

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 882**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2017 PCT/DE2017/100260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17174071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2017 E 17724313 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3440099**

54 Título: **Material basado en polímero con secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática**

30 Prioridad:

04.04.2016 EP 16163667

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

19.04.2021

73 Titular/es:

**TISSUEGUARD GMBH (100.0%)
Trienter Strasse 16
01217 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**TSURKAN, MIKHAIL;
BESSERT, JULIANE y
WERNER, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 819 882 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

Material basado en polímero con secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática

5 La invención se refiere a un material basado en polímero con secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática. Por lo demás, la invención se refiere al empleo de tal material basado en polímero para una producción *in-vitro* de cultivos celulares o tejidos u órganos, para una estabilización *in-vitro* de células, tejidos u órganos donados, así como para un tratamiento *in-vivo* o *in-vitro* de células, tejidos u órganos vivos. En este caso, la unión entre el material por una parte y de la muestra por otra parte, es decir, células, tejidos u órganos, es degradable de manera controlada sin destruir la integridad de la muestra (matriz extracelular, así como contactos célula-célula y matriz-célula extracelulares) (bioortogonalidad).
10

15 Existe una serie de técnicas para la formación de materiales compatibles con la célula y para su funcionalización individual con una variedad de moléculas con actividad biológica, como péptidos adhesivos con la célula unidos mediante enlace covalente, proteínas, y parcialmente de factores de crecimiento y citoquinas. En comparación con tales procedimientos, los métodos sintéticos para la introducción de reacciones selectivas de descomposición de material no se han investigado esencialmente. Los procedimientos enzimáticos para el desprendimiento celular/disociación aplicados hasta el momento, como procedimientos bajo aplicación de tripsina, pepsina o colagenasas, no son aplicables para tejidos y órganos recientemente generados ni para tejidos y órganos donados, ya que estos procedimientos no selectivos dañan el orden de su matriz extracelular. Además, la aplicación de tales enzimas para la liberación de células en materiales tridimensionales está limitada en gran medida, ya que esta requiere una concentración enzimática más elevada o tiempos de tratamiento más largos, que pueden conducir a la disociación no deseada de las proteínas de la superficie celular. Las metaloproteasas matriz (MMPs) más selectivas, que disocian determinadas secuencias de aminoácido, han demostrado ser aplicables para la extracción celular cuidadosa en materiales de hidrogel tridimensionales. Las MMPs empleadas con mayor frecuencia han mostrado una acción reducida sobre el comportamiento celular. Sin embargo, el empleo de MMPs en aplicaciones para tejidos u órganos es posible generalmente solo de manera limitada, ya que estas provocan una disociación de proteínas de la familia del colágeno en la matriz extracelular (EZM), lo que puede conducir a la pérdida de unidades estructurales importantes de tejidos y órganos. En resumen, el actual estado de la técnica ofrece técnicas prácticas para la extracción de células en aplicaciones tanto bidimensionales como también tridimensionales, mientras que hasta el momento no se dispone de ningún procedimiento biotecnológico apropiado para la obtención cuidadosa de organizaciones celulares complejas, como tejidos y órganos, a partir de materiales soporte.
20
25
30

35 Por el documento WO 02/50242 A2 es conocido un procedimiento para el crecimiento *in-vitro* de tejidos. En este caso se emplea un sustrato moldeable que está poblado con células que forman tejidos, y que define al menos un canal de circulación que contiene un medio de cultivo líquido. El sustrato se puede producir a partir de un material como un polímero sintético o una macromolécula agregada natural, a modo de ejemplo una proteína o un polisacárido. El sustrato puede ser biodegradable, presentando secuencias peptídicas incorporadas que son disociables mediante proteasas.

40 En el documento WO 2013/071126 A1 se describe un procedimiento para la producción de un hidrogel con una distribución tridimensional controlada espacialmente de una o varias señales bioactivas. En este caso, el hidrogel contiene un polímero que está acoplado a un péptido con un aminoácido con grupo protector fotolábil. Este grupo protector está posicionado de modo que impide una degradación enzimática de la secuencia del péptido disociable con proteasa. Solo tras eliminación fotoinducida del grupo protector se genera un péptido degradable mediante proteasa, que presenta al menos un punto disociable mediante una proteasa, por ejemplo MMPs.

45 Por el documento WO 2014/039245 A1 es conocido un procedimiento para la producción de un hidrogel, que comprende la condensación de dos grupos funcionales, conteniendo el primer grupo una molécula o macromolécula que presenta dos o más grupos hidroxilamina o grupos aminooxi, y conteniendo el segundo grupo una molécula o macromolécula que presenta dos o más grupos aldehído, cetona u otros grupos oxo reactivos. La condensación tiene lugar en condiciones bajo las que se forma un hidrogel. En este caso, el hidrogel puede contener un grupo disociable por vía enzimática, por ejemplo un grupo disociable con MMP, que está ubicado entre un polipéptido y una macromolécula. En la adición de enzimas se libera el polipéptido a continuación.

50 Por la publicación MIKHAIL V. TSURKAN ET AL: "Defined Polymer-Peptide Conjugates to Form Cell-Instructive starPEG-Heparin Matrices In Situ" son conocidos conjugados polímero-péptido para la formación de matrices formadoras de células a partir de polietilenglicol en forma de estrella y heparina. También en este caso se obtienen hidrogeles que son disociables por medio de MMP.

El documento EP 2 511 289 A1 se refiere a un procedimiento para la producción de un péptido glicosilado que comprende la puesta a disposición de un péptido, que está conjugado con uno o varios polímeros hidrófilos, y la glicosilación del péptido conjugado con polímero por medio de una o varias glicosiltransferasas. Tras aislamiento de los conjugados glicosilados a partir de la reacción de glicosilación sigue la liberación de productos glicopeptídicos a partir de los productos previos conjugados con polímero por medio de una proteasa. A tal efecto está previsto un punto disociable por vía proteolítica, a modo de ejemplo un punto de disociación de proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV), proteasa de factor Xa, de proteasa de SUMO, de proteasa del virus de moteado de venas del tabaco (TVMV) o una proteasa 3C, pudiendo estar localizado el punto disociable, por ejemplo, entre el polímero hidrófilo y el punto de glicosilación.

Además de los métodos enzimáticos clásicos existen algunas técnicas de extracción celular prometedoras para el futuro, que se basan en la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los materiales empleados. Por ejemplo se consiguieron algunos progresos en el desarrollo de materiales biohíbridos termosensibles, que inducen una tensión mecánica en el caso de modificaciones de la temperatura. Tal carga, a modo de ejemplo el hinchamiento de una estructura de hidrogel, induce el desprendimiento (deslaminación) de células adheridas y, por lo tanto, se empleó para las producciones de capas celulares de un estrato, para la denominada ingeniería de lámina celular. Sin embargo, este procedimiento requiere mantener en equilibrio la adherencia celular y el desprendimiento inducido y generar propiedades de soporte definidas por el usuario para ser empleable en diferentes tipos de células. Sin tal generación/adaptación que requiere tiempo y recursos, la carga inducida por material puede dañar la EZM celular que está aplicada sobre los materiales, con lo cual la reproducibilidad de tales procedimientos es limitada.

Además, este estado de la técnica está limitado exclusivamente a aplicaciones bidimensionales simples y una aptitud del soporte sensible a la temperatura para tejidos multicapa o más complejo es cuestionable. Tal limitación de la empleabilidad se intensifica si se trata del transporte o del tratamiento de órganos: entonces ya no son aplicables soportes termosensibles, ya que no permitirían una adherencia suficientemente fuerte (las capas de polímero presentan un grosor de solo algunos cientos de nanómetros). Otro inconveniente del soporte termosensible es la modificación de temperatura requerida para la deslaminación: existen células que son muy sensibles y no soportan modificaciones de temperatura/descensos de temperatura a largo plazo sin sufrir daños.

Recientemente, el interés creciente en el sentido de métodos ortogonales en la química de materiales condujo a la generación de hidrogeles que se podían disociar ortogonalmente mediante luz y células. El empleo de técnicas de dos fotones permite la aplicación de tales procedimientos para una fuga celular/disociación fotocontrolada a partir de estructuras de hidrogel. Tales sistemas para la extracción celular se pudieron emplear con algunos ajustes, pero la actual limitación a aparatos de dos fotones y la baja biocompatibilidad de las correspondientes reacciones fotónicas restringen esta técnica prometedora a aplicaciones en células únicas.

En resumen, los métodos fisicoquímicos para la influencia de material desarrollados hasta el momento del modo más adecuado no disponen de la instrumentación necesaria para la disociación celular cuidadosa a partir de materiales soporte de organizaciones celulares complejas, como tejidos y órganos.

El desarrollo de materiales compatibles para la generación de tejidos nuevos, la ingeniería de tejidos o para la estabilización de tejidos donados o implantes de órganos es un método general en los sectores de medicina regenerativa e investigación de implantes. Los progresos en estos campos de investigación condujeron al actual entendimiento sobre el significado de métodos de autorregeneración, en los que los tejidos u órganos *ex vivo* se pueden generar de nuevo a partir de células originales. Estos métodos traen diversos problemas nuevos – en parte también problemas de autoexclusión – en el desarrollo de materiales para la producción de tejidos e implantes de órganos. Por una parte, los cultivos celulares requieren superficies o estructuras estables biofuncionalizadas, que son similares a la matriz tridimensional extracelular y que son degradables para la expansión de las células y una subsiguiente generación de tejido por la célula. Las propiedades de fuerte adherencia celular de tales materiales son una característica importante para un desarrollo exitoso de células o tejidos. Por otra parte, para un implante exitoso, el material formado se debía separar cuidadosamente del material soporte para mantener intacta su estructura de matriz celular y extracelular. En otras palabras, se debía degradar la unión adhesiva entre material y tejido sin destruir la matriz extracelular, así como enlaces célula-célula y matriz extracelular-célula dentro del tejido. No obstante, ya que estos enlaces son de la misma o de similar naturaleza química, su disociación selectiva requiere métodos bioortogonales novedosos, no triviales, para la descomposición selectiva de la unión adhesiva entre material y tejido.

Por lo tanto, la tarea que motiva la invención consiste en disponer un material en el que una adherencia entre el material y células, tejidos u órganos sea degradable selectivamente sin destruir la unión entre las células y la matriz extracelular dentro del tejido.

La tarea de la invención se soluciona mediante un material basado en polímero con secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática, según la reivindicación 1. En este caso, las secuencias

5 polipéptidicas degradables, preferentemente disociables, son inertes frente a la actividad biológica y metabólica de células y tejidos, es decir, no son degradables mediante la actividad biológica y metabólica de células y tejidos. Las secuencias peptídicas están constituidas en cada caso por dos a quince aminoácidos y se pueden incorporar al material basado en polímero o conjugar en el material basado en polímero. Por consiguiente, la secuencia peptídica puede ser parte de una estructura tridimensional o bidimensional del material basado en polímero. Por medio de una degradación de un enlace covalente de la secuencia peptídica, controlada por adición enzimática, se efectúa una degradación bioortogonal de la estructura tridimensional o, en el caso de una conjugación de la secuencia peptídica en el material basado en polímero se efectúa la liberación de al menos una parte de la molécula.

10 El número de restos aminoácido por molécula peptídica asciende preferentemente a 5 hasta 10. El material basado en polímero puede formar una estructura reticular bidimensional o tridimensional con nudos y cantos, conteniendo al menos una parte de los nudos y/o cantos las moléculas de enlace. El material basado en polímero puede ser, por ejemplo, un hidrogel o un polímero condensado, preferentemente sólido. Según una forma ventajosa de realización de la invención, el material basado en polímero puede ser un revestimiento polimérico de un sustrato soporte (por ejemplo vidrio).

15 Según una configuración de la invención especialmente preferente, el material basado en polímero comprende al menos un componente, preferentemente bioactivo, que es liberable mediante una degradación del enlace covalente de la secuencia peptídica, controlada por adición enzimática. Este componente pertenece a un grupo de componentes constituido por principios activos, ácidos nucleicos, por ejemplo ADN, ARN o aptámeros, proteínas, conjugados peptídicos, polisacáridos sulfatados y no sulfatados y sus conjugados. En este caso, la proteína, o bien el conjugado
20 proteico, puede ser ventajosamente una citoquina, una quimiocina, un factor de crecimiento, una hormona, un anticuerpo o un componente de la matriz extracelular.

Correspondientemente a una variante de realización, las moléculas del componente liberable, al menos uno, están conjugadas en el material basado en polímero mediante engarces, que contienen respectivamente la secuencia peptídica degradable por vía enzimática.

25 Alternativamente, las moléculas del componente liberable, al menos uno, pueden estar encerradas físicamente en un retículo polimérico tridimensional y unidas físicamente a este. Mediante una degradación bioortogonal del retículo polimérico circundante se liberaron los componentes a continuación.

30 Según la invención, las secuencias peptídicas son degradables por vía enzimática presentando estas un punto disociable por vía enzimática a través de proteasas. También la liberación de principios activos, ácidos nucleicos, proteínas, conjugados proteicos o polisacáridos se puede controlar entonces a través de la adición de proteasa.

35 En este caso, la secuencia peptídica disociable presenta un punto disociable seleccionado a partir de un grupo de puntos de disociación constituido por un grupo de puntos disociables, constituido por un punto disociable a través de proteasa del virus del grabado del tabaco, un punto disociable por proteasa de rinovirus-3C humana, un punto disociable por factor X_a-proteasa, un punto disociable por trombina proteasa, un punto disociable por enteroquinasa, un punto disociable por sortasa-A-proteasa, un punto disociable por caspasa-3-proteasa, un punto disociable por granzima-B-serina-proteasa, así como un punto disociable por PreScission™. PreScission™ es un proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) y proteasa de rinovirus(HRV)-tipo-14-3C humana.

40 Como secuencias peptídicas degradables por vía enzimática se seleccionan ventajosamente aquellas secuencias peptídicas que no son degradables mediante la actividad biológica y metabólica de células y tejidos. En este caso, la secuencia peptídica se selecciona preferentemente a partir de un grupo que está constituido por ENLYFQ/X, ETVLFQ/GP, EVLFQ/GP, IEGR/IEGRX, CWGGGIEGR/MGGCG, CGGGIEGR/MGGWCG, DDDDK/, LVPRGS/FXRS, DXXD/, LEVLFQ/GP, LPET/G, DX, NX, MN y SX, indicando la barra diagonal (/) respectivamente el punto disociable, representando las letras el código de una letra de aminoácidos proteinógenos y X cualquier aminoácido presente en la naturaleza.

45 Según otra configuración de la invención, el material basado en polímero comprende además secuencias peptídicas que son degradables mediante la actividad biológica y metabólica de células y tejidos, y están incorporados al material basado en polímero o conjugados en el material basado en polímero de modo que la secuencia peptídica es parte de una estructura bidimensional o tridimensional del material basado en polímero. Mediante la actividad biológica y metabólica de células y tejidos se efectúa una degradación bioortogonal de la estructura tridimensional, o en el caso de una conjugación de la secuencia peptídica en el material basado en polímero se efectúa la liberación de al menos
50 una parte de la molécula. Estas secuencias peptídicas están unidas preferentemente a las secuencias peptídicas no degradables mediante la actividad biológica y metabólica de células y tejidos. En este caso, una adición controlada de una enzima, es decir, una adición de la enzima en caso necesario, conduce a una aceleración de la degradación de la degradación del material, o bien a una liberación de componentes acelerada.

La presente invención se puede emplear en procedimientos para la disociación según demanda, es decir, controlada temporalmente, de un enlace covalente en materiales basados en polímero, pudiéndose realizar estos procedimientos en presencia de células, tejidos y órganos vivos *in vitro* o *in vivo* bioortogonalmente. Estos empleos/procedimientos se basan en la incorporación de las secuencias peptídicas cortas degradables/disociables por vía enzimática como engarce molecular en estructuras de material basadas en polímero habituales. La degradación controlada por vía enzimática del enlace covalente conduce a una degradación de material cuando el enlace covalente degradable se encuentra dentro de la estructura del material. La degradación controlada por vía enzimática del enlace covalente conduce a que se liberen moléculas cuando el enlace degradable es respectivamente una parte de moléculas que están conjugadas en el material. Los enlaces de material degradables mediante la reacción enzimática posibilitan una aplicación ortogonal de la reacción enzimática en presencia de materias vivas, como células, tejidos u órganos, y/o en presencia de moléculas de la matriz extracelular.

El material basado en polímero provisto de la secuencia peptídica degradable se puede emplear para una liberación *in-vivo* o *in-vitro* controlada de un principio activo u otro de los componentes bioactivos liberables citados anteriormente, efectuándose la liberación mediante una degradación controlada por medio de adición enzimática del enlace covalente de la secuencia peptídica. Tal empleo se puede efectuar en especial en el ámbito de un tratamiento de células, tejidos y órganos *in vivo* o *in vitro*, en el que, en caso necesario, un principio activo y/u otro de los citados componentes bioactivos liberables se libera/n de manera controlada mediante adición enzimática.

Además, el material basado en polímero según la invención es apropiado para un cultivo celular *in-vitro* o una producción *in-vitro* de tejidos u órganos. En este caso, la disociación enzimática del material no daña la matriz extracelular ni contactos célula-célula y matriz extracelular-célula. Por consiguiente, esta posibilita la separación no destructiva de una muestra viva, es decir, de una célula, capa celular de un tejido u órgano, y su matriz extracelular a partir del material soporte mediante degradación de material en caso necesario en cualquier momento de desarrollo de la muestra viva.

El material basado en polímero provisto de la secuencia peptídica degradable se puede emplear también para la estabilización *in-vitro* de células donadas, así como de tejidos u órganos donados. Tampoco en este caso la disociación enzimática del material daña la matriz extracelular ni contactos célula-célula y matriz extracelular-célula. Mediante la disociación enzimática controlada de las secuencias peptídicas es posible separar las células/el tejido/el órgano del material soporte de manera cuidadosa/no destructiva, para posibilitar un implante exitoso.

En resumen se puede decir que el empleo de la degradación enzimática descrita como método bioortogonal para la degradación de material abre nuevas perspectivas para las aplicaciones como biomaterial de células, tejidos y órganos vivos *in vitro* o *in vivo*.

De la siguiente descripción de ejemplos de realización con referencia a los correspondientes dibujos resultan otras particularidades, características y ventajas de configuraciones de la invención. muestran:

- 35 la Fig. 1: una representación esquemática de estructuras de material basadas en polímero con secuencias peptídicas cortas disociables por vía enzimática incorporadas como engarce molecular,
- la Fig. 2: ejemplos de posibles revestimientos superficiales funcionales con secuencias peptídicas cortas disociables por vía enzimática como engarce molecular,
- la Fig. 3: ejemplos de un engarce peptídico disociable por vía enzimática también como parte de un hidrogel o de un material polimérico condensado,
- 40 la Fig. 4: el empleo de principios activos que se pueden unir al material a través de engarces peptídicos,
- la Fig. 5: una representación esquemática del empleo de una degradación de material bioortogonal para la producción de capas separadas de células, tejidos o trasplantes,
- la Fig. 6: una representación esquemática de la aplicación de la degradación de material bioortogonal para la producción de células y tejidos en aplicaciones tridimensionales,
- 45 la Fig. 7A: un esquema de reacción de una formación de conjugado PEG-péptido,
- la Fig. 7B: un análisis por HPLC de PEG-(maleimida)₄,
- la Fig. 7C: un análisis por HPLC de una mezcla de reacción de PEG-(maleimida)₄ con un péptido disociable,

- la Fig. 8A-8B: una vista esquemática de la formación de retículo de hidrogel mediante una adición de Michael,
- la Fig. 9: imágenes microscópicas con un ejemplo de un cultivo de larga duración en hidrogeles degradables con FXa,
- 5 la Fig. 10: imágenes microscópicas ópticas de la formación de capas de células endoteliales corneales humanas (HCEC) con degradación de hidrogel simultánea,
- la Fig. 11A: imágenes microscópicas ópticas de la formación de capas de células endoteliales corneales humanas (HCEC) con degradación de hidrogel simultánea, y
- la Fig. 11B: imágenes microscópicas ópticas de diversos ejemplos de capas de HCEC formadas.

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para la disociación según demanda, es decir, controlada temporalmente, del enlace covalente en materiales basados en polímero, que se realiza en presencia de células, tejidos u órganos vivos *in vitro* o *in vivo* bioortogonalmente, como se representa en forma esquemática en la Fig. 1. Este procedimiento se basa en la incorporación de secuencias peptídicas cortas disociables por vía enzimática como engarces moleculares, es decir, moléculas de unión, en estructuras de material habituales basadas en polímero, como hidrogeles o polímeros de condensación.

15 La imagen I de la Fig. 1 muestra esquemáticamente una molécula peptídica multifuncional con la estructura general R-C-B-A-R, moléculas peptídicas bifuncionales con las estructuras generales R-B-A-R y R-C-A-R, así como una molécula peptídica monofuncional con la estructura general R-A-R, representando R respectivamente un resto polimérico de material.

20 En este caso, A es una secuencia peptídica disociable por vía enzimática, que se puede disociar mediante una adición enzimática controlada. Estas enzimas son preferentemente proteasas, como se indica en la Tabla 1. Del mismo modo, en la Tabla 1, a estas proteasas se asignan respectivamente secuencias peptídicas disociables, que se pueden disociar mediante las correspondientes proteasas en los puntos de disociación (/).

25 Los péptidos indicados son ejemplos de péptidos que son inertes frente a la actividad biológica y metabólica general del tejido vivo, pero que se pueden someter a una disociación enzimática selectiva mediante enzimas específicas. Las enzimas indicadas en la Tabla 1 pueden disociar las secuencias de aminoácidos con una selectividad muy elevada, pero son exclusivamente inactivas frente a la disgregación de proteínas matriz tanto celulares como también extracelulares.

Tabla 1 Proteasas

Proteasas (abreviatura)	Secuencia peptídica disociable con punto de disociación (/)
Proteasa de virus del grabado del tabaco (TEV)	ENLYFQ/X
Proteína de rinovirus 3C humana (3C)	E(T)VLFQ/GP
Factor X _a (X _a)	IEGR/IEGRX
Thr trombina-proteasa	LVPRGS/FXRS
EntK enteroquinasa	DDDDK/
Caspasa Caspasa-3	DXXD/
PreScission™	LEVLFG/GP
Sortasa A	LPET/G
Granzima B serina (riesgo elevado de disociación inespecífica)	DX, NX, MN, SX

30 La letra B en las estructuras de la Fig. 1 representa motivos peptídicos bioactivos que son diferentes a las secuencias peptídicas A disociables por vía enzimática, por ejemplo una secuencia de RGD adhesiva con la célula.

La letra C en las estructuras de la Fig. 1 indica motivos peptídicos bioactivos que son diferentes a las secuencias peptídicas A disociables por vía enzimática, por ejemplo una secuencia de MMP sensible a la célula, es decir, una secuencia peptídica que es disociable mediante metaloproteasa matriz.

La imagen II de la Fig. 1 muestra un módulo de tipo C como secuencia de MMP sensible a la célula y un módulo enzimático ortogonalmente con una secuencia peptídica de tipo A, que están unidos entre sí por una parte, y respectivamente con uno de dos módulos de material por otra parte. Como muestra la Fig. 1 en la imagen II, las enzimas MMP excretadas por la célula pueden asegurar una disociación de la secuencia sensible a la célula del módulo C. La vista esquemática de la imagen II de la Fig. 1 muestra un producto de disociación de la secuencia C de MMP junto con un módulo de material, así como la secuencia peptídica A no disociada, que está unida por una parte al segundo producto de disociación de la secuencia de MMP y por otra parte al segundo módulo de unión de material.

El lado derecho de la imagen II en la Fig. 1 muestra una disociación ortogonal de la secuencia peptídica A disociable por vía enzimática. Una adición controlada de una enzima, es decir, una adición de la enzima según demanda, conduce en este caso a la disociación ortogonal del módulo A disociable por vía enzimática y, por consiguiente, a una aceleración de la degradación del material. Como producto de disociación se forma por un lado una parte con un motivo peptídico de la secuencia peptídica A disociada por vía enzimática, que está unida a un módulo de unión de material. Como segundo producto de disociación se forma un motivo peptídico de la secuencia peptídica A disociable por vía enzimática, que está unida a la secuencia C, que está enlazada por su parte con el módulo de material.

Los péptidos A disociables por vía enzimática empleados según la invención son inertes frente a la actividad biológica y metabólica general del tejido vivo, pero se pueden someter a una disociación enzimática mediante enzimas específicas, como se muestra en la Tabla 1. La disociación enzimática del material no daña la matriz extracelular ni contactos célula-célula y matriz extracelular-célula. Por consiguiente, posibilita la separación de la muestra viva y su matriz extracelular del soporte de material mediante degradación del material, según demanda en cualquier punto del desarrollo de la muestra viva. A continuación se describen también diversas vías de síntesis para el alojamiento de una secuencia peptídica disociable en materiales blandos y condensados basados en polímero habituales, que posibilita tal incorporación en la mayor parte de materiales para aplicaciones biológicas.

Como muestra la Fig. 2, un engarce con una secuencia peptídica disociable por vía enzimática se puede alojar como una parte de un revestimiento, permitiendo la secuencia peptídica disociable el desprendimiento de cada uno de los objetos que están colocados en el revestimiento a través del engarce.

En la imagen I, la Fig. 2 muestra esquemáticamente el revestimiento de un sustrato básico de SiO₂ por vía conocida, en primer lugar con uno o varios revestimientos poliméricos funcionalizados con enlace covalente o adhesivo (química covalente o adhesiva), sobre el que se efectúa entonces un revestimiento con péptidos. Los péptidos con las secuencias peptídicas disociables unen como engarce molecular los grupos funcionales de la capa polimérica con un compuesto activo.

Como muestra la imagen inferior II en la Fig. 2, mediante un segundo revestimiento parcial se puede generar una superficie estructurable biosensible no estando recubierta solo una parte del revestimiento peptídico con los compuestos activos en la superficie en un revestimiento.

Por medio de Ejemplos I, II, III y IV, la Fig. 3 muestra esquemáticamente la incorporación de engarces peptídicos disociables por vía enzimática en un hidrogel o un material polimérico condensado. Como muestran los ejemplos en la Fig. 3, el engarce disociable por vía enzimática es parte del hidrogel, o bien del material polimérico condensado, permitiendo el engarce disociable, en caso necesario, la degradación controlada del hidrogel, o bien de la estructura de material polimérico condensado. A consecuencia de la degradación, en este caso se liberan objetos que están unidos al material o encerrados en el material.

El Ejemplo I en la Fig. 3 muestra esquemáticamente la formación de un hidrogel/polímero de condensación a partir de polímeros biohíbridos. Se pueden producir polímeros biohíbridos mediante la copulación de polímeros no biológicos, como por ejemplo polietilenglicol (PEG) o poliacrilamida, con componentes biológicos como sacáridos, módulos proteicos y/o elementos de ADN. En este caso, el Ejemplo I muestra un polímero en forma de estrella, en cuyos extremos se encuentra respectivamente una secuencia peptídica. Las secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática, unen los polímeros biohíbridos entre sí, estando colocados respectivamente componente biológicos en varias secuencias peptídicas, que se encuentran en los extremos de las moléculas poliméricas en forma de estrellas. Por consiguiente, las secuencias peptídicas disociables son parte del hidrogel. Por consiguiente, los componentes biológicos están colocados en el material, o bien encerrados en el material. Mediante la adición de una enzima y la disociación de la secuencia peptídica del material biológico controlada de este modo se efectúa una degradación del material de hidrogel, con lo cual se libera el componente biológico, y las secuencias peptídicas permanecen en las moléculas no biológicas.

El Ejemplo II de la Fig. 3 representa esquemáticamente la generación de un material basado en polímero en un hidrogel o producto de condensación de polímeros en forma de estrella, por ejemplo PEG en forma de estrella, en la que las secuencias peptídicas disociables por vía enzimática unen los extremos de la variedad de moléculas poliméricas en

forma de estrella para dar una estructura reticular que forma nudos y cantos. Mediante adición enzimática y la disociación de las secuencias peptídicas provocada de este modo se puede efectuar una degradación controlada de la estructura reticular en polímeros en forma de estrella separados, en cuyos extremos se encuentran respectivamente los restos de la secuencia peptídica disociada en forma de motivos peptídicos.

5 En el Ejemplo III de la Fig. 3, las secuencias peptídicas disociables por vía enzimática son parte de un hidrogel/polímero de condensación con polímeros ramificados con cadenas laterales cortas, estando unidas las moléculas ramificadas entre sí en los extremos de sus cadenas laterales a través de las secuencias peptídicas disociables. Mediante adición enzimática y la disociación de las secuencias peptídicas provocada de este modo se puede efectuar una degradación controlada de la estructura reticular en polímeros ramificados separados con motivos
10 peptídicos de las secuencias peptídicas disociadas en los extremos de las cadenas laterales.

En el Ejemplo IV según la Fig. 3, las secuencias peptídicas disociables por vía enzimática son parte de un hidrogel/polímero de condensación con polímeros lineales, estando unidas entre sí las moléculas lineales en los extremos de sus cadenas laterales a través de las secuencias peptídicas disociables, y formándose un ovillo. Mediante adición enzimática y la disociación de las secuencias peptídicas provocada de este modo se puede efectuar una
15 degradación controlada de la estructura de ovillo en polímeros lineales separados, en cuyos extremos se encuentran motivos peptídicos de las secuencias peptídicas disociadas.

La Fig. 4 muestra esquemáticamente la aplicación de la invención para la liberación de principios activos, que están unidos al material mediante un engarce molecular con una secuencia peptídica disociable. Esto permite una emisión de principio activo según demanda, controlada temporalmente, estando colocado el principio activo en la superficie
20 del material o en la estructura del material como aplicación tridimensional.

La imagen I de la Fig. 4 muestra esquemáticamente la generación de un material basado en polímero en forma de un hidrogel o polímero de condensación, en el que las moléculas de un polímero en forma de estrella, por ejemplo PEG en forma de estrella, están unidas por medio de moléculas de engarce, que contienen secuencias peptídicas disociables enzimáticamente, en los extremos de las moléculas poliméricas para dar una estructura reticular
25 tridimensional. Mediante adición de un principio activo en la generación de la estructura reticular, las moléculas de principio activo se encierran físicamente en la estructura reticular. Mediante adición enzimática y la disociación de las secuencias peptídicas provocada de este modo se puede efectuar entonces una degradación controlada de la estructura reticular en polímeros en forma de estrella separados, en cuyos extremos se encuentran respectivamente los restos de la secuencia peptídica disociada en forma de motivos peptídicos. Mediante la degradación de la estructura
30 reticular se liberan también los principios activos antes encerrados físicamente en la estructura reticular.

En la Fig. 4, la imagen II muestra esquemáticamente la formación de un material tridimensional reticulado a partir de polímeros biohíbridos, preferentemente un hidrogel o un polímero de condensación, en cuya superficie se colocan moléculas que contienen respectivamente una secuencia peptídica disociable por vía enzimática con un principio activo unido mediante enlace covalente. Mediante la adición de la enzima se efectúa la disociación del enlace
35 covalente, lo que conduce a la liberación de las moléculas de principio activo con motivos peptídicos unidos mediante enlace covalente de las secuencias peptídicas disociadas. De este modo es posible una liberación de principio activo controlada por medio de adición enzimática, conservándose el retículo tridimensional (hidrogel o polímero de condensación).

El procedimiento de una degradación de material bioortogonal se puede utilizar también para la producción de capas separadas de células y tejidos y trasplantes, o en aplicaciones tridimensionales (Fig. 5).
40

La Fig 5 muestra una representación esquemática de la aplicación de la degradación de material bioortogonal para la producción de capas separadas de células, tejidos o trasplantes, en el que el material a añadir es un hidrogel. Este hidrogel comprende un retículo polimérico que, como se muestra en la Fig. 5, se genera mediante mezclado de un componente polimérico en forma de estrella, un segundo componente en forma de un sacárido o un glicosaminoglicano (GAGs), así como una secuencia peptídica corta disociable. Estos tres componentes forman conjuntamente un retículo polimérico en el que se encuentra respectivamente una secuencia peptídica en los extremos del polímero en forma de
45 estrella. A cada molécula de sacárido o GAG están unidas respectivamente varias secuencias peptídicas, que no están unidas a la misma molécula polimérica. De este modo se forma el retículo polimérico para dar el hidrogel, cuya parte son las secuencias peptídicas disociables. Las secuencias peptídicas disociables como parte de la estructura tridimensional del material basado en polímero son esenciales para la existencia de la estructura, de modo que, en el caso de disociación, o bien de degradación de la unión de las secuencias peptídicas, se efectúa una degradación bioortogonal de la estructura parcial a completa. Tras la formación de hidrogel, como se muestra en la parte superior de la Fig. 5, las células se aplican sobre el hidrogel, mediante lo cual se produce el crecimiento celular. Tras la formación de la capa celular o tejido, o bien la producción del trasplante, se puede degradar la unión adhesiva entre
50 el material basado en polímero y la capa celular/el tejido/el trasplante/implante, efectuándose una adición enzimática
55

controlada. La enzima asegura la disociación/degradación de un enlace covalente de las secuencias peptídicas, lo que tiene por consecuencia una degradación bioortogonal de la estructura de material tridimensional. En este caso, el retículo polimérico se descompone en moléculas poliméricas en forma de estrella con motivos peptídicos terminales de la secuencia peptídica disociada previamente, así como moléculas de sacárido o GAG, asimismo con motivos peptídicos unidos de la secuencia peptídica disociada, con lo cual el polímero en forma de estrella, así como el sacárido o GAG, se desprenden de manera cuidadosa y selectiva de la capa celular o de tejido, o bien del trasplante/implante.

La Fig. 6 ilustra en forma de una representación esquemática la aplicación de la degradación de material bioortogonal para la producción de células y tejidos en aplicaciones tridimensionales. En este caso se genera un retículo polimérico mediante mezclado de un componente polimérico en forma de estrella en cuyos cuatro extremos se encuentra respectivamente una secuencia peptídica corta disociable, así como de un sacárido o un GAG. En cada molécula de sacárido o GAG, en el retículo están unidas respectivamente varias secuencias peptídicas, que no están enlazadas a la misma molécula polimérica (formación de un retículo). Mediante adición de células en la generación de la estructura reticular, las células se unen físicamente en la estructura reticular. La estructura reticular tridimensional ofrece un esqueleto estable para las células, que es similar a la matriz tridimensional extracelular. Tras la producción exitosa del tejido, este se puede separar de manera cuidadosa y selectiva del material soporte tridimensional mediante la disociación enzimática controlada de secuencias peptídicas, descomponiéndose el retículo tridimensional en moléculas poliméricas en forma de estrella con motivos peptídicos terminales de la secuencia peptídica disociada previamente, así como moléculas de sacárido o GAG, asimismo con motivos peptídicos enlazados de la secuencia peptídica disociada.

Esta invención pone a disposición una nueva herramienta para investigadores o personal médico en la extracción, almacenamiento, así como cultivo/cría de células, tejidos, órganos vivos, que no se encuentran disponibles en otros métodos.

A continuación se describen detalladamente otros ejemplos de realización: se efectuó una síntesis de conjugados de PEG-(FXa)₄, como se representa esquemáticamente en la Fig. 7A. La síntesis de conjugados de PEG-(FXa)₄ se realizó como se describió también anteriormente en la publicación Tsurkan M. V. et al. Defined polymer-peptide conjugates to form cell-instructive starPEG-heparin matrices in situ. Adv. Mater. 25, 2606-2610 (2013). Se debe entender por péptido Fxa un péptido que presenta un punto disociable mediante factor X_a-proteasa

Se disolvieron brevemente 427 mg de PEG-maleimida en 10 ml acetonitrilo/agua al 50 % (v/v) y se mezclaron con 300 mg de péptido FXa (30 % de exceso), que estaba disuelto en 15 ml de acetonitrilo/agua al 50 % (v/v). Se ajustó el valor de pH de la mezcla de reacción a pH 7,5 – 8 mediante NaOH 1 M. Se realizó la reacción durante 5 horas bajo atmósfera de nitrógeno, y se siguió el fin de la reacción a través de HPLC analítica. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC preparativa. Se recogió el producto de la HPLC y se liofilizó durante más de 24 horas. Después se almacenó el polvo blanco formado a -20°C. El esquema de síntesis y el control de la reacción por HPLC se indican en las figuras Fig. 7A, Fig. 7B y Fig 7C.

Formación de hidrogel:

La representación esquemática de la formación de hidrogel y las propiedades mecánicas como función del grado de reticulación de hidrogel se muestran en las figuras Fig. 8A y Fig. 8B. El retículo de hidrogel se forma mediante reacción de adición de Michael bajo formación de puntos de reticulación peptídicos (nudos). El contenido en producto sólido total de todas las mezclas de gel se mantuvo siempre en 5 % (50 mg/ml) independientemente del grado de reticulación (lo que corresponde a una proporción molar PEG / CSMal₆ = \underline{c}). Un ajuste sencillo de la proporción volumétrica de PEG-(FXa)₄ y CSMal₆, con mantenimiento de un volumen total constante, posibilita el ajuste del hinchamiento y de la rigidez de los hidrogeles formados. En este caso, CS es la abreviatura de sulfato de condroitina, Mal es la abreviatura de maleimida.

Formación de capas de HCEC durante la degradación de hidrogel:

Las células endoteliales corneales humanas inmortalizadas de la línea (HCEC) HCEC-B4G12, como se describen en la publicación Valtink M. et al. Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. Cells. Tissues. Organs 187, 286-94 (2008), se cultivaron en SFM endotelial humano (SFM = medio de cultivo de órgano corneal exento de suero), complementado con 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante básico (bFGF). Las HCEC se sembraron con una densidad de 1×10^5 células por cm² en los hidrogeles degradables con FXa. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía 5 % de CO₂. El medio se cambió tres veces por semana. La formación de hidrogel y las propiedades mecánicas en función del grado de reticulación de hidrogel se muestran en la Fig. 9. La Fig. 9 muestra imágenes microscópicas del cultivo de HCEC de larga duración en hidrogeles degradables con FXa. Los hidrogeles

disociables con FXa de grado de reticulación $\gamma = 1,25$ se consideraron apropiados para el procedimiento de cultivo de HCEC, ya que después de 48 horas (2 días) se formó una capa celular casi unida.

5 Después de siete días de cultivo en los hidrogeles degradables con FXa se incubaron las muestras en SFM endotelial humano w/factor Xa-endoproteasa 900 nM durante 45 minutos a 37°C. Tras este tiempo, la monocapas celulares se habían liberado completamente y se pudieron tratar minuciosamente con una cánula 20-gauge (HSW Fine Ject, Tuttlingen, Alemania). Las figuras microscópicas ópticas de la formación de capa de HCEC durante la degradación de hidrogel se representan en las figuras complementarias Fig. 10 y Fig. 11A.

10 Por medio de imagenes microscópicas ópticas, la Fig. 10 muestra la formación de capas de HCEC durante la degradación de hidrogel en SFM endotelial humano w/factor Xa-endoproteasa 450 nM a 37°C. Se pudo observar una degradación completa después de 120 minutos.

Por medio de imagenes microscópicas ópticas, la Fig. 11A muestra la formación de capas de HCEC durante la degradación de hidrogel en SFM endotelial humano w/factor Xa-endoproteasa 900 nM a 37°C. Después de 45 minutos tuvo lugar una degradación completa.

La Fig. 11B muestra diferentes imágenes microscópicas ópticas de diversos ejemplos de la capa de HCEC formada.

15 LISTA DE SECUENCIAS

<110> IPF Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

<120> Material basado en polímero con secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática

<130> IPF17-15-EP

20 <140> EP 16163667.5
<141> 2016-04-04

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

25 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática, Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza

35 <400> 1
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Xaa
1 5

40 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática
- <400> 2
Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5
- 5 <210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
10 <223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática
- <400> 3
Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
- <210> 4
<211> 4
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática, Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza
- <400> 4
25 Asp Xaa Xaa Asp
1
- <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática, Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza
- <220>
<221> misc_feature
35 <222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza
- <400> 5
Ile Glu Gly Arg Ile Glu Gly Arg Xaa
1 5
- 40 <210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática
- <400> 6
Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5
- 5 <210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática
- <400> 7
Leu Pro Glu Thr Gly
1 5
- 15 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática, Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza
- <400> 8
Leu Val Pro Arg Gly Ser Phe Xaa Arg Ser
1 5 10
- 25 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia peptídica degradable por vía enzimática
- <400> 9
Glu Thr Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

REIVINDICACIONES

- 1.- Material basado en polímero con secuencias peptídicas unidas mediante enlace covalente, degradables por vía enzimática, que presentan al menos un punto disociable por vía enzimática mediante proteasas, que se selecciona a partir de un grupo de puntos disociables constituido por un punto disociable a través de proteasa del virus del grabado del tabaco, un punto disociable por proteasa de rinovirus-3C humana, un punto disociable por factor X_a-proteasa, un punto disociable por trombina proteasa, un punto disociable por enteroquinasa, un punto disociable por sortasa-A-proteasa, un punto disociable por caspasa-3-proteasa, un punto disociable por granzima-B-serina-proteasa, un punto disociable mediante una proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) y proteasa de rinovirus(HRV)-tipo-14-3C humana, estando constituidas las secuencias peptídicas respectivamente por dos a quince aminoácidos e incorporándose al material basado en polímero o conjugándose en el material basado en polímero de modo que son moléculas de unión (engarces) en una estructura bidimensional o tridimensional del material basado en polímero, de modo que por medio de una degradación de un enlace covalente de la secuencia peptídica, controlada mediante adición enzimática, se efectúa degradación bioortogonal de la estructura tridimensional o, en el caso de una conjugación de la secuencia peptídica en el material basado en polímero, se efectúa la liberación de al menos una parte de la molécula.
- 2.- Material basado en polímero según la reivindicación 1, caracterizado por que el material basado en polímero es un hidrogel o un polímero condensado.
- 3.- Material basado en polímero según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el material basado en polímero comprende al menos un componente bioactivo, que es liberable mediante una degradación del enlace covalente de la secuencia peptídica, controlada por adición enzimática, y que pertenece a un grupo de componentes constituido por principios activos, ácidos nucleicos (ADN, ARN, aptámeros), proteínas, conjugados peptídicos, polisacáridos sulfatados y no sulfatados y sus conjugados.
- 4.- Material basado en polímero según la reivindicación 3, caracterizado por que las moléculas del componente liberable, al menos uno, están conjugadas en el material basado en polímero por medio de engarces, que contienen respectivamente la secuencia peptídica degradable por vía enzimática.
- 5.- Material basado en polímero según la reivindicación 3, caracterizado por que las moléculas del componente liberable, al menos uno, están encerradas físicamente en un retículo polimérico tridimensional y/o están unidas físicamente a este.
- 6.- Material basado en polímero según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que las secuencias peptídicas degradables por vía enzimática no son degradables por medio de la actividad biológica y metabólica de células y tejidos.
- 7.- Material basado en polímero según la reivindicación 6, caracterizado por que la secuencia peptídica disociable que presenta un punto disociable por proteasa, se selecciona a partir de un grupo constituido por ENLYFQ/X, ETVLFQ/GP, EVLFQ/GP, IEGR/IEGRX, CWGGGIEGR/MGGCG, CGGGIEGR/MGGWCG, DDDDK/, LVPRGS/FXRS, DXXD/, LEVLFQ/GP, LPET/G, DX, NX, MN y SX, indicando la barra diagonal (/) respectivamente el punto disociable, representando las letras el código de una letra de aminoácidos proteinógenos y X cualquier aminoácido presente en la naturaleza.
- 8.- Material basado en polímero según la reivindicación 6 o 7, que comprende además secuencias peptídicas que son degradables mediante la actividad biológica y metabólica de células y tejidos, y están incorporadas en el material basado en polímero o conjugadas en el material basado en polímero de modo que son moléculas de unión (engarces) en una estructura bidimensional o tridimensional del material basado en polímero, de modo que por medio de la actividad biológica y metabólica de células y tejidos se efectúa una degradación bioortogonal de la estructura tridimensional o, en el caso de una conjugación de la secuencia peptídica en el material basado en polímero, se efectúa la liberación de al menos una parte de la molécula.
- 9.- Material basado en polímero según una de las reivindicaciones 3 a 8 para empleo para una liberación *in-vivo* controlada del componente liberable, que se efectúa por medio de una degradación del enlace covalente de la secuencia peptídica, controlada por medio de adición de proteasa.
- 10.- Material basado en polímero para empleo según la reivindicación 9 para un tratamiento *in-vivo* de células, tejidos y órganos, en el que, en caso necesario, un principio activo y/u otro de los citados componentes bioactivos liberables se libera/n de manera controlada mediante adición de proteasa.

11.- Empleo de un material basado en polímero según una de las reivindicaciones 1 a 8 para un cultivo celular *in-vitro* o una producción *in-vitro* de tejidos u órganos.

12.- Empleo de un material basado en polímero según una de las reivindicaciones 1 a 8 para la estabilización *in-vitro* de células, tejidos y órganos donados.

5 13.- Empleo de un material basado en polímero según una de las reivindicaciones 3 a 8 para un procedimiento *in-vitro* en el que, en caso necesario, se efectúa una degradación del enlace covalente de la secuencia peptídica, controlada por medio de adición de proteasa, y de este modo se efectúa una liberación del componente liberable.

10 14.- Empleo según la reivindicación 13 en el tratamiento *in-vitro* de células, tejidos u órganos vivos, liberándose de manera controlada, en caso necesario, un principio activo y/u otro de los citados componentes bioactivos liberables mediante adición de proteasa.

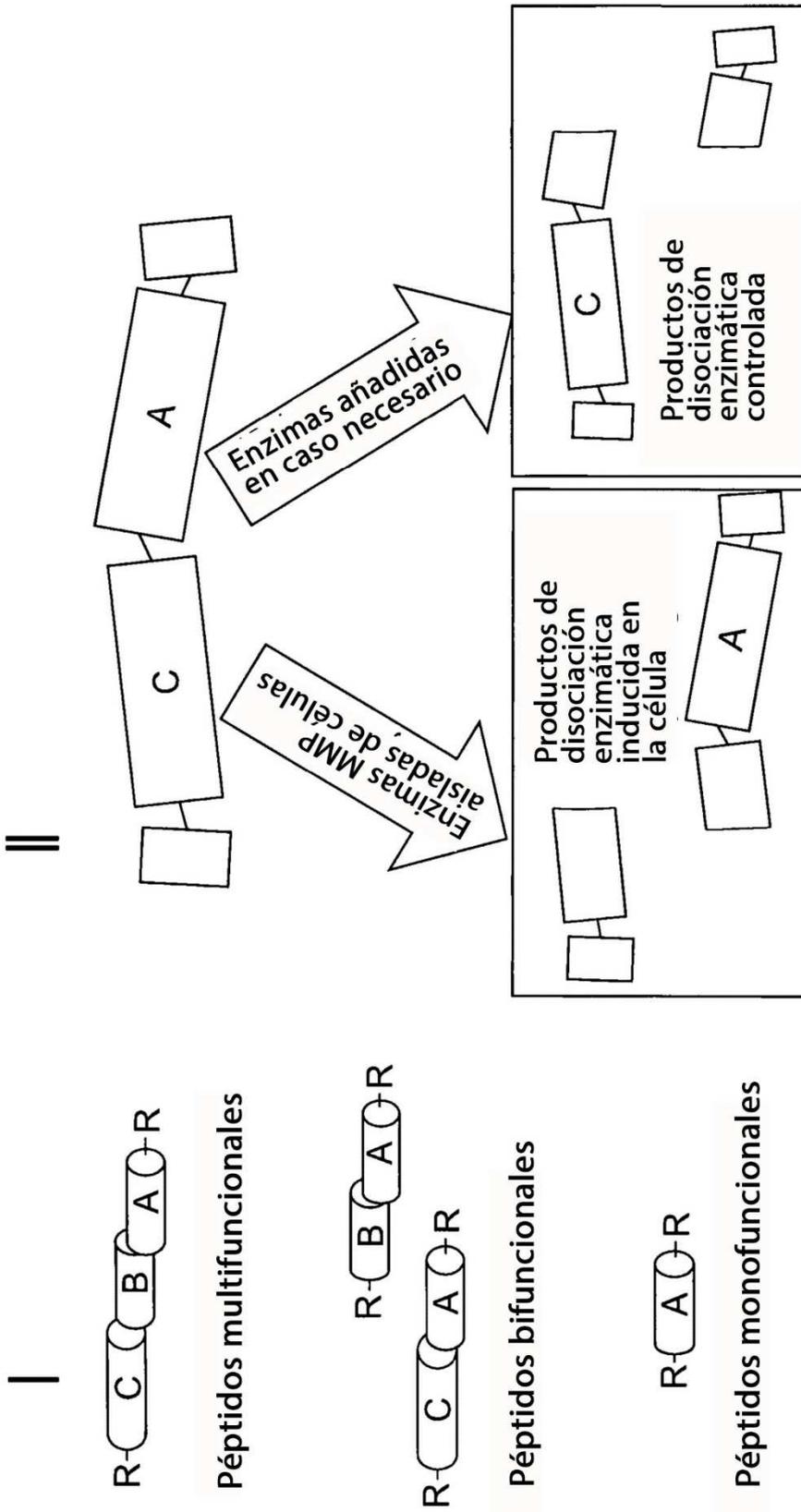


Fig. 1

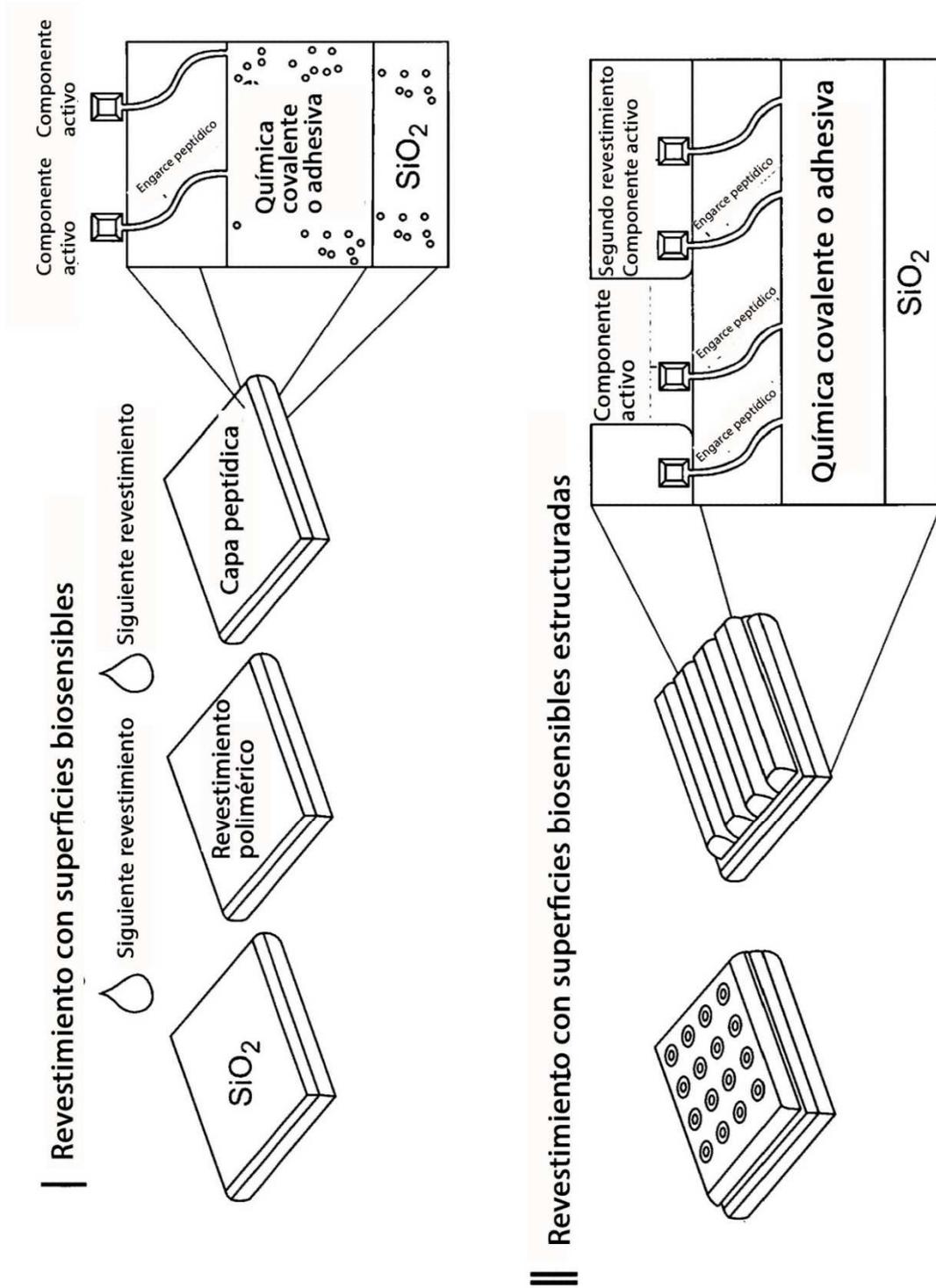


Fig. 2

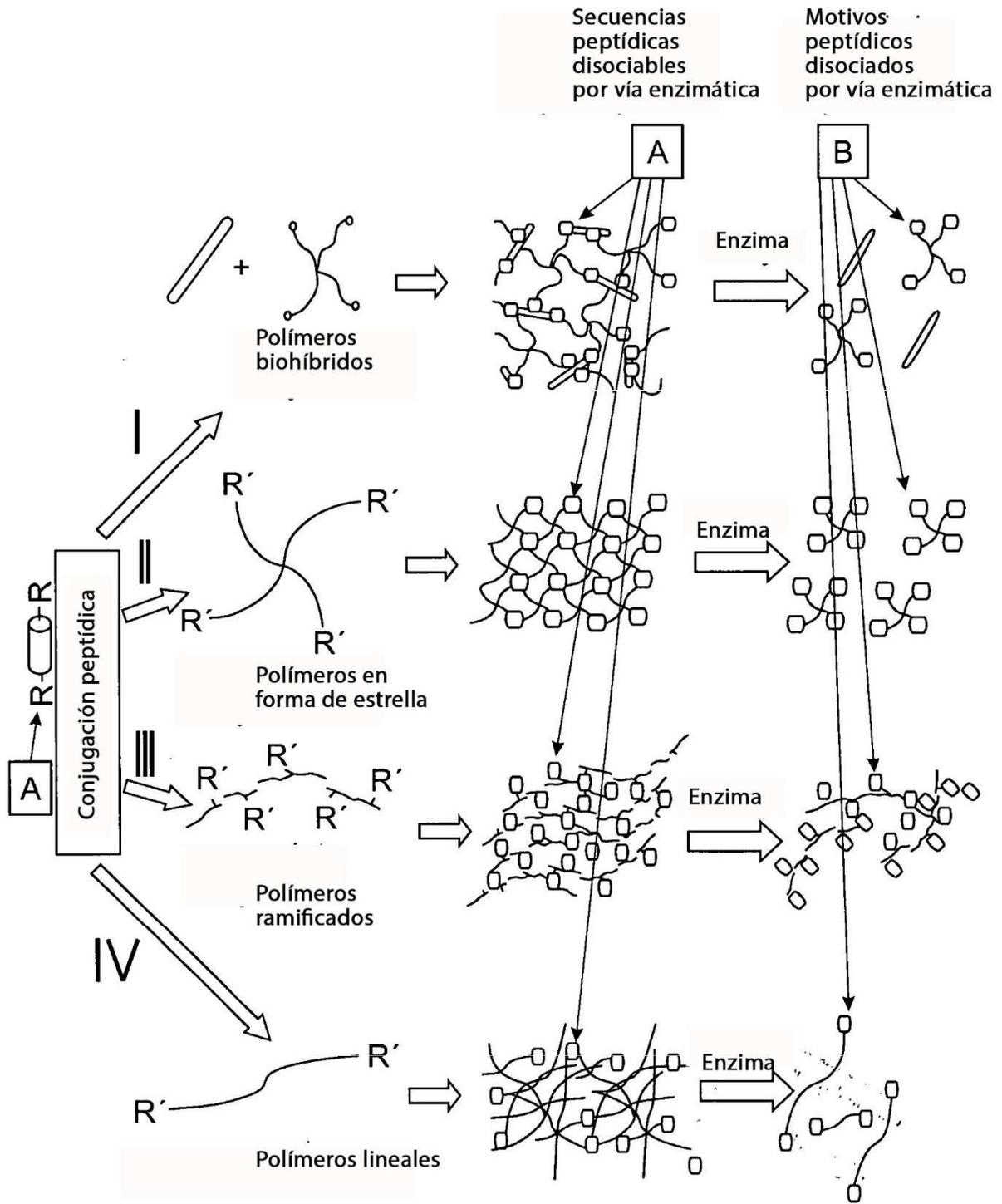


Fig. 3

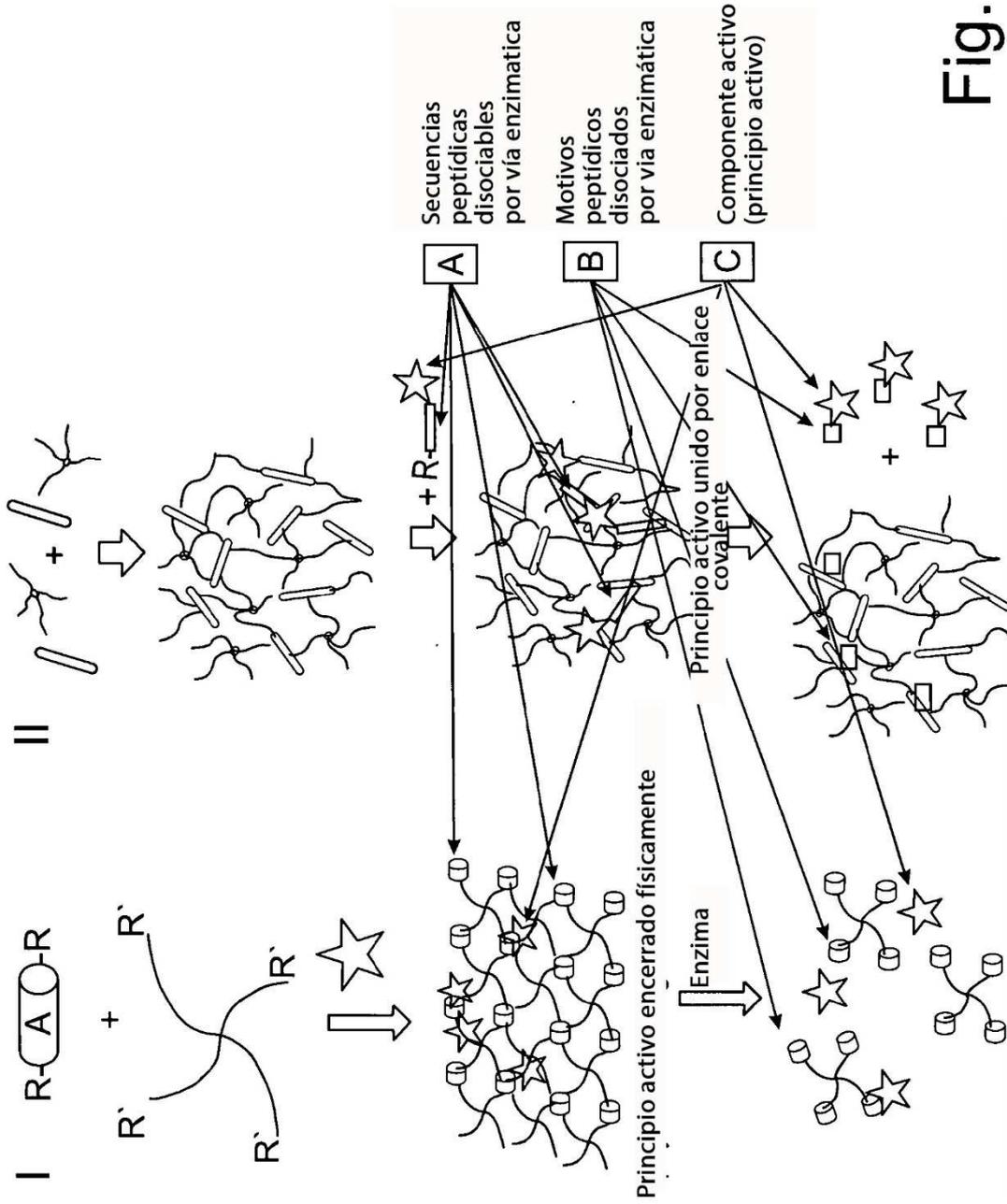


Fig. 4

Liberación de principio activo según demanda Liberación de principio activo según demanda

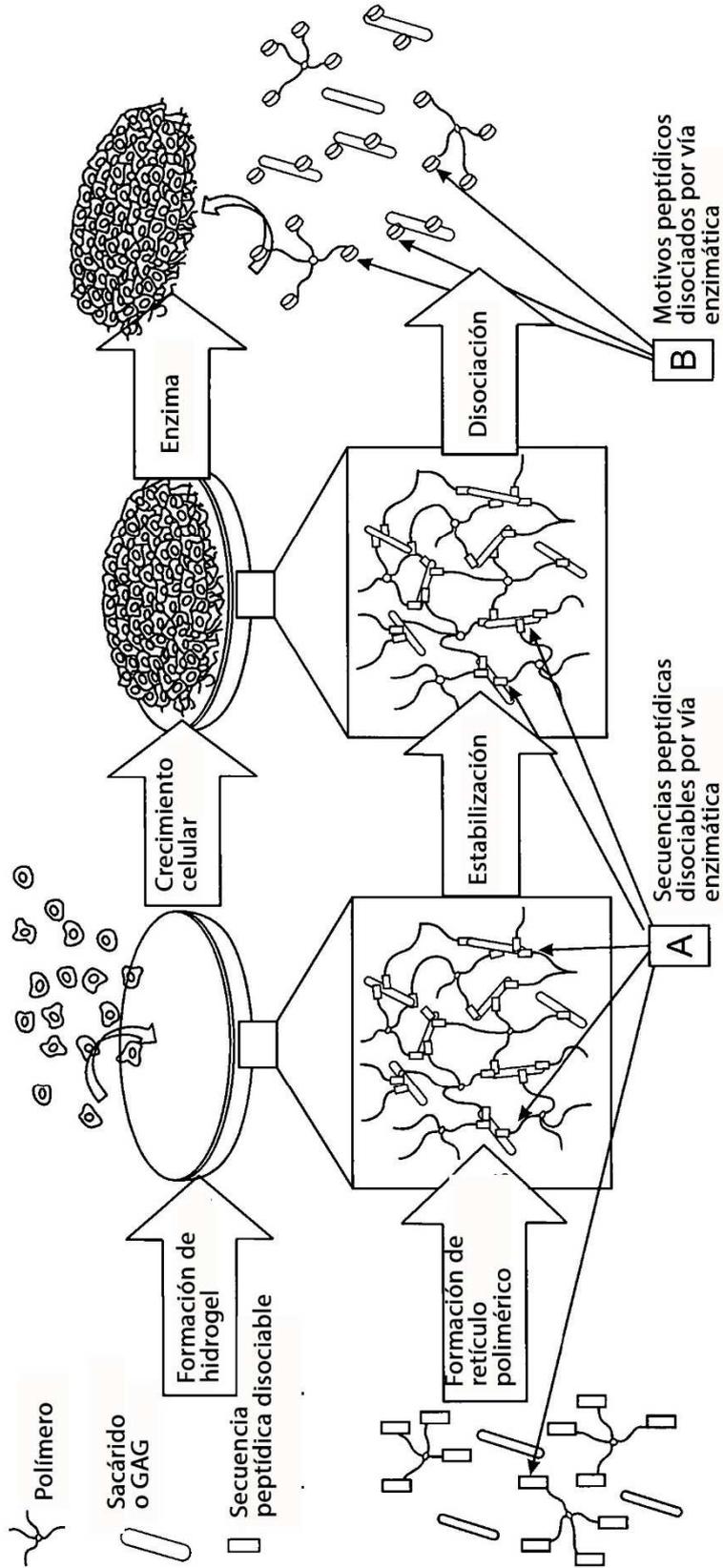


Fig. 5

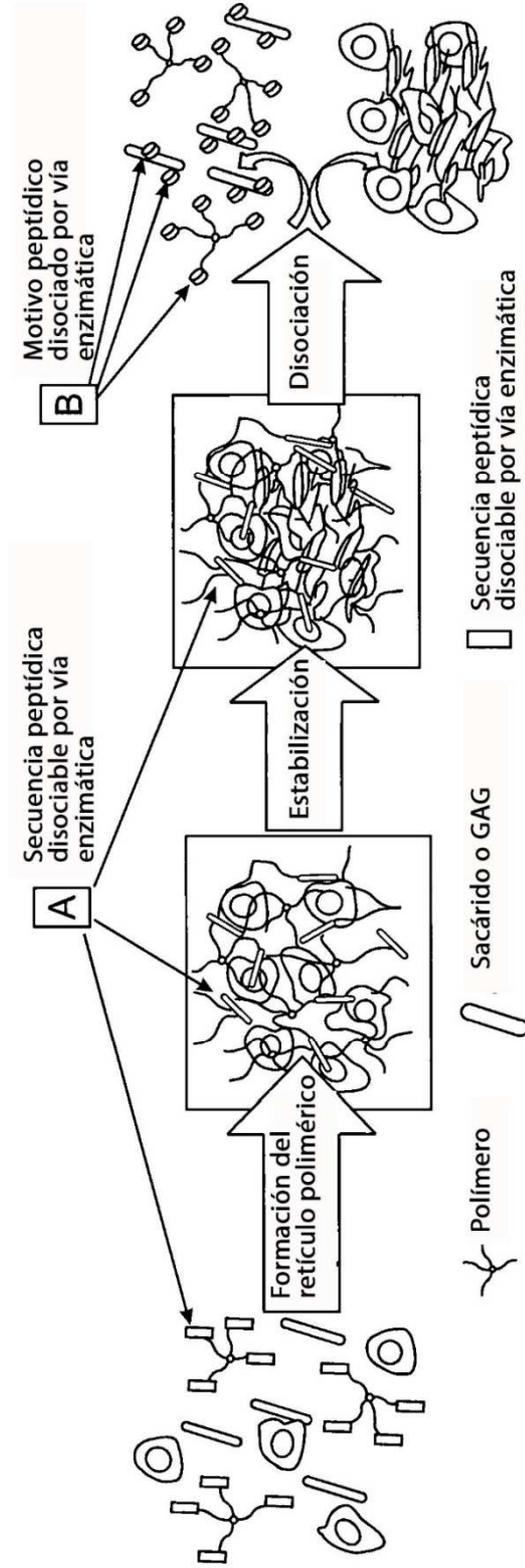


Fig. 6

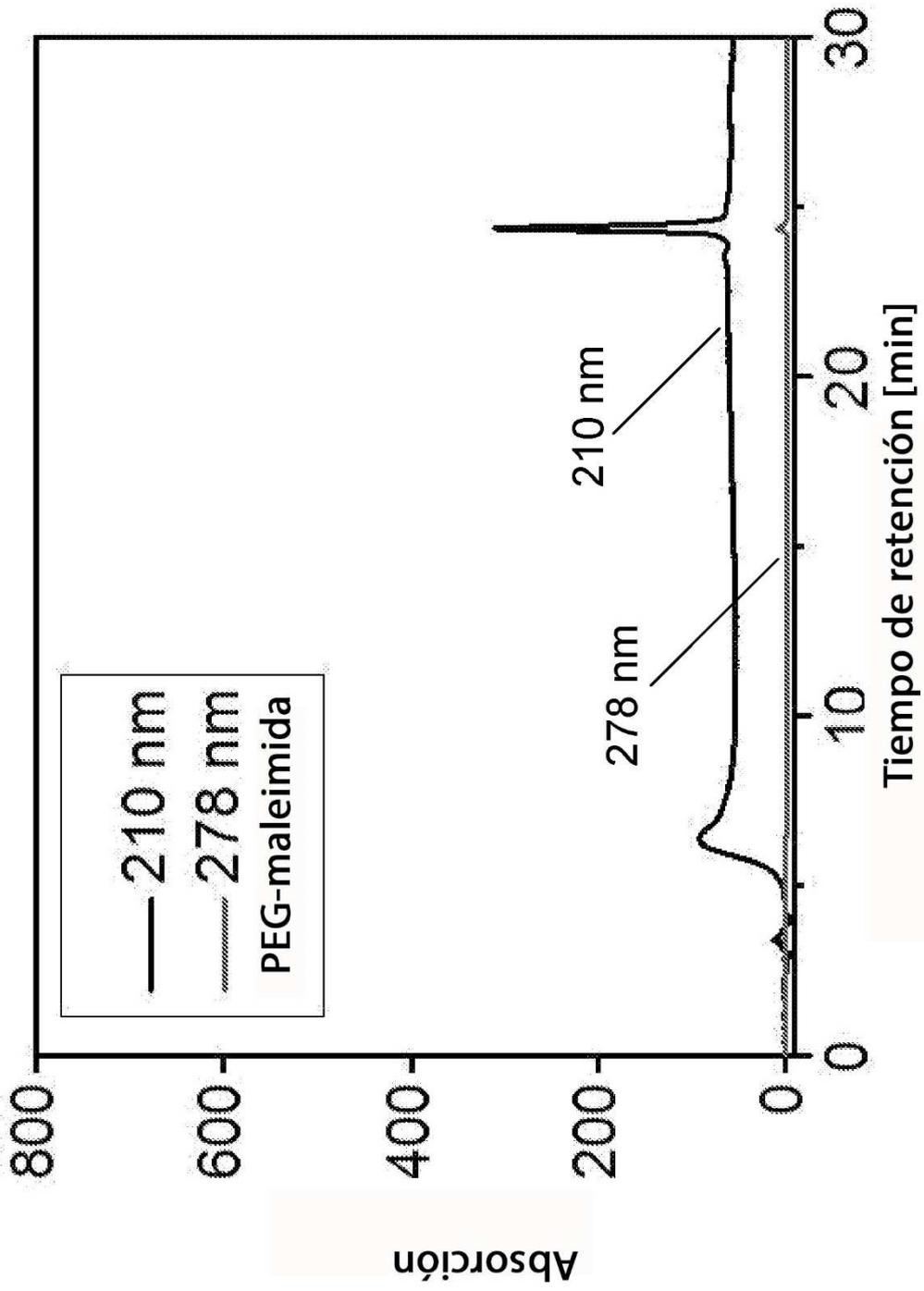


Fig. 7B

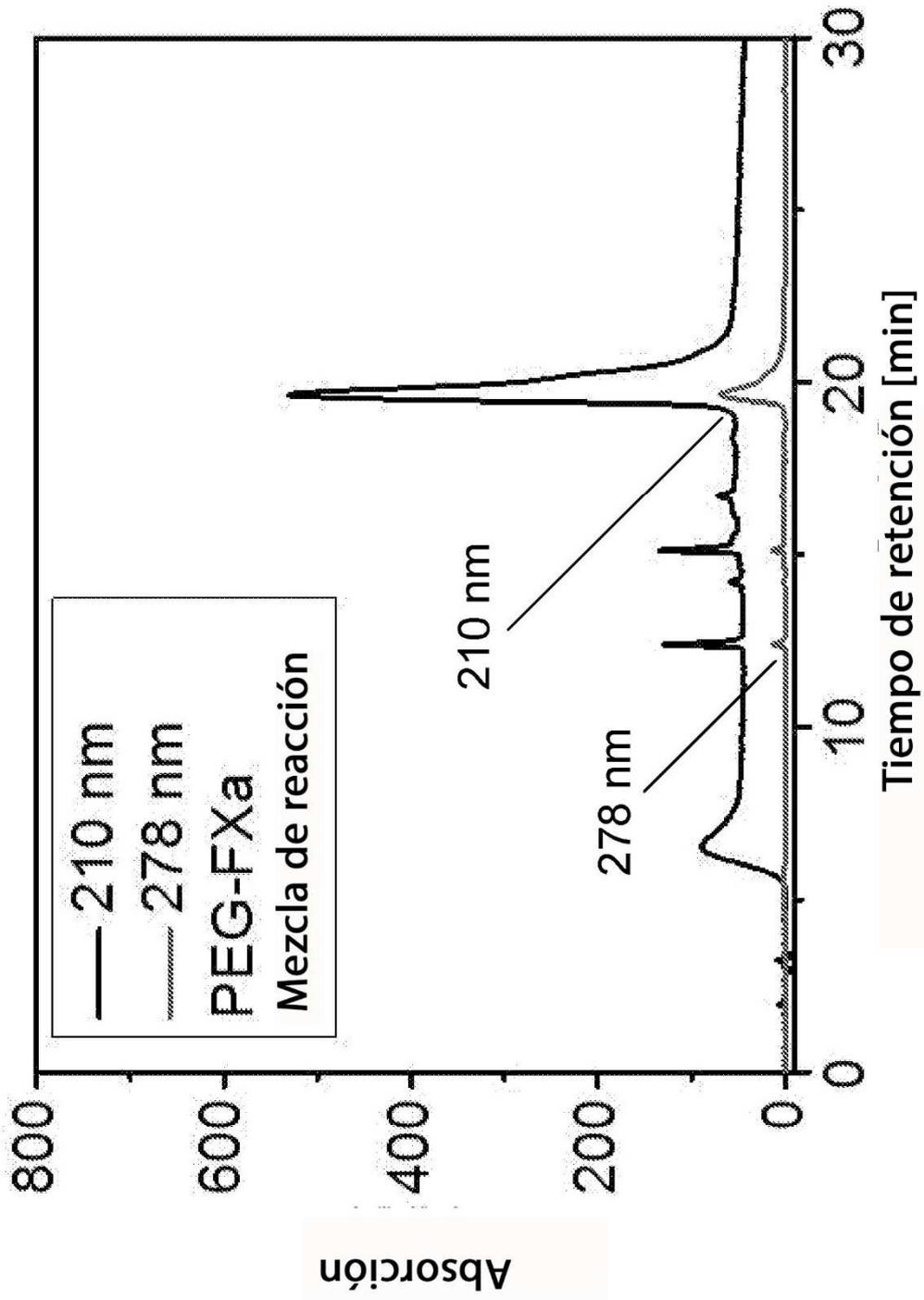


Fig. 7C

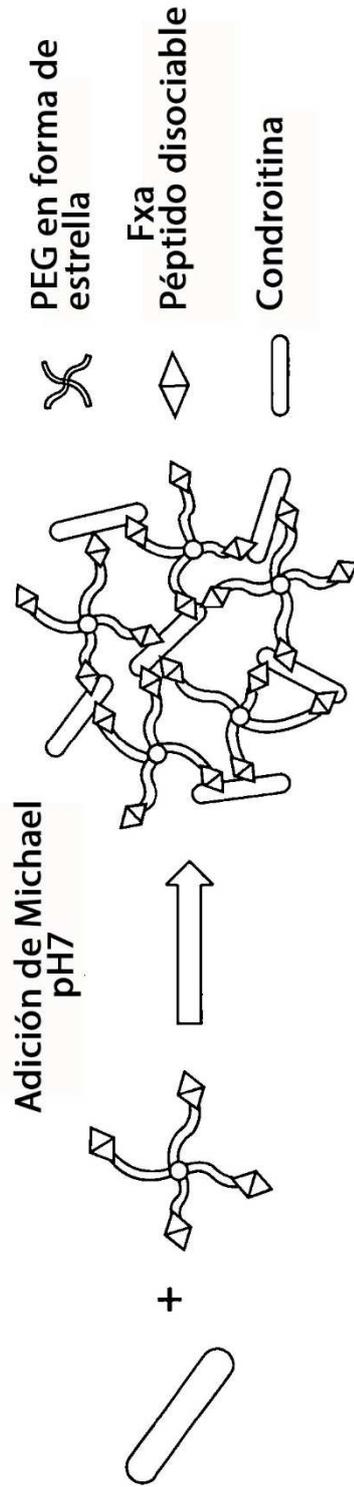


Fig. 8A

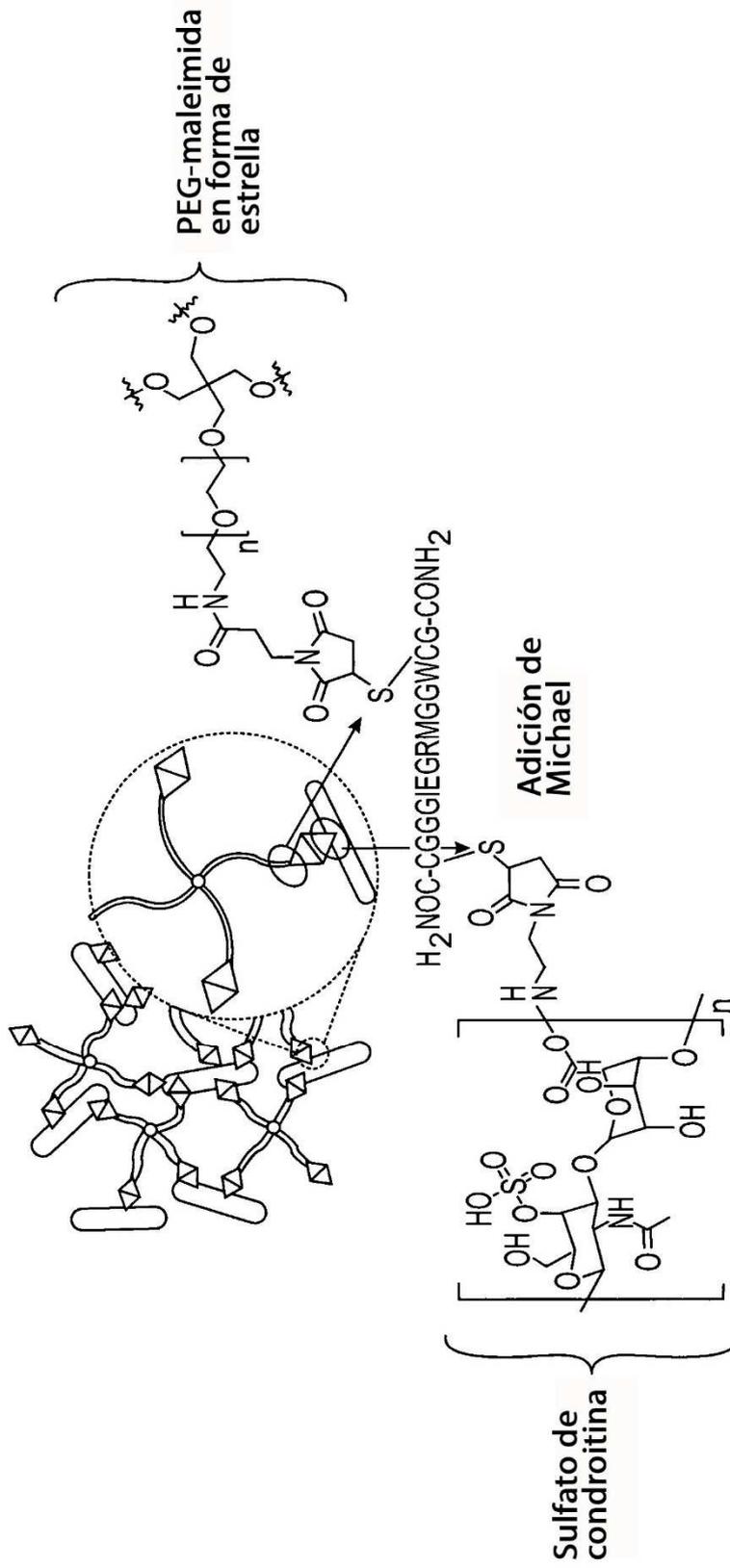
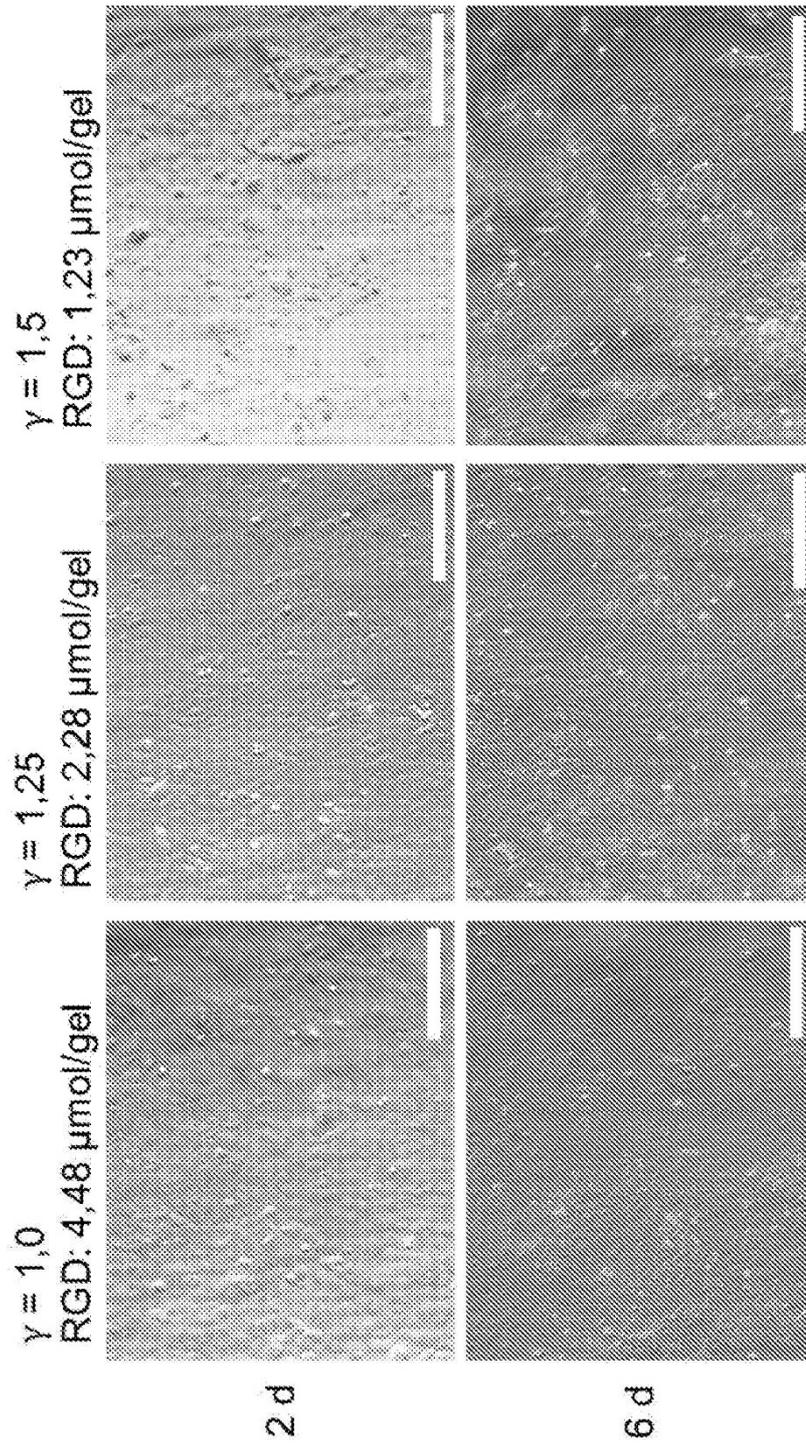


Fig. 8B



Barra de escala: 200 μm

Fig. 9

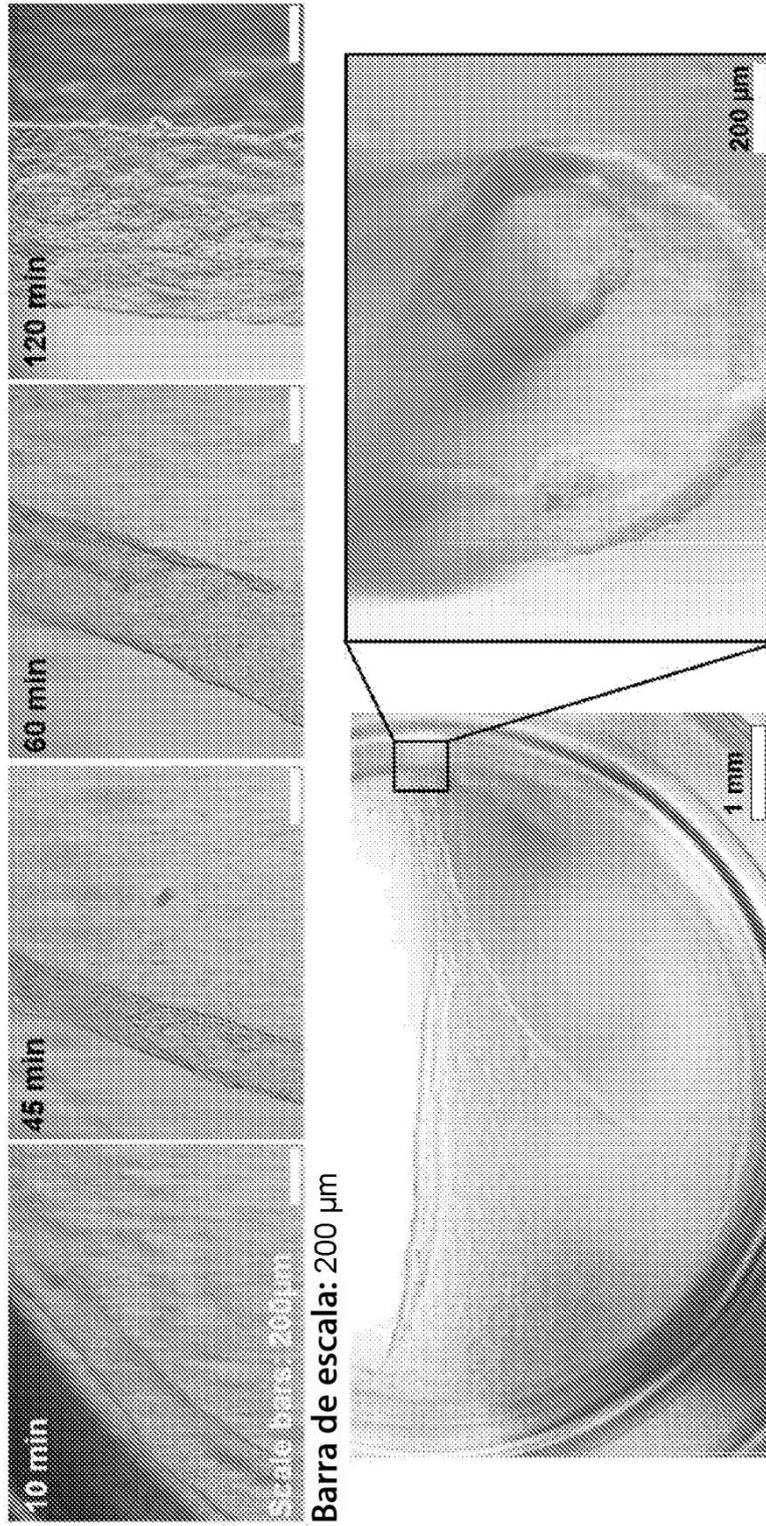


Fig. 10

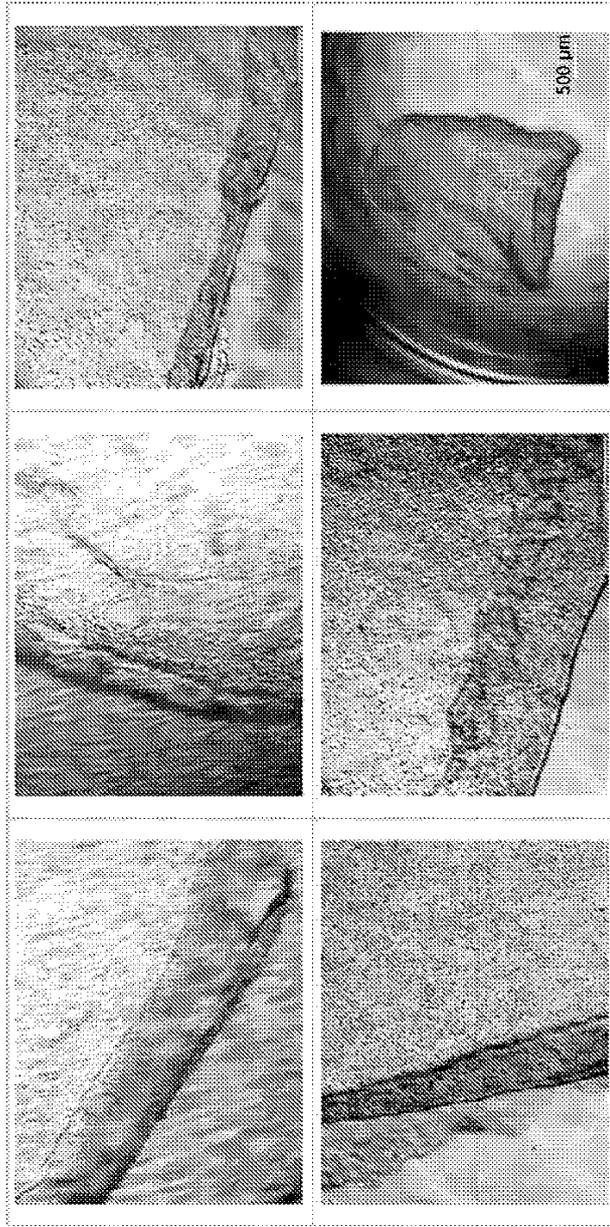


Fig. 11A



Fig. 11B