

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 149**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61L 27/22** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016 PCT/EP2016/071888**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016 E 16766020 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3349808**

54 Título: **Composiciones mejoradas para hidrogeles**

30 Prioridad:

**16.09.2015 GB 201516421**

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

**15.04.2021**

73 Titular/es:

**BIOGELX LIMITED (100.0%)  
BioCity Scotland, Bo'Ness Road  
Newhouse, Lanarkshire ML1 5UH, GB**

72 Inventor/es:

**IRVINE, ELEANORE JANE;  
HARPER, MHAIRI MALONE;  
GOLDIE, LAURA y  
CONNOLLY, MICHAEL LEO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 819 149 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

Composiciones mejoradas para hidrogeles

5 **Introducción**

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de hidrogel, incluyendo hidrogeles como tales, y precursores en forma líquida o seca, que pueden actuar como un andamio y el apoyo para el crecimiento celular. En particular, la invención se refiere a composiciones de hidrogel que pueden autoensamblarse en geles y se forman a partir de péptidos y derivados de péptidos.

**Antecedentes de la invención**

[0002] Se sabe que el crecimiento de células de soporte en estructuras sintéticas que se asemejan a las fisiológicas, incluyendo tales estructuras hidrogeles.

[0003] Zhang et al (J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, pp13680-13681) describe dipéptidos protegidos por Fmoc, por ejemplo Phe-Phe, Ala-Ala, Gly-Gly, Gly-Ala, Gly-Ser en combinación con un ligando de apilamiento aromático, formando armazones fibrosos. Estos se llevaron a cabo a un pH de 3-5, que es demasiado ácido para el crecimiento celular normal. No se llevaron a cabo investigaciones a pH fisiológico. Otros geles basados en péptidos se describen en Gary Scott y col., Langmuir, vol. 29, 2013, págs. 14321-14327; Mi Zou y col., Biomaterials, vol. 30, 2009, págs. 2523-2530; y Apurba Das et al, discusiones de Faraday, vol. 143, 209, págs. 293-303. Otros geles basados en péptidos se describen en Ron Orbach et al, Langmuir, vol. 28, 2012, págs. 2015-2022 y Ron Orbach et al, Biomacromolecules, vol. 10, 2009, págs. 2646-2651.

[0004] La patente de EE.UU. N° 8,420,605 a nombre de la Universidad de Strathclyde describe otros hidrogeles que comprenden un ligando de apilamiento aromático, como Fmoc o Cbz, junto con péptidos o derivados de péptidos a pH fisiológico. Se formó un hidrogel a un pH de 7 a partir de Fmoc-Phe-Phe. Se llevó a cabo un trabajo adicional utilizando otros péptidos, en combinación con un ligando de apilamiento aromático, como C-Phe-Phe, donde C = Alanina, Valina, Leucina o Fenilalanina. Sin embargo, el hidrogel formado a partir de Fmoc-Phe-Phe era demasiado hidrófobo para la unión de las células y, por tanto, no formó un soporte adecuado para el crecimiento celular de las células dependientes del anclaje.

[0005] Para la optimización del crecimiento celular, tales hidrogeles deben formar un gel suficientemente rígido para el crecimiento de células de soporte y deben hacerlo bajo pH fisiológico. Además, es ventajoso que el gel sea ópticamente transparente para ayudar a controlar las células, no esté demasiado concentrado (ya que una baja concentración de componentes del gel o tamaños de poros grandes entre los componentes del gel pueden ser beneficiosos para el crecimiento celular) y que tenga suficiente longevidad para el crecimiento requerido.

[0006] Se sabe que el uso de un aminoácido aromático, por ejemplo fenilalanina (Phe, F), en un derivado de péptido, por ejemplo, en combinación con un ligando de apilamiento aromático, puede actuar como un fuerte componente estructural que puede aumentar la resistencia del gel a través del apilamiento  $\pi$  mejorado del anillo aromático.

[0007] Ahora se ha encontrado que las combinaciones de péptidos, en dipéptidos particulares, se pueden usar para crear hidrogeles con propiedades sintonizables a condiciones de juego para el crecimiento de diferentes tipos de células.

[0008] Un objetivo de la presente invención es proporcionar hidrogeles alternativos y preferiblemente mejorados basados en péptidos derivados que presentan una rigidez suficiente y recubrimiento de un medio ambiente adecuado para el crecimiento celular.

**Sumario de la invención**

[0009] Por consiguiente, la invención proporciona hidrogeles y precursores de hidrogeles para usos científicos y terapéuticos. Los precursores incluyen formatos secos y mezclas de pre-gelificación, por ejemplo en las que los componentes gelificantes se proporcionan en un formato acuoso pero aún no gelificados. Los geles y precursores se denominan composiciones de hidrogel. Las composiciones de la invención se basan en nuevas combinaciones de péptidos que suministran geles que pueden apoyar el crecimiento celular, especialmente el crecimiento celular humano, con propiedades alteradas y preferiblemente mejoradas en comparación con los geles conocidos.

[0010] La invención proporciona, por ejemplo, una composición de hidrogel, que comprende una mezcla de primer y segundo péptido derivados en una relación de 1:4 a 4:1, en donde

los primeros derivados de péptidos comprenden ASL-GA-GA,  
los segundos derivados de péptidos comprenden ASL-GA-X, en donde  
ASL es un ligando de apilamiento aromático, que es Fmoc,

GA es el aminoácido fenilalanina (F),

X es un aminoácido seleccionado de la serina de aminoácidos neutros (S), aminoácidos positivamente cargados arginina (R) y lisina (K), y ácido aspártico de aminoácidos cargados negativamente (D) y ácido glutámico (E).

5  
[0011] Se ha encontrado que los hidrogeles que caen dentro de esta definición pueden ser obtenidos que son suficientemente rígidos para el apoyo del crecimiento celular (siendo rigideces de gel variable producibles para apoyar el crecimiento de diferentes tipos de células), son claros o suficientemente claros para las células cultivadas en el mismo para ser visualizados usando técnicas de microscopía y tienen suficiente longevidad para apoyar el crecimiento de células y tejidos durante períodos de tiempo terapéuticamente relevantes.

15  
[0012] Muchas de las propiedades de gel son variables según la elección de los componentes individuales y sus concentraciones y también componentes adicionales opcionales. La capacidad del usuario para elegir geles que tengan una rigidez predeterminada será evidente a partir de la discusión a continuación de las diversas características opcionales y preferidas de los hidrogeles de la invención. La proporción de los derivados peptídicos primero y segundo se modifica opcionalmente para alterar las propiedades del hidrogel. Por ejemplo, la proporción de péptidos que contienen aminoácidos hidrófobos tenderá a afectar a la hidrofobicidad general del gel. Este es un ejemplo de una propiedad que se varía según la preferencia del tipo de célula a cultivar en o sobre el gel. En todos los geles de la presente invención, la provisión de aminoácidos o derivados no hidrófobos en los componentes mixtos del gel reduce la hidrofobicidad, aumentando su utilidad para apoyar el crecimiento celular, una mejora con respecto a los geles de la técnica anterior basados predominantemente en Fmoc-Phe-Phe.

20  
[0013] Los geles específicos elaborados y descritos a continuación tienen proporciones de los derivados peptídicos primero:segundo de aproximadamente 1:1. En otros ejemplos preferidos, la relación puede ser de aproximadamente 2:3 a aproximadamente 3:2.

25  
[0014] Las composiciones de gel de la invención se forman espontáneamente 3 geles tridimensionales con rigidez medible, después de combinación con medios acuosos (opcionalmente suplementados por otros componentes mencionados aquí en otra parte) bajo condiciones de pH fisiológico, generalmente a pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, más adecuadamente a un pH en el intervalo de aproximadamente 7 a 8, siendo el pH del cuerpo humano típicamente aproximadamente 7,4. Cuando se proporciona, por ejemplo, en forma de polvo, la adición de una cantidad predeterminada de medio de cultivo conocido que contiene iones, suplementos, etc. conocidos produce una solución que tiene un pH en el intervalo anterior; el gel luego se forma y se endurece espontáneamente. Alternativamente, se puede proporcionar una mezcla de pregelificación en forma líquida; la adición de una cantidad predeterminada de medio produce una solución con pH en el rango de gelificación anterior y se forma el gel.

30  
[0015] Durante la formación de gel, fibras se forman dentro del gel por el apilamiento de los péptidos adyacentes en recta y, en algunos casos, las fibras ramificadas. La formación de esta matriz que contiene fibras se facilita por la presencia de ligandos de apilamiento aromáticos, adecuadamente como se describe en los documentos US 2013/0338084 y US 8,420,605. Los ejemplos incluyen Fmoc, Cbz y derivados de los mismos. Las interacciones de apilamiento aromático son reconocidas y bien descritas en la literatura científica y surgen de la fuerza de atracción entre las nubes de electrones  $\pi$  en grupos aromáticos adyacentes/vecinos. El apilamiento aromático puede verse afectado por varios factores, incluido el pH, y como se describe en otra parte del presente documento, las fuerzas son lo suficientemente fuertes como para que los presentes geles puedan formarse a pH fisiológico. En la invención, las fibras formadas por estas fuerzas de apilamiento entre, por ejemplo, electrones  $\pi$  adyacentes en grupos Fmoc crean los geles rígidos descritos.

35  
[0016] Los derivados de péptidos primero y segundo comprenden gel formador de aminoácidos, denominados en la fórmula como GA.

40  
[0017] En los hidrogeles, X tal como se define en general puede ser (aparte de fenilalanina) cualquier aminoácido de origen natural. Por tanto, los hidrogeles adecuados pueden contener, como X, un aminoácido neutro, un aminoácido cargado positivamente o un aminoácido cargado negativamente. En general, la invención proporciona así un sistema para la preparación de hidrogel en donde los geles resultantes pueden tener su hidrofobicidad, naturaleza cargada y rigidez ajustadas según la elección de los componentes, incluida la elección de los aminoácidos dentro del primer y segundo derivado peptídico del componente.

45  
[0018] En un conjunto de realizaciones de la invención, X es un aminoácido neutro. En un ejemplo a continuación, el uso de un aminoácido neutro dio como resultado un gel que tiene una rigidez aceptable con las concentraciones de péptido ensayadas, por ejemplo a concentraciones de 10 mM a 30 mM.

50  
[0019] En un segundo conjunto de formas de realización de la invención, se prepararon geles de la invención en los que X es un aminoácido cargado, es decir, X es un aminoácido seleccionado de entre R, K, D y E. Geles basados en péptidos en los que un aminoácido cargado se combina con F, ya que el componente GA puede exhibir una rigidez mejorada en comparación con los geles basados en aminoácidos neutros. Estos geles también fueron más susceptibles a la modificación de la rigidez y otras propiedades al incluir en la composición cationes en concentraciones

variables. Por lo tanto, una ventaja de estos geles que contienen aminoácidos cargados es la capacidad de modificar aún más las propiedades del gel mediante la adición de otros compuestos, moléculas, péptidos, derivados de péptidos y especialmente cationes en la composición del gel, por ejemplo mediante la adición de estos componentes a una mezcla de gelificación.

5 **[0020]** En realizaciones específicas de la invención, X es un aminoácido seleccionado de R y K. Geles basados en el uso de estos aminoácidos positivamente cargados mostraron altos niveles de rigidez, incluso en ausencia de componentes adicionales tales como cationes, produciendo valores de rigidez de 10-20 kPa y superiores para concentraciones de péptidos de 20 mM a 30 mM.

10 **[0021]** En otras realizaciones específicas, X es un aminoácido seleccionado entre D y E. Los geles de la invención, en base a estos aminoácidos cargados negativamente, geles cedidos que tienen rigidez aceptable, generalmente en niveles similares a o de aumento de la rigidez en comparación con un hidrogel de la técnica anterior que es una combinación de Fmoc-FF con Fmoc-S en una proporción de 1:1. Sin embargo, es de destacar que los geles de estas realizaciones específicas, basados en aminoácidos cargados negativamente, son susceptibles de tener su rigidez de gel aumentada notablemente por la incorporación de cationes en la composición, por ejemplo, mediante la adición de soluciones acuosas que contienen cationes a una mezcla de pre-gelificación. Dado que varían tanto los requisitos de rigidez individuales para la amplia gama de tipos de células que se van a cultivar, no es factible proporcionar una gama de hidrogeles que se adapten a cada célula individual sus requisitos óptimos de rigidez de gel. Mediante el uso de geles de la invención, especialmente aquellos que incorporan aminoácidos cargados negativamente, se puede lograr una variación de la rigidez en el gel final mediante la variación de la concentración de péptidos y/o iones, especialmente cationes, mejorando así la usabilidad y flexibilidad del sistema de gel de la invención.

15 **[0022]** Las composiciones de la invención pueden proporcionarse en una forma seca. A modo de ejemplo, la composición puede estar en forma de polvo o preparación liofilizada. En un uso, se agrega agua a la composición seca para producir una mezcla de pregelación, que a su vez se combina con el medio de cultivo para producir un gel. Alternativamente, la forma seca se combina en un solo paso con medio de cultivo para producir una mezcla que por sí misma forma espontáneamente un gel. Los formatos secos de la composición se pueden preparar sometiendo una solución acuosa de péptidos/derivados primero y segundo a técnicas de secado estándar. Como ejemplo, se liofiliza una mezcla de pre-gelificación para producir una forma seca de la invención.

20 **[0023]** Tal como se describe ampliamente en el presente documento, la variación de los componentes de gel y concentraciones puede resultar en geles que tienen un intervalo de valores de rigidez. De forma adecuada, el gel tiene una rigidez de 100 Pa a 100 kPa. Para la mayoría de las aplicaciones de cultivo celular, la concentración y elección de péptidos, de acuerdo con la invención, produce un gel que tiene una rigidez que es 500 Pa o mayor, más preferiblemente 1 kPa o mayor, o preferiblemente 2 kPa o mayor. El ajuste de las propiedades del gel evita una rigidez inaceptablemente alta. Sin embargo, es posible usar la invención para producir geles que tengan una rigidez excepcionalmente alta, para uso en aplicaciones particulares. Generalmente, los geles tienen una rigidez de hasta aproximadamente 70 kPa, preferiblemente hasta aproximadamente 50 kPa, más preferiblemente hasta aproximadamente 40 kPa.

25 **[0024]** En los ejemplos siguientes, se describen geles de la invención usando aminoácidos negativamente cargados que tienen rigidez de desde aproximadamente 500 Pa a aproximadamente 12 kPa. En otros ejemplos a continuación, describimos geles particulares de la invención basados en aminoácidos positivamente cargados, que tienen una rigidez en el rango de aproximadamente 3 kPa a aproximadamente 24 kPa.

30 **[0025]** Una ventaja de la invención es la capacidad de producir geles rígidos sin tener que utilizar una concentración excesivamente alta de péptido. Se prefiere que, al preparar composiciones y geles de la invención, la concentración de los derivados peptídicos (tratando para ese propósito solo los derivados peptídicos primero y segundo como un solo derivado) en el gel final sea de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, más preferiblemente 10 mM o más, preferiblemente hasta aproximadamente 70 mM, o preferiblemente hasta aproximadamente 50 mM. En ejemplos específicos, los geles basados en concentraciones de péptidos de aproximadamente 20 mM y 30 mM dieron ambos geles de alta rigidez, por lo tanto sin usar concentraciones de péptido excesivamente altas.

35 **[0026]** Las composiciones de la invención que no se proporcionan como composición de gel final se proporcionan secas o como mezclas de pregelación. Estas se pueden marcar para mostrar la cantidad adecuada de vehículo acuoso que se debe agregar para lograr el gel deseado. En realizaciones de la invención, por lo tanto, la composición se proporciona en forma seca o en forma de una mezcla de pre-gelificación, para combinar con un volumen predeterminado de vehículo acuoso de modo que en el gel resultante la concentración de los derivados peptídicos sea de 5 mM a 100 mM, preferiblemente de 10 mM a 50 mM. Por tanto, los productos en esta forma pueden marcarse para indicar las propiedades del gel obtenidas cuando la forma seca o la mezcla de predilatación se combinan con las cantidades de vehículo dadas. Los productos también pueden estar marcados para indicar cómo variarán las propiedades del gel según otros componentes del vehículo, como los iones, especialmente los cationes.

40 **[0027]** Las realizaciones particularmente preferidas se exponen en los ejemplos de abajo. Estas realizaciones incorporan selecciones preferidas para los diversos componentes de la composición de hidrogel. Por consiguiente, en

realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan composiciones en las que uno o más o todos:

- (i) la proporción de los derivados peptídicos primero y segundo es una proporción de 2:3 a 3:2,
- (ii) la ASL es Fmoc,
- (iii) GA es fenilalanina, y
- (iv) X se selecciona entre S, R, K, D y E.

**[0028]** Se prefiere además que los derivados peptídicos primero y segundo sean di-péptidos sustituidos, en donde la los primeros derivados peptídicos comprenden ASL-GA-GA-R<sub>1</sub> y los segundos derivados peptídicos comprenden independientemente ASL-GA-XR<sub>1</sub>. R<sub>1</sub> se selecciona independientemente de OH, grupo protector O, una amina, es decir, NH<sub>2</sub>, o amina sustituida y derivados ionizados de los mismos.

**[0029]** Las composiciones de la invención tienen diversas aplicaciones, especialmente en cultivo celular. Por consiguiente, la invención comprende además composiciones según la invención que comprenden además células, especialmente células madre. Otras composiciones de la invención comprenden además tejido, derivado opcionalmente de células o células madre cultivadas en los hidrogeles de la invención.

**[0030]** Aún otras composiciones proporcionadas en este documento incluyen los implantes para su uso en animales, especialmente humanos, la terapia que comprenden cualquier composición de la invención como se describe anteriormente.

**[0031]** La invención proporciona aún más un método de cultivo de células o tejido que comprende combinar células o tejido con la composición de la invención y cultivar las mismas. El cultivo puede comprender hacer crecer las células para aumentar el número de células (expandir las células), diferenciar las células o ambos.

**[0032]** Para ayudar a la comprensión de la invención, las realizaciones específicas de la misma se describirán ahora a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Fig. 1 es una fotografía de muestras de gel de A) Fmoc-FF con Fmoc-FD, B) Fmoc-FF con Fmoc-FS, C) Fmoc-FF con Fmoc-FK, D) Fmoc-FF con Fmoc-FE, E) Fmoc-FF con Fmoc-FR y F) Fmoc-FF con Fmoc-S; La Fig. 2 es un gráfico de rigidez frente a la concentración de gel para las combinaciones descritas. La Fig. 3 es una serie de fotografías de tinción viva/muerta después de 1 día de cultivo de MSC en A) Fmoc-FF con Fmoc-FS, B) Fmoc-FF con Fmoc-FS, C) Fmoc-FF con Fmoc-FK, D) Fmoc-FF con Fmoc-FD, E) Fmoc-FF con Fmoc-FE y F) Fmoc-FF con geles de Fmoc-FR a una concentración de 20 mM; y La Fig. 4 es una serie de gráficos de los resultados de la reología para las combinaciones de gel péptido con el tiempo para (a) geles 10 mM, (b) geles 20 mM, y (c) geles 30 mm.

**[0033]** Las combinaciones de péptidos fueron investigadas para determinar combinaciones particulares que produjeron hidrogeles con propiedades (claridad, rigidez, longevidad, pH fisiológico) que son ventajosas para el crecimiento celular. Los experimentos iniciales se concentraron en combinaciones de fenilalanina (F), con péptidos cargados y, en particular, ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), lisina (K), arginina (R) y serina (S).

**[0034]** Las combinaciones de los derivados de péptidos Fmoc-FF con Fmoc-FD, Fmoc-FF con Fmoc-FE, y Fmoc-FF con Fmoc-FK se prepararon como mezclas de pre-gelificación a aproximadamente relaciones 1:1. Las combinaciones de Fmoc-FF con FmocFD y Fmoc-FF con Fmoc-FE y Fmoc-FF con Fmoc-FK produjeron soluciones transparentes.

**[0035]** Con el fin de investigar la gama de alcanzable rigidez de estas combinaciones, así como dos combinaciones adicionales, a saber, Fmoc-FF con Fmoc-FR, y Fmoc-FF con Fmoc-FS, varias concentraciones diferentes de estas combinaciones se prepararon como se ha expuesto anteriormente, y todos produjeron soluciones transparentes, que luego se formaron en hidrogeles transparentes, con la excepción de Fmoc-FF con Fmoc-FR. Esto produjo una solución blanca turbia y, por tanto, un hidrogel turbio.

**[0036]** La Fig. 1 muestra las muestras de gel de A) Fmoc-FF con Fmoc-FD, B) Fmoc-FF con Fmoc-FS, C) Fmoc-FF con FmocFK, todas a tres concentraciones diferentes, D) Fmoc-FF con Fmoc-FE en cuatro concentraciones diferentes, E) Fmoc-FF con Fmoc-FR y F) Fmoc-FF con Fmoc-S en cinco concentraciones diferentes. Se pueden ver los geles turbios producidos por la combinación Fmoc-FF con Fmoc-FR.

**[0037]** Un estándar de una combinación de Fmoc-FF con Fmoc-S se incluyó en este experimento como control.

**[0038]** Con el fin de ver crecimiento celular en un hidrogel, en particular cuando se utiliza la tinción con un microscopio, la provisión de un hidrogel claro es ventajosa. Sin embargo, la turbidez no afecta al crecimiento celular, cuando el péptido o la combinación de péptidos es adecuada y, por tanto, para usos particulares, por ejemplo, cuando las células crecen para su posterior implantación, un hidrogel turbio no es insatisfactorio.

**[0039]** La rigidez de todas las combinaciones se evaluaron utilizando la reología, como anteriormente, con los resultados que figuran en la Tabla 1 a continuación (en donde Fmoc-FF/S no es parte de la presente invención).

**Tabla 1**

Péptidos	Rigidez (kPa)			
	10 mM	15 mM	20 mM	30 mM
Fmoc-FF/S	0,9	2,2	3,5	8,6
Fmoc-FF/FE	0,11	0,5	2,0	8,2
Fmoc-FF/FD	0,3	0,8	3,2	11,5
Fmoc-FF/FS	0,7	2,2	6,0	11,2
Fmoc-FF/FR	3,1	6,3	12,5	23,2
Fmoc-FF/FK	5,1	8,4	16,3	21,3

[0040] Los diferentes tipos de células requieren una rigidez diferente en el andamio para un crecimiento óptimo. Por ejemplo, las células cerebrales requieren un gel relativamente suave, mientras que las células óseas requieren un gel mucho más rígido. Para soportar una variedad de células diferentes, es deseable poder producir geles que tengan una rigidez de 100 Pa a 50 kPa. Por tanto, los geles indicados en la Tabla 1 proporcionaron rigideces adecuadas para una variedad de células.

[0041] Un gráfico de la rigidez frente a la concentración de gel para las combinaciones descritas incluyendo la desviación estándar se muestra en la Fig. 2.

[0042] Esto demostró que mediante la alteración del segundo péptido en la secuencia de dipéptido, una diferencia en la fuerza de andamio se obtiene cuando se combina con un péptido Fmoc-difenilalanina.

[0043] Al comparar la combinación de Fmoc-FF con Fmoc-S y Fmoc-FF con Fmoc-FS los resultados muestran una rigidez casi idéntica hasta una concentración de gel de 15 mM. Para concentraciones más altas, se observa una rigidez significativamente mayor para Fmoc FF con geles Fmoc-FS. Es probable que esto se deba a que el aumento en el apilamiento  $\pi$  del anillo de fenilalanina adicional es más eficaz a concentraciones más altas.

[0044] Las combinaciones de Fmoc-FF con Fmoc-FD y Fmoc FF con Fmoc-FE muestran rigideces que en general estaban ligeramente por debajo del rango de rigidez del control, Fmoc-FF con Fmoc-S. Fmoc-FF con Fmoc-FK y Fmoc-FF con FmocFR demostraron una rigidez enormemente aumentada en cada concentración en comparación con el control.

[0045] Los grupos cargados positivamente en K y R parecían potenciar la reticulación fibrosa produciendo rigideces de gel significativamente superiores. Esto permite acceder a geles de mayor rigidez sin necesidad de aumentar la densidad de la fibra.

[0046] La concentración de péptidos en el hidrogel es otro factor que puede afectar el crecimiento celular debido a la densidad de la fibra producida por el alineamiento de los péptidos. Cuando la densidad de la fibra es demasiado alta, el movimiento celular puede verse restringido y los geles se vuelven menos susceptibles al crecimiento celular. La concentración de los péptidos es un factor que puede afectar a la rigidez del hidrogel y, por lo tanto, un hidrogel adecuado para promover el crecimiento celular tiene una rigidez como se ha indicado anteriormente y, sin embargo, una concentración no demasiado alta. Las concentraciones adecuadas de péptidos serán hasta un máximo de 100 mM, y típicamente hasta 40 mM. Preferiblemente, el hidrogel tendrá una concentración de péptido de menos de 30 mM.

[0047] Los experimentos anteriores describen la preparación y propiedades de hidrogeles en diversas combinaciones y concentraciones. El propósito de los hidrogeles es apoyar el crecimiento celular y, por lo tanto, algunas de las combinaciones descritas anteriormente también se probaron para determinar la viabilidad celular de los hidrogeles.

[0048] Se formaron hidrogeles como se describió anteriormente a partir de combinaciones de Fmoc-FF con Fmoc-FD, Fmoc-FF con FmocFE y Fmoc-FF con Fmoc-FK a una concentración de 20 mM y se sembró con células, es decir, un formato 2D. Las células se cultivaron durante 24 horas y se usó un ensayo de fluorescencia vivo/muerto con un microscopio confocal para determinar la viabilidad del crecimiento celular en los geles. Imágenes de tinción vivas/muertas se muestran en la Fig. 3.

[0049] El ensayo demostró buena supervivencia celular en todos los geles con la muerte celular mínima. Por tanto, el experimento confirmó que los geles 20 mM para las combinaciones descritas eran adecuadas para soportar y hacer crecer poblaciones celulares variables.

[0050] Los experimentos también se llevaron a cabo para notar y garantizar la coherencia de los geles producidos. Se eligieron combinaciones de FmocFF con Fmoc-FS, Fmoc-FF con Fmoc-FK y Fmoc-FF con Fmoc-FD para dar una visión general de cómo las diferentes cargas incorporadas en la secuencia pueden afectar las propiedades del gel. Fmoc-FF con Fmoc-FK incorpora un aminoácido cargado positivamente (lisina), Fmoc-FF con Fmoc-FD incorpora un aminoácido cargado negativamente (ácido aspártico) y Fmoc-FF con Fmoc-FS incorpora un aminoácido neutro pero

polar (serina).

5 **[0051]** Un método de preparación pre-gelificación A se formuló que fue utilizado para todas las combinaciones de péptidos y concentraciones y demostraron que los geles se podrían preparar con una apariencia clara similar para cada combinación.

**[0052]** A continuación, se determinó la rigidez de cada uno de estos geles durante un período de tiempo para asegurar que el gel tuviera una longevidad adecuada para el crecimiento celular para diferentes propósitos.

10 **[0053]** Mezclas de pre-gelificación para cada una de las combinaciones de péptidos se prepararon a 10, 20 y 30 concentraciones mM. Los geles se prepararon usando medio de cultivo celular DMEM y la rigidez de los geles se evaluó usando reología en los días 1, 3, 7, 10, 14, 21 y 28. Los gráficos de la Fig. 4 muestran las rigideces obtenidas para cada combinación y concentración de gel a lo largo del tiempo.

15 **[0054]** Una tendencia general era que todos los geles mostraron una disminución en la rigidez de gel en el tiempo. Fmoc-FF con Fmoc-FK demostró los valores de rigidez más altos durante el estudio de tiempo, seguido de Fmoc-FF con Fmoc-FS y los valores de rigidez más bajos se observaron en el Fmoc-FF con geles de Fmoc-FD. Sin embargo, Fmoc-FF 10 mM con Fmoc-FS y Fmoc-FF con Fmoc-FD muestran valores similares durante un período de 7 días.

20 **[0055]** Se ha demostrado que Fmoc-FF con geles de Fmoc-FK a concentraciones más altas, 20 y 30 mM, es estable hasta 28 días en medio con el gel de concentración más baja 10 mM viable hasta el punto de tiempo de 21 días.

25 **[0056]** Los geles Fmoc-FF con Fmoc-FS han demostrado que, aunque hay una disminución general de la rigidez durante 10 días, la tasa de disminución es menos rápida que el Fmoc-FF con geles Fmoc-FK. Esto es muy beneficioso ya que permite mantener la consistencia del gel durante un período de tiempo más prolongado.

30 **[0057]** Por lo tanto todas las combinaciones proporcionan hidrogeles que son estables durante un período de tiempo útil para lograr el crecimiento celular y todos pueden proporcionar andamios adecuados para el crecimiento celular, dependiendo del tipo de célula a ser apoyado y la duración de la exigencia del andamio.

35 **[0058]** Así, estos experimentos han demostrado el uso de Fmoc-difenilalanina combinado con Fmoc-fenilalanina-X (X puede ser sustituida por K, D, E, R y S) para la producción de hidrogeles para soportar la viabilidad celular y el crecimiento en útiles gamas de rigidez sin excesivamente aumentar la fibra densidad. Además, se ha demostrado que tales hidrogeles subsisten durante al menos 28 días, aunque con una rigidez decreciente en el hidrogel.

40 **[0059]** La invención por lo tanto proporciona mejores hidrogeles y métodos de fabricación de ellos y usos de los mismos.

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Una composición de hidrogel, que comprende una mezcla de los derivados peptídicos primero y segundo en una proporción de 1:4 a 4:1,  
en donde  
los primeros derivados peptídicos comprenden ASL-GA-GA,  
los segundos derivados peptídicos comprenden ASL-GA-X,  
en donde  
10 ASL es un ligando de apilamiento aromático, que es Fmoc,  
GA es el aminoácido fenilalanina (F), y  
X es un aminoácido seleccionado del aminoácido neutro serina (S), aminoácidos positivamente cargados arginina (R),  
y lisina (K) y aminoácidos cargados negativamente ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E).
- 15 **2.** Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma seca.
- 3.** Una composición según la reivindicación 2, en forma de polvo o preparación liofilizada.
- 4.** Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en forma de un gel o una preparación de  
20 pre-gelificación, que puede formar un gel tras la adición de un vehículo acuoso.
- 5.** Una composición según la reivindicación 4, en la que el gel tiene una rigidez de 100 Pa a 100 kPa.
- 25 **6.** Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en forma de gel en la que la concentración de los derivados peptídicos es de 5 mM a 100 mM, preferiblemente de 10 mM a 50 mM.
- 30 **7.** Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que
- i. la relación de los derivados peptídicos primero y segundo es de 2:3 a 3:2,
  - ii. el ASL es Fmoc,
  - iii. GA es fenilalanina y
  - iv. X se selecciona de S, R, K, D y E.
- 8.** Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además células.
- 35 **9.** Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además células madre.
- 10.** Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además tejido.
- 40 **11.** Un implante, que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 8, 9 ó 10.
- 12.** Un método de cultivo de células o tejido que comprende combinar las células o tejido con una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y cultivarlos.

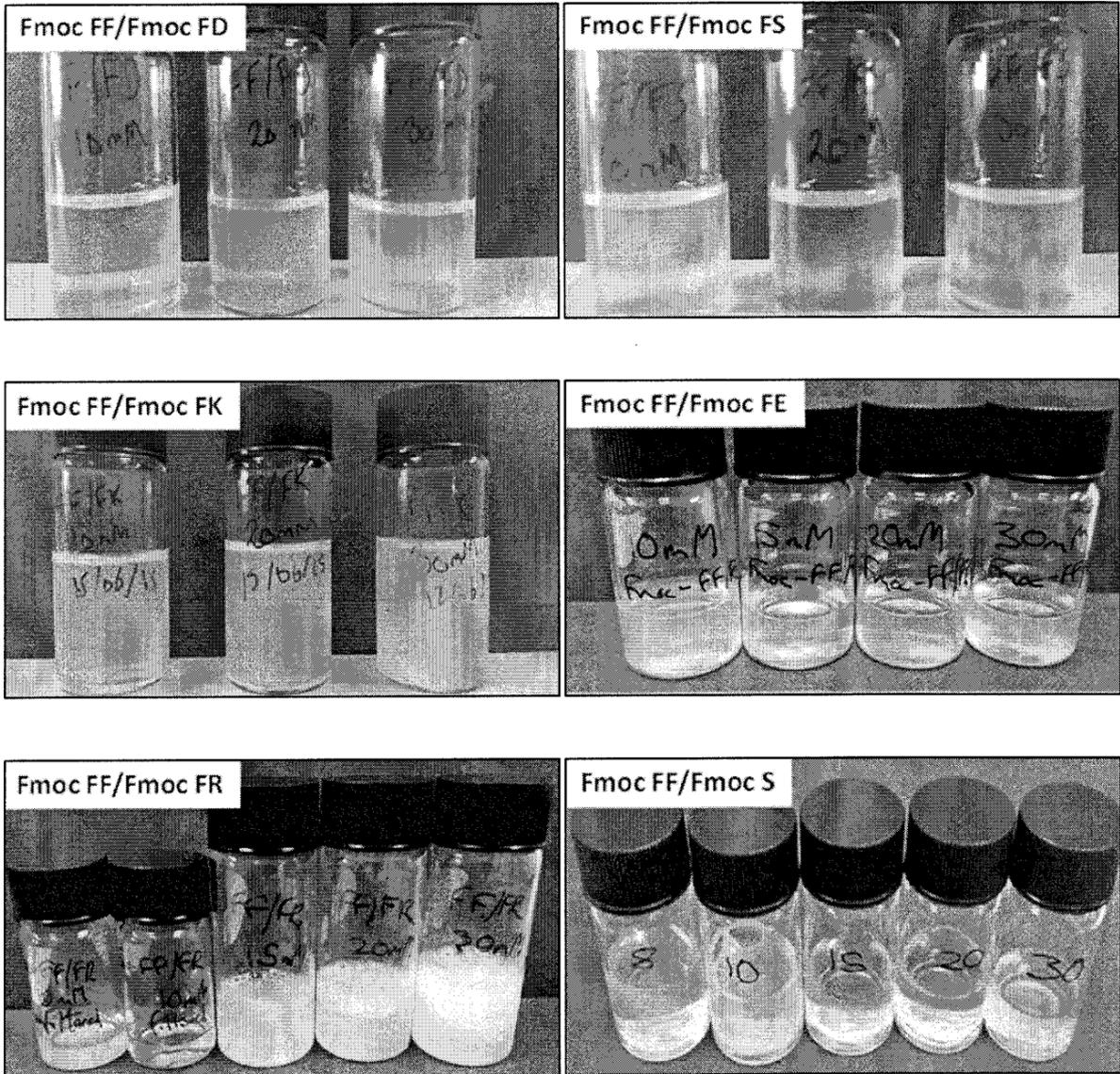


FIG. 1

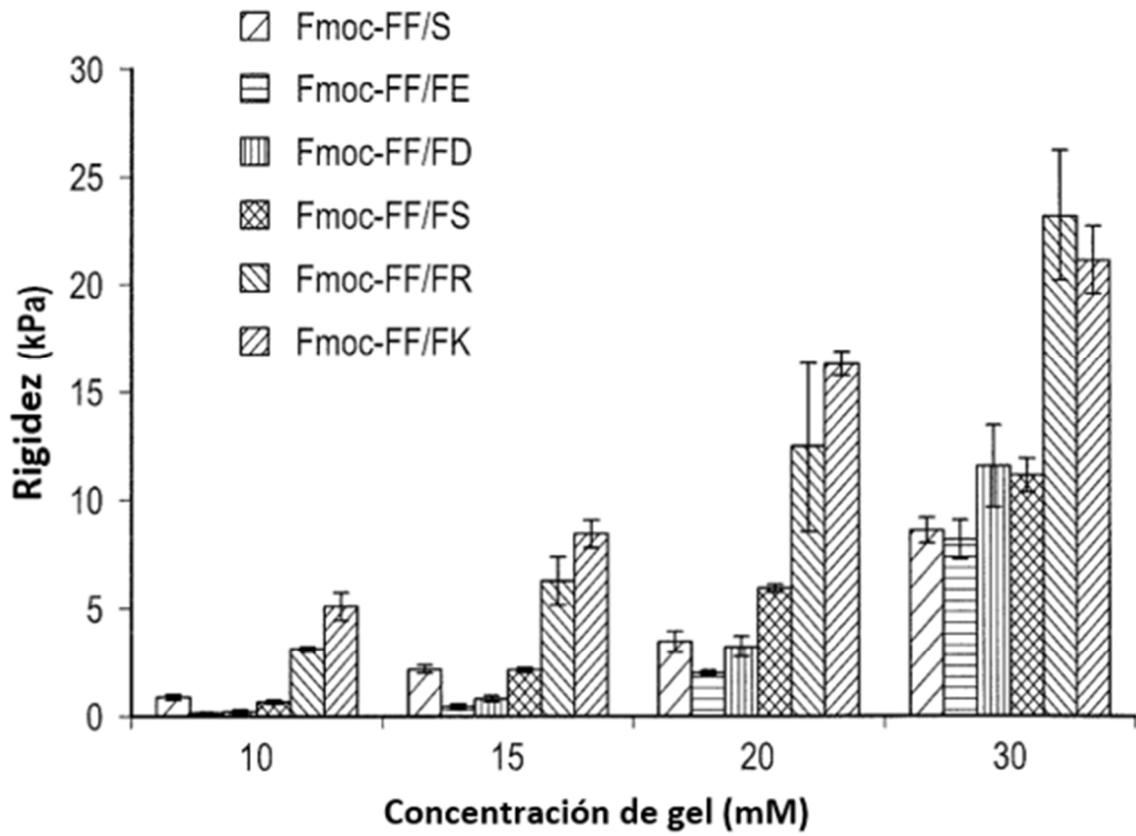


FIG. 2

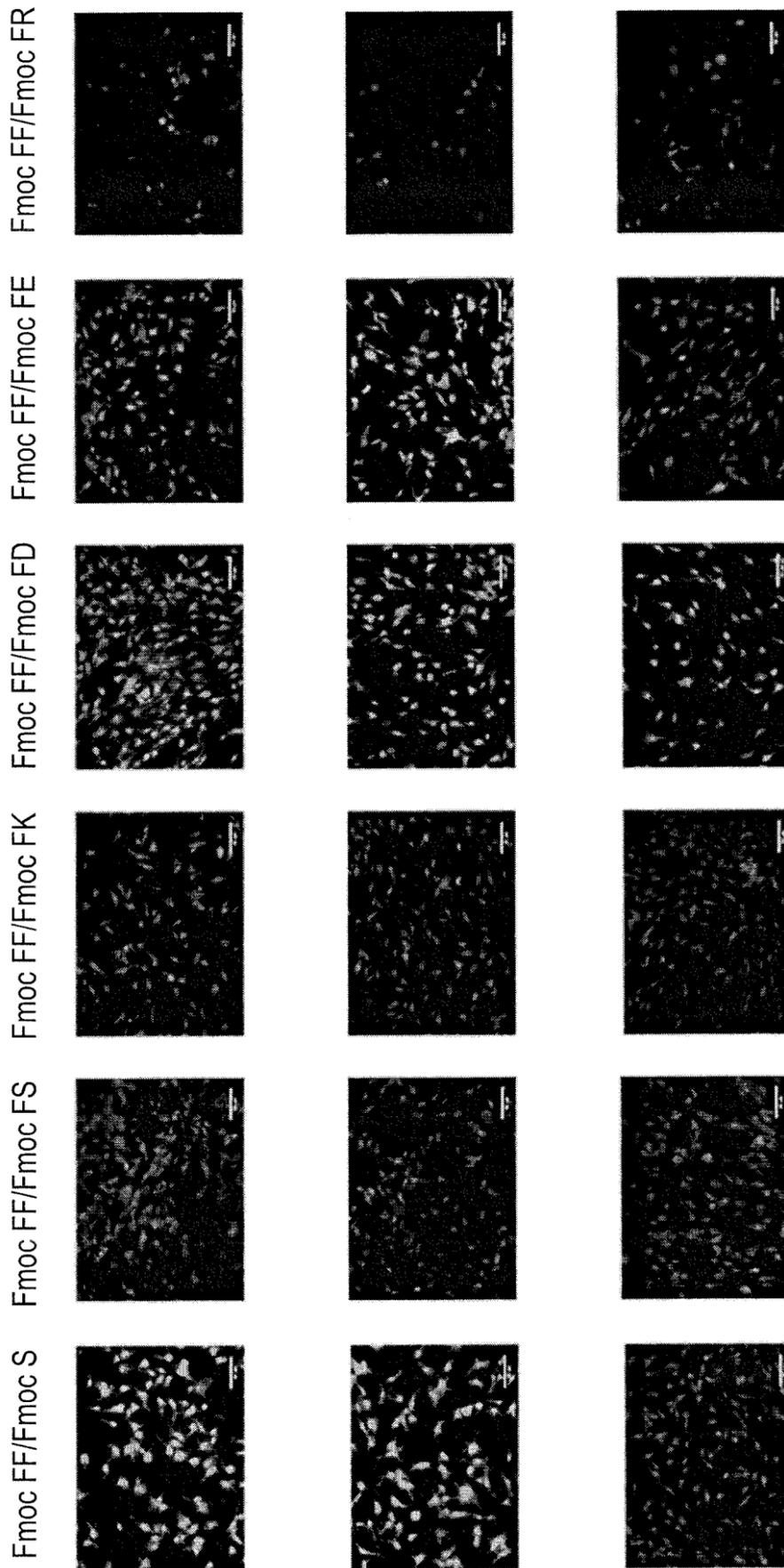


FIG. 3

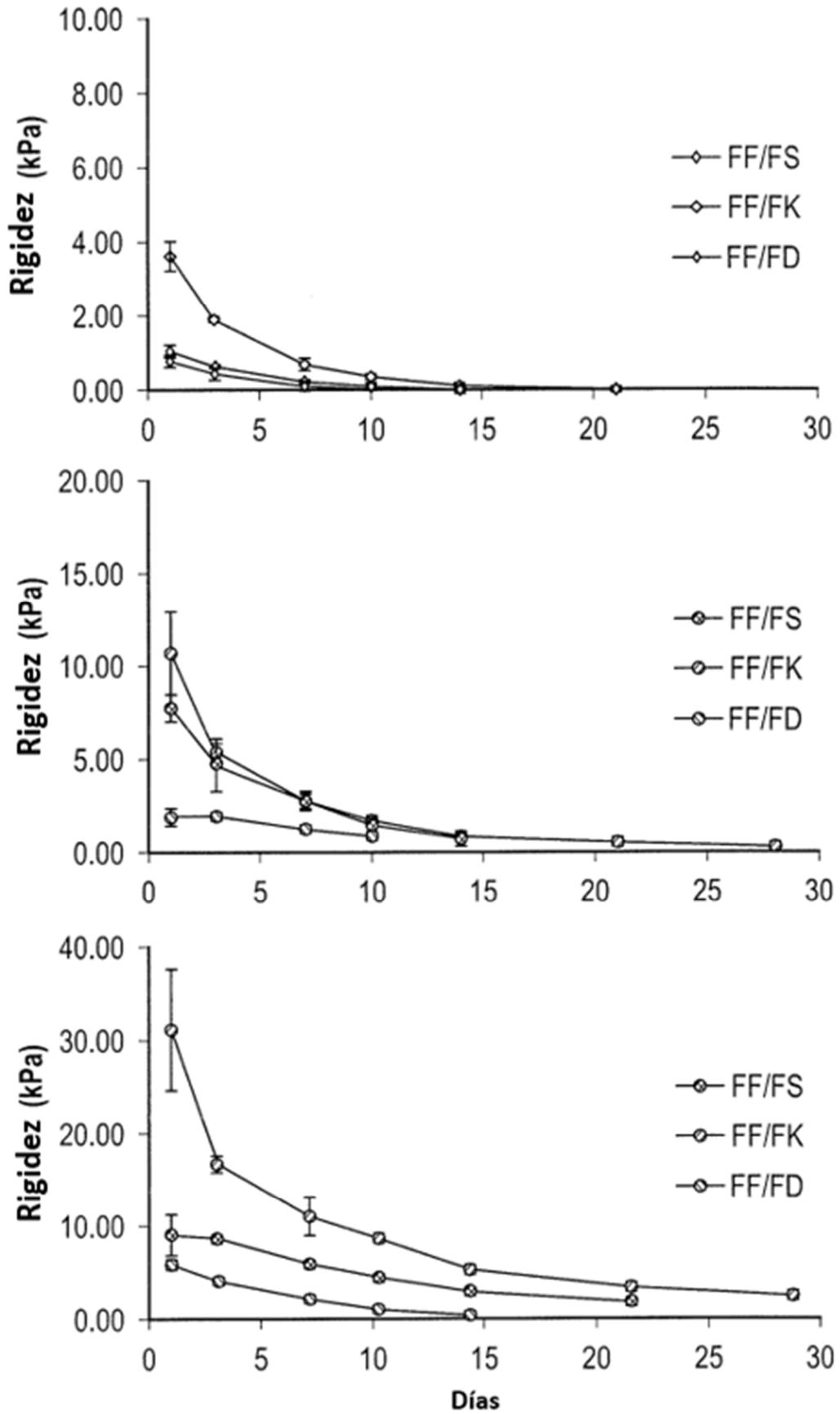


FIG. 4