradizo
	400	1,79	5,4	Turbio, separado por fases
				7,0
KLD12	0	2,5	2,1	Gel claro y espeso
	50	2,38	2,4	Gel claro y espeso
	100	2,27	2,6	Gel claro y espeso
	150	2,17	2,9	Gel claro, espeso y rígido
	200	2,08	3,3	Gel claro, espeso y rígido
	225	2,04	3,6	Gel claro, espeso y rígido
	250	2,0	4,0	Gel ligeramente turbio y quebradizo
	300	1,92	4,7	Gel turbio y quebradizo
	350	1,85	5,2	Turbio, separado por fases
				7,0

Ejemplo 3: Propiedades reológicas de soluciones peptídicas de pH ajustado

10 Sobre la base de la observación visual del efecto del nivel de pH en las propiedades de las soluciones peptídicas, se evaluó el efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas después de ajustar su nivel de pH a 3,4 (PuraMatrix® y KLD12) o 3,7 (IEIK13). Si los niveles de pH de las soluciones peptídicas son superiores a 3,5 (PuraMatrix® y KLD12) o 3,7 (IEIK13), la solución peptídica comienza a separarse de la fase y se vuelve turbia. Las propiedades reológicas de las soluciones PuraMatrix®, KLD12 e IEIK13 fueron mayores a pH 3,4. Los resultados se muestran en la Figura 2 para KLD12 al 1 %, Figura 3 para IEIK13 al 1 % y las Figuras 4-5 para PuraMatrix® al 1 % y 15 2,5 %, respectivamente. Las pruebas de barrido de estrés se realizaron a 10 rad/s. Las pruebas de barrido de frecuencia se realizaron a 1 Pa.

Ejemplo 4: Otras propiedades reológicas de soluciones peptídicas de pH ajustado

20 Sobre la base de los resultados del efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas después de ajustar su nivel de pH a 3,4 (PuraMatrix® y KLD12) o 3,7 (IEIK13), se evaluó el efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas a varios niveles de pH. La propiedad reológica de las soluciones PuraMatrix® e IEIK13 aumenta con el ajuste del pH hasta 3,4. Las propiedades reológicas de los péptidos se evaluaron a diversas concentraciones utilizando un reómetro (DHR-1, TA Instruments) con placas de 20 mm. Los resultados se muestran 25 en la Figura 6A para la solución de PuraMatrix® al 2,5 % y la Figura 6B para la solución de IEIK13 al 1,5 %, respectivamente. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 1 rad/seg a 10 rad/seg a 1 Pa y se seleccionó el módulo de almacenamiento a 1 rad/seg para los datos.

30 **Ejemplo 5: Efecto del nivel de pH en las propiedades reológicas de los hidrogeles peptídicos en diversas concentraciones antes/después del tratamiento con DMEM**

Sobre la base de los resultados del efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas después de ajustar su nivel de pH, se evaluó el efecto en las propiedades reológicas de los hidrogeles peptídicos a varios pH

después del tratamiento con DMEM y se comparó con el efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas a varios pH antes del tratamiento con DMEM. La propiedad reológica de los hidrogeles PuraMatrix® e IEIK13 después del tratamiento con DMEM aumenta con el ajuste del pH hasta 3,4. Los resultados son visibles en la Figuras 7A-7B para PuraMatrix® y las Figuras 8A-8B para IEIK (SEQ ID NO: 5), respectivamente. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 1 rad/seg a 10 rad/seg a 1 Pa y se seleccionó el módulo de almacenamiento a 1 rad/seg para los datos.

Ejemplo 6: Efecto en la cinética de la gelificación de los hidrogeles peptídicos de pH ajustado

El efecto del nivel de pH en las propiedades de la cinética de gelación se evaluó para identificar niveles de pH optimizados para los péptidos como se describe en el presente documento. La cinética de gelificación rápida de PuraMatrix® y otros péptidos dentro del fluido corporal generalmente puede mejorar su función y tiempo de respuesta para diversas aplicaciones clínicas. El nivel de pH puede conferir un tiempo de respuesta para comenzar la gelificación cuando se trata con un fluido corporal simulado que incluye, pero no se limita a, DMEM. PuraMatrix® sin ajuste de pH (pH 2,2) no mostró un aumento del módulo de almacenamiento durante los 13 segundos iniciales, mientras que PuraMatrix® con ajuste de pH mostró un aumento inmediato del módulo de almacenamiento debido a la rápida gelificación. El tiempo de respuesta rápido de PuraMatrix® y otros péptidos dentro del fluido corporal generalmente puede mejorar su función y tiempo de respuesta para diversas aplicaciones clínicas.

Las pruebas de barrido de tiempo se realizaron a 1 rad/seg y a 1 Pa con placas de 20 mm y una distancia de separación de 500 µm. Durante la prueba de barrido de tiempo de la solución de PuraMatrix® al 2,5 %, se agregó DMEM en la cámara que rodea las placas de medición para remojar la solución de PuraMatrix® en el punto temporal 0. Los resultados se muestran en la Figura 9A para la solución de PuraMatrix® al 2,5 %.

IEIK (SEQ ID NO: 5) sin ajuste de pH mostró un aumento de módulo de almacenamiento inmediato, mientras que PuraMatrix® sin ajuste de pH (pH 2,2) no mostró un aumento de módulo de almacenamiento durante los 13 segundos iniciales. IEIK13 con ajuste de pH también mostró un aumento inmediato del módulo de almacenamiento debido a la rápida gelificación. Un tiempo de respuesta rápido de IEIK13 dentro del fluido corporal generalmente puede mejorar su función y tiempo de respuesta para diversas aplicaciones clínicas.

Las pruebas de barrido de tiempo se realizaron a 1 rad/seg y a 1 Pa con placas de 20 mm y una distancia de separación de 500 µm. Durante la prueba de barrido de tiempo de la solución de IEIK13 al 1,5 %, se agregó DMEM en la cámara que rodea las placas de medición para remojar la solución de IEIK13 al 1,5 % en el punto temporal 0 y se registraron continuamente los datos. Los resultados se muestran en la Figura 9B para la solución de IEIK13 al 1,5 %.

Ejemplo 7: Efecto del nivel de fuerza iónica salina en soluciones e hidrogeles peptídicos

El efecto del nivel de fuerza iónica salina en las propiedades de las soluciones peptídicas se evaluó para identificar niveles de fuerza iónica salinos optimizados para los péptidos como se describe en el presente documento. Aumentar el nivel de fuerza iónica salino de PuraMatrix® y otros péptidos generalmente puede mejorar su función y resistencia mecánica para diversas aplicaciones clínicas. Para ajustar la fuerza iónica salina de las soluciones peptídicas a modo de ejemplo, se añadieron varias soluciones tamponadas de sal que incluyen NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ y DPBS (10X) a 2 ml de soluciones peptídicas al 1,5 %.

Los resultados se muestran para PuraMatrix® en la Tabla 2a. De forma destacable, un aumento de la fuerza iónica salina hasta aproximadamente 0,85-1,15 M (dependiendo de las diferentes sales) no cambió notablemente el color claro de las soluciones de PuraMatrix®, mientras que su rigidez aparente aumentó. Los resultados se muestran para KLD12 en la Tabla 2b. De forma destacable, un aumento de la fuerza iónica salina hasta aproximadamente 0,25~0,35 M (dependiendo de las diferentes sales) no cambió notablemente el color claro de las soluciones de KLD12, mientras que su rigidez aparente aumentó. Los resultados se muestran para IEIK13 en la Tabla 2c. De forma destacable, un aumento de la fuerza iónica salina hasta aproximadamente 0,025~0,035 M (dependiendo de las diferentes sales) no cambió notablemente el color claro de las soluciones de IEIK13, mientras que su rigidez aparente aumentó.

Tabla 2a Aspecto de la solución de PuraMatrix® con varias sales a temperatura ambiente

Solución salina	Volumen de solución salina agregado en solución de PuraMatrix® al 1,5 % (µl/ml.)	Conc. de PuraMatrix® (%)	Conc. de sal (M)	Fuerza iónica (M)	Aspecto
NaCl (3 M como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro y espeso
	52,6	1,43	0,15	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,3	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	176,5	1,27	0,45	0,45	Gel claro, espeso, más rígido
	250	1,2	0,6	0,6	Gel claro, espeso, más rígido
	333,3	1,13	0,75	0,75	Gel claro, espeso, más rígido

ES 2 729 214 T3

(continuación)

Solución salina	Volumen de solución salina agregado en solución de PuraMatrix® al 1,5 % (pi./ml.)	Conc. de PuraMatrix® (%)	Conc. de sal (M)	Fuerza iónica (M)	Aspecto
	363,6	1,10	0,8	0,8	Gel claro, espeso, más rígido
	395,3	1,08	0,85	0,85	Gel claro, espeso, más rígido
	428,6	1,05	0,9	0,9	Gel ligeramente turbio y quebradizo
	463,4	1,03	0,95	0,95	Turbio, separado por fases
	500	1,0	1,0	1,0	Turbio, separado por fases
KCl (3 M-como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro y espeso
	52,6	1,43	0,15	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,3	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	176,5	1,27	0,45	0,45	Gel claro, espeso, más rígido
	250	1,2	0,6	0,6	Gel claro, espeso, más rígido
	333,3	1,13	0,75	0,75	Gel claro, espeso, más rígido
	428,6	1,05	0,9	0,9	Gel claro, espeso, más rígido
	463,4	1,03	0,95	0,95	Gel claro, espeso, más rígido
	500	1,0	1,0	1,0	Gel claro, espeso, más rígido
	538,5	0,98	1,05	1,05	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	578,9	0,95	1,1	1,1	Gel ligeramente turbio y quebradizo
	621,6	0,93	1,15	1,15	Turbio, separado por fases
MgCl ₂ (3 M-como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro y espeso
	16,9	1,48	0,05	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,1	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,15	0,45	Gel claro, espeso, más rígido
	71,4	1,4	0,2	0,6	Gel claro, espeso, más rígido
	90,9	1,38	0,25	0,75	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,3	0,9	Gel claro, espeso, más rígido
	132,1	1,32	0,35	1,05	Gel claro, espeso, más rígido
	146,5	1,31	0,383	1,15	Gel claro, espeso, más rígido
	153,8	1,3	0,4	1,2	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	161,3	1,29	0,417	1,25	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	168,8	1,28	0,433	1,3	Turbio, separado por fases
CaCl ₂ (3 M-como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	16,9	1,48	0,05	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,1	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,15	0,45	Gel claro, espeso, más rígido
	71,4	1,4	0,2	0,6	Gel claro, espeso, más rígido
	90,9	1,38	0,25	0,75	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,3	0,9	Gel claro, espeso, más rígido
	132,1	1,32	0,35	1,05	Gel claro, espeso, más rígido
	146,5	1,31	0,383	1,15	Gel claro, espeso, más rígido
	153,8	1,3	0,4	1,2	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	161,3	1,29	0,417	1,25	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	168,8	1,28	0,433	1,3	Turbio, separado por fases
DPBS pH 3,2) (10X-1,5 M-como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	111,1	1,35	0,15	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	250	1,2	0,3	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	428,6	1,05	0,45	0,45	Gel claro, espeso, más rígido
	666,7	0,9	0,6	0,6	Gel claro, espeso, más rígido
	1000	0,75	0,75	0,75	Gel claro, espeso, más rígido
	1500	0,6	0,9	0,9	Gel claro, espeso, más rígido
	1725	0,55	0,95	0,95	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	2000	0,5	1,0	1,0	Turbio, separado por fases

Tabla 2b Aspecto de la solución de KLD12 con varias sales a temperatura ambiente

Solución salina	Volumen de solución salina agregado en solución de KLD12 al 1,5 % (pi./ml.)	Conc. de PuraMatrix® (%)	Conc. de sal (M)	Fuerza iónica (M)	Aspecto
NaCl (3M- como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	16,9	1,48	0,05	0,5	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,1	0,1	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,15	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	71,4	1,4	0,2	0,2	Gel claro, espeso, más rígido
	90,9	1,38	0,25	0,25	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,3	0,3	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	132,1	1,32	0,35	0,35	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	153,8	1,3	0,4	0,4	Turbio, separado por fases
KCl (3M- como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	16,9	1,48	0,05	0,5	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,1	0,1	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,15	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	71,4	1,4	0,2	0,2	Gel claro, espeso, más rígido
	90,9	1,38	0,25	0,25	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,3	0,3	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	132,1	1,32	0,35	0,35	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	153,8	1,3	0,4	0,4	Turbio, separado por fases
MgCl ₂ (3M- como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	16,9	1,48	0,05	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	22,7	1,47	0,067	0,2	Gel claro, espeso, más rígido
	28,6	1,46	0,083	0,25	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,1	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	40,2	1,44	0,117	0,35	Gel claro, espeso, más rígido
	46,5	1,43	0,133	0,4	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	52,6	1,43	0,15	0,45	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	58,8	1,42	0,167	0,5	Turbio, separado por fases
CaCl ₂ (3M- como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	16,9	1,48	0,05	0,15	Gel claro, espeso, más rígido
	22,7	1,47	0,067	0,2	Gel claro, espeso, más rígido
	28,6	1,46	0,083	0,25	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,1	0,3	Gel claro, espeso, más rígido
	40,2	1,44	0,117	0,35	Gel claro, espeso, más rígido
	46,5	1,43	0,133	0,4	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	52,6	1,43	0,15	0,45	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	58,8	1,42	0,167	0,5	Turbio, separado por fases

Tabla 2c Aspecto de la solución de IEIK13 con varias sales a temperatura ambiente

Solución salina	Volumen de solución salina agregado en solución de IEIK13 al 1,5 % (pE/ml)	Conc. de PuraMatrix® (%)	Conc. de sal (M)	Fuerza iónica (M)	Aspecto
NaCl (0,2 M- como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	25,6	1,46	0,005	0,005	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,01	0,01	Gel claro, espeso, más rígido
	81,1	1,39	0,015	0,015	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,02	0,02	Gel claro, espeso, más rígido
	142,9	1,31	0,025	0,025	Gel claro, espeso, más rígido
	176,5	1,27	0,03	0,03	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	212,1	1,24	0,035	0,035	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	250	1,2	0,04	0,04	Turbio, separado por fases
KCl (0,2 M- como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	25,6	1,46	0,005	0,005	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,01	0,01	Gel claro, espeso, más rígido

(continuación)

Solución salina	Volumen de solución salina agregado en solución de IEIK13 al 1,5 % (pE/ml)	Conc. de PuraMatrix® (%)	Conc. de sal (M)	Fuerza iónica (M)	Aspecto
	81,1	1,39	0,015	0,015	Gel claro, espeso, más rígido
	111,1	1,35	0,02	0,02	Gel claro, espeso, más rígido
	142,9	1,31	0,025	0,025	Gel claro, espeso, más rígido
	176,5	1,27	0,03	0,03	Gel claro, espeso, más rígido
	212,1	1,24	0,035	0,035	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	250	1,2	0,04	0,04	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	290,3	1,16	0,045	0,045	Turbio, separado por fases
MgCl ₂ (0,2 M-como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso,
	25,6	1,46	0,005	0,015	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,0067	0,02	Gel claro, espeso, más rígido
	43,5	1,44	0,0083	0,025	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,01	0,03	Gel claro, espeso, más rígido
	61,9	1,41	0,0117	0,035	Gel claro, espeso, más rígido
	71,4	1,40	0,0133	0,04	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	81,1	1,39	0,015	0,045	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	91,1	1,37	0,0167	0,05	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	100,9	1,36	0,0183	0,055	Turbio, separado por fases
CaCl ₂ (0,2 M-como solución madre)	0	1,5	0	0	Gel claro, espeso
	25,6	1,46	0,005	0,015	Gel claro, espeso, más rígido
	34,5	1,45	0,0067	0,02	Gel claro, espeso, más rígido
	43,5	1,44	0,0083	0,025	Gel claro, espeso, más rígido
	52,6	1,43	0,01	0,03	Gel claro, espeso, más rígido
	61,9	1,41	0,0117	0,035	Gel claro, espeso, más rígido
	71,4	1,40	0,0133	0,04	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	81,1	1,39	0,015	0,045	Gel ligeramente turbio, espeso y más rígido
	91,1	1,37	0,0167	0,05	Gel ligeramente turbio, quebradizo
	100,9	1,36	0,0183	0,055	Turbio, separado por fases

Los resultados de las Tablas 1a-1c muestran que las fuerzas iónicas salinas críticas en las que tres péptidos se vuelven turbios se muestran a continuación: PuraMatrix® (0,9~1,2 M) > KLD13 (0,3~0,4 M) > IEIK13 (0,03~0,04 M).

5

Ejemplo 8: Efecto del nivel de fuerza iónica salina en las propiedades reológicas de soluciones peptídicas

Sobre la base de la observación visual del efecto de la fuerza iónica salina en las propiedades de las soluciones peptídicas, se evaluó el efecto sobre las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas después de ajustar su nivel de fuerza iónica con NaCl a 0,7 M (PuraMatrix®), 0,2 M (KLD12) o 0,02 M (IEIK13), que está muy por debajo de la fuerza iónica crítica en la que cada péptido se vuelve turbio. Si los niveles de fuerza iónica con NaCl de soluciones peptídicas son superiores a 0,9 M (PuraMatrix®), 0,3 M (KLD12) o 0,03 M (IEIK13), la solución peptídica comienza a separarse de la fase y se vuelve turbia y débil. La propiedad reológica de las soluciones de PuraMatrix®, KLD12 e IEIK13 fue mayor después de ajustar su nivel de fuerza iónica con NaCl a 0,7 M (PuraMatrix®), 0,2 M (KLD12) o 0,02 M (IEIK13). Los resultados se muestran en la Figura 10 para KLD12 al 1 %, Figura 11 para IEIK13 al 1 % y Figura 12 para PuraMatrix® al 1 %, respectivamente. Las pruebas de barrido de frecuencia se realizaron desde 1 rad/s hasta 10 rad/s a 1 Pa.

10

15

Ejemplo 9: Efecto adicional del nivel de fuerza iónica salina en las propiedades reológicas de soluciones peptídicas

20

Sobre la base de los resultados del efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas después de ajustar su nivel de fuerza iónica con NaCl a 0,7 M (PuraMatrix®), 0,2 M (KLD12) o 0,02 M (IEIK13), se evaluó el efecto en las propiedades reológicas de la solución peptídica a varias fuerzas iónicas salinas. La propiedad reológica de las soluciones PuraMatrix® al 1 % aumenta con el ajuste de la fuerza iónica hasta 0,7 M, mientras que disminuye por encima de 0,7 M. La propiedad reológica de las soluciones IEIK13 al 1 % aumenta con el ajuste de la fuerza iónica hasta 0,03 M, mientras que disminuye por encima de 0,03 M. Los resultados coinciden bien con la inspección visual de las soluciones peptídicas a varias fuerzas iónicas salinas. Los resultados se muestran en la Figura 13 para la solución de PuraMatrix® al 1 % y en la Figura 14 para la solución de IEIK13 al 1 %. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 1 rad/seg a 10 rad/seg a 1 Pa y se seleccionó el módulo de almacenamiento a 1 rad/seg para los datos.

25

30

Ejemplo 10: Efecto en las propiedades reológicas de soluciones peptídicas después del tratamiento con DMEM

Sobre la base de los resultados del efecto en las propiedades reológicas de las soluciones peptídicas después de ajustar sus niveles de fuerza iónica, se evaluó el efecto en las propiedades reológicas de los hidrogeles peptídicos después del tratamiento con DMEM durante 10 minutos. La propiedad reológica de los hidrogeles PuraMatrix® después del tratamiento con DMEM aumentó con el ajuste de la fuerza iónica hasta 0,7 M, mientras que disminuye por encima de 0,7 M. La propiedad reológica de los hidrogeles IEIK13 después del tratamiento con DMEM no cambió significativamente con el ajuste de la fuerza iónica hasta 0,025 M, mientras que disminuye por encima de 0,03 M. Por encima de 0,9 M de la fuerza iónica de NaCl en la cual la solución de PuraMatrix® se vuelve turbia, las propiedades reológicas de PuraMatrix® no cambiaron con el tratamiento con DMEM, lo que demuestra que no hay gelificación. Los resultados se muestran en la Figura 15 para hidrogeles PuraMatrix® al 1 % y en la Figura 16 para hidrogeles IEIK13 al 1 %, ambos después del tratamiento con DMEM durante 10 min. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 1 rad/seg a 10 rad/seg a 1 Pa y se seleccionó el módulo de almacenamiento a 1 rad/seg para los datos.

Ejemplo 11: Efecto de diversas sales

Sobre la base de los resultados del efecto en las propiedades reológicas de las soluciones e hidrogeles peptídicos después de ajustar sus niveles de fuerza iónica con NaCl, también se evaluó el efecto de diversas sales (KCl, MgCl₂ y CaCl₂). La propiedad reológica de las soluciones PuraMatrix® aumenta con el ajuste de la fuerza iónica a 0,15 M de todas las sales. Los aumentos de la propiedad reológica de las soluciones PuraMatrix® con diversas sales no fueron predominantemente diferentes. Sin embargo, los aumentos de la propiedad reológica de las soluciones PuraMatrix® pueden variar dependiendo de la constante de desestabilización salina, K de cada sal. La constante K es una constante en la ecuación de Cohen: $\log S = B - KI$, donde S es la solubilidad, B es la solubilidad idealizada, K es la constante de desestabilización salina e I es la fuerza iónica. Con un valor más alto de la constante K y la fuerza iónica de sales, la solubilidad del péptido puede disminuir, lo que da como resultado un autoensamblaje del péptido fuerte con un mayor efecto hidrófobo y mayores propiedades reológicas de la solución peptídica. La constante K de NaCl puede ser más alta que las de otras sales. Por lo tanto, la propiedad reológica de las soluciones PuraMatrix® con NaCl fue ligeramente superior a las de KCl y CaCl₂. La propiedad reológica de los hidrogeles PuraMatrix® después del tratamiento con DMEM durante 10 minutos también se evaluó con el ajuste de la fuerza iónica con diversas sales y los resultados fueron comparables a los aumentos de la propiedad reológica de las soluciones de PuraMatrix® con diversas sales ((NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂) a 0,15 M de fuerza iónica). Los resultados se muestran en la Figura 17 para solución de PuraMatrix® al 1 % antes del tratamiento con DMEM, y en la Figura 18 para hidrogeles PuraMatrix® al 1 % después del tratamiento con DMEM durante 10 min. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 1 rad/seg a 10 rad/seg a 1 Pa y se seleccionó el módulo de almacenamiento a 1 rad/seg para los datos. * indica que los datos son significativamente más altos que los datos de control de PuraMatrix® ($P < 0,05$). # indica que los datos son significativamente más bajos que los datos de PuraMatrix® al 1 % con NaCl 0,15M (fuerza iónica) ($P < 0,05$).

Ejemplo 12: Efecto de diversas sales en la cinética de gelificación

El efecto del nivel de fuerza iónica salina que rodea a la solución peptídica en las propiedades de las soluciones peptídicas se evaluó para identificar la posibilidad de gelificación del péptido cuando la solución peptídica se coloca en el entorno donde el nivel de fuerza iónica salina es alto. Por ejemplo, los hidrogeles se pueden colocar en el fluido corporal isotónico, que es comparable al tampón salino (0,15 M de NaCl). Como se demostró anteriormente, los péptidos de autoensamblaje que incluyen, pero sin limitación, PuraMatrix®, KLD12 e IEIK13 forman hidrogeles cuando se tratan a pH neutro. Sin efecto del pH, se evaluó el efecto del tratamiento con solución salina sobre la gelificación de las soluciones peptídicas. Cuando las soluciones peptídicas se trataron con tampón salino, su pH no cambió. Después del tratamiento con solución salina, solo IEIK13 mostró una gelificación rápida, mientras que PuraMatrix® y KLD13 mostraron una gelificación nula o insignificante. Esto se debe a que IEIK13 es mucho más sensible a los niveles de fuerza iónica salina. La rápida gelificación de IEIK13 en el nivel de fuerza iónica salina similar al nivel de sal isotónica del fluido corporal generalmente puede mejorar su función y velocidad de gelificación para diversas aplicaciones clínicas. Los resultados se muestran en la Figura 19 para soluciones IEIK13, KLD12 y PuraMatrix®. Las pruebas de barrido de tiempo se realizaron a 1 rad/seg y a 1 Pa con placas de 20 mm y una distancia de separación de 500 μ m. Durante la prueba de barrido de tiempo de la solución de IEIK13 al 1,5 %, KLD12 al 1,5 % y PuraMatrix® al 2,5 %, se agregó DMEM en la cámara que rodea las placas de medición para remojar la solución de PuraMatrix® en el punto temporal 0.

Ejemplo 13: Efecto de la fuerza iónica salina y el ajuste del pH en las propiedades reológicas

De acuerdo con una o más realizaciones, IEIK13, KLD12 y PuraMatrix® pueden disolverse en un tampón salino como NaCl y a un nivel de pH elevado ajustado con un tampón salino alcalino como el NaOH para mantener su fuerza iónica salina en sus puntos críticos de sal así como su nivel de pH a aproximadamente 2,5~4,0, para que puedan tener propiedades más rígidas. Con respecto a PuraMatrix®, KLD13 e IEIK13, las soluciones peptídicas todavía son claras con NaCl al 0,9 % (fuerza iónica: 0,15 M) a pH 3,4 ajustado con NaOH. La propiedad reológica de PuraMatrix® con NaCl al 0,9 % (fuerza iónica: 0,15 M) a pH 3,4 fue más rígida que las del control PuraMatrix y PuraMatrix con solo NaCl al 0,9 %. El efecto de la fuerza iónica salina y el ajuste del pH en las propiedades reológicas de la solución de PuraMatrix® al 2,5 % se muestran en la Figura 20. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 1 rad/seg a 10

rad/seg a 1 Pa y se seleccionó el módulo de almacenamiento a 1 rad/seg para los datos.

Ejemplo 14: Influencia de los cationes

5 En una comparación reológica de RADA16 al 2,5 % y RADA16 al 2,5 % + NaCl, KCl y CaCl₂, se prepararon soluciones de RADA16 al 0,5 % mezclado con 0,005, 0,05, 0,125, 0,25, 0,5 y 1 M de NaCl, KCl y CaCl₂. El anión, el cloruro (Cl⁻), se mantuvo igual para observar el efecto de los cationes, sodio (Na⁺), potasio (K⁺) y calcio (Ca²⁺). La Figura 21 proporciona una comprensión básica de cómo la variación de los cationes de una solución salina afecta las propiedades viscoelásticas y la rigidez de los péptidos de autoensamblaje. El Ca proporcionó la mejor mejora de la rigidez en comparación con Na o K en las mismas concentraciones molares. Esto debería ser porque el Ca tiene una fuerza iónica cuatro veces mayor que el Na y K en las mismas concentraciones molares. Por lo tanto, la influencia de las sales en la solución peptídica está más relacionada con su fuerza iónica que con su concentración molar, como se muestra en las Figuras 17-18 y tabla 2a-c. En algunas realizaciones, existe una correlación entre las propiedades de las soluciones peptídicas con sales basadas en la concentración de las sales.

Ejemplo 15: Resistencia mecánica

20 Se evaluaron las medidas reológicas de rigidez de RADA16 al 2,5 % y RADA16 al 2,5 % + CaCl₂ 0,25 M. La Figura 22 compara la rigidez de una solución altamente concentrada de RADA16 con otra solución altamente concentrada de RADA16 con una adición de CaCl₂ 0,125 M y proporciona una comprensión básica de las propiedades viscoelásticas del péptido y la mezcla de péptidos. Hubo un aumento notable en la rigidez entre las dos soluciones cuando se agregó una solución de catión. Se demostró que el Ca proporciona una mejora mecánica de RADA16 incluso a altas concentraciones utilizando el intervalo de concentración óptimo.

Ejemplo 16: Reversibilidad

25 Se evaluaron las medidas reológicas de reversibilidad de una solución de RADA16 al 0,5 % con + CaCl₂ 0,125, 0,25 y 0,5 M. Se prepararon soluciones de RADA16 al 0,5 % mezclado con CaCl₂ 0,125, 0,25 y 0,5 M. La estructura de la solución peptídica de autoensamblaje se rompió a fondo mediante la aplicación de estrés mecánico mediante vórtice y sonicación. Las mezclas se colocaron a temperatura ambiente durante 48 horas para permitir que tuviera lugar el autoensamblaje. Las Figuras 23A-23B proporcionan las propiedades viscoelásticas básicas de las mezclas de péptidos y muestran que la reversibilidad de la solución peptídica con sales se puede controlar y mantener incluso después de la perturbación de la estructura, específicamente señalada por la diferencia significativa entre las muestras control y perturbadas de RADA16 al 2,5 % + CaCl₂ 0,5 M. Las mezclas dentro del intervalo óptimo de concentración de sal permanecieron reversibles. El * indica la muestra control y la muestra perturbada, que sigue, como significativamente diferente. La Figura 23a presenta datos reológicos sin procesar de la solución peptídica control con sales y las soluciones peptídicas perturbadas con sales, mientras que la Figura 23b proporciona una comparación de la rigidez de las soluciones peptídicas control y las soluciones peptídicas perturbadas.

Ejemplo 17: Cinéticas de gelificación

40 Se evaluaron las medidas reológicas de la cinética de gelificación de RADA16 al 0,5 % + NaCl, KCl y CaCl₂. Se preparó una solución de RADA16 al 0,5 % y se observaron cinéticas de gelificación mediante tratamiento con varios cationes (por ejemplo, Na, Cl, K) y aniones (por ejemplo, Cl, CO₃, PO₄, SO₄). Se determinó cuánto tiempo tomarán las mezclas peptídicas para gelificar y cómo controlar ese tiempo de gelificación mediante la variación del tipo y la concentración de catión/anión. El cloro mostró la gelificación más rápida y el sulfato mostró la gelificación más lenta. Los experimentos cualitativos *in vivo* e *in vitro* y las observaciones resultantes apoyaron estas conclusiones.

Ejemplo 18: Cationes variables

50 Se diseñaron un hidrogel peptídico mezclado con una solución de catión/anión que afectó las propiedades mecánicas y otro con una concentración muy baja de un agente de contraste que no afectó las propiedades mecánicas. Los dos geles fueron: (1) una combinación del péptido de autoensamblaje con una solución de catión/anión bien conocida, solución de Ringer (pH 5,3), utilizada en el campo médico y (2) una combinación del péptido de autoensamblaje con un agente de contraste bien conocido, índigo carmín, que es una solución de tinte que contiene iones sulfato (anión) e iones sodio (catión). El índigo carmín contiene indigoindisulfonato de sodio (C₁₆H₈N₂Na₂O₈S₂), agua y citrato de sodio (C₆H₈O₇) para ajustar el pH. Utilizando polvo de índigo carmín, se preparó una solución al 1 % para utilizar en la experimentación. Esto corresponde a 10 mg/1 ml de agua. La concentración de solución de índigo carmín utilizada en la experimentación fue del 0,00585 % en agua.

60 Se utilizó polvo de carmín índigo para preparar una solución al 1 % en agua desionizada (DI). Utilizando polvo IEIK13, se preparó una solución al 2 por ciento utilizando agua DI. La cantidad de IEIK se pesó y la cantidad apropiada de agua DI se agregó suavemente por el costado del recipiente. La mezcla se realizó mediante vórtice durante aproximadamente 30 segundos, y luego se sonicó durante 30 segundos. La solución luego se centrifugó durante aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos a 3000 ppm. La solución puede sufrir más agitación y centrifugación hasta que la solución sea clara y sin burbujas.

Para obtener una concentración final de índigo carmín al 0,00585 %, se añade la cantidad necesaria de IC al 1 % a la cantidad apropiada de agua DI para diluir IEIK al 2 % a IEIK al 1,5 %. Luego, la solución se agita en vórtex durante aproximadamente 30 segundos y se centrifuga durante aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos a 3000 rpm. La solución puede sufrir más agitación y centrifugación hasta que la solución sea clara y sin burbujas.

La solución se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente antes de su uso. La tapa puede dejarse fuera del recipiente durante la preparación para permitir una eliminación más eficaz de las burbujas. Las comparaciones reológicas de estas mezclas y la visualización de los geles se pueden observar en la Figura 24a-24c. Se obtuvo un gel más rígido con una cinética de gelificación más rápida que mantiene la reversibilidad. También se obtuvo otra cinética que mantiene la rigidez, la reversibilidad y la cinética de la gelificación, pero que permite la muerte de los tejidos para la histología. La concentración del agente de contraste o la mezcla de cationes/aniones y el hidrogel peptídico que se mezclaron se basó en un entendimiento del uso de cationes y aniones como se describe en el presente documento. Los datos relacionados con estos hidrogeles peptídicos adaptados a RADA 16 + solución de Ringer e IEIK13 + Índigo carmín muestran que estos hidrogeles de autoensamblaje controlados pueden adaptarse para satisfacer las necesidades de un gel inyectable isotónico y un gel mejorado no mecánico para la visualización. La Figura 24A presenta datos reológicos sin procesar de IEIK (SEQ ID NO: 5) e IEIK (SEQ ID NO: 5) mezclado con índigo carmín. La Figura 24B muestra una comparación de la rigidez de IEIK (SEQ ID NO: 5) e IEIK (SEQ ID NO: 5) mezclado con índigo carmín. La Figura 24C presenta una comparación de la rigidez de RADA16 y RADA16 mezclado con la solución de Ringer.

Ejemplo 19: Prevención de fugas pulmonares

Se utilizaron sistemas de hidrogeles peptídicos de autoensamblaje e inyectables como selladores de aire para defectos pleurales. Se logró una presión de rotura (es decir, la presión a la que el aire penetra en la superficie del sellador) de 35 cm de H₂O o más.

Materiales y métodos

Configuración experimental

Los pulmones de cerdo se obtuvieron de cerdos recién eutanasiados. Se insertó un tubo endotraqueal a través de la tráquea y el bronquio primario en el pulmón de interés. Se suministró presión a los pulmones con el uso de una bomba de intubación endotraqueal manual. La tráquea se ató para evitar la fuga de aire alrededor del tubo. El bronquio primario del otro pulmón se sujetó para dirigir todo el flujo de aire al pulmón de interés. Se utilizó un manómetro para medir la presión del aire dirigido hacia los pulmones para inducir la expansión.

Preparación de hidrogeles peptídicos de autoensamblaje

Los hidrogeles peptídicos de autoensamblaje estaban compuestos de Ac-RADARADARADARADA-NH₂ (es decir, RADA16) (SEQ ID NO: 1), Ac-KLDLKLKLDL-NH₂ (es decir, KLD12) (SEQ ID NO: 3) o Ac-IEIKIEIKIEIKI-NH₂ (es decir, IEIK13) (SEQ ID NO: 2) con RADA16 o KLD12 solo o mezclado con cloruro de calcio 0,250 M. Si están solos, los péptidos se reconstituyeron en agua desionizada. Si, sin embargo, los péptidos se reconstituyeron con una solución de cloruro de calcio 0,250 M, los péptidos se reconstituyeron primero en agua desionizada y, posteriormente, se mezcló una solución de cloruro de calcio 0,500 M en una proporción de 1: 1.

Creación de defectos pleurales

Los defectos pleurales se crearon utilizando tres métodos diferentes para medir la eficacia de los hidrogeles peptídicos de autoensamblaje: (1) Se usó una aguja de calibre 16 para perforar el pulmón y la pleura, (2) se midió un área de 5 x 5 mm y el pulmón y la pleura se cortaron con un par de tijeras quirúrgicas y (3) una lobectomía (es decir, una resección completa de un lóbulo del pulmón de interés). Se aplicó una solución salina al 0,9 % sobre el área del defecto y se identificó la ubicación del defecto mediante el uso del sistema de bomba de intubación endotraqueal para introducir aire y observar la liberación de burbujas de aire.

Aplicación de hidrogeles peptídicos de autoensamblaje

Una vez que se identificó la ubicación del defecto, los hidrogeles se aplicaron al área del defecto a través de dos métodos diferentes: (1) el hidrogel se aplicó por vía tópica mediante la inyección a través de una jeringa en el área del defecto, y (2) el hidrogel se inyectó en el defecto a través de una aguja de calibre 18 con rebosadero para cubrir el área del defecto por vía tópica. Después de un período de relajación de 2 min, se aplicó presión a través de la bomba de intubación endotraqueal hasta que se identificó una presión de rotura. Para cualquier prueba adicional, se cortó el flujo de aire al defecto previamente probado utilizando una pinza quirúrgica. La Figura 25 muestra el flujo de procedimiento para identificar el defecto pleural, insertar la aguja, inyectar el hidrogel e identificar la presión de rotura: A) Identificación del defecto pleural, B) Inserción de la aguja en el defecto pleural, C) Inyección de hidrogel (IEIK13 al 1,5 %), D) Identificación de burbujas de aire que indican que se ha alcanzado la presión de rotura.

Resultados

5 Se usó RADA16 al 2,5 % para determinar el efecto en la presión de rotura de defectos pleurales con tamaños de aguja variables. Los defectos pleurales se crearon con agujas de calibre 14, 16, 18 y 22. Se aplicó RADA16 al 2,5 % tópicamente y se identificaron las presiones de rotura para cada defecto utilizando los métodos descritos anteriormente. La Figura 26 muestra que la variación de los calibres de aguja no altera la presión de rotura de un defecto pleural cuando se utiliza RADA 16 al 2,5 %. Los defectos pleurales causados por la variación de los calibres de aguja mostraron cambios insignificantes en las presiones de rotura.

10 Se utilizó RADA16 al 2,5 % para determinar si aumentar o no el tiempo de exposición de RADA16 al sitio del defecto pleural aumentaría la presión de rotura. Se creó un defecto pleural de 16 G y se aplicó RADA16 al 2,5 %. La presión de rotura se probó en diferentes puntos de tiempo. La Figura 27 muestra que aumentar la exposición de RADA16 al sitio del defecto incrementó la presión de rotura. Sin embargo, mientras que la presión de rotura generalmente aumenta con el tiempo de exposición, un cirujano pulmonar solo puede estar dispuesto a esperar un período de tiempo predeterminado durante la reparación de un defecto pleural antes de la aplicación de un sellador, por ejemplo, aproximadamente 2 minutos. La estrella indica el tiempo de espera máximo posible asignado en una cirugía realista.

20 Se usó una solución de aplicación tópica de NaCl 0,154 M (NaCl al 0,9 %) para determinar si la adición tópica de una solución de sal alteraría o no la presión de rotura de RADA16 al 2,5 %. Se creó un defecto pleural de 16 G y se aplicó RADA16 al 2,5 % por vía tópica como se describe anteriormente. Una solución de NaCl 0,154 M se aplicó tópicamente a RADA16 y la combinación se frotó suavemente para inducir una mezcla menor. La Figura 28 muestra que cuando una solución de NaCl a base de sal se añade tópicamente y se masajea suavemente en RADA16 al 2,5 %, la presión de rotura aumenta ligeramente. La aplicación tópica de una solución salina en RADA16 al 2,5 % aumentó la presión de rotura.

25 Debido al éxito de la solución de NaCl agregada por vía tópica, masajeadora suavemente en RADA16 al 2,5 %, lo que aumenta la presión de rotura de RADA16 al 2,5 %, otras soluciones a base de sal se mezclaron completamente con RADA16 y se midieron sus propiedades mecánicas. Se teorizó que los geles con mayores propiedades mecánicas exhibirían presiones de rotura aumentadas. Los resultados se pueden ver en la Figura 29 con respecto al módulo de almacenamiento (es decir, resistencia mecánica) de PuraMatrix al 0,5 % (RADA16) mezclado con NaCl, KCl o CaCl₂ a concentraciones variables. La mezcla de cloruro de calcio con RADA16 exhibió mayores propiedades mecánicas que la mezcla de cloruro de sodio o cloruro de potasio.

30 Los tres hidrogeles - RADA16, KLD12 e IEIK13 - se utilizaron en concentraciones variables, con RADA16 y KLD12 utilizados solos y en combinación con cloruro de calcio 0,250 M. Los hidrogeles se aplicaron a los defectos pleurales como se indicó anteriormente. La Figura 31 muestra varias combinaciones con CaCl₂ utilizado para determinar la eficacia de estos hidrogeles en la prevención de fugas de aire. Figura 30A muestra que RADA16 al 2,5 % con CaCl₂ 0,250 M, IEIK13 al 2,5 % y IEIK13 al 1,5 % superan todas las presiones de rotura de 35 cm de H₂O utilizando el método de inyección para sellar un defecto pleural con 16 G. Las Figuras 31B y 31C muestran que ninguna de las soluciones de hidrogel alcanzó una presión de rotura de 35 cm de H₂O cuando se usó como sellante para un defecto pleural de 5 x 5 mm o una lobectomía, respectivamente. RADA16 al 2,5 % + CaCl₂ 0,25 M y IEIK13 al 1,5 % exhibieron las mejores presiones de ruptura para defectos pleurales con 16 G. Las estrellas indican geles óptimos para un defecto pleural con 16 G.

45 Conclusión

50 El uso de sistemas de hidrogel peptídicos de autoensamblaje e inyectables como selladores de aire es viable para aplicaciones específicas de defectos pleurales. Como se determinó a partir de los experimentos señalados en el presente documento, los hidrogeles de RADA16 al 2,5 % con CaCl₂ 0,25 M, IEIK13 al 2,5 % y IEIK13 al 1,5 % se pueden utilizar para evitar fugas de aire con pinchazos de aguja, líneas de grapas y líneas de sutura cuando superan una presión de rotura de 35 cm de H₂O.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> 3-D MATRIX, LTD.

<120> PREVENCIÓN DE FUGA PULMONAR

<130> T2071-7006WO

60

<140>

<141>

<150> 61/953.221

65

<151> 14/03/2014

ES 2 729 214 T3

<150> 61/950.529
<151> 10/03/2014

<160> 6

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

15

<223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 1

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

20

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> Fuente

<223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 2

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

35

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

40

<223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 3

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu

1

5

10

45

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> Fuente

<223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

55

<400> 4

ES 2 729 214 T3

Arg Ala Asp Ala
1

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

10 <220>
<221> Fuente
<223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 5

Ile Glu Ile Lys
1

15

20 <210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> Fuente
<223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 6

Lys Leu Asp Leu
1

REIVINDICACIONES

1. Una solución que comprende un péptido de autoensamblaje que comprende entre aproximadamente 7 aminoácidos y 32 aminoácidos, en donde al menos una parte del péptido es anfifílica, de manera que el péptido puede exhibir una estructura de lámina beta en solución acuosa en presencia de condiciones fisiológicas en un sitio quirúrgico pulmonar, siendo la solución para su uso en una cantidad eficaz y en una concentración eficaz para administrar a un área diana para formar una barrera de hidrogel en condiciones fisiológicas del área diana para prevenir una fuga pulmonar anastomótica bronquial;
- 5 en donde la solución se introduce a través de un dispositivo de administración después de la etapa de introducir un dispositivo de administración en un área diana de la anastomosis bronquial del sujeto y colocar un extremo del dispositivo de administración en el área diana en la cual se desea la prevención de la fuga pulmonar anastomótica bronquial;
- 10 y en donde el dispositivo de administración se retira del área diana.
- 15 2. La solución de la reivindicación 1, en donde se aplica uno o más de los siguientes,
- a) la administración de la solución comprende inyectar la solución en el área diana, con un desbordamiento para cubrir el área diana tópicamente;
- b) la administración de la solución comprende administrar la solución en una dosis única; y
- 20 c) que comprende además administrar la solución después de un procedimiento quirúrgico, en donde opcionalmente el procedimiento quirúrgico puede crear una fuga pulmonar anastomótica bronquial postoperatoria.
3. La solución de la reivindicación 1, en donde la barrera de hidrogel proporciona una tolerancia a la presión de rotura de al menos 35 cm de H₂O y/o la barrera de hidrogel se forma en menos de aproximadamente tres minutos.
- 25 4. La solución de la reivindicación 1, que comprende además preparar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje y/o ajustar el pH de la solución.
5. La solución de la reivindicación 1, en donde la solución está sustancialmente libre de células y/o la solución está sustancialmente libre de fármacos.
- 30 6. La solución de la reivindicación 1, en donde al menos una de la cantidad eficaz y la concentración eficaz se basa en parte en una dimensión del área diana de la fuga pulmonar, en donde opcionalmente la cantidad eficaz es de aproximadamente 1 ml por 1 cm² de área diana o la cantidad eficaz para evitar la fuga pulmonar anastomótica bronquial comprende un volumen en un intervalo de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml.
- 35 7. La solución de la reivindicación 1, en donde la preparación de la solución que comprende el péptido de autoensamblaje comprende una adición del péptido de autoensamblaje a un tampón y la adición de un tampón a la solución, en donde opcionalmente el tampón comprende al menos dos sales, y en donde opcionalmente el tampón está a un pH de 7,2 o 7,4, y/o el tampón es un tampón alcalino, y/o en donde la solución está tamponada con aproximadamente 0,15 M de al menos uno de cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y cloruro de calcio.
- 40 8. La solución de la reivindicación 7, en donde el tampón comprende uno de entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 1,2 M de una sal, y el péptido de autoensamblaje es (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), entre aproximadamente 0,02 M y aproximadamente 0,04 M de una sal, y el péptido de autoensamblaje es (IEIK)₃I (SEQ ID NO: 2), y entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 0,4 M de una sal y el péptido de autoensamblaje es (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3).
- 50 9. La solución de la reivindicación 1, en donde el péptido de autoensamblaje se selecciona del grupo que consiste en (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1), (IEIK)₃I (SEQ ID NO: 2) y (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3).
10. La solución de la reivindicación 9, en donde la concentración eficaz para permitir el tratamiento de la fuga pulmonar comprende una concentración de péptido de autoensamblaje en un intervalo de aproximadamente 0,1 por ciento en peso por volumen (p/v) a aproximadamente 3 por ciento p/v.
- 55 11. La solución de la reivindicación 8, que comprende además preparar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje mediante la adición del péptido de autoensamblaje a una solución salina; o preparar la solución que comprende el péptido de autoensamblaje mediante:
- 60 la adición de agua a un polvo peptídico del péptido de autoensamblaje para proporcionar una solución peptídica acuosa;
- la adición de una solución salina a la solución peptídica acuosa; y
- 65 la mezcla de una solución salina y la solución peptídica acuosa;
- en donde opcionalmente la solución salina comprende al menos un catión seleccionado del grupo que consiste en

amonio, hierro, magnesio, potasio, pirimidio, amonio cuaternario, sodio, potasio y calcio, y/o al menos un anión seleccionado del grupo que consiste en cloruro, sulfato, acetato, carbonato, cloruro, citrato, cianuro, fluoruro, sulfato, nitrato, nitrito y fosfato.

- 5 12. La solución de la reivindicación 9, en donde la solución que comprende el péptido de autoensamblaje tiene una concentración de sal de entre aproximadamente 0,005 M y aproximadamente 1 M y/o la solución comprende cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y bicarbonato de sodio.
- 10 13. La solución de la reivindicación 1, que comprende además una solución que comprende un agente de contraste, en donde opcionalmente el agente de contraste comprende iones de sulfato e iones de sodio, y/o la solución comprende además al menos un agente biológicamente activo.
- 15 14. La solución de la reivindicación 11, en donde la solución tiene un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0, en donde opcionalmente la solución tiene un pH de aproximadamente 3,5, y el péptido de autoensamblaje es uno de (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) y (KLDL)₃ (SEQ ID NO: 3), o la solución tiene un pH de aproximadamente 3,7, y el péptido de autoensamblaje es (IEIK)₃I (SEQ ID NO: 2).
- 20 15. La solución de la reivindicación 7, en donde la solución que comprende el péptido de autoensamblaje comprende (RADA)₄ (SEQ ID NO: 1) a una concentración de aproximadamente 2,5 por ciento en peso por volumen (p/v), en donde opcionalmente la solución que comprende el péptido de autoensamblaje comprende una concentración de cloruro de calcio de aproximadamente 0,125 M, en donde más opcionalmente la solución que comprende el péptido de autoensamblaje tiene un módulo de almacenamiento de aproximadamente 600 Pa.

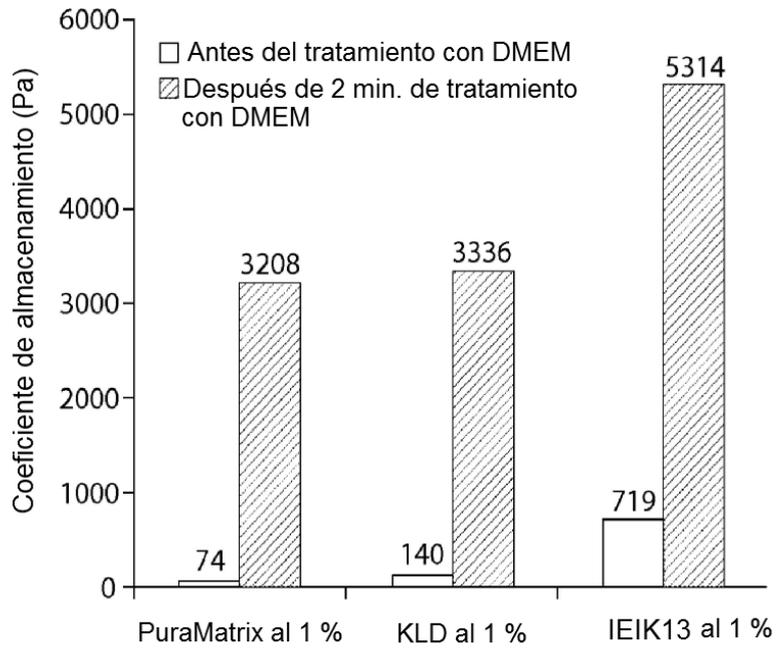


Fig. 1A

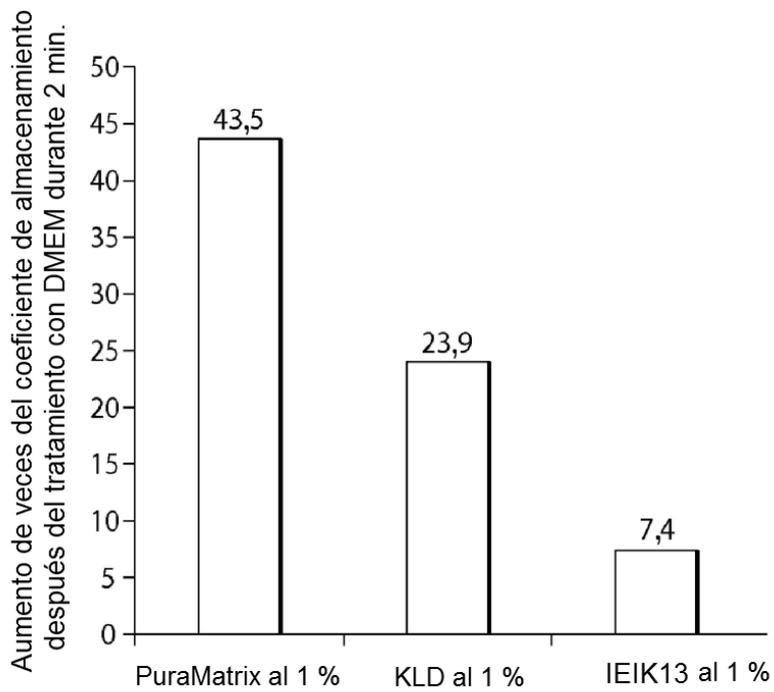


Fig. 1B

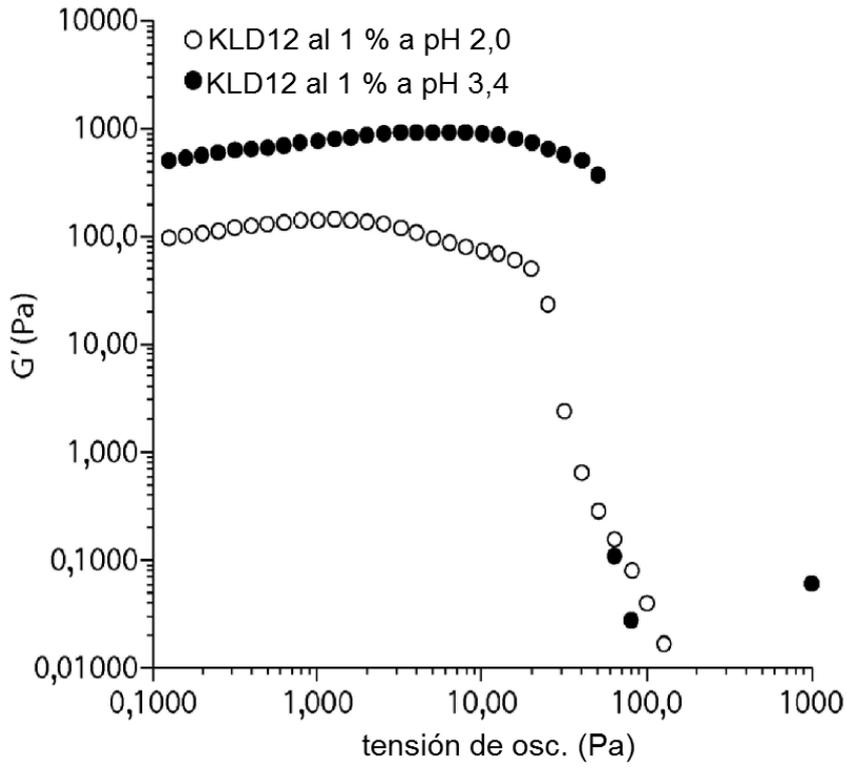


Fig. 2

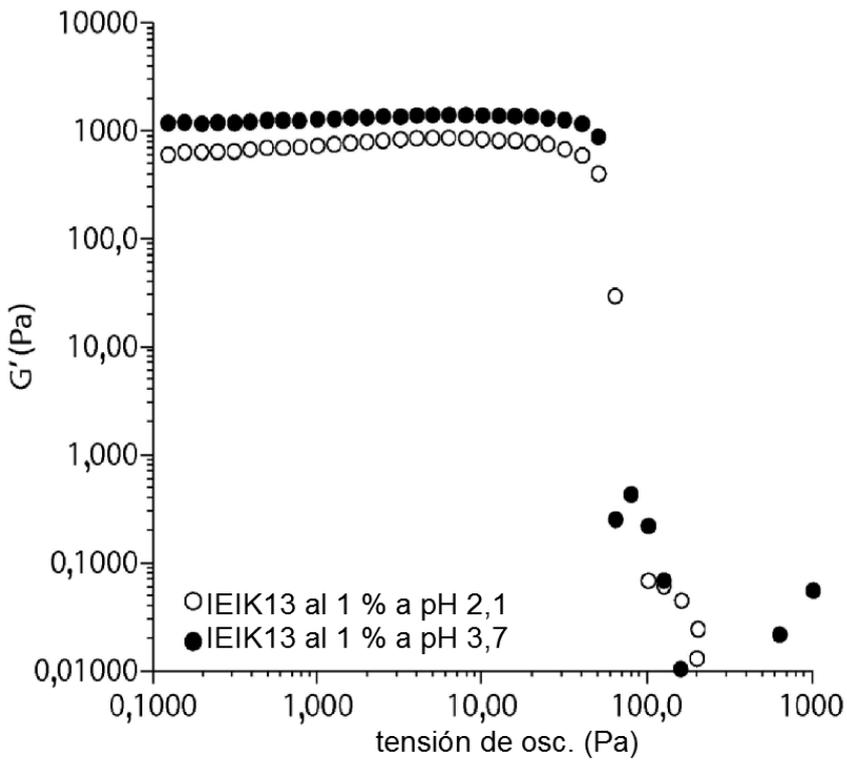


Fig. 3

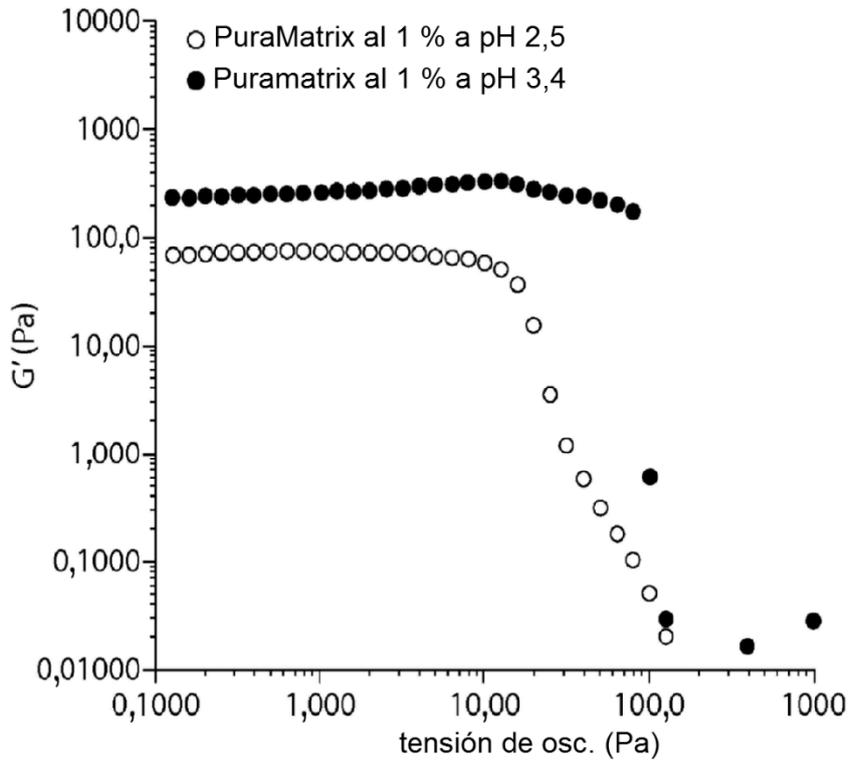


Fig. 4

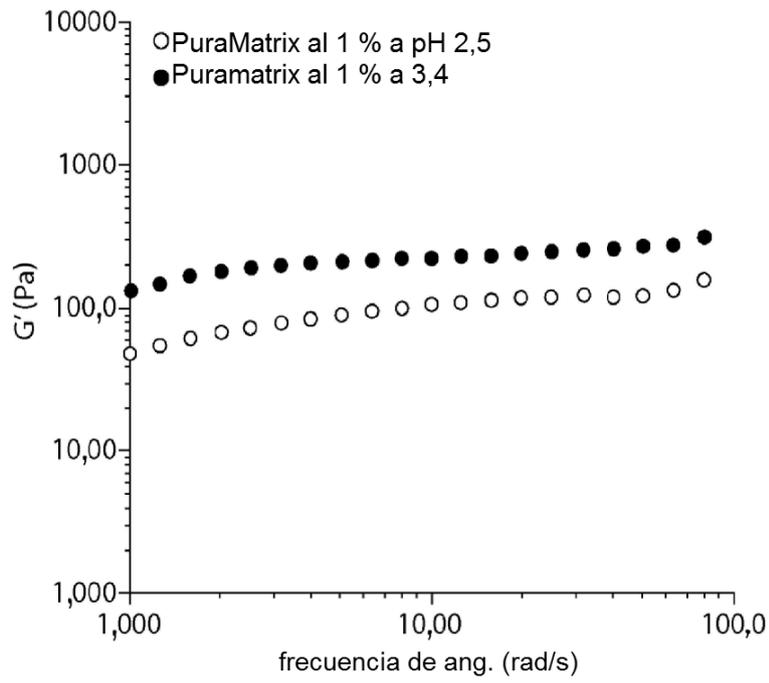


Fig. 5A

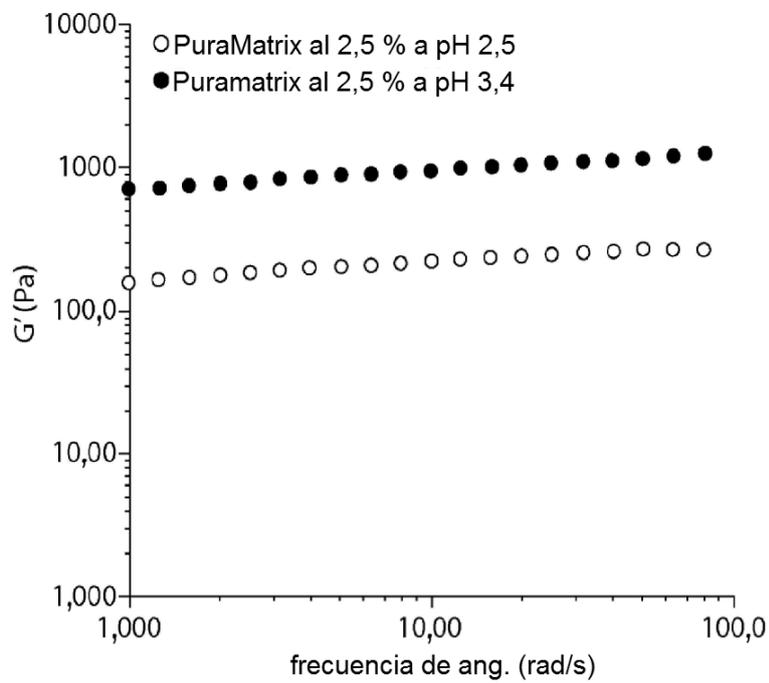


Fig. 5B

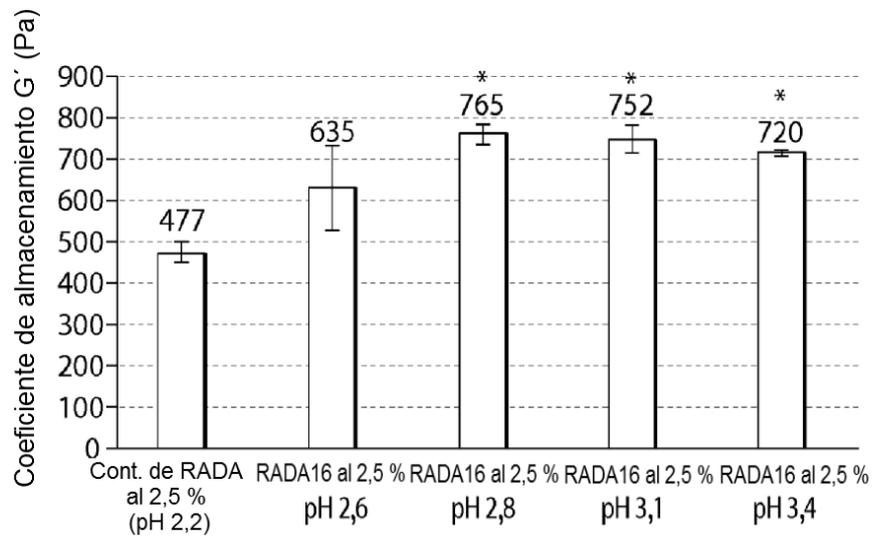


Fig. 6A

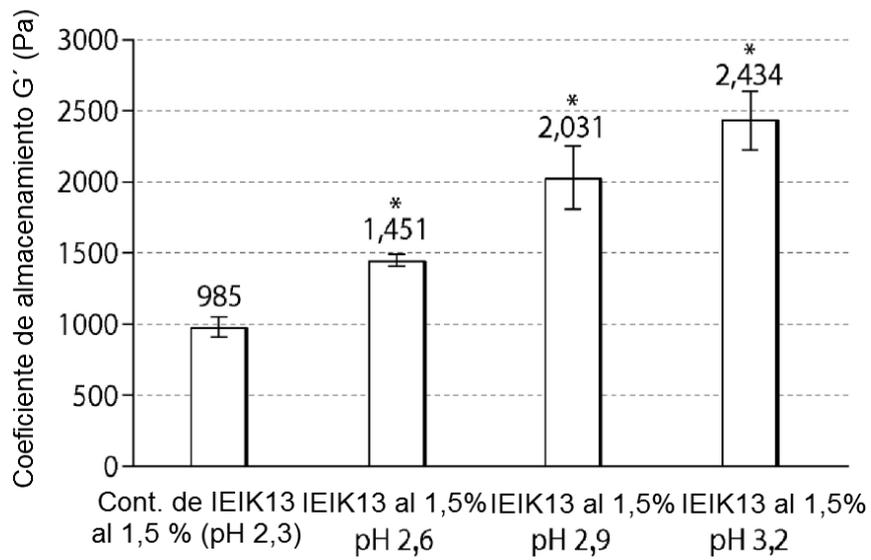


Fig. 6B

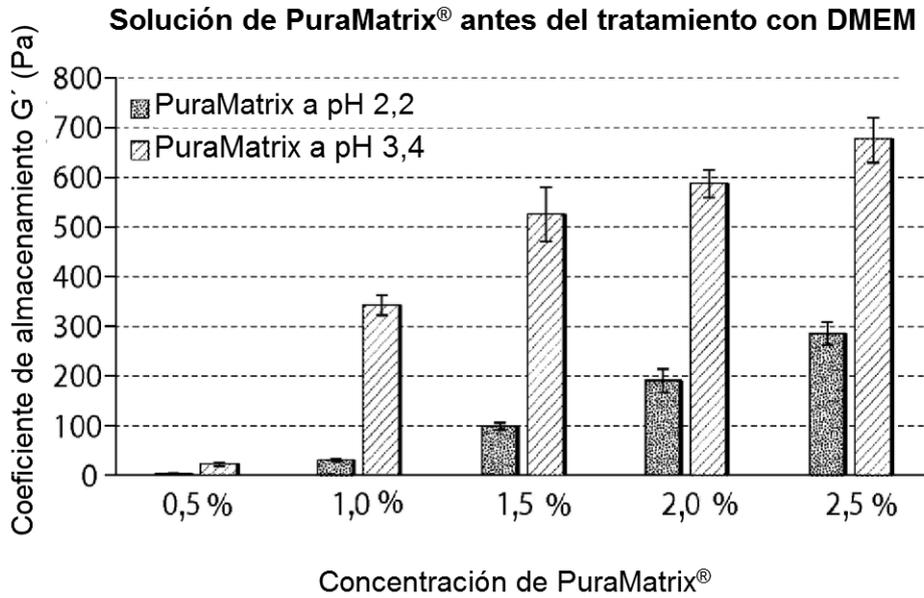


Fig. 7A

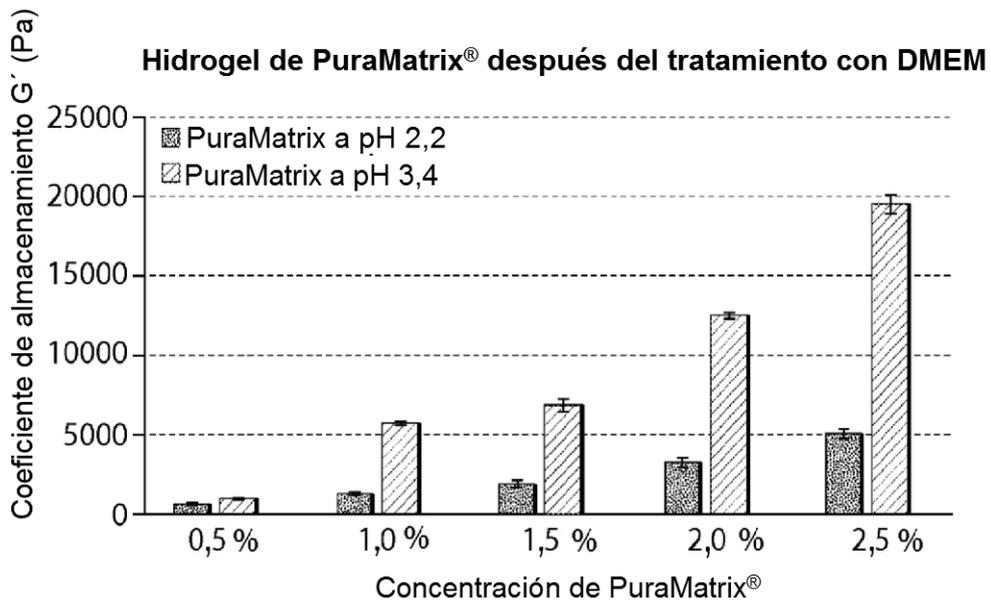


Fig. 7B

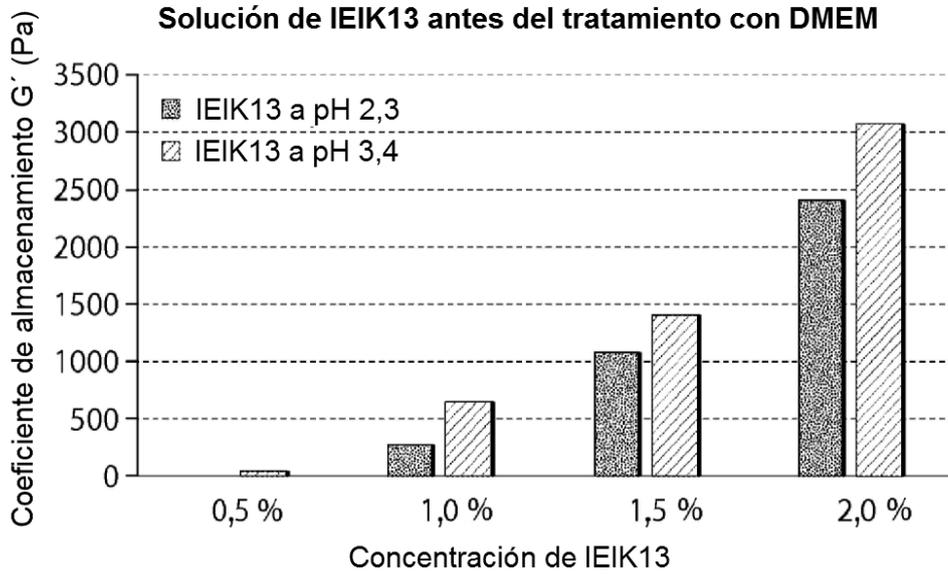


Fig. 8A

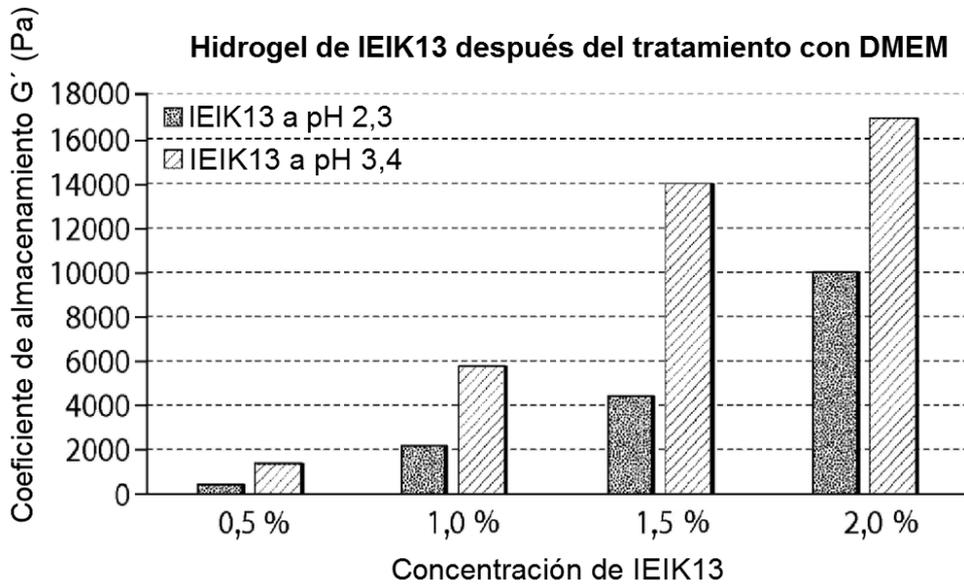


Fig. 8B

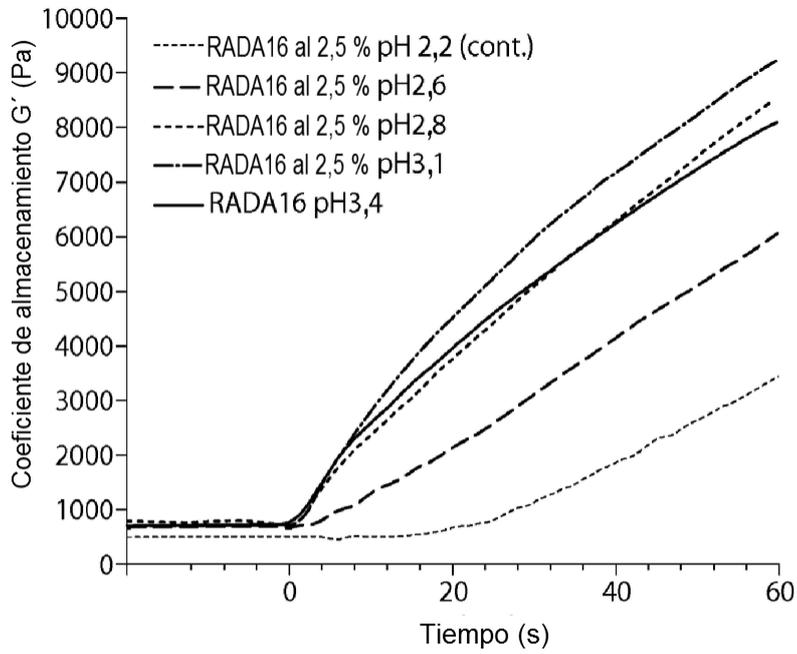


Fig. 9A

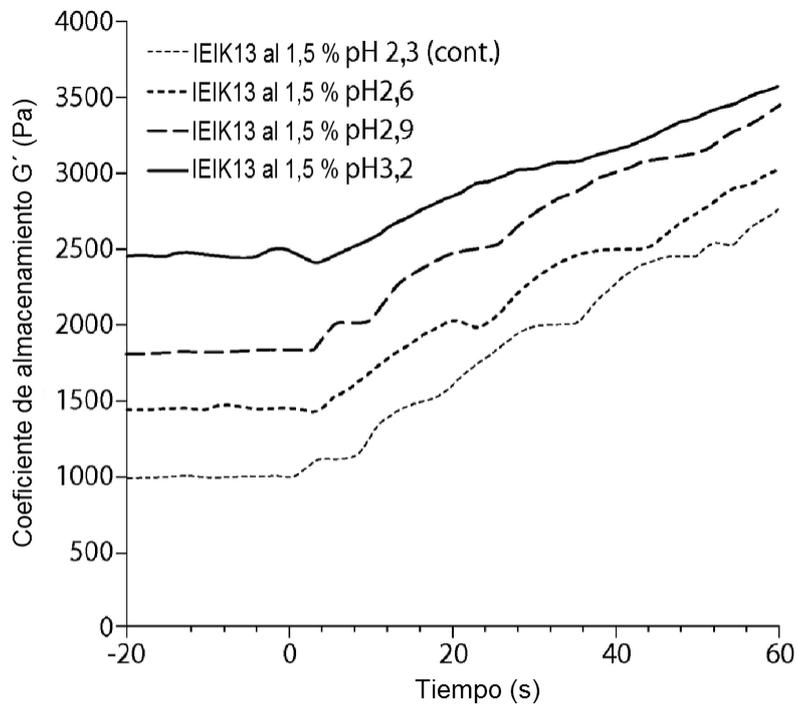


Fig. 9B

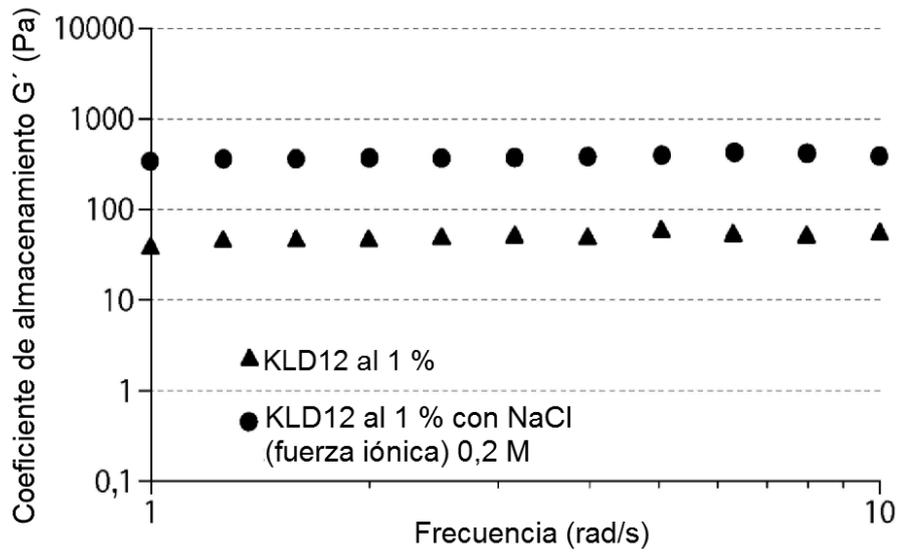


Fig. 10

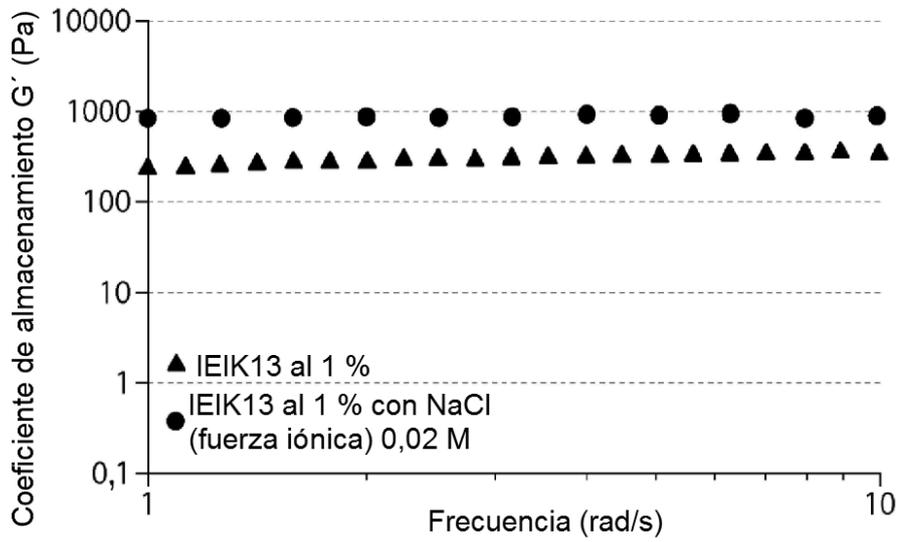


Fig. 11

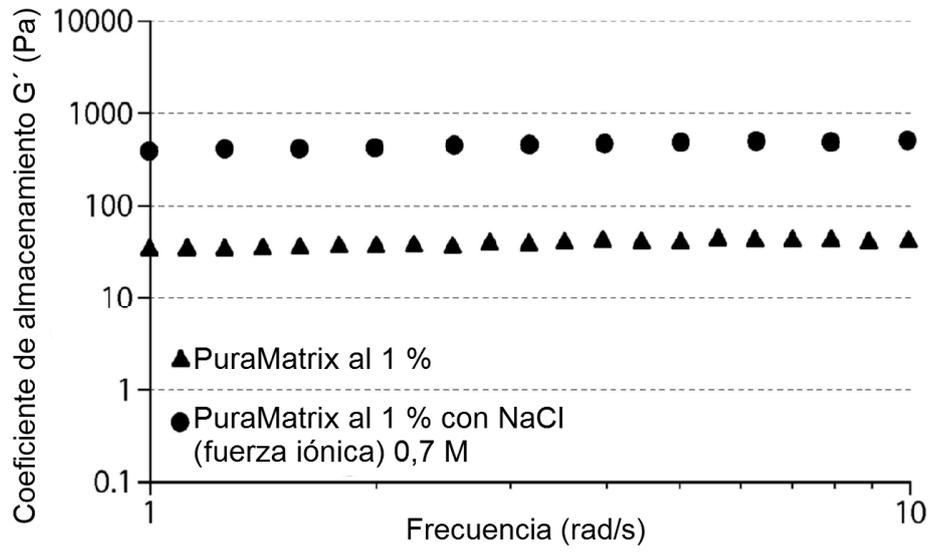


Fig. 12

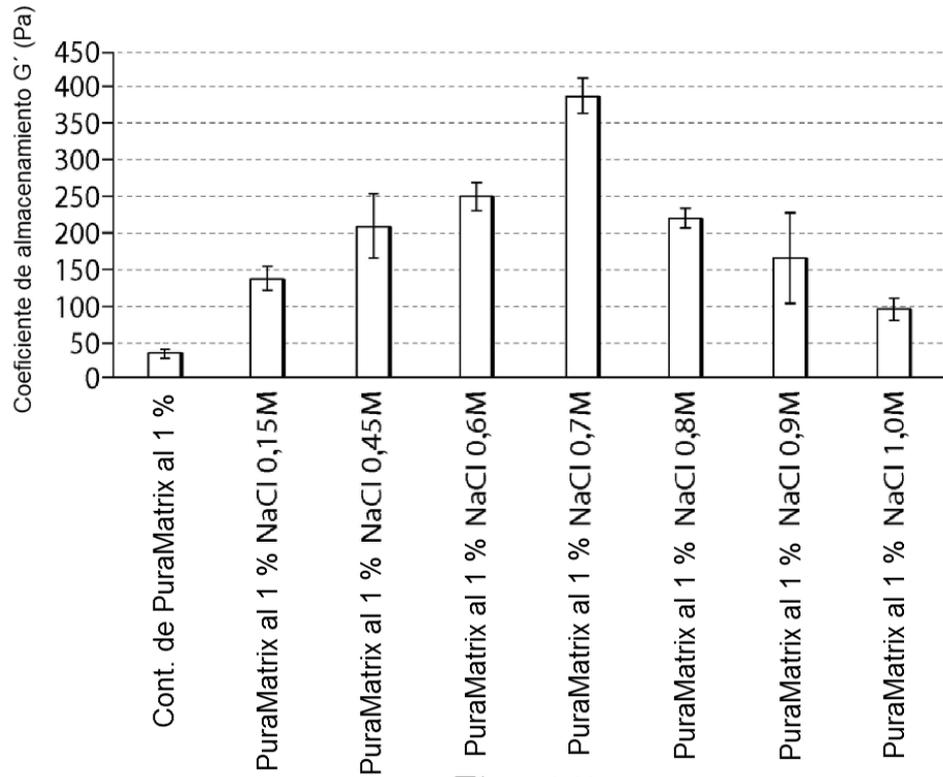


Fig. 13

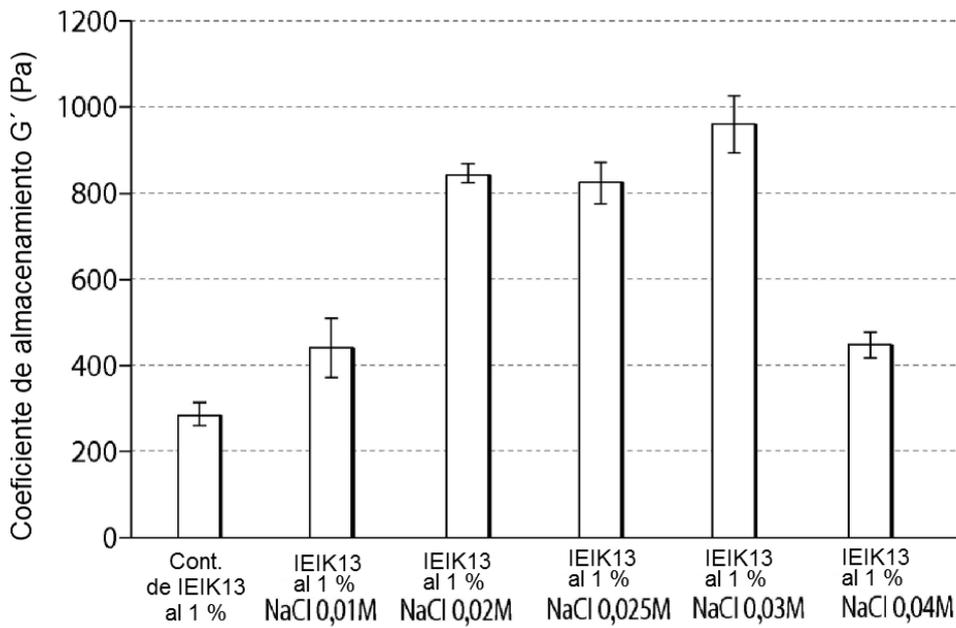


Fig. 14

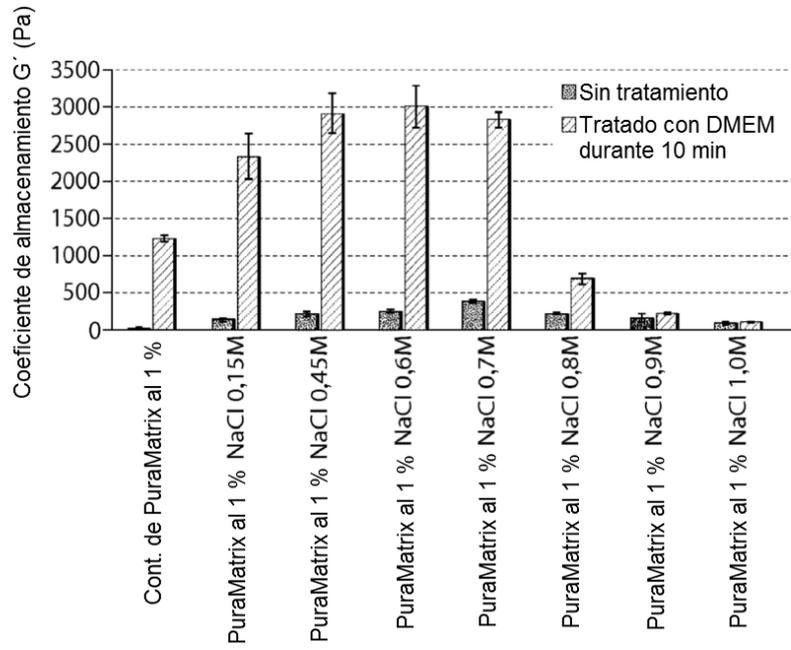


Fig. 15

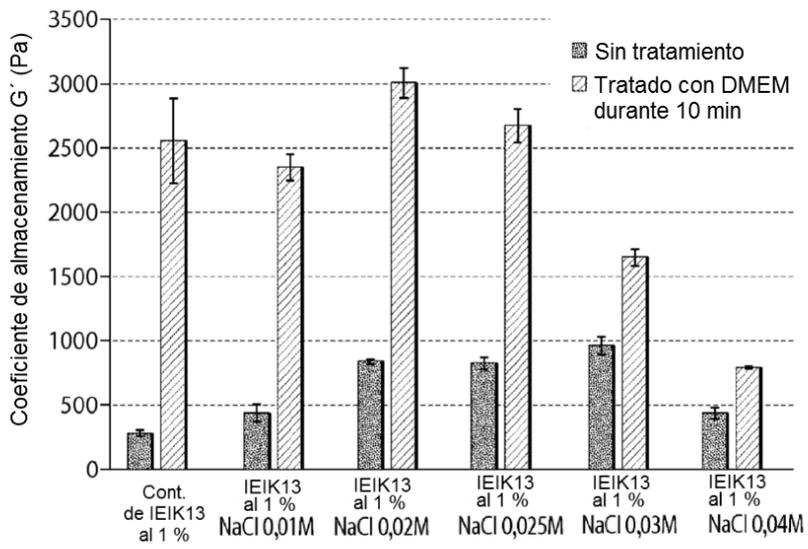


Fig. 16

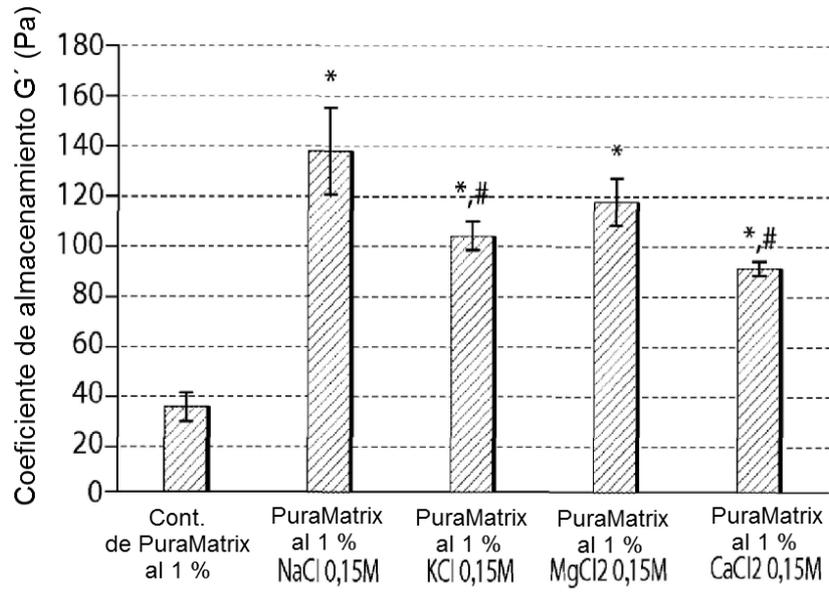


Fig. 17

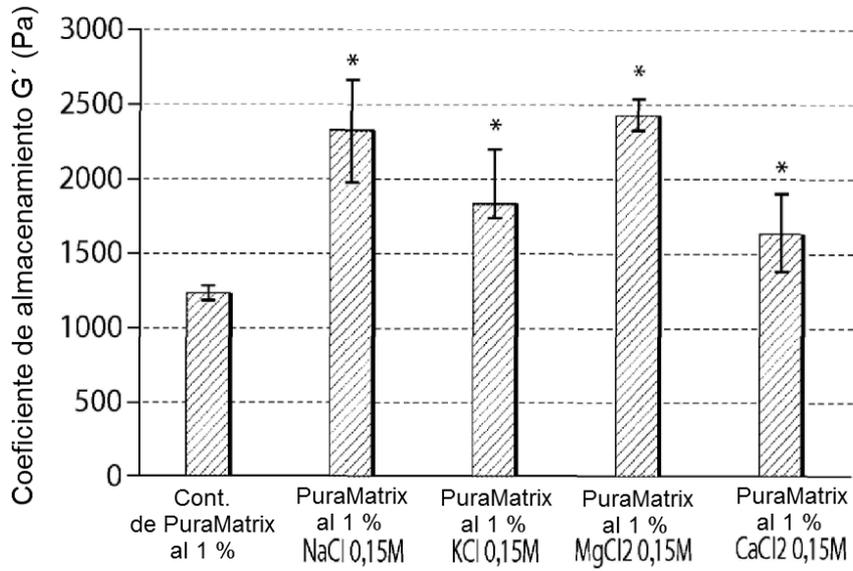


Fig. 18

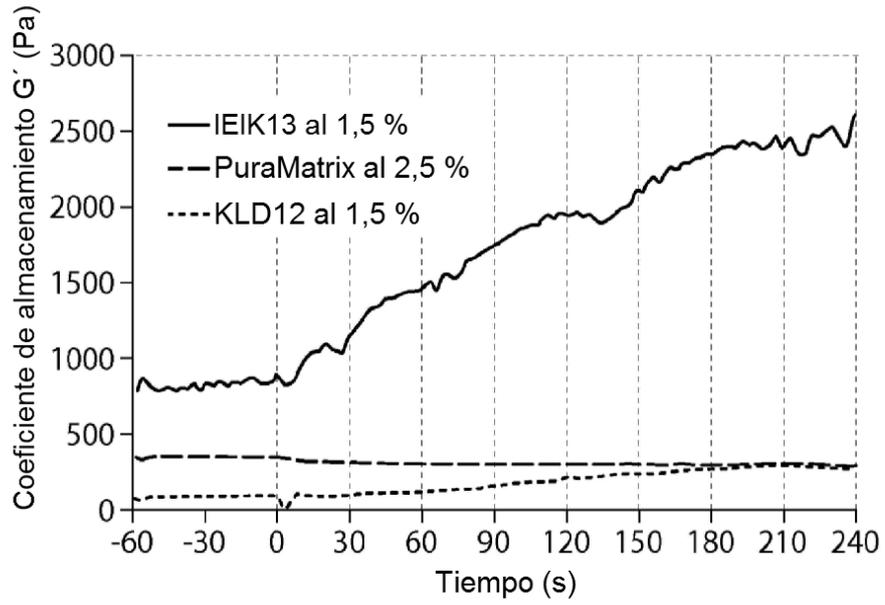


Fig. 19

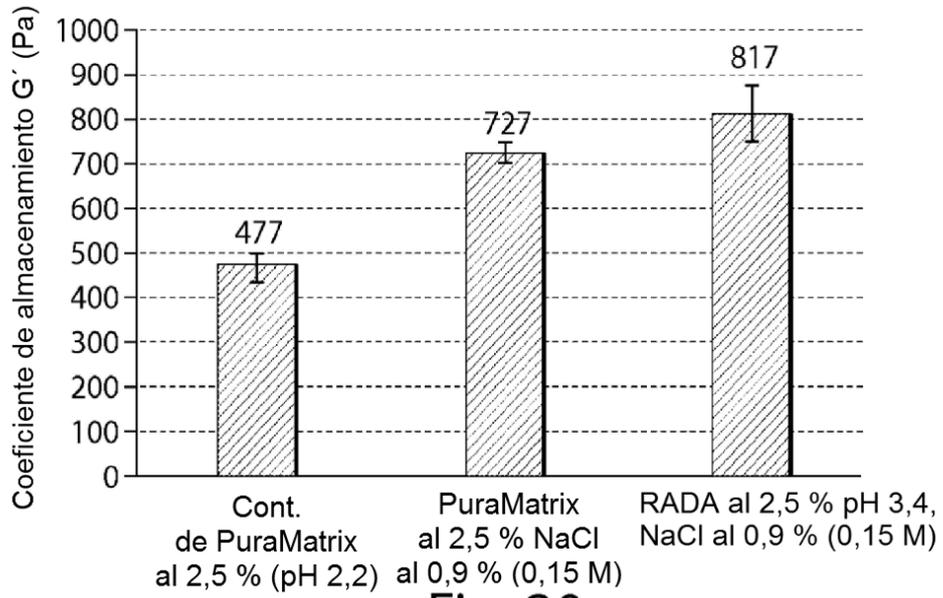


Fig. 20

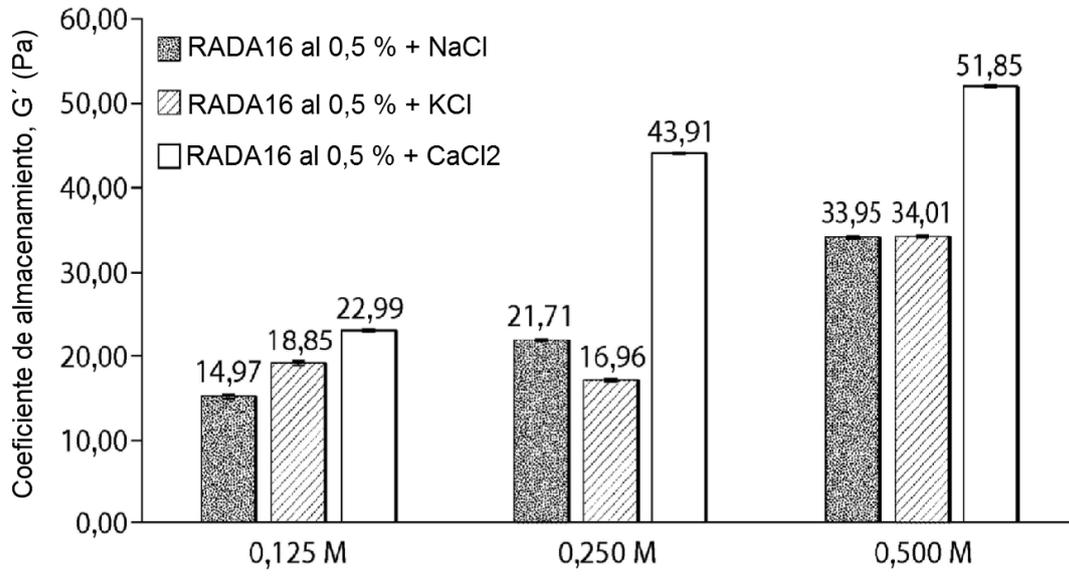


Fig. 21

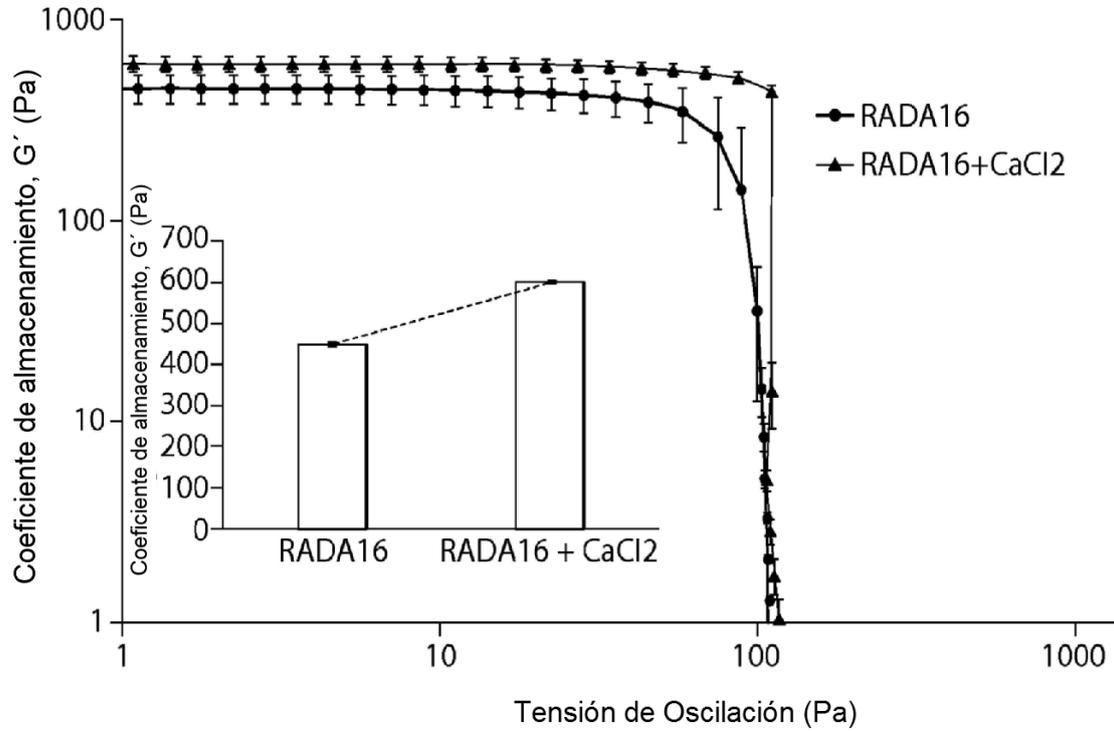


Fig. 22

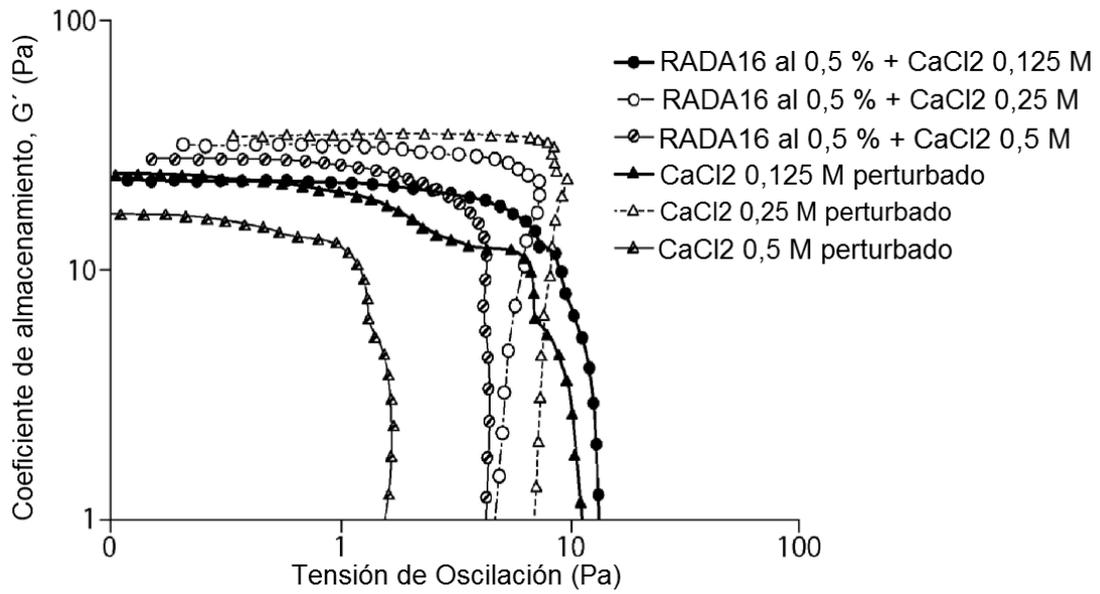


Fig. 23A

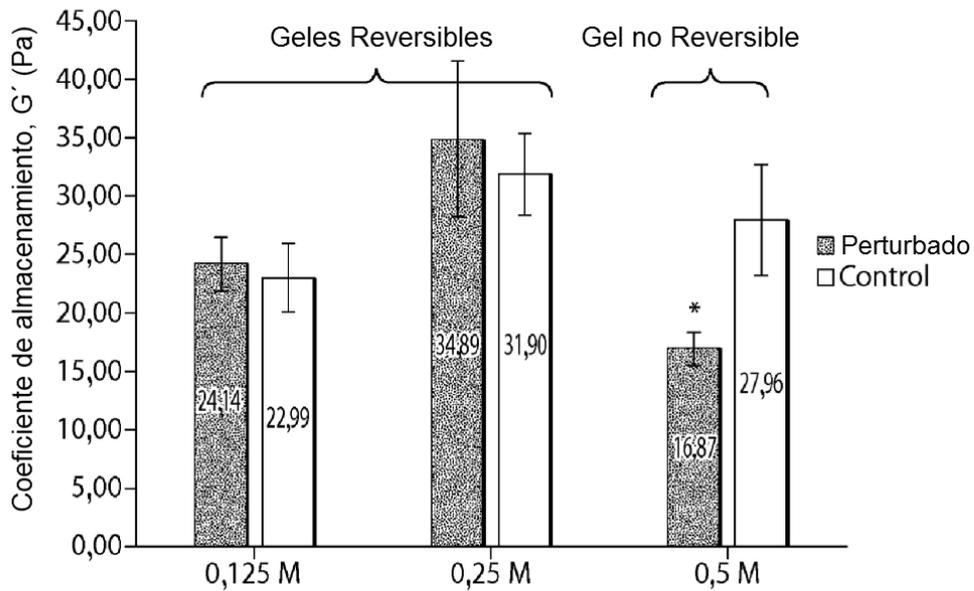


Fig. 23B

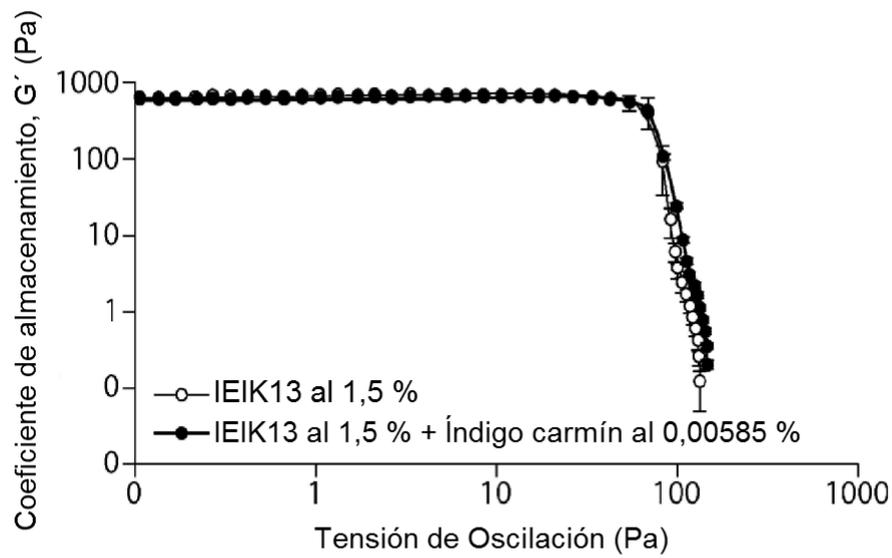


Fig. 24A

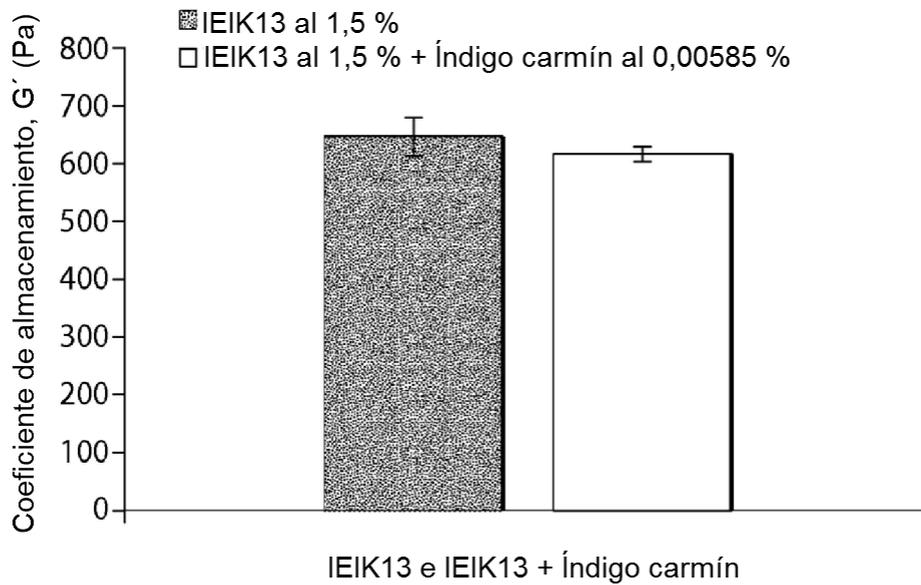


Fig. 24B

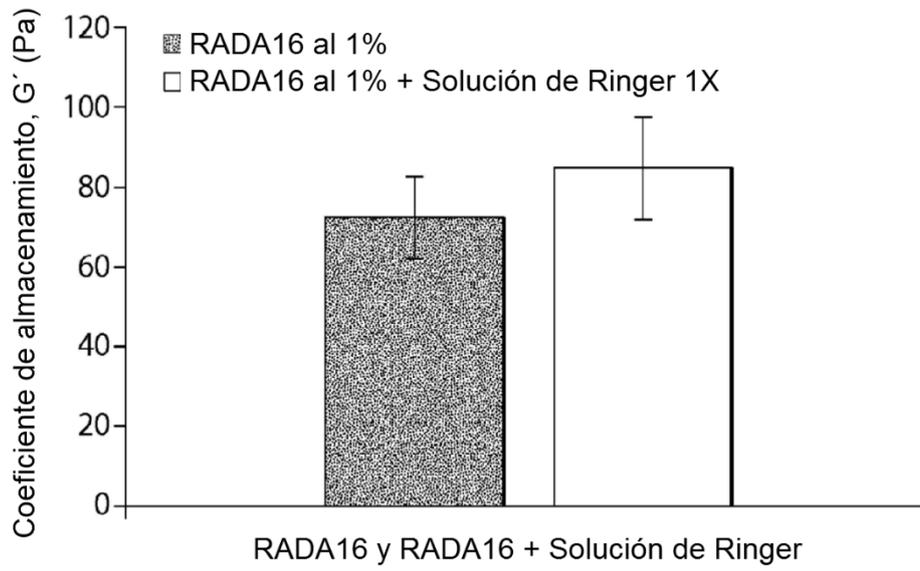


Fig. 24C

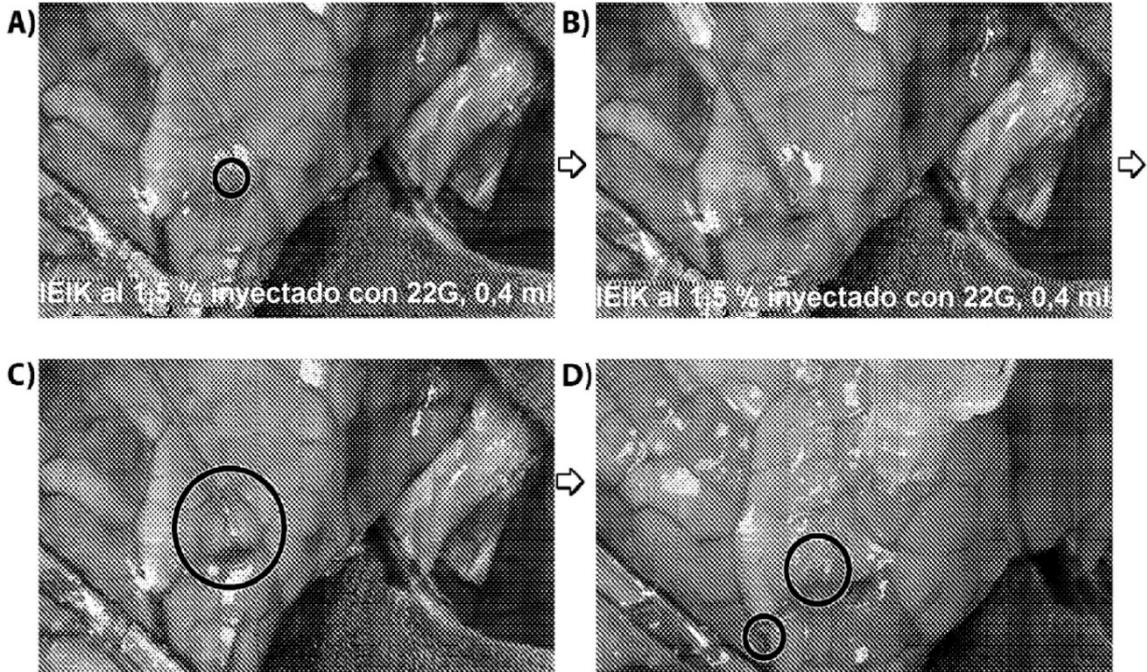


Fig. 25

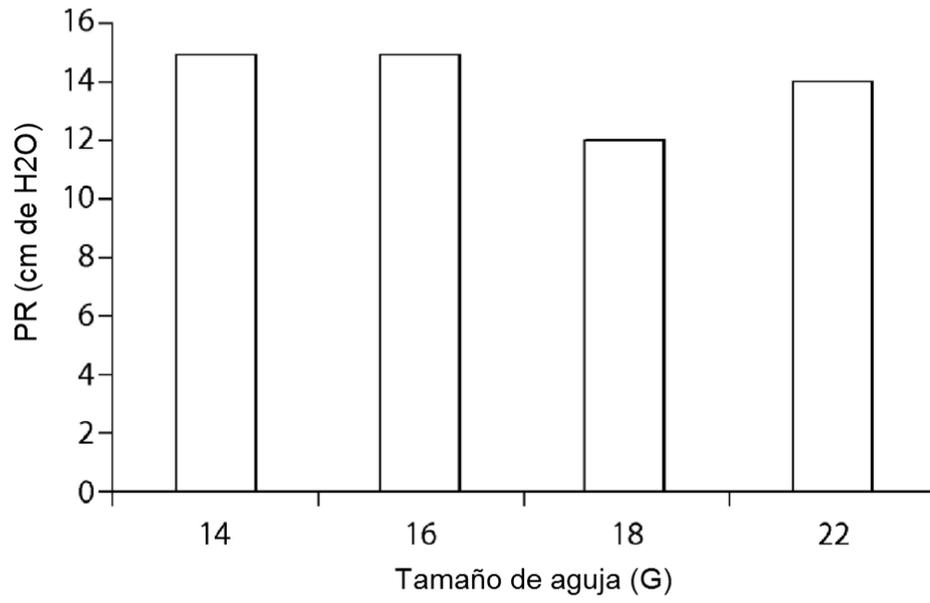


Fig. 26

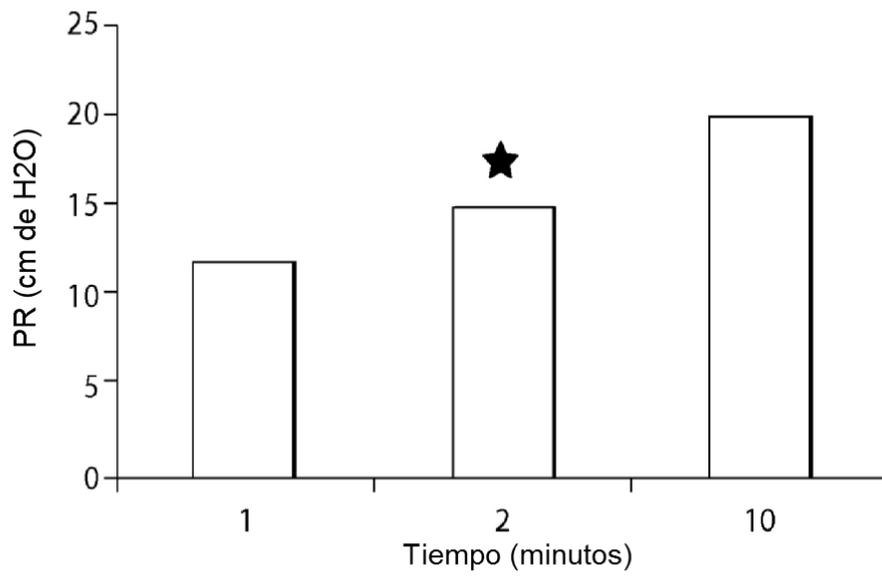


Fig. 27

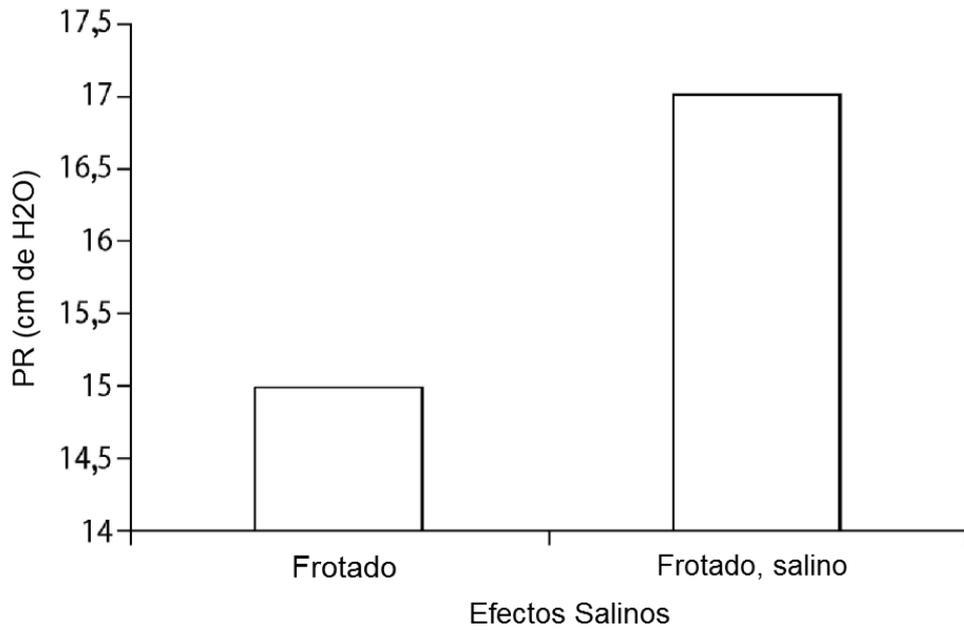


Fig. 28

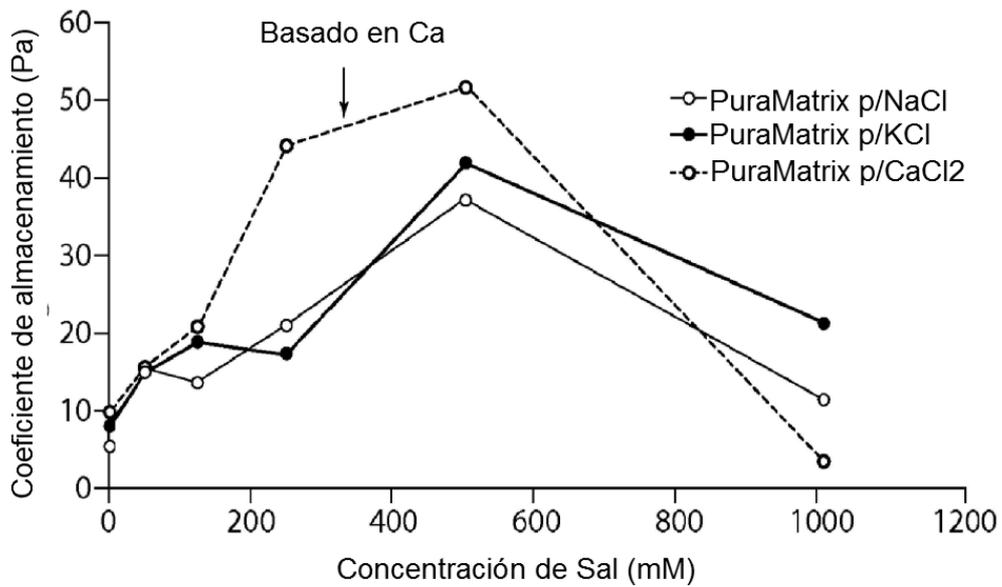


Fig. 29

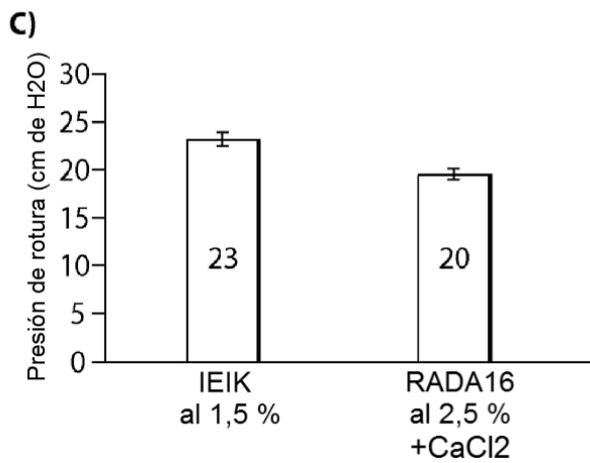
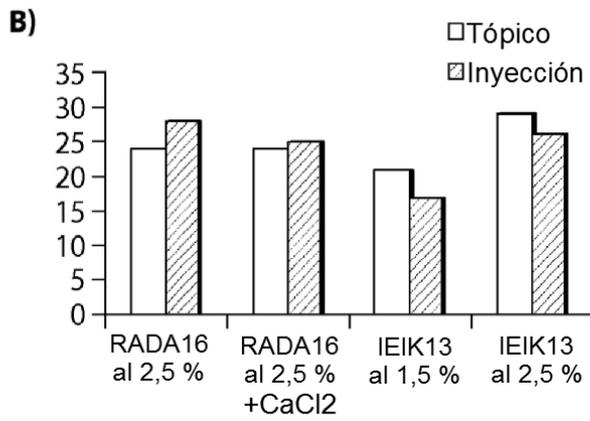
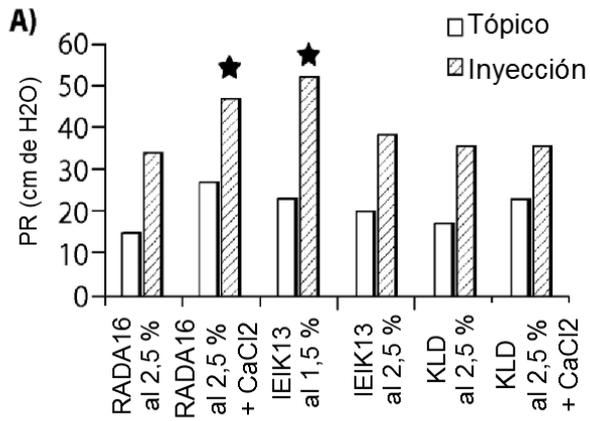


Fig. 30