

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 942**

51 Int. Cl.:

C08L 5/10 (2006.01)

C08L 25/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2018** **PCT/DE2018/100218**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018** **WO18162009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2018** **E 18715886 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021** **EP 3592807**

54 Título: **Procedimiento y material para el secuestro diferenciado de sustancias de distintos grupos de sustancias con hidrogeles que contienen componentes sulfatados o sulfonados**

30 Prioridad:

10.03.2017 DE 102017105195

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

29.12.2021

73 Titular/es:

**LEIBNIZ-INSTITUT FÜR POLYMERFORSCHUNG
DRESDEN E.V. (100.0%)
Hohe Strasse 6
01069 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**SCHIRMER, LUCAS;
FREUDENBERG, UWE;
WERNER, CARSTEN y
ATALLAH, PASSANT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 887 942 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

Procedimiento y material para el secuestro diferenciado de sustancias de distintos grupos de sustancias con hidrogeles que contienen componentes sulfatados o sulfonados

La invención se refiere a un procedimiento para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias A y B con hidrogeles que contienen componentes sulfatados y/o sulfonados y el empobrecimiento de sustancias del grupo de sustancias A en un biofluido con liberación diferenciada simultánea de sustancias del grupo de sustancias A o B del hidrogel que contiene componentes sulfatados y/o sulfonados en el biofluido y/o la unión reducida de las sustancias del grupo de sustancias B en el hidrogel que contiene componentes sulfatados o sulfonados. La invención se refiere además a hidrogeles que pueden obtenerse sintéticamente basados en poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como componente de red y moléculas de reticulación que contienen amina o tiol como componentes de red adicionales que pueden caracterizarse y utilizarse para el procedimiento mencionado anteriormente como material para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias. Los grupos de sustancias A y B no son grupos de sustancias definidos químicamente, sino que pueden contener diferentes sustancias según el tipo de hidrogel, que en la correspondiente constelación y composición dan lugar al secuestro diferenciado según la invención dentro del sistema general. Por lo tanto, los grupos de sustancias A y B se definen por su comportamiento en el sistema general.

El sector de aplicación de la invención se encuentra en el sector de la biotecnología y la medicina, en el que a nivel molecular determinadas sustancias se eliminan selectivamente de un biofluido y se secuestran en un hidrogel y, por otra parte, otras sustancias no se secuestran específicamente, sino que se liberan selectivamente desde el hidrogel en el biofluido. Por lo tanto, en un sentido más amplio, se trata de un procedimiento de separación a nivel molecular. En un sentido más amplio, el sector de aplicación de la invención se encuentra en el sector de utilización de hidrogeles cargados negativamente de forma gradual para aplicaciones técnicas, biomédicas y biológicas, por ejemplo, para el cultivo de células de mamífero o un tratamiento antibacteriano de superficies.

En el estado de la técnica, se conocen hidrogeles con componentes sulfatados, por ejemplo, hidrogeles de PEG en estrella-glicosaminoglicano, por el documento WO 2010/060485 A1, y se están investigando para su uso en aplicaciones biotecnológicas o como materiales de reemplazo de implantes o tejidos para su uso en tratamientos regenerativos.

Una propiedad clave de estos materiales consiste en las interacciones resultantes entre grupos sulfato presentes en las cadenas poliméricas de un componente de los hidrogeles con proteínas solubles, tales como, por ejemplo, proteínas que controlan el metabolismo, el transporte y las funciones de señalización tales como enzimas y moléculas señalizadoras, comprendiendo las primeras, por ejemplo, proteasas, lipolasas, amilasas y las segundas, por ejemplo, hormonas, neurotransmisores, citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas.

Las interacciones que son decisivas para la afinidad por estas proteínas se basan principalmente en fuerzas electrostáticas entre los grupos sulfato o de ácido sulfónico cargados negativamente de los hidrogeles en las condiciones de aplicación y las cadenas laterales de aminoácidos cargados positivamente de las proteínas.

Este principio ya se utiliza ampliamente en el estado de la técnica para el desarrollo de hidrogeles que contienen azúcares sulfatados (glicosaminoglicanos = GAG) para la liberación mantenida de moléculas señalizadoras, por ejemplo, para los factores de crecimiento VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2). Además, la liberación de FGF-2 y VEGF podría aumentarse gradualmente reduciendo el grado de sulfatación en los hidrogeles de PEG en estrella-GAG subyacentes. Se han utilizado polímeros sintéticos que contienen grupos de ácido sulfónico, por ejemplo, con ácido poliestirenosulfónico (APS), J. Phys. Chem. B, 2007, 111 (13), páginas 3391-3397, DOI: 10.1021/jp067707d9., o ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (patentes de Estados Unidos Nº 5.451.617 y 5.011.275 y solicitud de patente de Estados Unidos Nº 2008/011412) como componentes sulfonados para producir hidrogeles, por ejemplo, para su uso en lentes de contacto. Sin embargo, en la actualidad no se conocen redes poliméricas hidratadas covalentemente reticuladas que porten grupos de ácido sulfónico, es decir, hidrogeles en los que los grupos carboxilo de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) se hayan utilizado como grupos funcionales para la reticulación con reticulantes cortos que contienen grupos amina o polímeros que contienen grupos amina.

Otra desventaja es que las interacciones entre hidrogeles que contienen componentes (o elementos constituyentes) sulfatados o sulfonados y proteínas hasta la fecha solo se han investigado principalmente a partir de soluciones con una o dos moléculas señalizadoras y, a menudo, no en condiciones fisiológicamente relevantes. En el contexto biológico relevante, no obstante, existen biofluidos con una pluralidad de proteínas diferentes a diferentes concentraciones, estando presentes las moléculas señalizadoras en los biofluidos solo en niveles bajos en el intervalo de 100 pg/ml - 2000 ng/ml, mientras que otras proteínas tales como, por ejemplo, albúmina están presentes en altas concentraciones de aproximadamente 60 mg/ml.

A este respecto, las fuerzas de atracción principalmente electrostáticas entre los dominios cargados positivamente de las moléculas señalizadoras y los grupos sulfato o sulfonato cargados negativamente en el hidrogel desempeñan

un papel importante, para cuya estimación se puede utilizar a menudo el punto isoeléctrico (IEP) de una proteína. Además de la carga neta en condiciones fisiológicas, que se puede estimar utilizando el IEP, la distribución de la carga, por ejemplo, la presencia de agrupaciones de carga cargadas positivamente, así como las interacciones secundarias causadas por el tamaño y la estructura de la proteína, así como la formación de fuerzas intermoleculares no iónicas más débiles, tales como, por ejemplo, interacciones hidrófobas, enlaces de puente de hidrógeno o interacciones bipolares, desempeñan un papel, por lo que no ha sido hasta fecha posible predecir la unión absoluta o relativa de las proteínas a los hidrogeles. Además, se producen procesos competitivos que hasta la fecha no se han tenido en cuenta y se deben, por ejemplo, a las interacciones de las proteínas diana con la albúmina, que es responsable de controlar la presión osmótica y la regulación de los procesos de transporte, así como a interacciones entre la albúmina y el hidrogel. Además, las constantes de unión que se utilizan a menudo en la literatura para predecir las interacciones moleculares entre los polímeros cargados y las proteínas solo son adecuadas para describir la interacción de los complejos molécula-proteína individuales en solución, mientras que en los hidrogeles existe una fuerte influencia de las cadenas poliméricas adyacentes y la distribución tridimensional de los centros de carga o de afinidad en la red polimérica sobre las interacciones resultantes y, por lo tanto, sobre la unión de las proteínas en el hidrogel.

En consecuencia, la selectividad de la unión entre hidrogeles que contienen componentes (elementos constituyentes) sulfatados y/o sulfonados y componentes moleculares de biofluidos complejos aún no se ha aclarado. Con los métodos y procedimientos establecidos, un control selectivo del nivel de moléculas señalizadoras mediante hidrogeles que contienen componentes (elementos constituyentes) sulfatados o sulfonados en los biofluidos relevantes para la aplicación solo es posible, por lo tanto, de forma limitada.

El objeto de la invención consiste en proponer un procedimiento que permita influir selectivamente en la concentración de determinadas sustancias en biofluidos.

El objeto se logra mediante un procedimiento y un material que tiene las características según las reivindicaciones independientes. Como material adecuado para llevar a cabo el procedimiento pudo utilizarse un sistema de hidrogel totalmente sintético a base de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como componente sintético, cargado negativamente en condiciones fisiológicas y por lo tanto con afinidad por biomoléculas parcialmente cargadas positivamente para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias. En las reivindicaciones dependientes se indican desarrollos del procedimiento y del material. Totalmente sintético significa que no se requieren componentes de origen biológico para la formación de hidrogel. Por lo tanto, se puede excluir el riesgo de reacciones inmunogénicas adversas.

Por secuestro de sustancias de los grupos de sustancias A y B en el contexto de la invención se debe entender la unión de estas sustancias, tales como, por ejemplo, moléculas señalizadoras, factores o enzimas, a los centros de afinidad presentes en un material de hidrogel y, por lo tanto, la reducción de la concentración o la eliminación total de estas sustancias de un biofluido que se encuentra en contacto directo con el hidrogel. El hidrogel está constituido por elementos constituyentes que están cargados o no cargados.

Como hidrogeles que contienen grupos sulfato y/o sulfonato la invención comprende hidrogeles con las propiedades siguientes y la composición siguiente: redes poliméricas formadas mediante reticulación covalente (química) o reticulación física, por ejemplo, según el documento WO 2014040591 A2, entre dos componentes de hidrogel o elementos constituyentes de hidrogel. El primer elemento constituyente o componente del hidrogel es una molécula que no está cargada en condiciones fisiológicas, que también se denomina elemento constituyente no cargado (ENC) y preferentemente presenta un peso molecular de 20 g/mol a 100.000 g/mol. Las moléculas no cargadas se seleccionan o se derivan ventajosamente, a este respecto, de la clase de polietilenglicoles, poli(2-oxazolininas), polivinilpirrolidonas (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PAV) y/o poli(acrilamidas) (PAM) o una molécula reticulante bifuncional corta. Además, el ENC presenta al menos dos grupos funcionales, preferentemente de 4 a 8 grupos funcionales, que, de forma ventajosa, son especialmente adecuados para la reticulación. Funcionalidades adecuadas para la reticulación (en EC o ENC) pueden ser grupos amina, tiol, carboxilo, anhídrido, maleimida, vinilsulfona, acrilato, hidroxilo, isocianato, epoxi y aldehído o grupos que pueden formar uniones no covalentes basándose en fuerzas electrostáticas, interacciones hidrófobas, enlaces de puente de hidrógeno, interacciones dipolares. El segundo elemento constituyente (componente) está constituido por un polímero que porta grupos sulfato o sulfonato (que contiene azufre) y, por lo tanto, está cargado negativamente en condiciones fisiológicas (elemento constituyente cargado, EC) (opcionalmente con un peso molecular de 2.000 a 250.000 g/mol) que puede unirse principalmente por medio de interacciones electrostáticas (iónicas) y en menor medida por medio de enlaces menos fuertes, tales como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrófobas a proteínas en la red del hidrogel. Los centros de afinidad que determinan decisivamente la unión de las proteínas son, a este respecto, según la invención, los grupos sulfato o de ácido sulfónico que están cargados en gran parte negativamente en condiciones fisiológicas. Como polímeros sulfatados o sulfonados se utilizan, a este respecto, glicosaminoglicanos sulfatados obtenidos de fuentes naturales tales como heparina y heparinas desulfatadas selectivas, sulfato de condroitina, sulfato de heparán, sulfato de queratán, ácido hialurónico sulfatado, así como glicopolímeros sulfatados a base de manosa, lactosa, dextrano y compuestos polisulfonados que portan ácido estirenosulfónico (AES), ácido vinilsulfónico (AVS), ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AAMPS), ácido

aminopropanosulfónico (AAPS) o ácido anetolsulfónico (AAS) como monómeros que contienen azufre (también en copolímeros con unidades que contienen los grupos de reticulación antes mencionados).

Los centros de afinidad, grupos sulfato o sulfonato cargados negativamente, están distribuidos, de forma prevista, solo a lo largo del EC, mientras que, por el contrario, el ENC se utiliza como componente que minimiza la adsorción de proteínas. Los grupos carboxilos eventualmente presentes en el EC y que no se utilizan para la reacción de reticulación se consideran irrelevantes para la unión de las proteínas en el hidrogel debido a los grupos sulfato o sulfonato significativamente más ácidos en comparación con los mismos y, por lo tanto, preferentemente desprotonados del EC.

Condiciones fisiológicas son soluciones acuosas cuyos pH y fuerza iónica corresponden a tejidos humanos con un contenido fisiológico de sal y, por lo tanto, están ajustados a aproximadamente el 0,9% de NaCl con tampón fosfato a un pH de 7,4.

Un biofluido según la invención es una solución acuosa con un contenido de sal variable, preferentemente un contenido de sal fisiológico, y una mezcla de proteínas.

El contenido de proteínas puede variar y consiste principalmente en proteínas globulares solubles en agua, por ejemplo, moléculas señalizadoras, enzimas o factores, en niveles bajos en el intervalo de 100 pg/ml - 2000 ng/ml y albúminas, que regulan la presión osmótica y procesos de transporte en el cuerpo y para este propósito, por ejemplo, están presentes en una alta concentración de aproximadamente 60 mg/ml.

La concepción de la invención consiste en que las diferencias en la unión de las proteínas que controlan el metabolismo, el transporte y las funciones de señalización (por ejemplo, moléculas señalizadoras y enzimas) a hidrogeles que contienen componentes sulfatados o sulfonados (EC) se determinan, por una parte, mediante interacciones electrostáticas entre EC y proteínas, así como mediante el tamaño y la estructura de las proteínas (por ejemplo la presencia de dominios de proteínas característicos) y, por otra parte, en gran medida mediante los parámetros de red de los hidrogeles. Como parámetros de red determinantes, a este respecto, se determinaron (1) la concentración de sulfato o sulfonato en el hidrogel hinchado (mmol de sulfato o de sulfonato por ml) en el hidrogel hinchado en condiciones fisiológicas y (2) el número de grupos sulfato o sulfonato por unidad de repetición del EC dividido por la masa molar de las unidades de repetición del EC (número de grupos/(g/mol)) como una magnitud característica para la carga del EC. El parámetro (1) se correlaciona con el número de centros de interacción (correspondientes a grupos sulfato o sulfonato cargados negativamente) en la red de hidrogel hinchado tridimensionalmente y, por lo tanto, determinará la unión de proteínas (moléculas señalizadoras, enzimas) en el hidrogel. Este parámetro incluye interacciones intermoleculares (es decir, interacciones entre cadenas poliméricas adyacentes) del EC con proteínas (moléculas señalizadoras, enzimas). El parámetro (2), por otra parte, describe la densidad y la distribución de los centros de interacción (correspondientemente grupos sulfato o sulfonato cargados negativamente) a lo largo de los diversos EC y, por lo tanto, determinará en gran medida las interacciones de las proteínas con los respectivos EC individuales y, por lo tanto, a través de la modulación espacial de los centros de carga a lo largo de la cadena polimérica también incluye interacciones específicas que son conocidas, por ejemplo, para las interacciones proteína-glicosaminoglicano (véase Capila, I.; Linhardt, R.J. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002, 41 (3), 391-412). El comportamiento de unión y liberación de los hidrogeles para proteínas (moléculas señalizadoras) se determina según la invención mediante una superposición de las propiedades de la red de hidrogel resultantes que resultan de ambos parámetros (1) y (2) y, por lo tanto, se puede describir ampliamente mediante la especificación de estos parámetros (véase también el resultado de los ejemplos de realización ENC1-EC1 01 a ENC1-EC4 04).

Además, se deben tener en cuenta los efectos estéricos en el sentido de que se debe garantizar la accesibilidad estérica de la red de hidrogel para la unión y el secuestro de proteínas, es decir, el tamaño de las proteínas no debe superar la anchura de malla de los hidrogeles, que puede calcularse, por ejemplo, a partir del módulo de almacenamiento de los hidrogeles por medio de la teoría de la elasticidad del caucho según el material y los procedimientos.

Mediante la puesta en contacto de biofluidos con hidrogeles selectivamente graduables en su estructura de red y su grado de sulfatación o sulfonación, la concentración de moléculas señalizadoras relevantes en el biofluido se puede ajustar por medio de una selectividad característica de la unión de moléculas señalizadoras al hidrogel y en consecuencia, puede controlarse en una aplicación biológica o biotecnológica. La aplicación biológica se puede realizar, a este respecto, en el contexto médico en la modulación de moléculas señalizadoras solubles para el control de la angiogénesis, el brote de vasos sanguíneos, la respuesta inmunológica, entre otras cosas para la curación de enfermedades neurodegenerativas y autoinmunitarias y cancerosas, diabetes, en la cicatrización de heridas cutáneas y la regeneración ósea, para la inhibición de la proliferación de tumores, así como para el tratamiento antiséptico y antimicrobiano en o sobre el cuerpo. Existen aplicaciones biotecnológicas en el cultivo *in vitro* de células y órganos de células madre embrionarias (ES-), células madre pluripotentes inducidas (iPS-), así como otras células madre y precursoras que no pueden asignarse a ES e iPS, células primarias obtenidas de pacientes, líneas celulares inmortalizadas, así como tejido cardíaco, muscular, renal, hepático y nervioso, así como

en el enriquecimiento y el empobrecimiento y, por lo tanto, la separación de mezclas de proteínas, en particular de mezclas de moléculas señalizadoras o de enzimas.

Como ya se ha mencionado, un aspecto adicional de la invención se refiere a un material de hidrogel reticulado covalentemente para llevar a cabo el procedimiento mencionado anteriormente, basado en elementos constituyentes cargados en forma de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y elementos constituyentes no cargados en forma de polímeros que contienen grupos amina o grupos tiol o moléculas reticulantes con al menos dos grupos amina o tiol. A este respecto, los elementos constituyentes cargados y no cargados se unen para formar una red polimérica, que se puede obtener mediante la activación de los grupos carboxilo del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) y, o bien una reticulación directa con los polímeros que contienen grupos amina o las moléculas reticulantes con los, al menos dos, grupos amina, en cada caso con formación de amida o bien una funcionalización de los grupos carboxilo activados por medio de moléculas de reticulación bifuncionales, que contienen respectivamente un grupo amina y un grupo con capacidad para una adición de tipo Michael, y la posterior reticulación con los polímeros que contienen grupos tiol o las moléculas reticulantes con los, al menos dos, grupos tiol, en cada caso por medio de una adición de tipo Michael. El grupo con capacidad para una adición de tipo Michael se selecciona preferentemente de entre grupos maleimida, vinilsulfona y acrilato. Los polímeros que contienen grupos amina o tiol como elementos constituyentes no cargados se seleccionan preferentemente de la clase de polietilenglicoles (PEG), poli(2-oxazolinan) (POX), polivinilpirrolidonas (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PAV) y/o poliacrilamidas (PAM). Las moléculas de reticulación cortas que contienen grupos amina o tiol utilizadas alternativamente son preferentemente moléculas de reticulación bifuncionales no poliméricas. El poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como elemento constituyente cargado se selecciona ventajosamente con relaciones molares variables de ácido 4-estirenosulfónico con respecto a ácido maleico en el intervalo de 6:1 a 1:6 y masas molares en el intervalo de 5000 a 100.000 g/mol. Según una forma de realización particularmente preferida de la invención, como elementos constituyentes no cargados para la formación de redes poliméricas se utilizan polímeros con péptidos escindibles enzimáticamente. Estos péptidos escindibles enzimáticamente presentan preferentemente o bien lisina, con un grupo amina en la cadena lateral, o bien cisteína, con un grupo tiol en la cadena lateral, como aminoácido reactivo en la secuencia peptídica. Los péptidos escindibles enzimáticamente se pueden escindir ventajosamente mediante proteasas humanas o bacterianas, en particular los sensibles a metaloproteasas de matriz (MMP), tales como, por ejemplo, PQGIWGQ, IPVSLRSG o VPMSMRGG, los sensibles a cathepsina, tales como VPMSMRGG, los sensibles a elastasa, tales como, por ejemplo, AAPV o APEEIMDRQ, los sensibles a enzimas de coagulación sanguínea tales como, por ejemplo, GGF-ácido piperídico-RYSWGCG sensible a trombina o GG-ciclohexilalanina-ARSWGCG, los sensibles a FXa tales como, por ejemplo, GGIEGRMGWGCG, los sensibles a calicreína tales como CGGGPFRIGGWCG o los sensibles a proteasas bacterianas tales como, por ejemplo, ADVFEA sensible a aureolisina o AAEEA, AAPV sensible a elastasa o la secuencia sensible a proteasa IV MKATKLVLGAVILGSTLLAG. Los hidrogeles contruidos de esta forma permiten mecanismos autorreguladores de liberación y degradación. Según otra forma de realización de la invención, se unen moléculas bioactivas y/o antiadhesivas con un grupo amina o carboxilo y/o péptidos instructivos de células, en particular seleccionados de entre KCWG-RGDSP, KCWG-EIDGILT, KCWG-IKLLI, KGCWGGRNIAEIIKDI, KGCWGGSDPGYIGSRSDDSA, KGCWGGPQVTRGDVFTMP, KGCWGGKGGNGEPRGDTYRAY a través de lisina o cisteína en la secuencia al elemento constituyente cargado poli(4-estirenosulfónico ácido láctico-co-ácido maleico) o sus derivados con grupos con capacidad para una adición de tipo Michael con la formación de un enlace covalente a la red de hidrogel. Las moléculas bioactivas pueden ser sustancias antimicrobianas, por ejemplo, antibióticos o antisépticos, o principios activos farmacéuticos. Las moléculas antiadhesivas son preferentemente polietilenglicoles (PEG) o poli(2-oxazolinan) (POX). Los péptidos instructivos de células son preferentemente péptidos derivados de proteínas estructurales y funcionales de la matriz extracelular, por ejemplo, péptidos derivados de colágeno, laminina, tenascina, fibronectina y vitronectina. Según una forma de realización ventajosa, los péptidos bioactivos y/o antiadhesivos y/o instructivos de células se acoplan covalentemente a las redes de hidrogel mediante secuencias peptídicas escindibles enzimáticamente. Como ya se ha mencionado, los péptidos escindibles enzimáticamente son preferentemente sensibles a proteasas humanas o bacterianas, por ejemplo, MMP, cathepsinas, elastasas, enzimas de coagulación sanguínea. Los hidrogeles diseñados de esta forma permiten mecanismos autorregulativos de liberación y degradación incluso mientras se mantiene la red de hidrogel. El material de hidrogel presenta preferentemente un módulo de almacenamiento de 0,2 a 22 kPa. La concentración de sulfonato en la red hinchada y el número de grupos sulfonato por unidad de repetición (UR) dividido por la masa molar (MW) de la unidad de repetición en (g/mol) se puede variar independientemente entre sí de forma correspondiente a los intervalos definidos en la tabla 5.1 (véase más adelante).

Por lo tanto, la invención proporciona un hidrogel totalmente sintético, fuertemente hidratado con propiedades físicas y bioquímicas selectivamente graduables, que porta centros de afinidad para grupos de sustancias que hay que separar por medio de los grupos sulfonato de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como elemento constituyente cargado (EC). El poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) se utiliza, a este respecto, como elemento constituyente cargado (EC) en el sentido del material de hidrogel descrito anteriormente. Este material ofrece la posibilidad de representar todas las funciones importantes de la matriz extracelular (MEC) natural de forma modular, es decir, en gran medida independientemente unas de otras. Estas funciones son en detalle la función de andamiaje, soporte y protección para las células en crecimiento como primera función, el control de la adhesión celular como segunda función, el secuestro gradual y la liberación reversible de moléculas señalizadoras terapéuticamente relevantes como tercera función y la posibilidad de la remodelación adaptada por medio de células

en crecimiento como cuarta función. Las propiedades físicas, tales como la rigidez y la hidratación del material, se pueden ajustar en un amplio intervalo. Para este propósito, según una forma de realización preferida de la invención, se prepararon hidrogeles covalentemente reticulados mediante reacción de grupos carboxilo activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y grupos amina terminales de un polietilenglicol lineal o ramificado en forma de estrella como componente no cargado a través de grupos amida estables. En una forma de realización alternativa, que se prefiere para el embebido de células vivas, en una primera etapa, se graduaron los grupos carboxilo activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) por medio de la molécula reticulante bifuncional corta N-(2-aminoetil)maleimida, es decir, con 6 a 10 moléculas de N-(2-aminoetil)maleimida por molécula de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido-maleico), se funcionalizaron y a continuación se purificaron y se aislaron. Estos derivados de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con N-(2-aminoetil)maleimida permiten la reacción bioortogonal espontánea cuando se mezclan en soluciones acuosas o en biofluidos complejos con células vivas y biomoléculas sin su cambio funcional a través de una adición de tipo Michael entre los grupos maleimida de los derivados de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) funcionalizados y los grupos tiol de las moléculas de reticulación bifuncionales que contienen grupos tiol o polímeros que contienen grupos tiol como elementos constituyentes no cargados en el sentido de la estructura de hidrogel descrita anteriormente. Estos elementos constituyentes pueden ser, por ejemplo, péptidos escindibles enzimáticamente que presentan el aminoácido cisteína (que porta un grupo tiol en la cadena lateral) en la secuencia y que se han conjugado previamente a uno o más brazos de un polietilenglicol (PEG) de cuatro brazos, tal como se describe por Tsurkan et al. 2013 (Adv. Mater. 2013, 25, 2606-2610). La ventaja de este tipo de reticulación consiste en que, debido a la rápida reacción de las maleimidias con los grupos tiol libres, se efectúa una reacción dirigida sin reacciones secundarias no deseadas con otras biomoléculas o con proteínas de la superficie celular, por lo que la adición de tipo Michael se puede utilizar como una reacción de reticulación bioortogonal para la polimerización de células vivas. Los hidrogeles también se pueden funcionalizar a través de los grupos maleimida de los derivados de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) por medio de péptidos instructivos de células, por ejemplo la secuencia de aminoácidos CWGRGDSP. Además, los materiales de hidrogel se pueden funcionalizar con sustancias con actividad antimicrobiana, por ejemplo, con antibióticos cargados positivamente.

Como alternativa al material de hidrogel reticulado covalentemente, es posible utilizar un material de hidrogel reticulado físicamente para llevar a cabo el procedimiento mencionado anteriormente. Este material también completamente sintético está basado en interacciones físicas entre elementos constituyentes cargados en forma de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y elementos constituyentes no cargados en forma de polímeros, estando conjugados al polímero secuencias peptídicas fuertemente cargadas de forma positiva. Las secuencias peptídicas fuertemente cargadas de forma positiva comprenden preferentemente al menos diez repeticiones de lisina o arginina o al menos cinco repeticiones de motivos dipeptídicos con lisina y alanina o arginina y alanina.

Más detalles, características y ventajas de las formas de realización de la invención se deducen de la siguiente descripción de ejemplos de realización, que también se describen y se concretan en las tablas y figuras especificadas. La figura 1 muestra imágenes de microscopía óptica representativas de los cultivos celulares con células endoteliales humanas, cultivadas en hidrogeles, después de 24 horas.

Mediante la variación selectiva de las propiedades de la red, también se pueden ajustar otras relaciones de concentración ventajosas y, con una ampliación del análisis para otras moléculas señalizadoras, también es posible con el procedimiento propuesto el control de la concentración de estas especies en cualquier biofluido.

Tabla 1 : Descripción químico-física de los hidrogeles, ejemplos de realización 01 a 26: Reacción de reticulación 1 (RR1): grupo carboxilo activado con grupo amina; Reacción de reticulación 2 (RR2): grupo maleimida con grupo tiol

Denominación	Mezcla de hidrogel durante la reticulación, no hinchado			Propiedades del hidrogel en condiciones fisiológicas, hinchado						RR
	Concentración de ENC en mmol/ml	Concentración de EC en mmol/ml	Relación molar ENC:EC	Hinchamiento		Concentración de EC en mmol/ml	Concentración de sulfato/sulfonato en mmol/ml	Módulo de almacenamiento en kPa		
				Promedio	SD			Promedio	SD	
ENC1-EC1 01	0,0091	0,0030	3	1,77	1,70	0,0018	0,12	1,9	1,9	1
ENC1-EC2 02	0,0079	0,0040	2	1,62	0,03	0,0025	0,12	4,0	1,1	1
ENC1-EC3 03	0,0073	0,0045	1,5	1,71	0,04	0,0027	0,06	2,3	0,0	1
ENC1-EC4 04	0,0057	0,0038	1,5	1,23	0,01	0,0031	0,28	7,9	1,9	1
ENC1-EC4 05	0,0079	0,0026	3	1,54	0,54	0,0017	0,15	14,5	1,6	1
ENC1-EC4 06	0,0030	0,0020	1,5	1,54	0,05	0,0013	0,12	7,3	0,2	1
ENC1-EC4 07	0,0041	0,0014	3	1,12	0,03	0,0012	0,11	13,7	0,5	1
ENC1-EC4 08	0,0052	0,0009	6	0,95	0,03	0,0009	0,08	19,6	2,0	1
ENC1-EC4 09	0,0021	0,0014	1,5	1,25	0,18	0,0011	0,10	4,8	0,6	1
ENC1-EC4 10	0,0030	0,0010	3	1,01	0,12	0,0010	0,09	8,1	0,7	1
ENC1-EC4 11	0,0037	0,0006	6	0,86	0,11	0,0007	0,06	8,5	0,4	1
ENC1-EC5 12	0,0057	0,0038	1,5	1,68	0,035	0,0023	0,09	8,5	1,7	1
ENC1-EC5 13	0,0079	0,0026	3	1,48	0,23	0,0018	0,13	15,3	0,7	1
ENC1-EC5 14	0,0030	0,0020	1,5	1,81	0,04	0,0011	0,08	5,5	1,4	1
ENC1-EC5 15	0,0041	0,0014	3	1,28	0,08	0,0011	0,08	12,5	1,2	1
ENC1-EC5 16	0,0052	0,0009	6	0,99	0,04	0,0009	0,06	21,8	0,8	1
ENC1-EC5 17	0,0021	0,0014	1,5	1,58	0,08	0,0009	0,07	3,0	0,2	1
ENC1-EC5 18	0,0030	0,0010	3	1,05	0,10	0,0009	0,07	6,9	0,7	1
ENC1-EC5 19	0,0037	0,0006	6	0,90	0,04	0,0007	0,05	8,0	1,3	1
ENC2-EC4 20	0,0015	0,0022	1,5	1,22	0,03	0,0018	0,16	3,7	0,5	2
ENC2-EC4 21	0,0015	0,0015	1	1,62	0,20	0,0009	0,08	1,1	0,2	2

Denominación	Mezcla de hidrogel durante la reticulación, no hinchado			Propiedades del hidrogel en condiciones fisiológicas, hinchado						RR
	Concentración de ENC en mmol/ml	Concentración de EC en mmol/ml	Relación molar ENC:EC	Hinchamiento		Concentración de EC en mmol/ml	Concentración de sulfato/sulfonato en mmol/ml	Módulo de almacenamiento en kPa		
				Promedio	SD			Promedio	SD	
ENC2-EC4 22	0,0015	0,0011	0,75	2,20	0,19	0,0005	0,05	0,2	0,1	2
ENC2-EC5 23	0,0015	0,0022	1,5	1,19	0,17	0,0018	0,14	4,6	1,5	2
ENC2-EC5 24	0,0015	0,0015	1	1,56	0,07	0,0010	0,07	1,2	0,2	2
ENC2-EC5 25	0,0015	0,0011	0,75	1,95	0,72	0,0006	0,04	0,3	0,0	2
ENC2-ENC3 26	0,0018	0,0000	1	1,26	0,25	0,0000	0,00	4,4	0,5	2

Tabla 2: Propiedades químico-físicas de los elementos constituyentes (componentes) de hidrogel polimérico; MWP: Masa molar del polímero, MWUR: Masa molar de la unidad de repetición:

Polímero	Abreviatura	MWP en g/mol	MWUR en g/mol	Número de sulfatos/sulfonatos por UR	Número de sulfatos/sulfonatos por molécula de polímero
Heparina (HEP)	EC1	14.000	540	2,7	70,2
Heparina N-desulfatada (N-DSH)	EC2	13.600	523	1,8	48,4
SO, heparina N-desulfatada (ON-DSH)	EC3	12.320	474	0,9	23,4
Ácido poli{4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), relación molar de ácido sulfónico con respecto a ácido maleico: 3:1	EC4	20.000	660	3,0	90,0
Ácido poli{4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), relación molar de ácido sulfónico con respecto a ácido maleico: 1:1	EC5	20.000	265	1,0	75,0
PEG de cuatro brazos, terminado en amina	ENC1	10.000	44	0,0	0,0
PEG de cuatro brazos, terminado en tiol	ENC2	10.000	44	0,0	0,0
PEG de cuatro brazos, terminado en maleimida	ENC3	10.000	44	0,0	0,0
PEG de cuatro brazos, terminado con una secuencia peptídica escindible enzimáticamente	ENC4	15.600	44	0	0

Tabla 3: Propiedades químico-físicas de las moléculas señalizadoras, unión o secuestro de las proteínas en el hidrogel de los tipos ENC1-EC1 01, ENC1-EC2 02, ENC1-EC5 23, ENC1-EC3 03, ENC1-EC4 04, ENC2-EC4 20 y del hidrogel no cargado ENC2-ENC3 26 (como control negativo)

Denominación	Uniprot ID	Propiedades físico-químicas			Unión de proteínas en % de hidrógeno con la denominación											
		Peso molecular en daltons	IEP	Número de aminoacidos cargados	Familias de secuencias PROSITE	ENC1-EC1 01	ENC1-EC2 02	ENC2-EC2 23	ENC1-EC3 03	ENC1-EC4 04	ENC2-EC4 20	ENC2-EC3 26				
					Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD		
Factores de crecimiento	FGF-2	P00938	164076	96	28	31.0%	3.2%	5.4%	8.1%			0.0%	19.7%			
	TGF- β 1	P01337	12394.7	86	15	18.0%	4.2%	0.0%	2.0%			0.0%	5.9%			
	BNFG	P01338	13434.2	90	21	83.5%	7.3%	78.5%	4.5%			3.5%	3.5%			
	EGF	P01333	6222.0	48	7	7.2%	6.1%	8.1%	3.0%			11.0%	0.9%	26.3%	0.0%	
	HGF	P14210	53683.7	72	78	41.7%	4.0%	48.3%	5.2%			20.6%	1.5%	41.3%	3.4%	
	PDGF-BB	P01227	12294.4	9.4	19	100.0%	10.1%	100.0%	6.5%			100.0%	2.2%	100.0%	4.0%	
	PLGF	P43763	22785.9	8.4	31	2.3%	3.3%	6.9%	5.3%			7.7%	1.1%	25.0%	1.7%	
	VEGF-A	P15692	22694.4	9.2	47	90.0%	1.1%	85.6%	1.1%			68.4%	4.5%	83.4%	2.0%	
	Endostina	P51671	8394.8	9.9	16	100.0%	0.0%	98.0%	0.4%			91.9%	2.3%	100.0%	0.2%	
	GRO- α 1a	P03941	7865.1	9.5	12	98.4%	0.5%	73.9%	0.9%			51.8%	2.7%	100.0%	0.0%	
Quimocinas	IL-8	P10145	8822.3	9.2	17	94.2%	1.3%	69.6%	2.1%			44.7%	2.5%	99.0%	0.6%	
	IP-10	P02778	8646.2	10.2	17	96.2%	0.5%	92.7%	2.2%			65.5%	1.7%	98.0%	0.6%	
	MCP-1	P13500	8694.9	9.4	14	94.6%	0.5%	89.4%	0.7%			46.3%	4.3%	98.7%	0.7%	
	MIP-1 α 1a	P10147	7716.5	4.8	6	58.2%	2.7%	41.1%	1.2%			20.7%	3.1%	97.8%	0.9%	
	MIP-1 β 1a	P12326	7818.7	4.8	6	56.1%	2.2%	38.0%	2.7%			23.3%	3.1%	94.8%	0.7%	
	RANTES	P13501	7503.8	9.3	11	99.0%	0.2%	95.2%	0.6%			90.2%	0.5%	99.5%	0.2%	
	SCF-1 β 1a	P43661	6525.1	10.1	17	98.6%	0.3%	90.5%	0.5%			80.6%	1.5%	99.7%	0.3%	
	GM-CSF	P04141	14477.4	5.2	15	8.4%	2.1%	3.8%	1.0%			11.1%	2.5%	24.2%	1.7%	
	IPN-gamma	P01579	16177.3	9.5	28	99.5%	0.1%	92.8%	2.0%			75.8%	14.5%	99.0%	0.9%	
	IL-1 β 1a	P01584	17316.7	5.9	19	21.0%	3.7%	23.2%	0.6%			28.2%	3.5%	99.8%	1.9%	
Citocinas	IL-10	P22301	18347.2	7.6	25	32.7%	9.7%	14.7%	6.1%			15.7%	5.0%	99.8%	0.9%	
	IL-12p40	P29460	34866	5.4	43	69.9%	5.1%	85.1%	1.8%			45.8%	1.3%	92.5%	1.3%	
	IL-4	P05112	14863.0	9.3	26	98.5%	0.3%	82.4%	2.0%			72.6%	0.7%	98.1%	0.5%	
	IL-6	P03231	20812.5	6.2	25	24.3%	4.8%	7.9%	4.3%			17.3%	7.9%	89.5%	1.9%	
	TNF- α 1a	P01375	17552.5	7.0	18	38.9%	3.5%	24.7%	3.3%			24.8%	3.7%	88.2%	4.8%	
	Endostina	O98084	21522.1	9.6	38	65.0%	3.1%	42.0%	11.2%			0.0%	8.8%			
	DKK1	O94907	25777.8	8.7	42	84.0%	6.2%	78.0%	3.2%			38.0%	10.1%			
Clasificado como TIPO según la tabla 5.1																
					TIPO 1	TIPO 2	TIPO 2	TIPO 3	TIPO 4	TIPO 4	TIPO 5					

Tabla 4: Tiempo de activación de los grupos carboxilo de EC1 a 5 en minutos, volumen de gel utilizado para los estudios de unión

	Tiempo de activación	Volumen de gel para estudios de unión
ENC1-EC1 01	15 min	12,14 µl
ENC1-EC2 02	10 min	12,38 µl
ENC1-EC3 03	45 min	8,56 µl
ENC1-EC5-19	1 min	12,00 µl
ENC2-EC4 20 a ENC2-ENC3 26	0 min	10,00 µl

5

Tabla 5.1 Tipos de gel con intervalos de parámetros

	A	B	C	D
Tipo 1	0,0040-0,0060	0,09-0,20	< 20	no cargado
Tipo 2	0,0025-0,0040	0,05-0,18	< 20	no cargado
Tipo 3	0,0005-0,0025	0,01-0,12	< 20	no cargado
Tipo 4	0,0040-0,0100	0,16-0,80	< 20	no cargado
Tipo 5	0	0	< 20	no cargado

Tabla 5.2 Tipos de gel de ejemplos de realización preferidos

	A	B	C	D
Tipo 1 (ENC1-EC1 01)	0,0050	0,12	< 20	no cargado
Tipo 2 (ENC1-EC2 02)	0,0035	0,12	< 20	no cargado
Tipo 2 (ENC2-EC5 23)	0,0038	0,14	< 20	no cargado
Tipo 3 (ENC1-EC3 03)	0,0019	0,06	< 20	no cargado
Tipo 4 (ENC1-EC4 04)	0,0045	0,28	< 20	no cargado
Tipo 4 (ENC2-EC4 20)	0,0045	0,16	< 20	no cargado
Tipo 5 (ENC2-ENC3 26)	0	0	< 20	no cargado

10

Tabla 6.1

	E	F	G	C	D
Tipo 1	60-80	0,0015-0,0025	0,09-0,20	< 20	no cargado
Tipo 2	30-75	0,0015-0,0030	0,05-0,18	< 20	no cargado
Tipo 3	10-30	0,0010-0,0040	0,01-0,12	< 20	no cargado
Tipo 4	80-120	0,0018-0,0050	0,16-0,80	< 20	no cargado
Tipo 5	0	0	0	< 20	no cargado

Tabla 6.2.

15

	E	F	G	C	D
Tipo 1 (ENC1-EC1 01)	70,2	0,0018	0,12	< 20	no cargado
Tipo 2 (ENC1-EC2 02)	48,4	0,0025	0,12	< 20	no cargado
Tipo 2 (ENC2-EC5 23)	75,0	0,0018	0,14	< 20	no cargado
Tipo 3 (ENC1-EC3 03)	23,4	0,0027	0,06	< 20	no cargado
Tipo 4 (ENC1-EC4 04)	90,0	0,0031	0,28	< 20	no cargado
Tipo 4 (ENC2-EC4 20)	90,0	0,0018	0,16	< 20	no cargado
Tipo 5 (ENC2-ENC3 26)	0	0	0	< 20	no cargado

En las tablas 5.1, 5.2, 6.1 y 6.2, en la columna A se muestra como propiedad de los elementos constituyentes cargados el número de grupos sulfato o sulfonato por unidad de repetición (UR) dividido por la masa molar (MW) de UR en [mol/g]. Como propiedades de los hidrogeles hinchados se indican en la columna B la concentración de los grupos sulfato o sulfonato en mmol/ml y en la columna C el módulo de almacenamiento en kPa. La columna D proporciona las propiedades de los elementos constituyentes no cargados.

La columna E proporciona la concentración molar de grupos sulfato o sulfonato por mol de polímero (en mol/mol) del elemento constituyente cargado. Las propiedades de los hidrogeles se muestran en la columna F como la concentración de EC en mmol/ml, la columna G como la concentración de los grupos sulfato o sulfonato en mmol/ml y la columna C como el módulo de almacenamiento.

Según las suposiciones realizadas en los procedimientos, el módulo de almacenamiento de 20 kPa corresponde aproximadamente a un tamaño de malla de 6 nm y, por lo tanto, debería permitir el acceso estérico a todas las moléculas señalizadoras estructuralmente similares enumeradas en el presente documento en los hidrogeles.

Tabla 7

Denominación	Concentración / pg/ml
FGF-2	550
TGF β 1	4047
bNGF	29500
EGF	11986
HGF	30600
PDGF-BB	26000
PLGF	9971
VEGF-A	48290
Eotaxina	2500
GRO-alfa	9500
IL-8	12386
IP-10	8800
MCP-1	6500
MIP-1 alfa	6400
MIP-1 beta	13500
RANTES	3600
SDF-1 alfa	39800
GM-CSF	41000
IFN-gamma	50700
IL-1 beta	8250
IL-10	9250
IL-12p40	13500
IL-4	36200
IL-6	44368
TNF-alfa	31363
Esclerostina	13300
DKK1	864

La tabla 7 enumera las sustancias de los grupos de sustancias A y B en concentraciones relevantes en los biofluidos.

La invención se explica a continuación con referencia a los ejemplos de realización (ER) de las tablas mostradas anteriormente.

Por ejemplo, los hidrogeles de ENC1-EC1 01 de acuerdo con la tabla 1 (ER1) demuestran ser particularmente ventajosos para ajustar las concentraciones de diversas moléculas señalizadoras (véase la tabla 3). La clase de quimiocinas presenta una elevada similitud estructural de la estructura terciaria, que se estabiliza mediante la interacción de cuatro cisteínas a través de puentes disulfuro (correspondiente a PROSITE ID: PS00471 y PS00472).

Además, las quimiocinas se caracterizan por una carga neta fuertemente positiva IEP > 9 o dominios cargados positivamente tales como en MIP1-alfa y MIP1-beta y un peso molecular inferior a 10 kDa (véase la tabla 3) y se unen fuertemente en el hidrogel *de este tipo de hidrogel* y, por lo tanto, se empobrecen en los biofluidos adyacentes (unión de Mip1-alfa y Mip1-beta de aproximadamente el 60%, las otras quimiocinas eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, Rantes y SDF-1 alfa se unen $\geq 95\%$ (tabla 3), mientras que sorprendentemente las siguientes moléculas señalizadoras fuertemente cargadas positivamente que se asocian a la clase de los factores de crecimiento FGF-2 (IEP 9,58) y TGF β 1 (IEP 8,59), así como proteínas estructuralmente similares de la familia FGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00247) y la familia TGF β 1 (correspondiente a PROSITE ID: PS00250) con el 31% y el 18% solo se unen de forma reducida, PLGF (IEP 8,37) con una unión < 10% se une de forma aún más reducida (tabla 3), y las moléculas señalizadoras asociadas a la clase de las citoquinas con un IEP ligeramente básico tal como IL-10 (IEP 7,65), así como moléculas señalizadoras con un IEP en el intervalo neutro (pH 5,5-7) tales como IL1-beta, IL6 y TNF-alfa y proteínas estructuralmente similares de la familia de proteínas IL-1-beta (correspondiente a PROSITE ID: PS00253), la familia de proteínas IL-10 (correspondiente a PROSITE ID: PS00520), la familia de interleucina-6/GM-CSF/MGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00254) y la familia de proteínas TNF-alfa (correspondiente a PROSITE ID: PS00251) del biofluido complejo se unen solo ligeramente $\leq 30\%$ (tabla 3), (unión de TNF-alfa: aproximadamente el 38%) y por lo tanto están presentes en el biofluido con concentraciones casi sin cambios. Además, el factor de crecimiento con una carga neta ligeramente negativa EGF (IEP 4,8) casi no se une con una unión inferior al 10%. Esto significa que los factores de señalización que son esenciales para la supervivencia de las células, tales como EGF, FGF-2, TGF β o PLGF, no se ven afectados por el secuestro realizado por medio de los hidrogeles mencionados anteriormente.

Las citoquinas fuertemente básicas IFN-gamma (IEP 9,52), IL-4 (IEP 9,25), los antagonistas de WNT y BMP esclerostina (9,57) y DKK1 (8,72), así como proteínas estructuralmente similares de la familia IL-4/IL-13 (correspondiente a PROSITE ID: PS00838) y la familia similar a esclerostina (correspondiente a InterPro ID: IPR008835) y los factores de crecimiento fuertemente básicos bNGF (IEP 9,00), PDGF (IEP 9,4), y VEGF (IEP 9,2), así como proteínas estructuralmente similares de la familia NGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00248), y la familia PDGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00250) e IL-12p40, tal como se esperaba, se unen fuertemente $\geq 59,9\%$ (tabla 3) y, por tanto, se empobrecen en el biofluido.

Poniendo en contacto un biofluido con un hidrogel con las características de carga y de red especificadas del tipo 1 según la tabla 5.1, una selección selectiva de factores de crecimiento con proteínas estructuralmente similares a DKK1, bNGF, PDGF-BB, VEGF, así como quimiocinas (por ejemplo, eotaxina, Gro-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1 MIP-1 alfa, MIP1 beta, Rantes, SDF1 alfa) y citoquinas con proteínas estructuralmente similares a IFN-gamma, IL4 y esclerostina correspondientes a los motivos de secuencia y familias de proteínas señalados pueden, por lo tanto, empobrecerse en el biofluido o aumentarse mediante la precarga del hidrogel en su concentración en el biofluido, mientras que las moléculas señalizadoras EGF, FGF-2, TGF β 1, PLGF, IL-10, IL1 beta, IL6 y TNF alfa mencionadas anteriormente casi no varían, ventajosamente, en su concentración. Además, en el caso de este hidrogel existe una interacción de EC1 con las enzimas trombina y antitrombina, que son importantes para la coagulación sanguínea, según Uwe Freudenberg et al., "Journal of Controlled Release", Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society 220, N° Parte A (28 de diciembre de 2015): 79-88, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.028.

Otro ejemplo de realización particularmente ventajoso (ER2) consiste en el tipo de hidrogel ENC1-EC2 02 (véase la tabla 2) que excepto la unión más reducida de las dos quimiocinas MIP-1 alfa y MIP-1 beta y esclerostina (cada una aproximadamente el 40%, tabla 3) y de la más ventajosa aún más reducida unión de IL-10 (15%), IL-6 (8%), TNF alfa (25%), véase la tabla 3, y de la aún más ventajosa casi carente unión de FGF-2 (5%) y TGF β 1 (0%) y la falta de interacción de EC2 con las enzimas de coagulación sanguínea trombina y antitrombina (véase Uwe Freudenberg et al., "Journal of Controlled Release", Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society 220, N° Parte A (28 de diciembre de 2015): 79-88, doi: 10.1016/j.jconrel. 2015.10.028) presenta un patrón de unión o de secuestro que es casi idéntico al tipo de hidrogel ENC1:EC1 01 (véase la tabla 3). Otro ejemplo de realización ventajoso lo representa ENC2-EC5 23 (ER23, véase la tabla 1), que tiene una característica de carga que se puede asignar al tipo 2 según la tabla 5.1, como el ER2, pero con un contenido de sulfonato ligeramente diferente de 0,14 mmol/ml (tabla 1 o tabla 5.2 columna B) y un número ligeramente diferente de grupos sulfonato por unidad de repetición (UR) dividido por la masa molar (MW) de la UR en [mol/g] de 0,0038, encontrándose, no obstante, ambos parámetros de la tabla 5.1 en el intervalo preestablecido para un hidrogel del tipo 2. Sin embargo, el hidrogel se formó a partir de otro elemento constituyente de gel sintético cargado (EC5) con otra reacción de reticulación (tipo de reticulación 2, tabla 1) y, excepto la unión algo más fuerte de las dos quimiocinas MIP-1 alfa y MIP-1 beta, presenta un patrón de unión o de secuestro casi idéntico que el ER2 (véase la tabla 3). Esto confirma la clasificación de los hidrogeles con los patrones de carga característicos según la tabla 5.1 y también representa un patrón de secuestro particularmente ventajoso.

Otro ejemplo de realización ventajoso (ER3) consiste en el tipo de hidrogel ENC1-EC3 03 (véase la tabla 2), que debido a la concentración significativamente inferior de grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel (tabla 5.2, columna

B, 0,06 en comparación con 0,12 mmol/ml para ER1 o ER2) y también el menor número de grupos sulfato o sulfonato por UR dividido por la masa molar de la UR de 0,0019 en comparación con 0,005 o 0,0035 para ER1 o ER2 (véase la tabla 5.2, columna A) presenta una unión significativamente más reducida a muchas proteínas (moléculas señalizadoras) en comparación con ER1 y ER2. En este tipo de hidrogel, bNGF, PDGF-BB y VEGF A, eotaxina, GRO-alfa, IP-10, Rantes, SDF-1 alfa, IFN-gamma e IL-4 se unen en más del 50% por el hidrogel y, por lo tanto, se empobrecen en un biofluido, pero IL-8, MCP-1 e IL-12p40 se unen solo aproximadamente el 45% (véase la tabla 3), HGF, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, IL-1 beta, IL-10, IL-6, TNF alfa y DKK1 solo ligeramente con el 16-36% (véase la tabla 3) y FGF-2, TGF β 1, EGF, PLGF, GM-CSF y esclerostina casi no se unen (< 12%) (véase la tabla 3) y por lo tanto la mayor parte de las moléculas señalizadoras se unen de forma significativamente inferior que para ER1 y ER2 en el hidrogel. Con este tipo de gel, por ejemplo, una separación ampliamente selectiva de bNGF, PDGF-BB y VEGF A, eotaxina, GRO-alfa, IP-10, Rantes, SDF-1 alfa, IFN-gamma e IL-4 de cualquier biofluido es posible.

Otro ejemplo de realización ventajoso consiste en el hidrogel ENC1-EC4 04 (véase la tabla 1), que debido a la alta concentración de grupos sulfato o sulfonato de 0,28 mmol/ml en el hidrogel (tabla 5.2, columna B) y un número igualmente alto de grupos sulfonato por UR dividido por la masa molar de la UR de 0,0045 mol/g, excepto HGF, PLGF, GM-CSF y EGF, todos los factores investigados se unen al hidrogel con una elevada eficacia (de entre el 72-100%, véase la tabla 3) y por lo tanto se empobrecen en el biofluido (véase la tabla 3).

En particular, con este hidrogel tiene lugar una reducción de todos los factores investigados y estructuralmente similares (IEP y la presencia de similitudes estructurales), en particular de la clase de las quimiocinas, que presentan una alta similitud estructural de la estructura terciaria, que están caracterizadas por la interacción de cuatro cisteínas a través de puentes disulfuro (correspondiente a PROSITE ID: PS00471 y PS00472), por una carga neta fuertemente positiva IEP > 9 o dominios cargados positivamente tales como MIP1 alfa y MIP1 beta y un peso molecular inferior a 10 kDa (véanse las propiedades de proteínas de la tabla), FGF-2 (IEP 9,58), TGF β 1 (IEP 8,59) y proteínas estructuralmente similares de la familia FGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00247), la familia TGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00250), así como moléculas señalizadoras asociadas a la clase de las citocinas con IEP ligeramente básico tales como IL-10 (IEP 7,65), así como moléculas señalizadoras con un IEP en el intervalo neutro (pH 5,5-7) tales como IL1 β , IL6 y TNF y proteínas estructuralmente similares de la familia de proteínas IL-1 β (correspondiente a PROSITE ID: PS00253) y la familia de proteínas IL-10 (correspondiente a PROSITE ID: PS00520) de biofluidos adyacentes. Otro ejemplo de realización ventajoso, ENC2-EC4 20 (véase la tabla 1), que tiene una característica de carga que se puede asignar al tipo 4 según la tabla 5.1, así como el ER4, que presenta el mismo EC 5, véase la tabla 5.1, columna A: 0,0045, pero una concentración de sulfonato inferior de 0,16 mmol/ml (véase la tabla 1 y la tabla 5.1), que todavía se asigna al marco del tipo 4, pero que se formó, a este respecto, con una reacción de reticulación diferente (RR: 2 en la tabla 1), presenta un patrón de unión o de secuestro casi idéntico al ENC1-EC4 04 (véase la tabla 3). Por lo tanto, este hallazgo también confirma el poder predictivo eficaz de las características de carga de los tipos 1-5 según la tabla 5.1 para el secuestro diferenciado de sustancias o grupos de sustancias.

Otro patrón de realización es el hidrogel no cargado formado a partir de ENC1 y ENC3 (ENC2-ENC3 26), que, tal como se esperaba como control negativo, no se une a casi ninguna de las moléculas señalizadoras del biofluido. Con la excepción del menor secuestro, que no puede clasificarse como significativo, de PDGF-BB del $19,7 \pm 23,1\%$ e IP 10 al nivel de $16,1 \pm 16,4\%$, debido a las grandes desviaciones estándar, no tiene lugar ningún secuestro ($\leq 1,3\%$ para todas las moléculas señalizadoras analizadas, véase la tabla 3) por medio de este hidrogel. Este hallazgo se puede atribuir claramente a la ausencia de centros de afinidad cargados y, por lo tanto, a la ausencia de las interacciones de carga discutidas en el presente documento. El módulo de almacenamiento y, por lo tanto, también la anchura de la malla de la red es, por el contrario, con 4,4 kPa (tabla 1), casi idéntico a los módulos de almacenamiento del ENC1-EC2 02, ENC2-EC4 20 y ENC2-EC5 23, es decir, existen interacciones estéricas comparables a los ejemplos de realización cargados con las moléculas señalizadoras. Estos resultados, en particular la falta de interacciones (es decir, la ausencia de efectos de unión y secuestro) del hidrogel no cargado (ENC2-ENC3 26) con las moléculas señalizadoras, apoyan las reivindicaciones correspondientes a la tabla 5.1 para el secuestro diferenciado.

Sin embargo, al mismo tiempo, pueden liberarse factores individuales selectivamente en el biofluido mediante la precarga selectiva de los hidrogeles de los tipos 1 a 3 de la tabla 5, paralelamente e independientemente del secuestro y, por lo tanto, del empobrecimiento de los otros factores. Con los diferentes tipos de hidrogel, casi cualquier nivel de moléculas señalizadoras individuales se puede ajustar en biofluidos complejos mediante la precarga selectiva de los hidrogeles o si no el secuestro (reducción) casi cuantitativo de moléculas señalizadoras (por ejemplo, la aplicación para separar moléculas señalizadoras de cualquier solución que contenga proteínas).

Sobre la base a los ejemplos de realización en ENC1-EC1 01 a ENC2-ENC3 26, se pueden observar las siguientes relaciones entre las propiedades de las proteínas, las propiedades del hidrogel y la unión de las proteínas en la red de hidrogel, que son importantes para la descripción de la invención: Una fuerte unión de las moléculas señalizadoras correspondientemente a la tabla 3 se correlaciona en el lado de las proteínas con una carga neta positiva (y, a este respecto, con un IEP básico elevado como parámetro correspondiente) e inversamente con el peso molecular (un IEP elevado y un peso molecular reducido fortalecen la unión, véase la tabla 3, las quimiocinas fuertemente cargadas positivamente y, al mismo tiempo, relativamente pequeñas (< 9 kDa) son las que más

fuertemente se unen y en el lado de las redes de hidrogel actúa una (1) alta concentración de grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel (tabla 1 y 5.2, columna B) y (2) un elevado número de grupos sulfato o sulfonato por UR dividido por la masa molar de la UR fortaleciendo la unión de las moléculas señalizadoras. De forma correspondiente al parámetro se obtiene para los hidrogeles el siguiente orden de la unión más fuerte ENC1-EC4 04 $\approx$ ENC2-EC4 20 < ENC1-EC1 01 < ENC1-EC2 02 $\approx$ ENC2-EC5 23 < ENC1-EC3 03 << ENC2-ENC3 26 a la unión más débil, este hallazgo se sustenta por los valores de unión encontrados experimentalmente (véase la tabla 3). Además, mediante diferentes combinaciones de ambos parámetros de la red de hidrogel (1) y (2) mencionados anteriormente, pueden ajustarse las fuertes interacciones entre proteínas y polielectrolitos cargados negativamente (por ejemplo, glicosaminoglicanos) conocidas en la literatura como "interacciones específicas", es decir, una coincidencia espacial de diferentes centros de interacción y, por lo tanto, otras propiedades estructurales adicionalmente al peso molecular y la carga neta se pueden utilizar también en el lado de la proteína con el fin de modular la unión a los hidrogeles. Estas relaciones también explican la reducida unión de las moléculas señalizadoras fuertemente básicas y relativamente pequeñas FGF-2, TGF β 1 y PLGF a los tipos de hidrogel ENC1-EC1 01, ENC1-EC2 02, ENC1-EC3 03 y ENC1-EC4 04.

Otras posibilidades de control de los niveles de moléculas señalizadoras solubles consisten en la aplicación secuencial o combinada de los diferentes tipos de hidrogel para poder ajustar con precisión una amplia diversidad de propiedades específicas de secuestro y liberación. Por medio de la variación selectiva de las propiedades de la red (en particular los parámetros (1) y (2) descritos anteriormente) y también la combinación de micropartículas de hidrogel compuestas de manera diferente (por ejemplo, carga con moléculas señalizadoras individuales) en los denominados materiales de hidrogel de varias fases (es decir, mediante el mezclado de tipos de hidrogel de diferentes tipos o precarga con moléculas señalizadoras o proteínas) pueden ajustarse también otras relaciones de concentración ventajosas en biofluidos adyacentes.

Al ampliar el análisis a otras moléculas señalizadoras, también es posible con el procedimiento propuesto el control de la concentración de estas sustancias en cualquier biofluido.

Para poder controlar eficazmente las complejas funciones biológicas de las moléculas señalizadoras, por ejemplo, para conceptos terapéuticos, además de la liberación mantenida de moléculas señalizadoras individuales a partir de hidrogeles precargados con las moléculas señalizadoras, es necesaria una gestión activa de diferentes moléculas señalizadoras del entorno biológico inmediato de las células o de la aplicación biológica. Por lo tanto, las interacciones con una pluralidad de moléculas señalizadoras relevantes deben considerarse de manera integral. Si los hidrogeles con componentes sulfatados o sulfonados se cargan, por ejemplo, con una molécula señalizadora para la liberación mantenida, pueden secuestrarse y, por lo tanto, inactivarse, simultáneamente con la liberación terapéuticamente deseada de las moléculas señalizadoras otras moléculas también terapéuticamente importantes del entorno biológico, es decir, puede obtenerse un efecto secundario indeseable. Sin embargo, por otra parte, también se pueden secuestrar selectivamente moléculas señalizadoras no deseadas terapéuticamente y, por tanto, inactivarlas en el hidrogel que porta grupos sulfatados o sulfonados. En general, son posibles escenarios de liberación y secuestro muy complejos, que en su totalidad deciden sobre el efecto biológico, en particular las propiedades de separación molecular, de los materiales.

Otras formas de realizaciones ventajosas de la invención consisten en el uso de hidrogeles correspondientes a los tipos 1-4 de la tabla 5 para modular la concentración o el nivel de proteínas biológicamente activas en niveles totales bajos.

Una gran ventaja del proceso es la universalidad de sus posibilidades de uso. El procedimiento se puede utilizar ventajosamente tanto para la purificación biotecnológica como para la separación de mezclas de proteínas de biofluidos o en los mismos utilizando hidrogeles con componentes sulfatados o sulfonados.

En un sentido más estricto ejemplar, el procedimiento se puede utilizar para la gestión de factores *in vivo* para controlar la angiogénesis, enfermedades inmunológicas, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y la cicatrización de heridas.

Durante la cicatrización de heridas, las quimiocinas en su mayor parte con actividad proinflamatoria (por ejemplo, eotaxina, GRO- α , IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-3, MCD, RANTES y SDF-1) son secuestradas en el interior de los hidrogeles, mientras que los factores prorregenerativos (por ejemplo, EGF, FGF-2, TGF β 1, IL-10, HGF y PLGF) permanecen en gran parte inalterados.

Un sector de aplicación particularmente importante de la invención consiste en el control de las concentraciones de sustancias en biofluidos que son responsables de las decisiones sobre el destino celular *in vitro* e *in vivo*. La desregulación de las quimiocinas proinflamatorias y la inflamación crónica asociada es la causa del desarrollo de diversas enfermedades tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, asma o artritis reumatoide. La modulación selectiva de la concentración de estos factores inflamatorios a partir de biofluidos mediante la aplicación según la invención de diferentes hidrogeles con componentes sulfatados o sulfonados representa un posible escenario de aplicación.

En un sentido más amplio, el uso según la invención de los hidrogeles con componentes sulfatados o sulfonados permite la purificación selectiva de las moléculas señalizadoras investigadas en el presente documento o estructuralmente similares a partir de mezclas de proteínas complejas. Por lo tanto, los sistemas de gel descritos pueden utilizarse biotecnológicamente para la purificación selectiva de proteínas a partir de lisados celulares de origen microbiano o eucariota. Dichos lisados celulares se hacen pasar, a este respecto, a través de hidrogeles según la invención para unir las moléculas señalizadoras. En una segunda etapa, las sustancias unidas se pueden eliminar de nuevo de los hidrogeles, y por lo tanto separarse de los mismos, para su uso posterior enjuagando con soluciones con alto contenido de sal o polielectrolitos cargados positivamente (por ejemplo, quitosano). Además, una selección negativa para la separación de las moléculas señalizadoras que se unen ligeramente a los hidrogeles de los tipos 1-3 en dichas condiciones, por ejemplo, EGF, FGF-2, TGF- β , IL-10, HGF y PLGF, es posible mediante el uso de sobrenadantes después de 24 horas de unión.

Una ventaja práctica relevante de la invención es que incluso con altas concentraciones de albúmina de 1 mg/ml a 45 mg/ml con niveles simultáneamente bajos de moléculas señalizadoras de 100 pg/ml a 2000 ng/ml en electrolito fisiológico como biofluido, se realiza la unión de una pluralidad de moléculas señalizadoras biológicamente relevantes a hidrogeles sulfatados o sulfonados con características de carga selectivamente graduales y estructura de red y en base a esto, pueden utilizarse las diferencias de selectividad en la unión de las moléculas señalizadoras individuales a los diferentes tipos de hidrogel.

Los ejemplos de realización de ENC1-EC1 01 a ENC1-EC4 011 enumerados en la tabla 1 son hidrogeles reticulados covalentemente según la reacción de reticulación 1, en los que de 6 a 24 grupos carboxilo (dependiendo de la relación molar de 1,5 a 6 en el caso de PEG en estrella de cuatro brazos) de una molécula de EC4 (poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), relación molar de ácido estirenosulfónico:ácido maleico 3:1, tabla 1) se activaron por medio de EDC/sulfo-NHS y se convirtieron directamente en un hidrogel por medio del ENC1 de cuatro brazos terminado en amina (véase la tabla 1). Así se obtienen hidrogeles con una concentración de sulfonato variable de 0,28 a 0,06 mmol/ml y módulos de almacenamiento variables de 4,8 a 19,6 kPa (véase la tabla 1).

Los ejemplos de realización ENC1-EC5 12 a ENC1-EC5 19 enumerados en la tabla 1 son hidrogeles reticulados covalentemente según el principio de reticulación 1, en los que de 6 a 24 grupos carboxilo (dependiendo de la relación molar de 1,5 a 6 en el caso de PEG en estrella tetrafuncionales) de una molécula de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con una relación molar de ácido estirenosulfónico con respecto a ácido maleico de 1:1 (EC5), se activaron por medio de EDC/SNS y se convirtieron directamente en un hidrogel por medio del ENC1 de cuatro brazos terminado en amina (véase la tabla 1). Así se obtuvieron hidrogeles con concentraciones variables de sulfonato de 0,13 a 0,05 mmol/ml y módulos de almacenamiento variables de 3 a 21,8 kPa (véase la tabla 1).

Los ejemplos de realización ENC2-EC4 20 a ENC2-EC4 22 son hidrogeles reticulados covalentemente según el principio de reticulación 2, en los que ocho de los grupos carboxilo de EC4 activados mediante EDC/sulfo-NHS (poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con la relación molar de ácido estirenosulfónico:ácido maleico de 3:1) se funcionalizaron en una primera etapa por medio de la molécula reticulante bifuncional corta N-(2-aminoetil)maleimida y después se purificaron y se aislaron. Estos derivados de EC4 se convirtieron después en un hidrogel mediante mezclado en solución salina fisiológica (o suero) con ENC-2 (PEG de cuatro brazos terminado en tiol). Se obtienen hidrogeles con una gradación en la concentración de los grupos sulfonato de 0,16 a 0,05 mmol/ml y módulos de almacenamiento de 3,7 a 0,2 kPa.

Los ejemplos de realización ENC2-EC5 23 a ENC2-EC5 25 son hidrogeles reticulados covalentemente según el principio de reticulación 2 (RR2, tabla 1), en los que ocho de los grupos carboxilo de EC5 (poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con una relación molar ácido estirenosulfónico:ácido maleico de 1:1) activados mediante EDC/sulfo-NHS se funcionalizaron en una primera etapa por medio de la molécula reticulante bifuncional corta N-(2-aminoetil)maleimida y después se purificaron y se aislaron. Estos derivados de EC5 se convirtieron después en un hidrogel mediante mezclado en solución salina fisiológica (o suero) con ENC-2 (PEG de cuatro brazos terminado en tiol). Se obtienen hidrogeles con una gradación en la concentración de los grupos sulfonato de 0,14 a 0,04 mmol/ml y módulos de almacenamiento de 4,6-0,3 kPa.

El ejemplo de realización ENC2-ENC3 26 es un hidrogel de PEG no cargado en el que, según el principio de reticulación 2, se hizo reaccionar PEG de cuatro brazos terminado en tiol (ENC-2) con un PEG de cuatro brazos terminado en maleimida (ENC-3). Este hidrogel sirvió como control negativo no cargado en los ensayos de secuestro.

Sobre la base de los ejemplos de realización 04-5, es posible, sorprendentemente, producir hidrogeles completamente sintéticos con una amplia diversidad de propiedades y combinaciones de propiedades ventajosas sin reacciones inmunogénicas desventajosas. Se puede ajustar en gran medida independientemente entre sí una amplia concentración de grupos sulfonato en el hidrogel hinchado de 0,04 a 0,28 mmol/ml y con una variación igualmente grande del módulo de almacenamiento de 0,2 a 21,8 kPa. Por ejemplo, los hidrogeles ENC2-EC4 21, ENC1-EC5 14, ENC1-EC5 15 y ENC1-EC4 08 presentan una concentración constante de grupos sulfonato en el hidrogel hinchado de 0,08 mmol/ml pero al mismo tiempo módulos de almacenamiento crecientes de 1,1, 5,5, 12,5 y

19,6 kPa, es decir, la concentración de sulfonato y la rigidez de los hidrogeles puede modularse independientemente entre sí en un amplio intervalo. Del mismo modo, con la selección del ENC1-EC5 19 con una concentración de sulfonato de 0,05, del ENC1-EC4 11 con una concentración de sulfonato de 0,06 y del ENC1-EC4 10 con una concentración de sulfonato de 0,09 con un módulo de almacenamiento casi constante de 8,0-8,5 kPa, la concentración de sulfonato se puede variar independientemente de la rigidez de los hidrogeles (véase la tabla 1). Además, debido a una variación adicional de las relaciones molares ENC:EC en los intervalos de entre 1,5 y 3 y de entre 3 y 6 para RR1 y de entre 0,5 y 0,75, así como 1 y 1,5, así como 1,5 y 2 para RR2 y otra variación en la concentración de EC y ENC, se puede obtener una pluralidad de otras combinaciones de propiedades.

Sorprendentemente, a este respecto, mediante la reticulación del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), comenzando con la activación de EDC/sulfoNHS de uno de los grupos ácidos estrechamente adyacentes del ácido maleico, que en su reactividad no solo se ven influenciados por el grupo carboxilo adyacente sino en particular por los grupos sulfonato y las unidades de estireno hidrófobas de una forma impredecible, pudieron sintetizarse materiales de hidrogel definidos con elementos constituyentes no cargados con las propiedades ampliamente graduables mencionadas anteriormente. A este respecto, se logró una formación de red precisa (para RR1) o derivatización (para RR2) mediante el uso de un tiempo de activación sorprendentemente muy corto de 1 min, es decir, el tiempo en el que se proporciona EDC/sulfoNHS al poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), véase la tabla 4, antes de hacer reaccionar a continuación una molécula que porta grupos amina mediante mezclado con el poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) entonces activado y un mezclado a fondo intensivo de los asociados de reacción.

En un ejemplo de realización adicional se funcionalizaron hidrogeles de los tipos ENC1-EC1 01, ENC1-EC4 20, ENC1-EC5 23 y ENC1-EC3 26 con el péptido de adhesión CWRGDSP y se precargaron con VEGF-A y FGF-2 y se utilizaron para el cultivo de células endoteliales humanas en la superficie del gel en un medio de cultivo celular desprovisto de suero. La morfología de las células adheridas se analizó después de un periodo de cultivo de 24 h, tal como se muestra en la figura 1 para ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20, ENC2-EC5 23, ENC2-ENC3 26. Las células endoteliales adquirieron, a este respecto, una morfología diferente en los diferentes hidrogeles, que puede describirse mediante los dos parámetros, relación de aspecto y circularidad. Una relación de aspecto grande y una circularidad baja corresponden a la morfología de células endoteliales alargadas deseada, a la primera etapa en la formación de las estructuras tubulares biológicamente deseadas. La relación de aspecto de las células endoteliales cultivadas en ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20 y ENC2-EC5 23 fueron $3,4 \pm 1,0$, $4,1 \pm 1,1$ y $4,9 \pm 1,6$, mientras que los geles de referencia no cargados ENC2-ENC3 26 presentaban una relación de aspecto significativamente inferior de $2,1 \pm 1,2$. La circularidad se comportó de forma correspondientemente inversa con $0,5 \pm 0,1$, $0,4 \pm 0,1$, $0,3 \pm 0,1$ y $0,7 \pm 0,3$ para las células endoteliales en los hidrogeles ENC1-EC1 01, ENC1-EC4 20 y ENC1-EC5 23 y ENC1-EC3 26. Estas diferencias fueron estadísticamente muy significativas. Las células endoteliales se comportan en consecuencia en los hidrogeles con las diferentes propiedades de carga y secuestro de tipo 1 (ENC1-EC1 01), tipo 4 (ENC2-EC4 20), tipo 2 (ENC2-EC5 23) y de tipo 5 no cargado (ENC1-EC3 26) correspondientes a la tabla 5.1 de forma claramente diferente. En el hidrogel no cargado, las células muestran proporciones de aspecto cortas no deseadas y una alta circularidad, mientras que la morfología deseada aumenta en el orden ENC1-EC1 01 < ENC1-EC4 20 < ENC2-EC5 23. El hidrogel ENC2-EC5 23 de tipo 2 muestra los mejores resultados en este ensayo. Esta gradación confirma una influencia directa de las propiedades de la carga y los patrones de secuestro sobre el cultivo de células endoteliales humanas.

En un ejemplo de realización adicional, se utilizaron hidrogeles de tipo 1 (ENC1-EC1 01), tipo 4 (ENC1-EC4 20), tipo 2 (ENC1-EC5 23) y tipo 5 no cargados (ENC1-ENC3 26) para la polimerización de células mesenquimales del estroma humanas. Los hidrogeles respondían a las células, es decir, además de la funcionalización de los hidrogeles con el péptido promotor de la adhesión CWGRGDSP, la secuencia peptídica GCGGPQGIWQGCG, que puede escindirse enzimáticamente por medio de metaloproteasas de matriz secretadas por estas células, se conjugó previamente con el elemento constituyente no cargado respectivo y se utilizó para la reticulación según RR2. Después de 24 horas, la actividad metabólica de las células embebidas se caracterizó como prueba de viabilidad mediante un ensayo PrestoBlue®. A este respecto, la actividad metabólica, medida como unidades de fluorescencia relativa, de las células mesenquimales del estroma humanas polimerizadas dentro del hidrogel era del tipo 1 7112 ± 3924 , del tipo 2 3704 ± 2945 , del tipo 4 3160 ± 6023 y del tipo no cargado 5 2316 ± 446 . De forma correspondiente, las células mesenquimales del estroma humanas embebidas en geles de tipo 2 mostraron la actividad metabólica más alta y las embebidas en geles del gel de referencia no cargados la más baja. Por lo tanto, los hidrogeles, en particular del tipo 2, resultaron ser especialmente ventajosos para el cultivo de células mesenquimales del estroma humanas vivas en 3D.

En otro ejemplo de realización ventajoso, se funcionalizaron ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20, ENC2-EC5 23, ENC2-ENC3 26 con el antibiótico gentamicina, que porta grupos cargados positivamente, mediante secuestro diferenciado. La inhibición se midió a continuación liberando la gentamicina de los diferentes hidrogeles utilizando las dos cepas bacterianas relevantes que causan enfermedades *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus epidermidis* (*Staph. epidermidis*). El efecto antimicrobiano se midió sobre la base del tamaño de la zona de inhibición (eliminación del hidrogel de la placa de cultivo, véase Material y procedimientos). No hubo zonas de inhibición detectables para los hidrogeles de los tipos ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20, ENC2-EC5 23, ENC2-ENC3 26 sin secuestro previo de gentamicina, es decir, los hidrogeles no tenían efecto antimicrobiano. En el caso del secuestro diferenciado previo

de gentamicina por los hidrogeles, se midieron las siguientes zonas de inhibición graduales: ENC1-EC1 01: $3,08 \pm 0,33$ mm, ENC2-EC4 20 *E. coli*: $3,08 \pm 0,33$ mm, *S. epidermidis*: $2,94 \pm 0,35$ mm, ENC2-EC4 20: *E. coli*: $1,78 \pm 0,27$ mm, *S. epidermidis*: $1,76 \pm 0,45$ mm; ENC2-EC5 23 *E. coli*: $2,18 \pm 0,38$ mm, *S. epidermidis*: $1,81 \pm 0,51$ mm y para los geles de referencia no cargados ENC2-ENC3 26 *E. coli*: $0,48 \pm 0,36$ mm, *S. epidermidis*: $0,90 \pm 0,28$ mm. En consecuencia, para los geles de referencia no cargados ENC2-ENC3 26, tal como se esperaba, solo las cantidades más pequeñas de gentamicina se secuestran de forma inespecífica y posteriormente se liberan de nuevo. Se encontró un efecto antimicrobiano gradual en el orden ENC2-EC4 20 < ENC2-EC5 23 < ENC1-EC1 01 para los otros hidrogeles. Este hallazgo respalda las afirmaciones sobre el secuestro diferenciado de moléculas de principio activo cargadas positivamente. Además, se pueden ajustar diferentes efectos antimicrobianos mediante la variación de la concentración de secuestro de gentamicina.

Material y procedimientos:

Desulfatación regioselectiva de heparina (producción de EC2 y EC3 a partir de EC1)

Para la síntesis de heparina desulfatada regioselectivamente (EC2 y EC3), se disolvió en primer lugar heparina (MW 14.000, Merck-Millipore, N° del fabricante: 375095, Alemania, EC1) en agua ultrapura desionizada y se desalinizó utilizando una columna de intercambio iónico Amberlite IR-120 H+ (Sigma-Aldrich, Alemania). Mediante la adición de piridina (Sigma-Aldrich, Alemania) a la solución de heparina hasta alcanzar un pH de 6, se formó una sal de heparina-piridina, que se enriqueció por evaporación del disolvente en un evaporador rotatorio B-490 (Büchi, Alemania), después se liofilizó a -80 °C (GEA Lyovac GT2, Alemania) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

Para la producción de heparina N-desulfatada (N-DSH, EC2) se disolvió 1 g/l de heparina-piridina en una mezcla de DMSO y agua ultrapura desionizada (95:5) y se incubó a 50 °C durante 1,5 horas. La solución resultante se diluyó 1:1 con agua ultrapura desionizada y se ajustó a pH 9 con una solución de hidróxido de sodio 1 M (Sigma-Aldrich, Alemania). Después de la diálisis de la solución (Spectrum Labs, Alemania, MWCO = 8 kDa) frente a agua ultrapura desionizada durante tres días, se realizó la N-acetilación de la heparina desulfatada. Para ello se añadieron a la solución metanol al 10% v/v (Sigma-Aldrich, Alemania) y carbonato de sodio 50 mM (Sigma-Aldrich, Alemania). La reacción de acetilación tuvo lugar durante tres horas con enfriamiento a 4 °C y agitación constante a 400 rpm mediante la adición de 400 µl de anhídrido acético (Sigma-Aldrich, Alemania) por 1 mg de heparina cada media hora y el ajuste posterior del pH a 7,5 mediante la adición de una solución de carbonato de sodio 2 M.

Para la producción de heparina 6O-N-desulfatada (6ON-DSH, EC 3) se disolvió 1 g/l de heparina-piridina en una mezcla de DMSO y agua ultrapura desionizada (95: 5) y se incubó a 90 °C durante 24 horas. La solución resultante se diluyó 1:1 con agua ultrapura desionizada y se ajustó a pH 9 con una solución de hidróxido de sodio 1 M (Sigma-Aldrich, Alemania). Después de la diálisis en un tubo de diálisis (laboratorios Spectrum, Alemania, MWCO = 8 kDa) frente a agua ultrapura desionizada durante tres días, la heparina desulfatada-6O-N se enriqueció por evaporación del disolvente B-490 (Büchi, Alemania) y después se liofilizó (GEA Lyovac GT2, Alemania).

Caracterización de EC y ENC (véase la tabla 2):

El peso molecular de EC1-EC3 se determinó mediante dispersión de luz de múltiples ángulos a 690 nm en un aparato Dawn HELEOS II (Wyatt Technology Europe, Alemania). Los valores dn/dc necesarios para la determinación del peso molecular se determinaron con un detector RI (Optilab T-rEX, Wyatt, Alemania) a una longitud de onda de $\lambda = 690$ nm. Los incrementos de RI, dn/dc de $0,1351$ ml g⁻¹ para EC1, EC2 y EC3 fueron necesarios para la evaluación de los experimentos de dispersión de luz. La evaluación de los resultados de dispersión de luz para determinar la masa molar se realizó con el programa informático Astra, versión 6.1 (Wyatt Technology, Estados Unidos).

El grado de sulfatación de los derivados de heparina (EC1-EC3) se determinó mediante análisis elemental (Elementar, Vario MICRO cube, Alemania) basándose en la relación molar S:N. Debido a que cada unidad de disacárido contiene exactamente un átomo de N, el grado de sulfatación de EC1, EC2 y EC3 (número de grupos sulfato/unidad de repetición) se determinó mediante la relación molar S:N. A partir de ello también se determinó el peso molecular de la unidad de repetición. Basándose en ello, se calculó el número de grupos sulfato por unidad de repetición o por mol de polímero.

El peso molecular y el número de grupos sulfonato por unidad de repetición o por mol de polímero de EC4 y EC5 (poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico)) se basan en la información del fabricante (Sigma-Aldrich, N° del fabricante: 434566, Alemania).

El peso molecular y la estructura de ENC1, ENC2, ENC3, PEG de cuatro brazos terminado en amina, tiol o maleimida se basan en la información del fabricante (Jenkem technology, Estados Unidos). El peso molecular y la estructura de ENC4 (PEG de cuatro brazos terminado en péptido escindible enzimáticamente) está de acuerdo con el procedimiento, tal como se ha descrito, producido y utilizado por Tsurkan et al. 2013 (Adv. Mater. 2013, 25, 2606-2610).

Producción de hidrogeles a base de heparina o derivados de heparina (véase también la tabla 1): Para producir los hidrogeles, se disolvieron según el tipo de hidrogel (véase la tabla 2), como elemento constituyente cargado (EC) heparina (EC1) (Merck-Millipore, N° del fabricante: 375095, Alemania), derivados de heparina desulfatados a base de EC1 mediante el procedimiento descrito anteriormente, véase Desulfatación regioselectiva, para EC2 y EC3) en agua desionizada ultrapura a 4 °C durante 30 segundos a 500 rpm con un mezclador de vórtice (IKA, Alemania). Adicionalmente se disolvieron para todos los tipos de hidrogel como ENC1 PEG terminado en amina de cuatro brazos (MW 10.000, Jenkem technology, Estados Unidos), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC; Sigma-Aldrich, Alemania) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS; Sigma-Aldrich, Alemania) de la misma forma. Para asegurar la disolución completa de los elementos constituyentes de hidrogel, estas soluciones se trataron adicionalmente durante 5 min a 4 °C con un baño de ultrasonidos (RK 100H, Bandelin, Alemania).

Para activar de EC1 a EC3, se añadieron EDC y sulfo-NHS (relación 2:1 de EDC:sulfo-NHS) al EC disuelto (4 mol de sulfo-NHS, 8 mol de EDC con respecto a cada mol de ENC1 de la mezcla de reacción terminada) y se incubaron de forma correspondiente a los tiempos de la tabla 4 a 4 °C. Después del periodo de activación de EC1, EC2, EC3, el PEG de 4 brazos terminado en amina disuelto (ENC1) se añadió también y se mezcló durante 30 segundos a 500 rpm con un mezclador de vórtice (IKA, Alemania).

Producción de hidrogeles a base de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) según la reacción de reticulación 1 (RR1, véase también la tabla 1):

Se utilizaron poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con la relación molar ácido 4-estirenosulfónico:ácido maleico 3:1 (Sigma-Aldrich, N° del fabricante: 434566, Alemania, EC4, véase la tabla 2) y con la relación molar ácido 4-estirenosulfónico:ácido maleico 1:1, Sigma-Aldrich, N° del fabricante: 434558, Alemania, EC5, véase la tabla 2) y ENC1 (PEG de cuatro brazos terminado en amina, (MW 10.000, Jenkem technology, Estados Unidos) para producir hidrogeles reticulados covalentemente de la forma siguiente: se disolvieron EC4 o EC5 y ENC1 respectivamente en un tercio del volumen total de la mezcla de hidrogel en agua desionizada ultrapura con 3 veces la concentración que se indica en la tabla 1 y se trataron adicionalmente durante 5 min a 4 °C con un baño de ultrasonidos (RK 100H, Bandelin, Alemania). A continuación, todas las soluciones se templaron a 4 °C para las etapas adicionales. Se disolvieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC; Sigma-Aldrich, Alemania) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS; Sigma-Aldrich, Alemania) también en cada caso en una sexta parte de toda la mezcla de reacción y se calentaron a 4 °C. La relación molar de ENC1:EDC:sulfoNHS es de 1:8:4 (1:2:1 para cada grupo amina de ENC1). Como etapa siguiente, se añadieron el EDC y el sulfoNHS al EC4 o EC5 y se mezclaron pipeteando y se esperaron 30 segundos, a continuación la mezcla de reacción se mezcló durante 10 segundos en el agitador de vórtice (VWR, Alemania) y después se esperaron nuevamente 20 segundos. Después de este procedimiento con un tiempo de activación total de 1 min, se añadió el ENC1 al EC4 o EC5 activado pipeteando en el agitador de vórtice y a continuación se mezcló con el agitador de vórtice durante 10 segundos adicionales. La mezcla de reacción terminada (las concentraciones de ENC1 y EC4 o EC5 corresponden ahora a las concentraciones indicadas en la tabla 1) se pueden verter ahora en cualquier forma mediante pipeteo y la formación de gel tuvo lugar por polimerización a lo largo de un periodo de 12 horas. A continuación, los hidrogeles se hincharon completamente en solución salina tamponada con fosfato mediante múltiples intercambios de solución durante varias horas antes del uso o la caracterización posterior de los hidrogeles.

Producción de hidrogeles para cultivo celular con células endoteliales humanas:

Para el cultivo de células endoteliales humanas, se formaron geles unidos a superficie con un espesor final de aproximadamente 100 µm pipeteando 11 µl de la mezcla de reacción final/cm² sobre cubreobjetos de vidrio. Para ello, los cubreobjetos de vidrio se recubrieron previamente con una fina película de poli(etileno-alt-anhídrido de ácido maleico) según el procedimiento de Pompe et. al. Biomacromolecules 2003, 4, 1072-1079 para garantizar una unión covalente del hidrogel. Para la modificación con péptidos RGD, los hidrogeles formados hinchados en solución salina tamponada con fosfato con EDC/sulfo-NHS con una concentración de EDC 50 mM y sulfo-NHS 25 mM se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato 1/15 M a 4 °C y los grupos carboxilo remanentes del EC4 o EC5 se activaron durante 20 min y después se enjuagaron con tampón de borato (100 mM, pH 8,0, 4 °C). Los hidrogeles activados se hicieron reaccionar después con una solución con una concentración de 50 mg/ml de la secuencia peptídica H2N-GWGGRGDSP-CONH2 (Peptides International, Louisville, KY, Estados Unidos) disuelta en tampón borato (100 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente durante 2 horas y después se lavó en exceso con solución salina tamponada con fosfato.

Cultivo de células:

Se pasaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, Lonza, Alemania) en frascos de cultivo celular recubiertos con fibronectina en Promocell C-22010 con una mezcla suplementaria (PromoCell GmbH, Alemania) a 37 °C y el 5% de CO₂ hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Las células del pase 2 al 6 se utilizaron en los experimentos siguientes.

Los hidrogeles unidos a la superficie funcionalizados con RGD se incubaron con VEGF-A y FGF-2 a una concentración de 0,565 µg por cm² de superficie de hidrogel durante 18 horas a temperatura ambiente y después se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato.

Se cultivaron 50.000 células/cm² en los hidrogeles funcionalizados con RGD, VEGF-165 y FGF-2 en medio Promocell sin la mezcla suplementaria. Después de 24 horas de cultivo, las células se lavaron, se fijaron y se caracterizaron mediante microscopía óptica (microscopio invertido Olympus IX73, Hamburgo, Alemania). La relación de aspecto se determinó después de medir células individuales utilizando el programa informático de procesamiento de imágenes Fiji dividiendo la longitud de la célula entre la anchura de la célula. La circularidad se determinó utilizando el programa informático de procesamiento de imágenes Fiji según la fórmula siguiente: $\text{circularidad} = 4 \cdot \pi \cdot (\text{área de célula} / \text{perímetro})^2$. En cada caso, se determinaron 20 células por imagen en $n = 10$ muestras independientes. El análisis estadístico con el programa informático GraphPad Prism y un ensayo Anova unidireccional mostró diferencias significativas para todas las condiciones examinadas.

Producción de hidrogeles a base de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) según la reacción de reticulación 2 (RR2, véase también la tabla 1):

Derivatización de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con grupos maleimida:

Para la formación de hidrogeles según la reacción de reticulación 2, el EC4 o EC5 debe funcionalizarse en primer lugar con trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida (Sigma, Alemania). Para ello, se disolvieron 500 mg (25 µmol) del EC4 o EC5 respectivo en 2,7 ml de agua ultrapura desionizada y se agitaron en hielo durante 10 min. Un vaso de 25 ml con tapón a presión sirve como recipiente de muestra. A continuación, se añaden 65,14 mg de NHS (0,30 mmol) disueltos en 400 µl y 115,02 mg (0,60 mmol) de EDC disueltos en 200 µl de agua ultrapura desionizada helada a la solución de EC4 o EC5 y se esperan 5 min. En la etapa siguiente, se añadieron gota a gota 76,25 mg (0,30 mmol) de trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida disueltos en 200 µl de agua MilliQ al EC4 o EC5 activado a lo largo de un periodo de 40 s después de que finalizara el tiempo de activación. La mezcla de reacción se agita en hielo durante 10 min adicionales. Finalmente, se retira el baño de hielo y se agita la preparación a temperatura ambiente durante la noche. El producto se dispone en un tubo de diálisis con un tamaño de exclusión de MWCO = 5 kDa. La diálisis se lleva a cabo durante dos días, dializándose frente a una solución de cloruro de sodio monomolar de 2,5 l durante 6 horas el primer día. A este respecto, la solución se cambia, en cada caso, cada 2 horas. Después de 6 h, se lleva a cabo la diálisis frente a agua ultrapura desionizada durante la noche. El segundo día se realiza la diálisis durante 8 horas con agua ultrapura desionizada, cambiándose el agua, en cada caso, cada 2 horas. En la última etapa, la solución se liofiliza.

Cromatografía de exclusión por tamaño para la caracterización de derivados de maleimida EC4/EC5:

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se utiliza para determinar el número de grupos maleimida por molécula EC4 o EC5. Para ello, el péptido RGD-SP ($M = 990$ g/mol) se acopla al derivado de maleimida EC4/EC5 en diferentes excesos. Los excesos molares de RGD-SP investigados son 6,8, 10 o 12 con respecto a EC4 o EC5. En primer lugar, se registra una calibración mezclando 35 µl de la concentración de RGD-SP respectiva con 35 µl de solución salina tamponada con fosfato en un recipiente de muestra.

Para esta investigación se utiliza una columna BioSEP-SEC S2000 de Phenomenex (Alemania), que se inserta en el sistema HPLC Agilent 1100 (Alemania). La solución salina tamponada con fosfato con un caudal de 0,5 ml/min sirve como eluyente. El volumen de inyección es de 50 µl.

La determinación de los grupos maleimida también se realiza en las mismas condiciones de elución. En cada caso, se mezclan 35 µl de una concentración de RGD con 35 µl de la solución de derivado de maleimida EC4/EC5 en el recipiente de muestra. El procedimiento permite la determinación exacta de las conversiones de maleimida con EC4 o EC5.

Producción de hidrogeles basados en derivados de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) según la reacción de reticulación 2 (RR2, véase también la tabla 1):

Se disuelven derivados de maleimida EC4/EC5 y PEG de cuatro brazos terminado en tiol (ENC2, $M_w = 10.000$ Da, Jenchem, Estados Unidos, tabla 2) en una solución salina tamponada con fosfato con el doble de la concentración especificada en la tabla 1. A continuación se pipetea volúmenes iguales de ambos componentes en un recipiente de microrreacción y se agitan en el agitador de vórtice durante 10 segundos. A continuación, se retira un volumen definido de la mezcla de reacción y se dispone sobre un cubreobjetos de vidrio revestido con Sigma Cote® con un diámetro de 9 mm. Otro cubreobjetos de vidrio recubierto con Sigma Cote® se dispone sobre la gota. Después de 30 minutos, se retiran los cubreobjetos de vidrio y el disco de gel se hincha en una solución salina tamponada con fosfato a lo largo de 12 horas. En el caso de concentraciones altas de ENC2, el valor de pH del ENC2 se puede ajustar a un valor de pH de entre 5-7 con HCl 1 M para lograr una formación de gel óptima.

Producción de hidrogeles para cultivo celular con células estromales mesenquimales humanas en 3D:

Los hidrogeles escindibles por metaloproteasa de matriz (MMP) se prepararon utilizando el ENC4 (tabla 4, sintetizado según el procedimiento descrito por Tsurkan et al., Adv. Mater. 2013, 25 (18), 2606-2610) en lugar de ENC2 según el procedimiento mencionado anteriormente.

Para ello, las células se suspendieron en el derivado de EC4 o EC5 y después se formaron los hidrogeles mezclando según el procedimiento mencionado anteriormente y se hincharon en solución salina tamponada con fosfato y medio de cultivo celular inmediatamente después de un tiempo de gelificación de 5 min.

Cultivo de células:

Se cultivaron células estromales mesenquimales (MSC, ATCC, aisladas de tejido adiposo, Alemania) en DMEM con suero de ternero fetal al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% en condiciones de cultivo estándar (5% de CO₂ y 37 °C). En los experimentos se utilizaron MSC de los pases 2 a 4.

Se mezclaron derivados de EC-4 o EC-5 y ENC con 1 mol de CGWGGRGDSP por mol de EC y se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato (la concentración de los derivados de EC4 o EC5 correspondió a 3 veces la concentración según la tabla 1). Después de mezclar, la solución se incubó durante 10-15 min a 37 °C y después se mezcló una suspensión celular concentrada en un tercio del volumen de gel final con 6 x 10⁶ células/ml extrapoladas a la mezcla de reacción final. El ENC4 (3 veces la concentración de la tabla 1) se disolvió en un tercio adicional del volumen total de gel en solución salina tamponada con fosfato y se añadió a la mezcla de derivados de EC4/5 con células y se mezcló pipeteando. Después de la formación del gel durante 5 minutos, se añadió el medio de cultivo celular descrito anteriormente y los hidrogeles se incubaron a 37 °C durante 24 horas tal como se ha descrito anteriormente. Ensayo PrestoBlue®: el ensayo PrestoBlue® se realiza después de un periodo de incubación de 24 horas después de realizar el cultivo de las células en los hidrogeles. Para ello, se añade a cada muestra de hidrogel una solución al 10% del colorante PrestoBlue® disuelto en medio de cultivo celular y se incuba en placas de microvaloración durante 1 h a 37 °C. A continuación, se mide la fluorescencia en el fotómetro de microplacas (Tecan Spark®, Alemania). La longitud de onda de excitación es de 560 nm y la fluorescencia se midió a una longitud de onda de 590 nm. La actividad metabólica de las células se indicó sobre la base de los valores de fluorescencia relativa (RFU). Se evaluaron 10 ensayos independientes con 4 determinaciones técnicas (n = 40) y se encontraron diferencias significativas (Anova de una dirección) para todas las condiciones.

Ensayo de zona de inhibición antibacteriana:

Se incubaron discos de hidrogel (60 µl) en 1 ml de gentamicina a 50 µg/ml (Sigma Aldrich, Alemania) durante 18 horas y después se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato. La actividad antimicrobiana de los hidrogeles cargados con gentamicina se determinó utilizando un ensayo de zona de inhibición. Para ello, se prepararon placas de agar de caldo Luria (LB) (Sigma Aldrich, Múnich, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los cultivos de Escherichia coli K12 DH5 (DSMZ, Alemania) y Staphylococcus epidermidis PCI 1200 (ATCC, Estados Unidos) después de 12 h de crecimiento se diluyeron hasta una densidad óptica (DO) medida a 600 nm de 0,1 y se aplicaron 250 µl de esta suspensión bacteriana a las respectivas placas. Se utilizó un paño de algodón estéril para distribuir las bacterias de manera uniforme. Los hidrogeles ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20 y ENC2-EC5 23 y ENC2-ENC3 26, cada uno cargado o no cargado con gentamicina, se dispusieron en las cuatro esquinas de la placa de AGAR y las placas se incubaron a 37 °C durante la noche. A continuación, se midió la zona de inhibición utilizando un calibre digital. Se evaluaron 10 ensayos independientes con 3 determinaciones especializadas (n = 30) y se encontraron diferencias significativas (Anova de una dirección) para todas las condiciones.

Determinación de las propiedades físico-químicas de los hidrogeles:

Para determinar las propiedades físicas de los diferentes tipos de hidrogel, se polimerizaron en cada caso 67 µl de solución de hidrogel no polimerizado entre dos portaobjetos de vidrio de 9 mm (Menzel Gläser, Alemania) tratados con Sigmacote (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 16 h a temperatura ambiente y después los discos de gel resultantes se retiraron de los portaobjetos de vidrio. El diámetro de los discos de gel se determinó ópticamente utilizando un escáner del tipo FLA-3100 (Fujitsu, Japón) (diámetro en estado no hinchado). Los discos de gel se hincharon después en solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,9% de NaCl tamponado a pH de 7,4 (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 24 h (condiciones fisiológicas) y se determinaron de nuevo utilizando el escáner FLA-3100 (Fujitsu, Japón) (diámetro en estado hinchado). El hinchamiento de los hidrogeles se determinó a partir de los diámetros determinados utilizando la ecuación siguiente:

$$\text{Hinchamiento} = \frac{\text{Diámetro de hidrogel hinchado}^3}{\text{Diámetro del hidrogel no hinchado}^3}$$

$$\text{Hinchamiento} = \frac{\text{Diámetro del hidrogel hinchado}^3}{\text{Diámetro del hidrogel no hinchado}^3}$$

véase la tabla 1.

Los datos notificados se obtienen promediando (MW) de al menos cuatro muestras independientes. También se proporcionó la desviación estándar (SD).

Además, el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida de los hidrogeles se determinaron mediante reometría oscilatoria (en kilopascales) utilizando un reómetro de cizallamiento de tipo Ares de la empresa TA Instruments United Kingdom. Para ello, se perforaron discos de 8 mm de hidrogeles hinchados en condiciones fisiológicas (solución salina tamponada con fosfato (PBS, NaCl al 0,9% tamponado a pH de 7,4 (Sigma-Aldrich, Alemania)) durante 24 horas y se midieron con una disposición de medición de placa-placa de 9 mm con aumento de la frecuencia de 1-100 rad/s a temperatura ambiente con una deformación reducida (2%) y se determinó el valor promedio a lo largo del intervalo completo de frecuencia (1 valor de medición en una muestra). Los valores notificados son los valores medios de cuatro discos de hidrogel producidos de forma independiente y se indican como +/- la desviación estándar (SD). El módulo de almacenamiento de los cuatro tipos de hidrogel se indicó en la tabla 1, el módulo de pérdida fue en cada caso de varios órdenes de magnitud inferior (datos no mostrados).

La tabla 1 muestra las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles.

La anchura de malla de los hidrogeles se puede derivar sobre la base de la teoría de la elasticidad del caucho a partir del módulo de almacenamiento determinado experimentalmente utilizando la fórmula siguiente (Polymer Physics, Michael Rubinstein y Ralph H. Colby, 2006, Oxford University Press, Oxford):

$$\xi = \left(\frac{G' N_A}{RT} \right)^{-1/3}$$

En la que G' es el módulo de almacenamiento medido, N_A es la constante de Avogadro, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura (en Kelvin).

Para determinar las propiedades de unión de los diferentes tipos de hidrogeles, se polimerizaron soluciones de hidrogel sin polimerizar entre dos portaobjetos de vidrio de 5 mm (vidrios Menzel) tratados con Sigmacote (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 16 h a temperatura ambiente y después se hincharon en solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,9% de NaCl tamponado a pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 24 h. A este respecto, el volumen total se ajustó en consecuencia para asegurar las mismas cantidades molares de EC1, EC2, EC3 y EC4 en los cuatro tipos de hidrogel (véase la tabla 4). Para los estudios de unión (secuestro), los respectivos discos de hidrogel se incubaron durante 24 h en recipientes de reacción Protein LoBind de 0,5 ml (Eppendorf Tubes, Alemania) con la mezcla de proteínas correspondiente (tabla 3) disuelta en 400 µl de PBS con el 1% (m/v) de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich, Alemania) y el 0,05% (m/v) de Proclin 300 (Sigma-Aldrich, Alemania) (corresponden a la solución después de la incubación 2). Para producir la mezcla de proteínas, se disolvió el patrón ProcartaPlex A, B y C (ebioscience, Alemania) según las instrucciones del fabricante y se suplementó con las proteínas DKK1 (Nº del fabricante: 120-30, Peprotech, Alemania), esclerostina (Nº del fabricante: 1406-ST, Peprotech, Alemania) y TGFβ1 (Nº del fabricante: 100-21, Peprotech, Alemania). Las concentraciones individuales se muestran en la tabla 7 (corresponden a la solución antes de la incubación 1).

Las soluciones 1 y 2 se almacenaron a -80 °C hasta que se midió la concentración de proteínas. Para determinar las concentraciones de proteínas en las soluciones 1 y 2, las muestras se midieron según las instrucciones del fabricante utilizando el ProcartaPlex Human Chemokine Panel 1 (ebioscience, Alemania) en combinación con los correspondientes kits ProcartaPlex Simplex en un dispositivo del tipo Bioplex 200 (Biorad, Alemania).

La unión (secuestro) de las moléculas señalizadoras se determinó a partir de las concentraciones determinadas de la solución 1 y 2 según la ecuación siguiente: Unión en % = (1 - concentración en la solución 2 (después de la incubación)/concentración en la solución 1 (antes de la incubación)) x 100.

La tabla 4 muestra el tiempo de activación de los grupos carboxilo de EC 1 a 4 en minutos y el volumen de gel utilizado para los estudios de unión.

Los hidrogeles sulfatados o sulfonados se caracterizan mediante su distribución de carga en el elemento constituyente cargado (EC) en mol de grupos sulfato o sulfonato por mol de polímero y la concentración de grupos sulfato o sulfonato en el volumen de hidrogel hinchado en condiciones fisiológicas en mmol de sulfato o sulfonato/ml de hidrogel y el número de grupos sulfato o sulfonato por UR dividido por el peso molecular de la UR en los intervalos especificados. El cálculo se realizó a partir de las concentraciones molares de los elementos constituyentes de hidrogel durante la formación del hidrogel (véase la tabla 1) y el hinchamiento volumétrico, tabla 1) asumiendo que los elementos constituyentes de hidrogel se incorporan cuantitativamente en la red.

La concentración de los grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel no hinchado se calculó a partir de la concentración de EC en el hidrogel no hinchado x número de unidades de repetición x número de grupos sulfato o sulfonato por unidad de repetición. La concentración del sulfato o sulfonato en el gel hinchado (tabla 1) se calculó a partir de la concentración de los grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel no hinchado dividida por el hinchamiento (véase la tabla 1).

Los ensayos de extracción no proporcionaron como resultado ninguna elución medible de los elementos constituyentes del gel, por lo que se considera justificada la suposición de que los elementos constituyentes del gel se han incorporado por completo.

La tabla 3 indica las cantidades porcentuales unidas de moléculas señalizadoras en los hidrogeles normalizadas a la concentración de los factores solubles antes de la incubación, tal como se ha explicado anteriormente. Los porcentajes se refieren al porcentaje en masa.

El tamaño molecular de las sustancias, que también se denominan sustancias señalizadoras o factores, se expresa en kilodaltons (kDa).

Las proteínas (moléculas señalizadoras) están claramente asignadas en abreviaturas (tabla 3 y los números de identificación UniProt (Uniprot ID) del banco de datos de proteínas Universal Protein Resource (UniProt; <http://www.uniprot.org/>).

El punto isoelectrico (IEP) y la masa molar se calcularon basándose en la secuencia de aminoácidos completamente procesada biológicamente utilizando el programa ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>; Referencia: Gasteiger, E. et al. en The Proteomics Protocols Handbook 571-607 (2005)).

Los parámetros estructurales de las proteínas se determinaron utilizando el banco de datos ExPASy PROSITE basándose en los números de identificación UniProt (<http://prosite.expasy.org/>; Sigris, C.J.A. et al. New and continuing developments at ExPASy PROSITE; Referencias: (1) Nucleic Acids Res. 41, (2013); (2) Sigris, C.J.a. et al. PROSITE: una base de datos documentada que utiliza patrones y perfiles como descriptores de motivos. Brief. Bioinform. 3, 265-274 (2002)).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias A y B en un hidrogel sulfatado y/o sulfonado y para el empobrecimiento de sustancias del grupo de sustancias A en un biofluido con liberación diferenciada simultánea de sustancias del grupo de sustancias A o B del hidrogel sulfatado y/o sulfonado en el biofluido o la unión reducida de sustancias del grupo de sustancias B en el hidrogel sulfatado y/o sulfonado, en el que el hidrogel sulfatado y/o sulfonado se selecciona de un grupo de hidrogeles de tipo 1, tipo 2, tipo 3 o de tipo 4 y los hidrogeles están constituidos por elementos constituyentes no cargados y elementos constituyentes cargados caracterizados por que los elementos constituyentes cargados se caracterizan por un parámetro calculado a partir del número de grupos sulfato y/o sulfonato por unidad de repetición dividido por la masa molar de la unidad de repetición de 0,0040-0,0060 mol/g para el tipo 1, de 0,0025-0,0040 mol/g para el tipo 2, de 0,0005-0,0025 mol/g para el tipo 3 y de 0,0040-0,0100 mol/g para el tipo 4 y los hidrogeles hinchados presentan un módulo de almacenamiento inferior a 20 kPa y las propiedades de los hidrogeles hinchados presentan una concentración de grupos sulfato o sulfonato en mmol/ml de 0,09 a 0,20 en el tipo 1, de 0,05 a 0,18 en el tipo 2, de 0,01 a 0,12 en el tipo 3 y de 0,16 a 0,8 en el tipo 4, y por que se influye en la concentración de sustancias del grupo de sustancias A y de sustancias del grupo de sustancias B en el biofluido mediante la elección del tipo de hidrogel.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los elementos constituyentes cargados de los hidrogeles presentan un número de grupos sulfato y/o sulfonato por unidad de repetición dividido por la masa molar de la unidad de repetición de 0,0050 mol/g para el tipo 1, de 0,0035 mol/g o 0,0038 mol/g para el tipo 2, de 0,0019 mol/g para el tipo 3 y de 0,0045 mol/g para el tipo 4, y por que las propiedades de los hidrogeles hinchados presentan una concentración de sulfato o sulfonato en mmol/ml de 0,12 en el tipo 1 y de 0,12 o 0,14 en el tipo 2 y de 0,06 en el tipo 3 y de 0,28 o 0,16 en el tipo 4.
3. Procedimiento para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias A y B en un hidrogel sulfatado y/o sulfonado y para el empobrecimiento de sustancias del grupo de sustancias A en un biofluido con liberación diferenciada simultánea de sustancias del grupo de sustancias B del hidrogel sulfatado y/o sulfonado en el biofluido o la unión reducida de sustancias del grupo de sustancias B en el hidrogel sulfatado y/o sulfonado, en el que el hidrogel sulfatado y/o sulfonado se selecciona de un grupo de hidrogeles de tipo 1, tipo 2, tipo 3 o de tipo 4 y los hidrogeles están constituidos por elementos constituyentes no cargados y elementos constituyentes cargados caracterizados por que los elementos constituyentes cargados presentan una concentración en moles de grupos sulfato o sulfonato por mol de polímero de 60 a 80 en el tipo 1, de 30 a 75 en el tipo 2, de 10 a 30 en el tipo 3 y de 80 a 120 en el tipo 4, y por que los elementos constituyentes cargados en el hidrogel presentan una concentración de EC en mmol/ml de 0,0015 a 0,0025 en el tipo 1, de 0,0015 a 0,0030 en el tipo 2, de 0,0010 a 0,0040 en el tipo 3 y de 0,0018 a 0,0050 en el tipo 4, y por que los hidrogeles hinchados presentan un módulo de almacenamiento inferior a 20 kPa, en el que los grupos sulfato o sulfonato presentan una concentración en mmol/ml en el hidrogel de 0,09 a 0,20 en el tipo 1, de 0,05 a 0,18 en el tipo 2, de 0,01 a 0,12 en el tipo 3 y de 0,16 a 0,80 en el tipo 4, y por que se influye en la concentración de sustancias del grupo de sustancias A y de sustancias del grupo de sustancias B en el biofluido mediante la elección del tipo de hidrogel.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que los elementos constituyentes cargados tienen una concentración en moles de grupos sulfato o sulfonato por mol de polímero de 70,2 en el tipo 1 y de 48,4 o 75,0 en el tipo 2 y de 23,4 en el tipo 3 y de 90,0 en el tipo 4, y por que los elementos constituyentes cargados en el hidrogel presentan una concentración de EC en mmol/ml de 0,0018 en el tipo 1, de 0,0025 o 0,0018 en el tipo 2, de 0,0027 en el tipo 3 y de 0,0031 o 0,0018 en el tipo 4, y por que los hidrogeles hinchados presentan un módulo de almacenamiento inferior a 20 kPa, en el que la concentración de grupos sulfato o sulfonato en mmol por ml en el hidrogel es de 0,12 en el tipo 1, de 0,12 o 0,14 en el tipo 2, de 0,06 en el tipo 3 y de 0,28 o 0,16 en el tipo 4.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la reticulación de los elementos constituyentes para dar el hidrogel se realiza mediante reacción de grupos funcionales adecuados en el EC y/o el ENC de la clase de aminas, tioles, carboxilos, anhídridos, maleimidias, vinilsulfonas, acrilatos, hidroxilos, isocianatos, epóxidos y aldehídos, o grupos que pueden formar enlaces no covalentes basados en fuerzas electrostáticas o interacciones hidrófobas, enlaces de puente de hidrógeno o interacciones dipolares.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la reticulación de los elementos constituyentes cargados para dar el hidrogel se realiza mediante reticulación directa por medio de una molécula de reticulación bifuncional pequeña con una masa molar de ENC < 500 g/mol.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que como elementos constituyentes cargados se seleccionan glicosaminoglicanos sulfatados obtenidos de fuentes naturales, tales como heparina y heparinas desulfatadas selectivas, sulfato de condroitina, sulfato de heparán, sulfato de queratán, ácido hialurónico sulfatado, así como glicopolímeros sulfatados a base de manosa, lactosa, dextrano y compuestos polisulfonados que portan ácido estirenosulfónico (AES), ácido vinilsulfónico (AVS), ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AAMPS), ácido aminopropanosulfónico (AAPS) o ácido anetolsulfónico (AAS) como monómeros que contienen azufre y también en copolímeros con unidades que contienen los grupos de reticulación mencionados, y por que

como elementos constituyentes no cargados se seleccionan polietilenglicoles, poli(2-oxazolin), polivinilpirrolidona (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PAV) y/o poliacrilamidas (PAM) o una molécula reticulante bifuncional corta.

- 5 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 1 como sustancia del grupo de sustancias A se selecciona al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma, IL-12p40, IL-4, esclerostina y/o DKK1, en el que las sustancias se empobrecen en el biofluido en más del 50% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.
- 10 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 1 como sustancia del grupo de sustancias B se selecciona al menos una de las sustancias FGF-2, TGFb1, EGF, HGF, PLGF, GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-6 y/o TNF-alfa, en el que las sustancias se unen solo hasta el 50% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan del mismo.
- 15 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 2 como sustancia del grupo de sustancias A se selecciona al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma, IL-12p40, IL-4 y/o DKK1, en el que las sustancias se empobrecen en el biofluido en más del 50% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.
- 20 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 2 como sustancia del grupo de sustancias B se selecciona al menos una de las sustancias FGF-2, TGFb1, EGF, HGF, PLGF, GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-6, TNF-alfa y/o esclerostina, en el que las sustancias se unen solo hasta el 50% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan del mismo.
- 25 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 3 como sustancia del grupo de sustancias A se selecciona al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IP-10, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma y/o IL-4, en el que las sustancias se empobrecen en el biofluido en más del 50% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.
- 30 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 3 como sustancia del grupo de sustancias B se selecciona al menos una de las sustancias FGF-2, TGFb1, EGF, HGF, PLGF, IL-8, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-12p40, IL-6, TNF-alfa, esclerostina y/o DKK1, en el que las sustancias se unen solo hasta el 50% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan del mismo.
- 35 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 4 como sustancia del grupo de sustancias A se selecciona al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma, IL-1 beta, IL-10, IL-12p40, IL-4, IL-6 y/o TNF-alfa, en el las sustancias se empobrecen en el biofluido en más del 60% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.
- 40 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que en hidrogeles de tipo 4 como sustancia del grupo de sustancias B se selecciona al menos una de las sustancias EGF, PLGF y/o GM-CSF, en el que las sustancias se unen solo hasta el 40% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan del mismo.
- 45 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado por que los hidrogeles de tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4 están precargados con al menos una sustancia del grupo de sustancias A y/o B en alta concentración y después estas sustancias se liberan del hidrogel paralelamente e independientemente en el biofluido para cambiar la concentración.
- 50 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado por que los hidrogeles se forman a partir de materiales multifásicos, es decir, a partir de mezclas de los diferentes tipos 1-4 de materiales de hidrogel o diferentes formas de procesamiento (micropartículas e hidrogeles en masa) o están precargados con diferentes sustancias o cantidades de sustancias.
- 55 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado por que la liberación diferenciada de sustancias del grupo de sustancias A o B del hidrogel sulfatado y/o sulfonado en el biofluido y la unión reducida de las sustancias del grupo de sustancias B en el hidrogel sulfatado y/o sulfonado se realizan simultáneamente.
- 60

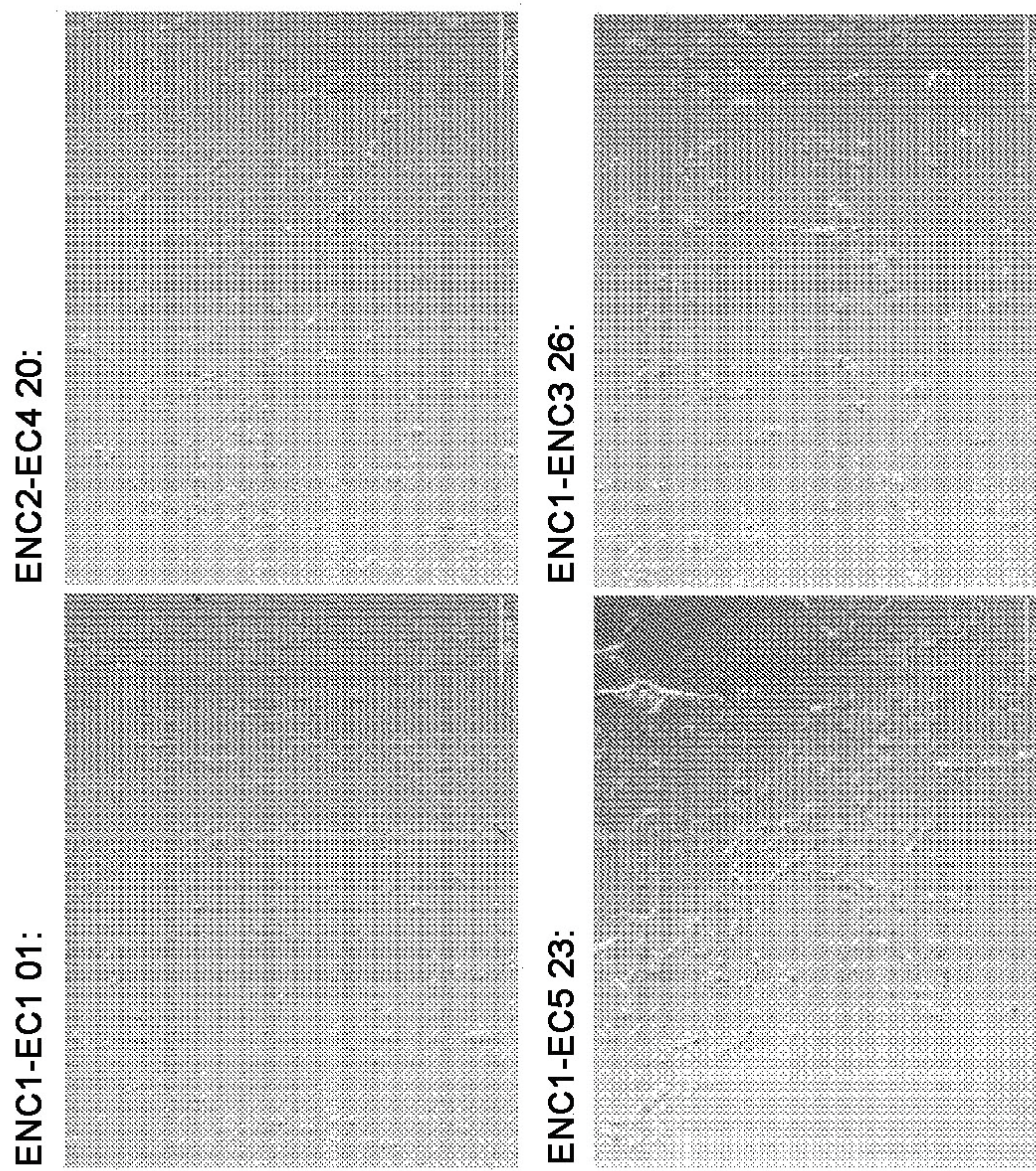


Fig. 1