

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 173**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/52** (2006.01)

**C08G 61/04** (2006.01)

**C08G 65/333** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2017 PCT/EP2017/081561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018 WO18104324**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2017 E 17809288 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3548107**

54 Título: **Redes biomiméticas que comprenden hidrogeles poliisocianopeptídicos**

30 Prioridad:

**05.12.2016 EP 16202260**

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

**20.11.2023**

73 Titular/es:

**STICHTING RADBOUD UNIVERSITEIT (100.0%)  
Houtlaan 4  
6525 XZ Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**KOUWER, PAUL;  
ROWAN, ALAN EDWARD y  
SCHOENMAKERS, DANIËL**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 954 173 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**

Redes biomiméticas que comprenden hidrogeles poliisocianopeptídicos

5 La invención se refiere a redes biomiméticas sintéticas que comprenden hidrogeles peptídicos de poliisocianato.

Los hidrogeles de poliisocianato son conocidos en la técnica. El documento WO 2011/007012 divulga un hidrogel que comprende poliisocianopeptídicos funcionalizados con oligo (alquilenglicol). Los poliisocianopeptídicos se preparan funcionalizando un isocianopeptídico con cadenas laterales oligo(alquilenglicol) y posteriormente polimerizando los isocianopeptídicos funcionalizados con oligo-alquilenglicol a poliisocianopeptídicos (PIC). Este material PIC es un hidrogel que se endurece por deformación completamente sintético con una arquitectura de haces de polímero. Una solución de estos polímeros en agua mostrará un comportamiento de temperatura crítica más baja de la solución (LCST - Lower Critical Solution Temperature); por encima de la LCST, un hidrogel se forma mediante la formación de una red ramificada de haces semiflexibles enredados, una consecuencia de la desolvatación entrópica de los restos de etilenglicol en los polímeros. En la fase de gel, el material imita las propiedades mecánicas de los materiales naturales, incluyendo el endurecimiento por deformación en el régimen biológicamente alcanzable gracias a su arquitectura.

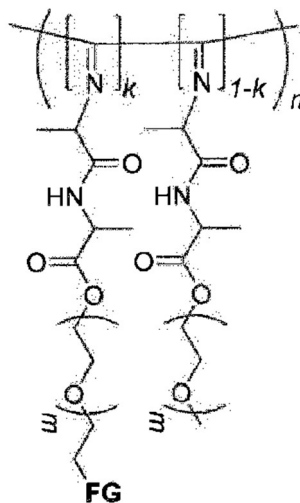
Estos poliisocianopeptídicos se pueden usar como un hidrogel para cultivar células, lo que se describe en el documento WO 2015/007771.

Sin embargo, para algunas aplicaciones, la facilidad de reversibilidad de las propiedades mecánicas puede ser una desventaja. Existe la necesidad de un sistema polimerizado, en donde las propiedades mecánicas puedan ajustarse y mantenerse constantes durante un tiempo más largo, sin perder todas las propiedades especiales de los poliisocianopeptídicos (PIC). La reticulación de hidrogeles e hidrogeles agrupados es un método bien establecido para estabilizar las propiedades (mecánicas) de un material en el tiempo. La presente invención presenta un método para colocar selectivamente las reticulaciones dentro de los haces del polímero PIC y *no* al azar en la red, que es el enfoque de reticulación seguido habitualmente. Usando este método, se retiene la arquitectura del gel de red agrupado poroso y las propiedades mecánicas únicas. En los enfoques de reticulación común, la arquitectura de red cambia, lo que a su vez cambia las propiedades mecánicas

Los inventores han descubierto que una reticulación parcial de los haces de PIC presentes en un hidrogel puede estabilizar el hidrogel y reducir la dependencia de la temperatura después de la formación del hidrogel. Se cree que la formación de reticulaciones dentro de la arquitectura agrupada es importante en este proceso.

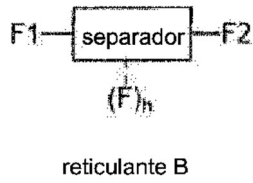
35 La invención según la reivindicación 1 se refiere a un hidrogel polimérico que comprende

a) un polímero formado por la reacción de reticulación de una unidad polimérica A según la fórmula (I),



polímero A

40 con una unidad de reticulación B según la fórmula (II)



b) y agua,

5 en donde

$n = 100-10.000$ , preferiblemente 250-2500, más preferiblemente 500-1500;

$m =$  independientemente 2-10, preferiblemente 3 o 4;

10

FG es un resto funcional que puede acoplarse covalentemente al resto funcional complementario F1 o F2 de la unidad de reticulación (B);

$K = 0,01-0,05$ ;

15

$h = 0, 1$  o  $2$ ;

el separador es un resto orgánico, que tiene una cadena principal que comprende al menos dos restos funcionales F1 y F2, en donde la longitud del reticulante en la conformación extendida según se determina por modelado molecular (incluyendo separador y grupos funcionales F1 y F2) está entre 2,5 y 12 nm, o en donde la longitud es entre 20 y 80 átomos.

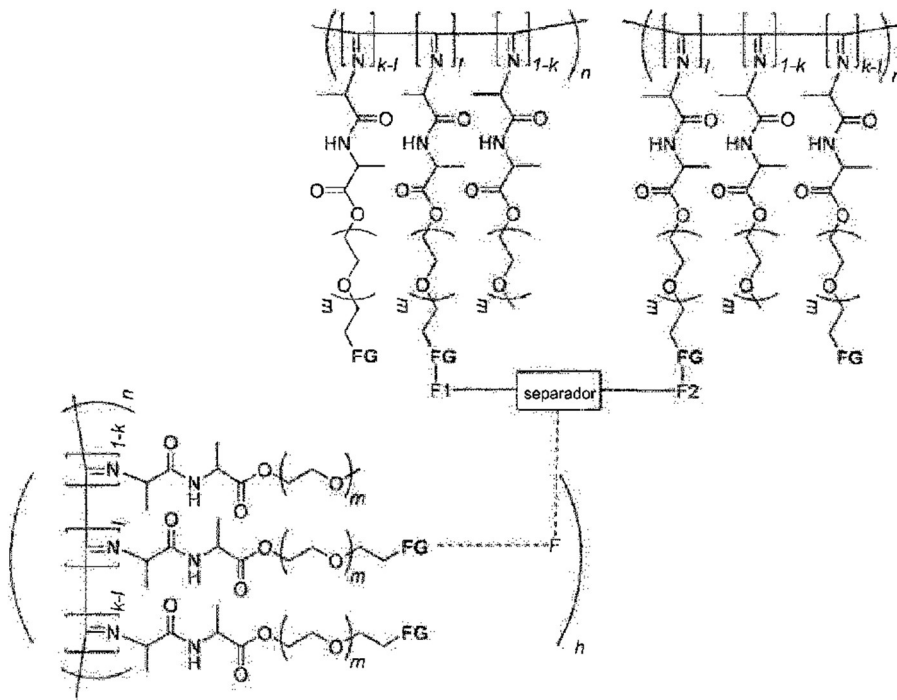
20

La longitud de la unidad de reticulación se calcula a partir del puente F1 de unión de unión a una primera unidad polimérica, a lo largo de la cadena principal del separador al puente F2 de unión de reticulación a una segunda unidad polimérica, en donde se incluyen los átomos de la cadena principal del separador y los grupos funcionales F1 y F2, y en donde se elige la ruta más corta, de modo que se cuente la cantidad mínima de átomos entre los dos enlaces de reticulación de la primera y segunda cadenas poliméricas.

25

El polímero también puede estar representado por la fórmula (III),

30



en donde  $n = 100-10.000$ , preferiblemente 250-2500, más preferiblemente 500-1500;

## ES 2 954 173 T3

$m$  = independientemente 2-10, preferiblemente 3 o 4;

FG es un resto funcional que puede acoplarse covalentemente al resto funcional complementario F1 o F2 acoplado a un separador de una unidad de reticulación (B);

5  
 $K=0,01-0,05$ ;  
 $I=0,002-0,05$ ;

10  $h = 0, 1$  o  $2$ ;

// $k$  es la conversión de restos FG reaccionados con restos F1 y/o F2 de la unidad de reticulante B y varía entre 0,2 y 1;

15 el separador es un resto orgánico, que tiene una cadena principal acoplada a al menos dos restos funcionales F1 y F2, en donde la longitud del reticulante en la conformación extendida según se determina por modelado molecular (incluyendo separador y grupos funcionales F1 y F2) está entre 2,5 y 12 nm, o en donde la longitud es entre 20 y 80 átomos.

20 Preferiblemente, la cantidad de polímero en el hidrogel varía entre 0,01 % en peso y 1 % en peso, más preferiblemente entre 0,02 % en peso y 0,5 % en peso.

La invención también se refiere a un proceso para preparar el hidrogel polimérico, y al uso del hidrogel polimérico.

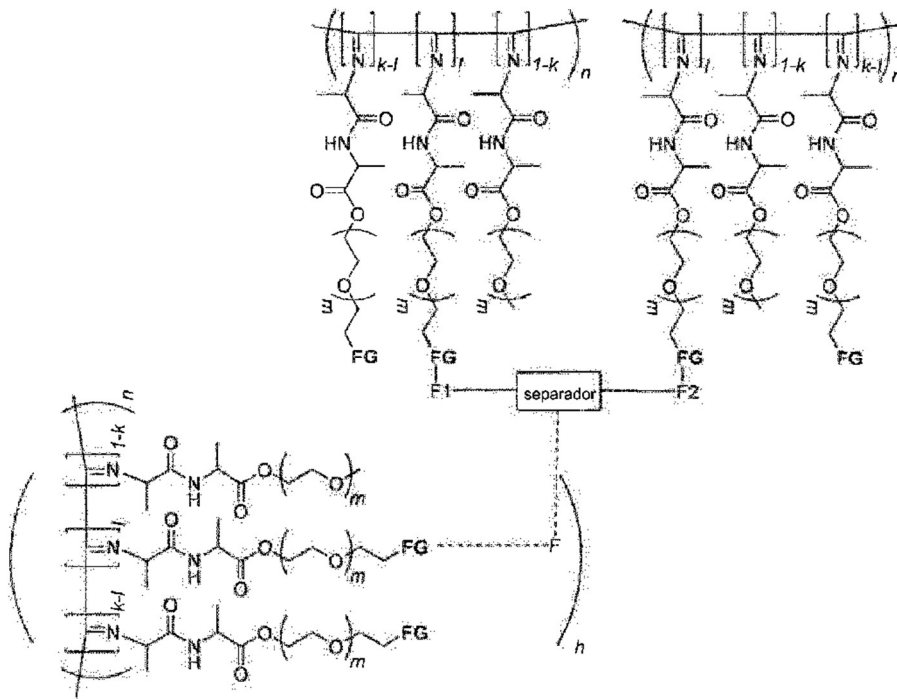
25 El documento WO 2011/007012 menciona en general la posibilidad de reticulación del polímero PIC. No contiene ningún ejemplo de materiales reticulados ni ningún detalle sobre cómo debe realizarse dicha reticulación.

Los inventores encontraron que la reticulación según la invención tiene varias ventajas inesperadas, especialmente cuando se usan reticulantes que tienen un tamaño específico.

30 En esta solicitud de patente, los inventores presentan un método para conservar las propiedades mecánicas y la estabilidad de un hidrogel PIC biomimético completamente sintético, sin afectar a la arquitectura. Los inventores diseñaron un método para reticular polímeros de PIC de una manera controlada, con el objetivo de obtener reticulaciones intra-haces en lugar de inter-haces de modo que la arquitectura no se cambie sino que solo se estabilice.  
35 De esta manera, los inventores pueden crear una red biomimética con las propiedades mecánicas deseadas, congelar la arquitectura y mantener estas propiedades a lo largo de un régimen de temperatura grande (véanse también las Figuras 1-3).

Descripción detallada.

40 El hidrogel polimérico según la presente invención comprende un polímero según la fórmula (III),



(III),

en donde  $n = 100-10.000$ , preferiblemente 250-2500, más preferiblemente 500-1500;

5  $m =$  independientemente 2-10, preferiblemente 3 o 4;

FG es un resto funcional que puede acoplarse covalentemente al resto funcional complementario F1 o F2 acoplado a un espaciador de una unidad de reticulación (B);

10  $K=0,01-0,05$ ;

$l=0,002-0,05$ ;

15  $h = 0, 1$  o 2;

// $k$  es la conversión de restos FG reaccionados con restos F1 y/o F2 de la unidad de reticulante B y varía entre 0,2 y 1;

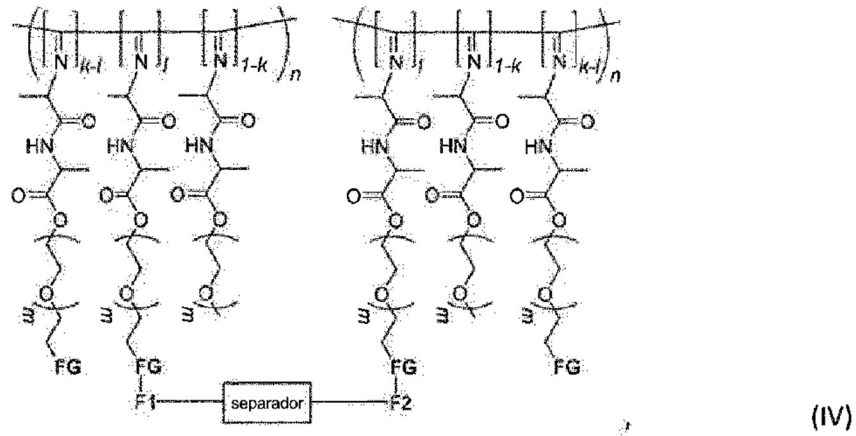
20 el espaciador es un resto orgánico, que tiene una cadena principal acoplada a al menos dos restos funcionales F1 y F2, en donde la longitud del reticulante en la conformación extendida según se determina por modelado molecular (incluyendo espaciador y grupos funcionales F1 y F2) está entre 2,5 y 12 nm, o en donde la longitud es entre 20 y 80 átomos.

25 La longitud de la unidad de reticulante en la conformación extendida según se determina por modelado molecular (incluyendo grupos funcionales F1 y F2 y el separador), varía entre 2,5 y 12 nm.

30 La longitud puede expresarse alternativamente como el número de átomos de la unidad de reticulación que une las dos cadenas poliméricas. El número de átomos varía preferentemente entre 20 y 80 átomos. El número de átomos es el número mínimo de átomos que pueden contarse entre los enlaces de reticulación de la primera y la segunda unidad polimérica.

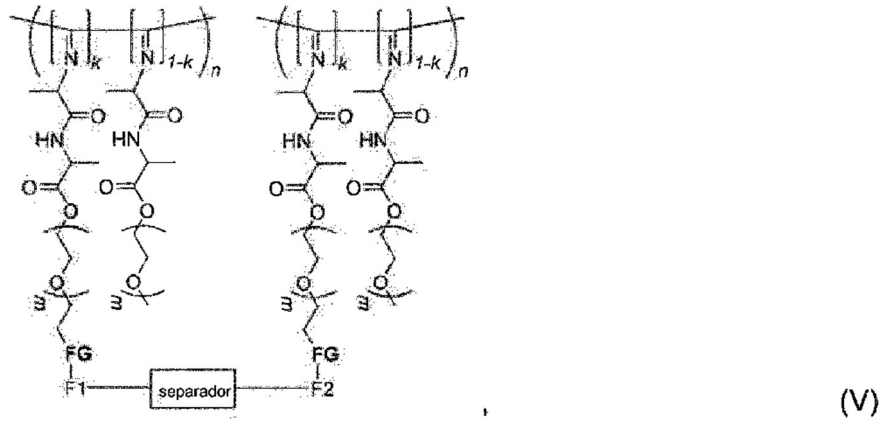
35 El polímero es una estructura ramificada o reticulada que comprende una primera cadena polimérica de poliisocianopéptido acoplada a través de un puente FG-F1 a una segunda cadena polimérica de poliisocianopéptido a través de un puente FG-F2, y opcionalmente acoplada a unidades poliméricas adicionales a través de F. La unidad de reticulación tiene un tamaño específico, para proporcionar reticulaciones predominantemente intra-haces. Otros tipos de reticulaciones como intramolecular (dentro de una sola cadena de polímero), o inter-haces (entre haces adyacentes de cadenas de polímero PIC) no son eficaces para proporcionar el polímero y el hidrogel según la presente invención.

40 Preferiblemente, el polímero en el hidrogel contiene el producto de reacción de un reticulante difuncional (que tiene grupos funcionales F1 y F2) y la unidad de monómero polimérico (A) y tiene la fórmula IV



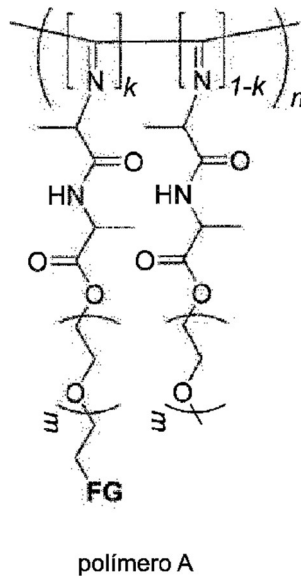
en donde n, k, m, F1, F2, FG, separador son como se han definido anteriormente.

- 5 En una realización, el polímero en el hidrogel contiene el producto de reacción de un reticulante difuncional (que tiene grupos funcionales F1 y F2) y la unidad de monómero polimérico (A) y tiene la fórmula V

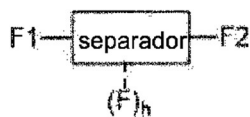


- 10 en donde n, k, m, F1, F2, FG, espaciador son como se han definido anteriormente.

El hidrogel polimérico se forma mediante la reacción de reticulación de una unidad polimérica A según la fórmula (I)



- 15 con una unidad de reticulación B según la fórmula (II)



reticulante B

5 Las unidades poliméricas A se pueden formar copolimerizando un primer comonomero de un isocianopéptido funcionalizado con oligo(etilenglicol) injertado con un grupo funcional FG y un segundo comonomero de un isocianopéptido funcionalizado con oligo(etilenglicol) no injertado.

10 El número de unidades de etilenglicol (m) varía independientemente entre 2 y 10, preferiblemente el número de unidades de etilenglicol es 3 o 4, con la máxima preferencia 3.

15 El grupo funcional FG de la unidad polimérica (A) puede reaccionar con un grupo funcional F1, F2 o F en la unidad de reticulación, formando así un enlace covalente o enlace de reticulación.

20 En muchos casos, no todo el grupo funcional en el polímero (FG) o en el reticulante (F1, F2) reacciona, lo que significa que la conversión de los grupos FG no es 100 %, y  $l/k < 1$ . Esto puede ajustarse fácilmente por la relación entre los dos grupos diferentes. A concentraciones iguales, la conversión se acerca al 90 %. A una baja concentración de reticulante (B), la conversión de FG será baja, mientras que a una alta concentración de reticulante (B), la conversión de los grupos FG será alta, pero la eficiencia de reticulación aún puede ser baja, ya que la unidad de reticulante está presente en exceso y no forma las reticulaciones deseadas. La conversión se expresa en la proporción de grupos funcionales convertidos (FG) en el polímero,  $l$ , contra el número originalmente presente de grupos funcionales en el polímero,  $k$ : conversión =  $l/k$ . La densidad de reticulación total se calcula como los grupos funcionales de concentración en el polímero  $[FG]$  veces el cuadrado de la conversión:  $[x\text{-enlaces}] = [FG] * (l/k)^2$ , y debe estar entre 20-100  $\mu\text{M}$ , véase la Figura 6.

25 Una densidad de reticulación en el intervalo entre 20-100  $\mu\text{M}$  se puede lograr prácticamente proporcionando un hidrogel que contiene polímero A que tiene una  $[FG]$  entre 20 y 200  $\mu\text{M}$ , preferiblemente entre 50 y 150  $\mu\text{M}$ , para reaccionar con el reticulante B. Preferiblemente, la relación molar entre  $[FG]$  y  $[F]$  varía entre 0,5: 1 y 2:1, más preferiblemente entre 0,7: 1 y 1.5:1.

30 El tamaño de la unidad de polímero (A) puede variar:  $n$  está típicamente comprendido entre 100 y 10.000, preferentemente entre 250 y 2500, más preferentemente entre 500 y 1500.

35 La relación de la primera unidad de monómero que tiene el grupo funcional FG y la segunda unidad de monómero que no tiene grupo funcional FG es también importante;  $k$  típicamente varía entre 0,01 y 0,05. Preferentemente  $k$  varía entre 0,02 y 0,04. Esto significa que la cantidad molar del primer monómero varía entre 1 y 5 % en moles con respecto al total de la unidad polimérica, preferiblemente entre 2 y 4 % en moles.

40 Una cantidad demasiado alta de primeras unidades monoméricas que tienen un grupo funcional FG puede disminuir la solubilidad en agua de la unidad polimérica, disminuyendo así la usabilidad para preparar geles.

45 Cuando la cantidad de grupos funcionales FG es demasiado baja, la densidad de reticulación será demasiado baja y un efecto estabilizador a bajas temperaturas no puede ocurrir a un nivel satisfactorio. Cuando la cantidad de grupos funcionales FG es demasiado alta, muchas de las reticulaciones serán intramoleculares y no contribuirán a la estabilización de la red.

50 El hidrogel polimérico según la invención está formado por la reacción de unidades poliméricas (A) que tienen grupos funcionales FG con una unidad de reticulación (B) que tiene grupos funcionales que pueden reaccionar con los grupos funcionales FG. La unidad de reticulación (B) comprende un separador y al menos dos grupos funcionales F1 y F2 que pueden reaccionar con grupos funcionales FG de la unidad polimérica (A). Es posible que la unidad de reticulación tenga más de dos grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos funcionales FG de la unidad polimérica, por ejemplo 3 grupos funcionales, o 4 grupos funcionales. Preferentemente, la unidad de reticulación tiene 2 grupos funcionales.

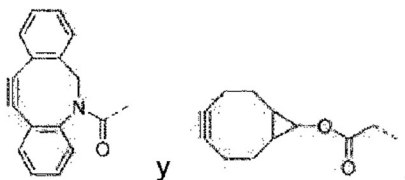
55 En una realización preferida F1 y F2 son los mismos grupos funcionales.

Ejemplos de grupos funcionales F1, F2 y grupos funcionales FG adecuados que pueden proporcionar acoplamiento covalentes son: acoplamiento alquino-azida, acoplamiento dibenzociclooctina-azida, acoplamiento biciclo[6.1.0]non-4-ino-azida, acoplamiento vinilsulfona-tiol, acoplamiento maleimida-tiol, acoplamiento metacrilato de metilo-tiol, acoplamiento de éter, acoplamiento de tioéter, acoplamiento de biotina-estreptavidina, ácido amino-carboxílico que da

como resultado enlaces amidas, acoplamiento alcohol-ácido carboxílico que da como resultado enlaces ésteres, acoplamiento tetrazina-trans-cicloocteno y acoplamiento NHS -éster (N-hidroxisuccinimida éster)-amina.

5 Los acoplamientos preferidos se basan en el acoplamiento de azida-alqueno y/o azida-alquino tal como acoplamiento dibenzociclooctina-azida, acoplamientos de azida basados en biciclo[6.1.0]non-4-ina.

Los ejemplos preferidos de grupos funcionales F1 y F2 de la unidad de reticulación se seleccionan de



10 y sus derivados.

15 La unidad de reticulación comprende un separador entre los dos o más grupos funcionales F1 y F2. La longitud de la unidad de reticulación (que incluye el separador y dos grupos funcionales F1 y F2) está entre 2,5 y 12 nm. Alternativamente, la longitud de la unidad de reticulación puede expresarse como el número mínimo de átomos entre los enlaces reticulados que conectan FG con F1 o F2. Preferiblemente, el número de átomos que une la primera y la segunda cadena polimérica es de entre 20 y 80 átomos, o entre 25 y 60 átomos.

20 La longitud de la unidad de reticulación se calcula a partir del puente F1 de unión de unión a la primera unidad polimérica, a lo largo de la cadena principal del separador al puente F2 de unión de reticulación a la segunda unidad polimérica, en donde se incluyen los átomos de la cadena principal del separador y los grupos funcionales F1 y F2, y en donde se elige la ruta más corta, de modo que se cuente la cantidad mínima de átomos entre los dos enlaces de reticulación de la primera y segunda cadenas poliméricas.

25 Preferiblemente, la longitud de la unidad de reticulación varía entre 3 y 9 nm, o entre 3,5 y 6 nm.

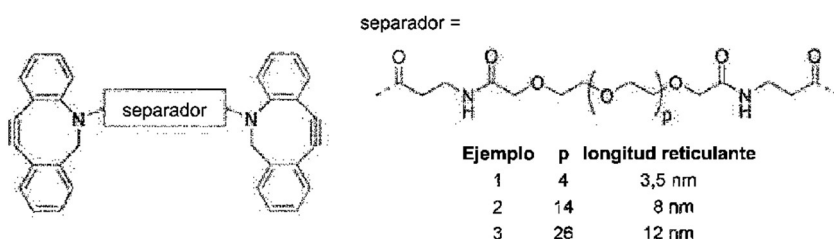
30 Ejemplos de separadores adecuados comprenden unidades de polietilenglicol, que tienen de 3 a 26 unidades de etilenglicol, preferiblemente entre 4 y 14, o entre 4 y 10 unidades de etilenglicol. En caso de que el separador comprenda unidades de etilenglicol (EG), la relación entre la longitud (nm) y el número de unidades de EG es la siguiente: Un separador corto que tiene 4 unidades de EG tiene una longitud de aproximadamente 2 nm. Un separador que tiene 14 unidades de EG, tiene una longitud de aproximadamente 5 nm, mientras que un separador largo que tiene 26 unidades de EG tiene una longitud de 9 nm.

35 Otros ejemplos son separadores que comprenden secuencias peptídicas cortas, que pueden ser metaloproteinasas escindibles (MMP) que incluyen MMP-1 y MMP-2, por ejemplo, pero sin limitación, los péptidos VPMSMRG, VPMSMRGG, RPMSMR, IPESLRAG, IPVSLRSG, VPLSLYSG, VPMSMR, PAYYTA, GPQGIWGQ, SGESPAYYTA, GPQGIAGQ, RPFMIMG, VPLSLTMG, YAAPVRGG, GTAGLIGQ o GDQGIAGF, más preferiblemente VPMSMRG, VPMSMRGG, RPMSMR, IPESLRAG, IPVSLRSG, VPLSLYSG, VPMSMR y KVPMSMRGK. En la presente memoria, V = Valina; P = Prolina; M = Metionina; S = Serina; R = Arginina; G = Glicina; I = Isoleucina; E = Ácido glutámico L = Leucina; A = Alanina; Y = Tirosina; Q = Glutamina; K = lisina y F = Fenilalanina.

45 También es posible usar reticulaciones fotoescindibles, en donde el separador contiene un colorante que es capaz de escindir el separador sobre la irradiación con la longitud de onda adecuada, por ejemplo colorantes basados en cumarina  $\Phi 1$  y  $\Phi 2$  y derivados, que reaccionan tras la exposición a luz visible o IR cercano, respectivamente, y como resultado, escinden el separador.

Los separadores que contienen secuencias peptídicas cortas o reticulaciones fotoescindibles también pueden comprender unidades monoméricas de óxido de etileno para aumentar la solubilidad en agua.

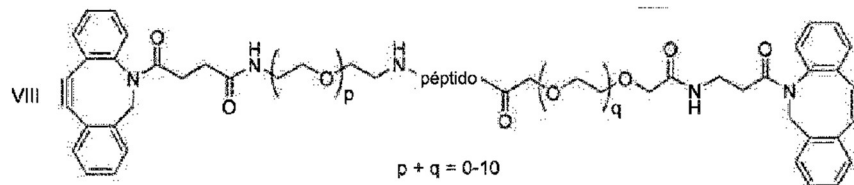
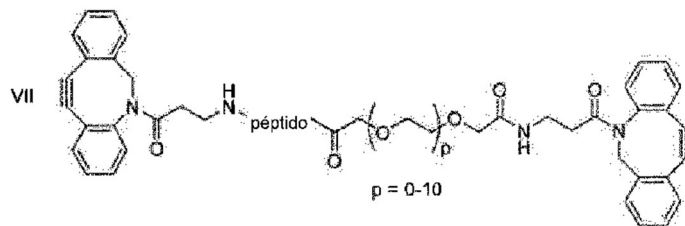
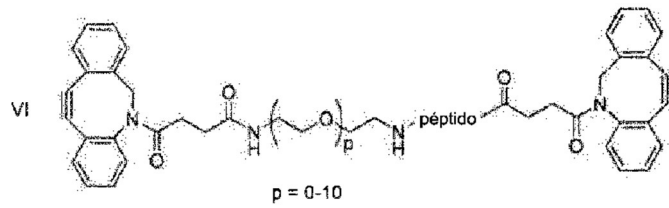
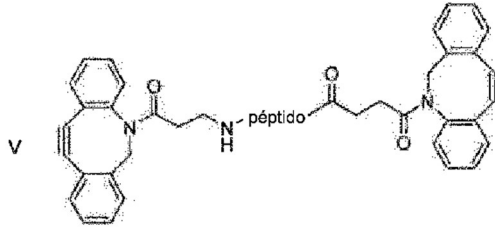
50 Una realización preferida de la invención usa un precursor de la unidad de reticulación que es una molécula según la fórmula IV



en donde la longitud del reticulante está entre 2,5 y 12 nm, preferiblemente entre 3,5 y 9 nm.

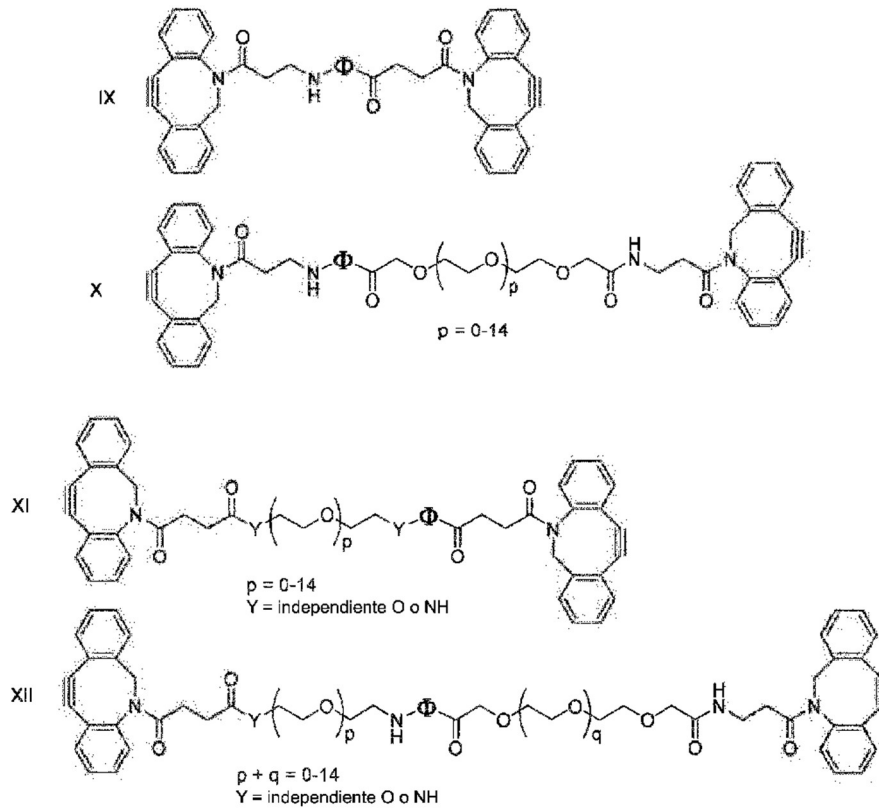
En otra realización preferida, el reticulante tiene una estructura según cualquiera de

5



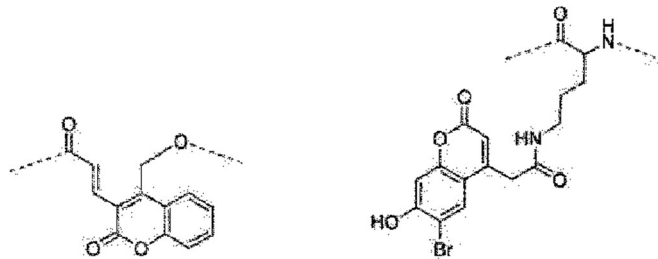
10 en donde el péptido es escindible por una metaloproteínasa (MMP). Los péptidos tienen preferentemente las secuencias como se definieron anteriormente.

En una realización se está aplicando un reticulante fotoescindible. Ejemplos de reticulantes fotoescindibles son:



donde  $\Phi$  es un colorante fotoescindible que, como resultado de la reacción fotoquímica, escinde el separador, por ejemplo:

5



$\Phi$ 1 colorante fotoescindible 1:  $\lambda = 450$  nm

$\Phi$ 2 colorante fotoescindible 2:  $\lambda = 740$  nm

La cantidad de agua en el hidrogel varía entre 90 y 99,99 % en peso con respecto al total del hidrogel.

10 El hidrogel puede contener otros componentes además del agua y el polímero, como por ejemplo medios de cultivo celular, células, otros disolventes (como, por ejemplo, DMSO) y similares.

15 El polímero en el hidrogel también puede contener otras cadenas o ramas además de las ramas como se define por las fórmulas I y III. Por ejemplo, la unidad polimérica A puede contener ligandos, factores de adhesión, factores de crecimiento, anticuerpos, péptidos u otros restos bioactivos, así como colorantes (fluorescentes) o cualquier otra molécula orgánica funcional. La relación de grupos funcionales de reacción también es relevante para la formación de la red reticulada. Preferiblemente, la relación de grupos funcionales (F1 F2 (F)h) unida al reticulante a la cantidad de grupos funcionales FG unidos a las unidades poliméricas varía entre 50 y 150 % en moles, más preferiblemente entre 70 y 130 % en moles, o entre 80 y 120 % en moles.

20 El polímero presente en el hidrogel según la invención está al menos parcialmente reticulado. Debido al tamaño derecho del separador, el reticulante no forma (sustancialmente) reticulaciones intramoleculares. Por el contrario, los inventores creen que las reticulaciones se forman principalmente intra-haces, estabilizando así el gel. Las reticulaciones preferiblemente no se extienden entre diferentes haces de cadenas poliméricas (inter-haz), ya que esto afectaría negativamente el tamaño de poro grande del gel biomimético y el módulo.

25

La reticulación del polímero estabiliza diferentes propiedades mecánicas, en función de la temperatura de reacción entre el polímero y el reticulante y la temperatura de medición (después de la reacción de reticulación). En primer lugar, el hidrogel se lleva a una cierta temperatura: la temperatura del hidrogel no reticulado determina un número de parámetros mecánicos. Un cambio de la temperatura cambiará estos parámetros bastante rápidamente, ya que los parámetros dependen de la temperatura.

La reticulación intra-haz del hidrogel a una temperatura definida estabilizará los parámetros a esa temperatura, y hace que los parámetros sean menos dependientes de la temperatura. Ver, por ejemplo, la Figura 1: en la parte izquierda de la figura, el comportamiento del PIC conocido (no reticulado) muestra una formación de haz reversible en función de la temperatura. A baja temperatura (por ejemplo, a 5 °C), se encuentra una solución de polímero diluida. Tras calentar hasta por ejemplo 37 °C se forman haces de polímeros que dan las propiedades mecánicas características de estos polímeros. Este comportamiento es reversible para hidrogeles PIC no reticulados. En la parte derecha de la Figura 1, se muestra que la adición de un reticulante generará una estructura reticulada, pero principalmente después de que se hayan formado los haces. Mediante la reacción de reticulación, se detiene la reversibilidad de este proceso.

La formación de haces depende de la temperatura. Cuando un hidrogel de una primera muestra se realiza a una primera temperatura y posteriormente se reticula, se obtendrá un hidrogel que tenga propiedades a un nivel determinado por la primera temperatura. Cuando un hidrogel no reticulado de una segunda muestra se lleva a una segunda temperatura, que es diferente de la primera temperatura, se obtendrá un segundo hidrogel que tenga propiedades diferentes en comparación con la primera muestra. La reticulación generará dos hidrogeles que tendrán diferentes propiedades a la misma temperatura, véanse las Figuras 2 y 3.

Preferentemente, la temperatura de la formación de hidrogel varía entre 20 y 50 °C, más preferiblemente entre 22 y 40 °C.

La densidad de reticulación se puede determinar mediante dos métodos independientes: análisis químico y análisis mecánico.

El cálculo de la cantidad de reticulaciones se puede realizar de una manera teórica, asumiendo que solo se están formando reticulaciones intra-haces. En este caso, la cantidad de grupos funcionales FG en las unidades poliméricas (A) se conoce a partir de la síntesis del polímero, y la cantidad de reticulaciones se puede calcular dependiendo de la concentración de grupos funcionales FG en polímero [FG], la concentración de grupos funcionales [F1] + [F2] + [F] en el agente de reticulación y la conversión C de los grupos funcionales FG, que se pueden determinar con espectroscopía de absorción UV-vis. Esto da una densidad de reticulación teórica (moles de reticulaciones por volumen)  $\rho_{cl} = [FG] \cdot C^2$ . En muestras con alta densidad de reticulación, es decir  $\rho_{cl} > 20 \mu\text{M}$ , las propiedades mecánicas de la muestra serán estables.

También se puede realizar un análisis mecánico. El análisis mecánico se basa en la disminución de la rigidez macroscópica al enfriar el hidrogel. La rigidez de las muestras con baja densidad de reticulación y con reticulaciones con longitudes de separador demasiado altas disminuirá cuando se produce el aflojamiento del haz en el enfriamiento. Este método produce el porcentaje de rigidez restante en 5 °C,  $G'_5$ , en comparación con la rigidez a 37 °C,  $G'_{37}$ :

$$R = 100\% \times G'_5 / G'_{37}$$

A altas densidades de reticulación, el porcentaje R será alto: por encima del 40 %.

A bajas densidades de reticulación, la R será baja; a valores  $R < 10\%$ , el grado de reticulación es tan bajo que el gel se desintegra casi completamente a bajas temperaturas (por ejemplo, entre 0 y 5 °C).

A valores intermedios  $10\% < R < 40\%$ , se mantiene la arquitectura agrupada del gel, pero los haces se aflojan y las propiedades mecánicas se han reducido considerablemente. Sin embargo, en estos geles, se mantienen las propiedades mecánicas no lineales de los geles.

Preferentemente, R es al menos 20 %, más preferiblemente al menos 30 %. Lo más preferiblemente, R es al menos 40 %.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un proceso para preparar un copoliisocianopéptido funcionalizado con **oligo(etilenglicol)**, en donde el proceso comprende las etapas de:

i) copolimerización

- de un primer comonomero de un isocianopéptido funcionalizado con oligo(etilenglicol) injertado con un grupo funcional FG y

- de un segundo comonomero de un isocianopéptido funcionalizado con oligo(etilenglicol) no injertado,

en donde la relación molar entre el primer comonomero y el segundo comonomero es 1:100 y 1:20 para preparar un polímero (A);

5 ii) disolver el polímero (A) en agua a una concentración entre 0,01 y 1 % en peso de polímero en agua entre 0 y 10 % en peso de polímero en agua entre 0 y 10 °C para evitar la formación de hidrogel;

iii) añadir un compuesto de reticulación que tiene una unidad separadora y al menos dos grupos funcionales  $F=F_1=F_2=(F)_n$  capaz de reaccionar con el grupo funcional FG,

10 en donde el grupo funcional FG y el grupo funcional F se eligen para reaccionar y formar un acoplamiento

en donde el acoplamiento se selecciona independientemente del grupo que consiste en acoplamiento alquino-azida, acoplamiento dibenzociclooctina-azida, acoplamiento azida a base de oxanorbornadieno, acoplamiento vinilsulfona-  
 15 tiol, acoplamiento maleimida-tiol, acoplamiento metacrilato de metilo-tiol, acoplamiento éter, acoplamiento tioéter, acoplamiento biotina-estreptavidina, ácido amino-carboxílico que da como resultado enlaces amidas, acoplamiento alcohol-ácido carboxílico que da como resultado enlaces éster, tetrazina-trans-cicloocteno y acoplamiento NHS-éster (N-hidroxisuccinimida éster)-amina;

20 iv) poner el hidrogel en 10 minutos a la temperatura de reticulación deseada para la formación de gel (rápido) a temperaturas por encima de la LCST o temperatura de gelificación y la reacción con un compuesto de reticulación (más lento).

Para una reticulación eficiente, se necesita la formación de un hidrogel: de lo contrario, la concentración de grupos  
 25 funcionales FG es muy baja y, en consecuencia, la reacción de reticulación tiene lugar lentamente. Una vez que se han formado los haces, la concentración local de grupos funcionales FG aumenta y la reacción de reticulación comenzará a ejecutarse. Se prefiere que la formación de geles sea rápida en relación con la reacción de reticulación, de modo que primero la formación de gel pueda tener lugar, con la formación de las propiedades mecánicas deseadas, seguido de "congelamiento" de las propiedades por la reacción de reticulación.

30 La temperatura de reacción varía preferiblemente entre 20 y 50 °C, más preferiblemente entre 22 y 40 °C .

El grupo funcional FG y el grupo F (esto es F1, F2 y F) se eligen para reaccionar y formar un acoplamiento que puede ser cualquier acoplamiento mencionado en la lista anterior. Por ejemplo, para obtener un acoplamiento alquino-azida,  
 35 el grupo funcional FG puede ser alquino y el grupo F puede ser azida o el grupo funcional FG puede ser azida y el grupo F puede ser alquino. Los acoplamientos mencionados en la lista anterior son bien conocidos por el experto y la formación de los acoplamientos se encuentra en libros de texto. Por ejemplo, el acoplamiento  $NH_2-COOH$  puede estar mediado por EDC.

Preferentemente, el acoplamiento es un acoplamiento alquino-azida.

40 Polimerización

El monómero de isocianopéptido oligo(etilenglicol) injertado con el grupo funcional FG (primer comonomero) y los  
 45 monómeros de isocianopéptido oligo(etilenglicol) no injertados con el grupo funcional FG (segundo comonomero) se mezclan y copolimerizan posteriormente.

La copolimerización se realiza preferiblemente en presencia de un disolvente apolar. Disolventes apolares adecuados se pueden seleccionar del grupo que consiste en disolventes de hidrocarburo saturados y disolventes de hidrocarburo  
 50 aromático o mezclas de los mismos. Ejemplos de disolventes apolares son pentano, hexano, heptano, 2-metilbutano, 2-metilhexano, ciclohexano y tolueno, xilenos de benceno o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el tolueno se elige para el proceso de polimerización de isocianopéptidos de oligo(etilenglicol) donde la parte de oligo(etilenglicol) contiene al menos tres unidades de etilenglicol.

Preferiblemente, la polimerización se lleva a cabo en presencia de un catalizador. El catalizador es preferiblemente una sal de níquel (II). Ejemplo de sales de Ni(II) son haluros de níquel(II) (por ejemplo, cloruro de níquel (II), perclorato de níquel(II) o perclorato de tetrakis-(tertbutsocianuro) de níquel (II).

Se pueden usar otros complejos y sales de níquel siempre que sean solubles en el medio de polimerización o se disuelvan inicialmente en un disolvente adecuado que sea miscible en el medio de polimerización.

60 Preferiblemente, la concentración de monómero se elige por encima de 30 mmol/L y la relación catalizador/monómero se elige entre 1/100 y 1/10 000. Reducir la cantidad de níquel(II) (relación catalizador/monómero por debajo de 1/1000) permite la preparación de materiales que exhiben un grado sustancial de polimerización [DP medio > 500], que se desea para la aplicación posterior de los polímeros como macrohidrogeladores.

65

En un ejemplo representativo, una solución milimolar de monómero en un disolvente orgánico no polar o una mezcla de disolventes se añade a un catalizador de níquel (II) disuelto en un disolvente polar en una relación molar de 1:50 hasta 1:10.000 de catalizador al monómero. En un entorno sellado, la mezcla se agita durante 2 a 72 horas. Una vez completada, la mezcla de reacción se diluye con disolvente y se precipita en dietiléter o disolventes orgánicos no compatibles similares, dando el producto deseado.

La invención también se refiere a hidrogeles poliméricos que están además sustituidos con ligandos, factores de adhesión, factores de crecimiento, anticuerpos, péptidos u otros restos bioactivos, así como colorantes (fluorescentes) o cualquier otra molécula orgánica funcional.

La invención también se refiere al uso de los hidrogeles poliméricos según la invención, por ejemplo, en ingeniería de tejidos y robótica suave.

La invención también se refiere a cultivos celulares que comprenden células, medio de cultivo celular y el hidrogel según la presente invención.

### Figuras

La Figura 1 muestra la formación esquemática del hidrogel PIC reticulado.

La Figura 2 muestra el efecto de la formación de reticulaciones intra-haces a temperaturas más altas en las propiedades mecánicas después de enfriar el hidrogel polimérico reticulado.

La Figura 3 muestra el efecto de la reticulación a diferentes temperaturas sobre las propiedades de los hidrogeles en función de la temperatura.

La Figura 4 muestra el efecto de usar separadores cortos (EO4) con relación a largos (EO26) presentes en la unidad de reticulación en el módulo de almacenamiento.

La Figura 5 muestra el efecto de usar separadores cortos (EO4) con relación a largos (EO26) presentes en la unidad de reticulación sobre el módulo diferencial.

La Figura 6 muestra la estabilidad térmica del gel en función de la concentración de reticulación [retic] dada en  $\mu\text{M}$ . La estabilidad se cuantifica mediante  $R = 100 \% \times G'_5 / G'_{37}$ .

### Experimental

**Materiales:** El tolueno se destiló sobre sodio. El agua se purificó con un sistema MilliPore MilliQ (agua mQ 18,2 m $\Omega$ ). A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional. Si no se dan más detalles, la reacción se realizó bajo atmósfera y temperatura ambiente. La cromatografía en columna se realizó usando gel de sílice (0,060-0,200 mm) proporcionado por Baker.

Síntesis del monómero de isocianuro funcionalizado con azida

El monómero de isocianuro funcionalizado con azida se sintetizó siguiendo un procedimiento de bibliografía modificada. La primera y última etapa del procedimiento se alteraron.

Síntesis de p-toluenosulfonato de tetraetilenglicol

Se disolvió etilenglicol (52,68 g, 271 mmol) en 10 ml de THF y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió una solución de NaOH (1,81 g, 45,25 mmol) en 10 ml de agua y la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Una solución de cloruro de tosilo (8,08 g, 42,4 mmol) en 70 ml de THF se añadió gota a gota. La mezcla de reacción se agitó durante 2,5 h. Posteriormente, la solución se vertió sobre agua con hielo (200 ml) y se añadieron 50 ml de diclorometano (DCM). La capa de agua se extrajo 4 veces con 100 ml de DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron usando NaSO<sub>4</sub> anhidro y se retiraron los disolventes *al vacío*. El producto se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) para producir 11,8525g (80 %) de un aceite amarillo.

Análisis: **FT-IR (cm<sup>-1</sup>, ATR)** 3442 (O-H), 2870 (C-H), 1597 (N-H), 1453 (C-H), 1352 (S=O), 1175 (S=O), 1096 (C-O); **<sup>1</sup>H-NMR  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si)** 7,80 (dd, J = 7,81 Hz, 2H, -CH<sub>A</sub>-), 7,33 (d, J = 7,35 Hz, 2H, -CH<sub>A</sub>-S), 4,17 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,65 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>-), 2,45 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si)** 21,16 (1C, CCH<sub>3</sub>), 61,0 (1C, COH), 68,13 (1C, COS), 69,0 (1C, OCH<sub>2</sub>), 70,0, 70,1, 70,1, 70,2 (4C, OCH<sub>2</sub>), 70,8, 72,0 (2C, OCH<sub>2</sub>), 127,5 (2C, CHCCH), 129,5 (2C, CHCCH), 139,7 (1C, CCH<sub>3</sub>), 144,5 (1C, CHCS).

Síntesis de (R)-2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil 2-(S)-2-isocianopropanamido)propanoato

(*R*)-2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil 2-(((*S*)-2-formamidopropanamido)propanoato (640 mg, 1,64 mmol) se disolvió en 60 ml de DCM recién destilado. A esta solución, *N*- (trietilamoniosulfonil) carbamato de metilo (reactivo de Burges; se añadieron 594 mg, 2,49 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 6 h hasta que no se observó material de partida en TLC. Los disolventes se retiraron *al vacío*, y el producto se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM:MeCN 3:1) para producir 0,436G (72 % ) de un aceite amarillo pálido.

Análisis: **FT-IR (cm<sup>-1</sup>, ATR)** 3318 (N-H), 2875 (C-H), 2142 (C=N), 2105 (N<sub>3</sub>), 1744 (C=O), 1540 (N-H), 1453 (C-H), 1123 (C-O); **<sup>1</sup>H-NMR δ<sub>H</sub>(300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si)** 7,00 (bd, 1H, -NH-), 4,59 (m, 1H, -NHCH(CH<sub>3</sub>)C(O)O-), 4,32 (m, 3H, (-C(O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), -C≡NCH(CH<sub>3</sub>)C(O)NH-), 3,67 (m, 12H, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 3,39 (m, 2H, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,65 (d, J = 7,2, 3H, C≡NCH(CH<sub>3</sub>)C(O)-), 1,48 (d, J = 7,2, 3H, C≡NCH(CH<sub>3</sub>)C(O)-); **<sup>13</sup>C NMR δ<sub>C</sub> (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si)** 170,69 (1C, CH(CH<sub>3</sub>)C(O)OCH<sub>2</sub>), 165,72 (1C, CH(CH<sub>3</sub>)C(O)NH), 70,69, 70,65, 70,61, 70,56, 70,02, 68,81 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 50,66 (1C, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 48,56 (C≡NCH), 19,66, 18,04 (1C, CH(CH<sub>3</sub>)CO); **MS (ESI) m/z [M+Na]<sup>+</sup>** (C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Na), calcd 394,17; encontrado 394,1.

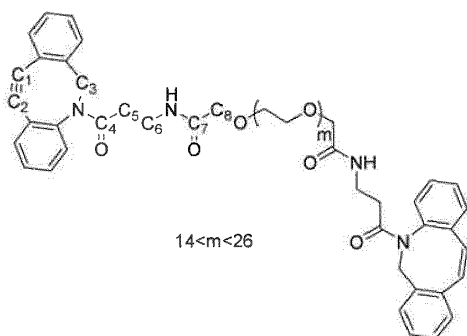
#### 15 Polimerización

El monómero comercial de isocianuro terminado en metoxi se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 1:3 MeCN:DCM) antes de su uso. El monómero purificado (250 mg, 0,79 mmol) y el monómero de isocianuro funcionalizado con azida (10,1 mg, 0,027 mmol) se disolvieron en tolueno recién destilado (4 ml). Posteriormente, 81,7 μL de una solución recién preparada de 1 mM Ni (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O en tolueno recién destilado que contenía EtOH al 10 % se diluyó a 1 ml usando tolueno recién destilado. Esta dilución del catalizador se añadió a la solución de monómero. La mezcla resultante se agitó durante 72 h a ta. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y el producto se precipitó en di-isopropil éter. Este tratamiento fue repetido tres veces. El producto se produjo como 243,6 mg (94 % ) de un sólido amarillo.

**[0080] FT-IR ν<sub>max</sub> film (cm<sup>-1</sup>):** 3268, 2876, 1742, 1657, 1532, 1455, 1264, 1217, 1065, 729, 703. **M<sub>v</sub>** = 599 kDa, **UV-Vis λ<sub>max</sub> (25 °C, milliQ)** = 245 nm.

#### 30 Síntesis de reticulante largo

**4-Dimetilaminopiridina (DMAP, 0,5 mg, 4,4 μmol), DBCO-amina (38,1 mg, 138 μmol) y PEG(1000) bis-ácido acético (49,7 mg, 44 μmol) se disolvieron en DCM recién destilado (5 ml).**



La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 28 mg, 146 μmol) se añadió y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente. La solución se agitó durante la noche a ta. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con DCM y la capa orgánica se lavó con agua (3 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml). La capa orgánica se secó con Na anhidro 2SO<sub>4</sub> y los disolventes se evaporaron *al vacío*. El producto se disolvió en 1 ml de tetrahidrofurano (THF), se filtró y el disolvente se evaporó *al vacío*. Este procedimiento se repitió una vez. Para una mayor purificación, el producto se disolvió en una cantidad mínima de THF y se precipitó en heptano frío. Este procedimiento se repitió dos veces, después de lo cual el producto se produjo como 59,7 mg (84 % ) de un aceite amarillo.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ:** 7,70 (d, 2H, C<sub>Ar</sub>H), 7,46 - 7,31 (m, 14H, C<sub>Ar</sub>H), 7,13 (br t, 2H, NH), 5,16 (d, 2H, C<sub>3</sub>H), 3,90 (q, 4H, C<sub>8</sub>H<sub>2</sub>), 3,80 - 3,60 (m, 88H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>H), 3,60 - 3,49 (m, 8H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,44 - 3,32 (m, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>), 2,55 (dt, 2H, C<sub>5</sub>H), 2,02 (dt, 2H, C<sub>5</sub>H). **<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ:** 171,56 (C<sub>4</sub>), 169,79 (C<sub>7</sub>), 151,11 (C<sub>Ar</sub>), 148,07 (C<sub>Ar</sub>), 132,16 (C<sub>Ar</sub>), 129,09 (C<sub>Ar</sub>), 128,58 (C<sub>Ar</sub>), 128,29 (C<sub>Ar</sub>), 128,23 (C<sub>Ar</sub>), 127,73 (C<sub>Ar</sub>), 127,18 (C<sub>Ar</sub>), 125,53 (C<sub>Ar</sub>), 123,07 (C<sub>Ar</sub>), 122,55 (C<sub>Ar</sub>), 114,80 (C<sub>1</sub>), 107,74 (C<sub>2</sub>), 70,86 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 70,56 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- and C<sub>8</sub>), 70,27 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 55,45 (C<sub>3</sub>), 34,78 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>). **MALDI-TOF: m/z** = 1377,6179, 1421,6465, 1465,6640, 1509,6913, 1553,7158, 1597,7458, 1641,7732, 1685,8016, 1729,8202, 1773,8499, 1817,8627, 1861,8839 and 1905,8782 que corresponde a DBCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-DBCO+Na<sup>+</sup> (n = 14 - 26) y 1569,6882, 1613,7091, 1657,7335 and 1701,7500 que corresponde a DBCO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-DBCO+K<sup>+</sup> (n = 17 - 20). **FT-IR ν<sub>max</sub> film (cm<sup>-1</sup>):** 3507 (N-H), 2870 (C-H), 1655 (C=O amida), 1535, 1466, 1449, 1398, 1325, 1250, 1206, 1101 (C-N), 949, 846, 729. **UV-Vis λ<sub>max</sub> (25 °C, milliQ)** = 290,5 nm. **ε<sub>290,5</sub> (milliQ)** = 16430 L · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>.

## Reacción de reticulación

5 Cuando se usan reticulantes basados en dibenzociclooctina (DBCO), la conversión de los grupos DBCO puede seguirse experimentalmente mediante el uso de espectroscopia UV-vis. Para este fin, la (disminución) absorbancia del DBCO a  $\lambda = 304 \text{ nm}$  se traza durante la reacción de reticulación. Los grupos de DBCO restantes se pueden calcular a partir de la extinción del agente de extinción en la  $\lambda = 304 \text{ nm}$ :  $\epsilon_{304} = 7610 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## Preparación del hidrogel a partir del copolímero

10 Una solución homogénea de  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  se preparó el copolímero de poliisocianuro disolviendo el polímero seco en la cantidad apropiada de agua miliQ durante la noche a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y, ocasionalmente, agitar. Todas las soluciones de polímero se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior.

## Ejemplo 1 (preparación de un hidrogel reticulado)

15 Una solución de  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  del reticulante corto disponible comercialmente en DMSO, o  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  del reticulante largo en agua miliQ, se preparó y diluyó hasta la concentración deseada usando agua miliQ. Las concentraciones se eligieron de manera que el polímero y las soluciones de reticulante podrían mezclarse en una relación 1:1 para lograr la relación  $[\text{DBCO}] / [\text{N}_3] = 1$ . Antes de la medición, la solución del copolímero de poliisocianuro y una solución del reticulante largo o el reticulante corto se mezclaron en hielo en una relación 1:1, se homogeneizó brevemente y se calentó inmediatamente a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 1 hora, en un reómetro de TA Instruments Discovery Hybrid. Después de esto, el gel se enfrió hasta  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  y se dejó estabilizar durante 10 minutos. Se obtuvo un gel con un módulo de almacenamiento de  $161 \text{ Pa}$  en  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . El módulo de almacenamiento a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $95 \text{ Pa}$ . La conversión de DBCO después de 15 minutos fue de  $81 \pm 10 \%$  (medida usando UV-Vis).  $R = 59 \%$ . Densidad de reticulación =  $34 \text{ } \mu\text{M}$ .

## Ejemplo 2 (estabilidad del hidrogel reticulado)

30 Se repitió el Ejemplo 1, excepto que las muestras se dejaron estabilizar durante 19 horas en lugar de 10 minutos a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . El módulo de almacenamiento de esta muestra después de 10 minutos a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $103 \text{ Pa}$  ( $R = 63 \%$ ), y el módulo de almacenamiento después de 19 horas fue  $101 \text{ Pa}$  ( $R = 64 \%$ , densidad de reticulación =  $32 \text{ } \mu\text{M}$ ).

## Experimento 3 (baja concentración de reticulante proporciona haces sueltos)

35 El Ejemplo 1 se repitió excepto que la relación  $[\text{DBCO}] / [\text{N}_3]$  fue 0,5 en lugar de 1,0. El módulo de almacenamiento de este gel a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $185 \text{ Pa}$ , y el módulo de almacenamiento en  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $55 \text{ Pa}$ . La conversión de DBCO después de 15 minutos fue de  $94 \pm 10 \%$  (medida usando UV-Vis).  $R = 30 \%$  de densidad de reticulación =  $12 \text{ } \mu\text{M}$ .

## Experimento 4 (alta concentración de reticulante proporciona haces sueltos)

40 El Ejemplo 1 se repitió excepto que la relación  $[\text{DBCO}]/[\text{N}_3]$  fue 2,0 en lugar de 1,0. El módulo de almacenamiento del gel a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $156 \text{ Pa}$ , y el módulo de almacenamiento en  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $31 \text{ Pa}$ . La conversión de DBCO después de 15 minutos fue de  $63 \pm 10 \%$  (medida usando UV-Vis).  $R = 20 \%$ , densidad de reticulación =  $13 \text{ } \mu\text{M}$ .

## Ejemplo 5 (temperatura de reticulación más alta)

45 El Ejemplo 1 se repitió, excepto que la temperatura de reticulación fue  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  en lugar de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . El módulo de almacenamiento del gel a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $478 \text{ Pa}$ , y el módulo de almacenamiento en  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $218 \text{ Pa}$ .  $R = 46 \%$ . La densidad de reticulación no se determinó experimentalmente. Estimado (considerando Rendimiento de la reacción 90):  $34 \text{ } \mu\text{M}$ .

50 Ejemplo 6 (temperatura de reticulación más baja)

El Ejemplo 1 se repitió, excepto que la temperatura de reticulación fue de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en lugar de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . El módulo de almacenamiento del gel a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $48 \text{ Pa}$ , y el módulo de almacenamiento en  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $31 \text{ Pa}$ .  $R = 65 \%$ . La densidad de reticulación no se determinó experimentalmente. Estimado (considerando Rendimiento de la reacción 90):  $34 \text{ } \mu\text{M}$ .

## Experimento 7 (reticulante más largo)

60 El Ejemplo 1 se repitió excepto que el reticulante largo, se disolvió como  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  en miliQ, se usó (6-10 nm en lugar de 3 nm). El módulo de almacenamiento del gel a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $125 \text{ Pa}$ , y el módulo de almacenamiento en  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  fue  $40 \text{ Pa}$ . La conversión de DBCO después de 15 minutos fue de  $89 \pm 10 \%$  (medida usando UV-Vis).  $R = 32 \%$ . La densidad de reticulación no se determinó experimentalmente. Estimado (considerando Rendimiento de la reacción 90):  $34 \text{ } \mu\text{M}$ .

## Experimento 8 comparativo (gel desintegrado de concentración de reticulante demasiado bajo)

65

## ES 2 954 173 T3

El Ejemplo 1 se repitió excepto que la relación [DBCO]/[N<sub>3</sub>] fue 0,1 en lugar de 1,0. El módulo de almacenamiento del gel a 37 °C fue 155 Pa, y el módulo de almacenamiento en 5 °C fue 2 Pa. La concentración de DBCO fue demasiado baja para medir la conversión usando mediciones de UV-Vis. R <1 %, densidad de reticulación = 0,3 μM.

5 Experimento 9 comparativo (gel desintegrado de concentración de reticulante demasiado alto)

El Ejemplo 1 se repitió excepto que la relación [DBCO] / [N<sub>3</sub>] fue 10 en lugar de 1,0. El módulo de almacenamiento del gel a 37 °C fue 260 Pa, y el módulo de almacenamiento en 5 °C fue 0,3 Pa. La concentración de DBCO fue demasiado baja para medir la conversión usando mediciones de UV-Vis. R <1 %, densidad de reticulación = 0,3 μM.

10 Experimento 10 comparativo (sin reticulante)

Se repitió el Ejemplo 1, salvo que no se usó reticulante. El módulo de almacenamiento del gel a 37 °C fue 160 Pa, y el módulo de almacenamiento en 5 °C fue 0,6 Pa. R = 0,4 %. Densidad de reticulación = 0 μM.

15 Experimento 11 comparativo (reticulación aleatoria de los polímeros PIC, no en los haces):

20 Se repitió el Ejemplo 1, salvo que el hidrogel no se calentó a 37 °C. Después de la homogeneización de los componentes, pero se mantiene en 5 °C para permitir que la reacción de reticulación se complete. Después de 2 horas, el módulo se estabilizó a 7 Pa, indicativo de un gel muy débil. La densidad de reticulación (pero no en los haces) se estimó a 34 μM.

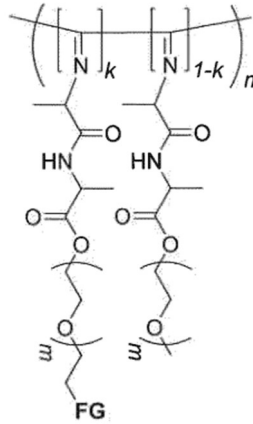
Experimento 12 comparativo (reticulación aleatoria de los polímeros PIC, no en los haces):

25 Se repitió el ejemplo 1, pero en presencia de NaI 1 M, lo que aumenta la LCST del polímero PIC. Después de la homogeneización de los componentes, la muestra se calentó a 25 °C (por debajo de la LCST) para permitir que la reacción de reticulación se complete. Después de 2 horas, el módulo se estabilizó por debajo de 1 Pa, indicativo de un gel muy débil. La densidad de reticulación (pero no en los haces) se estimó a 34 μM.

REIVINDICACIONES

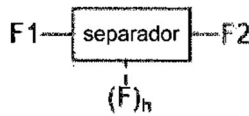
1. Un hidrogel polimérico que comprende

5 a) un polímero formado por la reacción de reticulación de una unidad polimérica A según la fórmula (I),



polímero A

10 con una unidad de reticulación B según la fórmula (II)



reticulante B

15 b) y agua,  
en donde

$n = 100-10.000$ , preferiblemente 250-2500, más preferiblemente 500-1500;

$m =$  independientemente 2-10, preferiblemente 3 o 4;

20 FG es un resto funcional que puede acoplarse covalentemente al resto funcional complementario F1 o F2 de la unidad de reticulación (B);

$k = 0,01 - 0,05$ ;

25  $h = 0, 1$  o 2;

el espaciador es un resto orgánico, que tiene una cadena principal que comprende al menos dos restos funcionales F1 y F2, en donde la longitud del reticulante en la conformación extendida según se determina por modelado molecular (incluyendo espaciador y grupos funcionales F1 y F2) está entre 2,5 y 12 nm, o en donde la longitud es entre 20 y 80 átomos;

en donde la concentración de grupos funcionales FG varía entre 20-200  $\mu\text{M}$ ; y

en donde la relación molar entre FG y grupos funcionales F1, F2, F varía entre 0,5: 1 y 2:1.

35 2. El hidrogel polimérico según la reivindicación 1, en donde la cantidad de polímero en el hidrogel varía entre 0,01 % en peso y 1 % en peso, más preferiblemente entre 0,02 % en peso y 0,5 % en peso, en donde la cantidad de agua en el hidrogel varía entre 90 y 99,99 % en peso con respecto al total del hidrogel.

40 3. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el número de unidades de etilenglicol ( $m$ ) varía independientemente entre 2 y 10, preferiblemente el número de unidades de etilenglicol es 3 o 4, con la máxima preferencia 3.

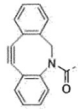
4. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde  $k$  varía entre 0,02 y 0,04.

45 5. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los grupos funcionales F1, F2, F y grupos funcionales FG que pueden dar acoplamientos de forma covalente se seleccionan de

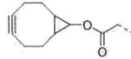
acoplamiento alquino-azida, acoplamiento dibenzociclooctina-azida, acoplamientos de azida basados en biciclo[6.1.0] non-4-ina, acoplamiento de vinilsulfona-tiol, acoplamiento de maleimida-tiol, acoplamiento de metacrilato de metilo-tiol, acoplamiento de éter, acoplamiento de tioéter, acoplamiento de biotina-estreptavidina, ácido amino-carboxílico resultante en enlaces amidas, acoplamientos de alcohol-ácido carboxílico resultantes en enlaces éster, acoplamiento de tetrazina-trans-cicloocteno y acoplamiento de NHS-éster (*N*-hidroxisuccinimida éster).

5  
6. El hidrogel polimérico según la reivindicación 5, en donde los acoplamientos se basan en un acoplamiento de azida-alqueno y/o azida-alquino tal como acoplamiento dibenzociclooctina-azida, acoplamientos de azida basados en biciclo[6.1.0]non-4-ina.

10  
7. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde los grupos funcionales F1 y F2 de la unidad de reticulación se seleccionan de



y

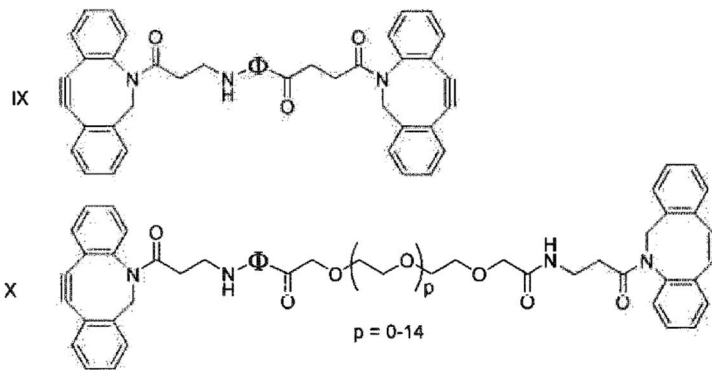


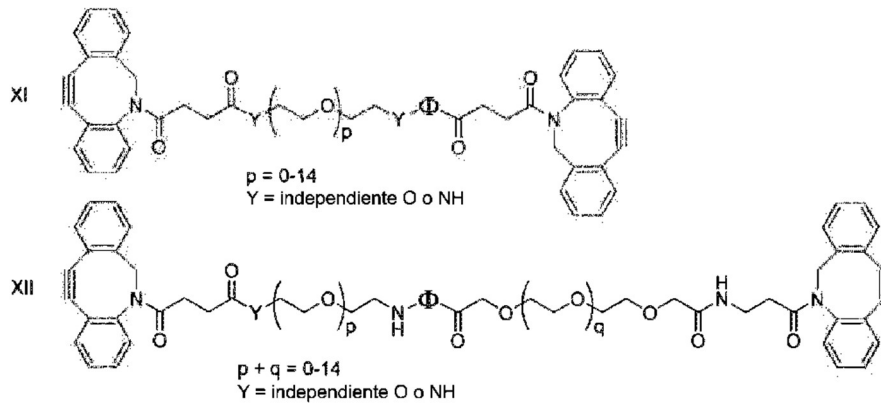
y sus derivados.

25  
8. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los espaciadores comprenden unidades de polietilenglicol, que tienen de 3 a 26 unidades de etilenglicol, preferiblemente entre 4 y 14, o entre 4 y 10 unidades de etilenglicol.

9. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los espaciadores comprenden secuencias peptídicas cortas, que son escindibles por la metaloproteinasa (MMP)

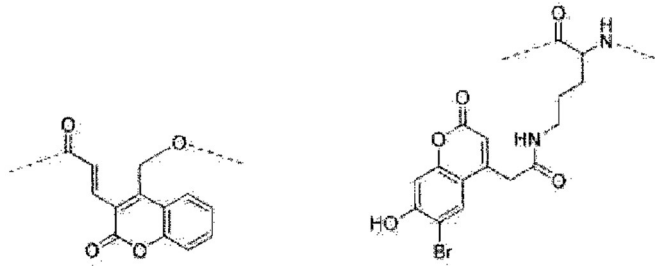
30  
10. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el reticulante se define por cualquiera de las fórmulas IX-XII





en donde  $\phi$  es un colorante fotoescindible que, como resultado de la reacción fotoquímica, escinde el espaciador, en donde  $\phi$  preferiblemente se selecciona de:

5



XIII

XIV

$\Phi 1$  colorante fotoescindible 1:  $\lambda = 450 \text{ nm}$      $\Phi 2$  colorante fotoescindible 2:  $\lambda = 740 \text{ nm}$

11. El hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el hidrogel tiene un valor R de al menos 40 %, en donde R se define como el porcentaje de rigidez restante a 5 °C,  $G'_5$ , en comparación con la rigidez a 37 °C,  $G'_{37}$ :

10

$$R = 100 \% \times G'_5 / G'_{37}.$$

12. Un proceso para preparar el hidrogel polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:

15

a. copolimerizar un primer comonomero de un isocianopéptido funcionalizado con oligo(etilenglicol) injertado con un grupo funcional FG y un segundo comonomero de un isocianopéptido funcionalizado con oligo(etilenglicol) no injertado, en donde la relación molar entre el primer comonomero y el segundo comonomero es 1:100 y 1:20 para preparar un polímero (A);

20

b. disolver el polímero (A) en agua a una concentración entre 0,01 y 1 % en peso de polímero entre 0 y 10 °C para evitar la formación de hidrogel

25

c. añadir un compuesto de reticulación que tiene una unidad separadora y al menos dos grupos funcionales  $F (=F1=F2=(F)_h)$  capaz de reaccionar con el grupo funcional FG,

30

en donde el grupo funcional FG y el grupo funcional F se eligen para reaccionar y formar un acoplamiento, en donde el acoplamiento se selecciona independientemente del grupo que consiste en acoplamiento alquino-azida, acoplamiento dibenzociclooctina-azida, acoplamientos de oxanorbornadieno-azida, acoplamiento de vinilsulfona-tiol, acoplamiento de maleimida-tiol, acoplamiento de metil metacrilato-tiol, acoplamiento de éter, acoplamiento de tioéter, acoplamiento de biotina-estreptavidina, ácido amino-carboxílico, que da como resultado enlaces amidas, acoplamiento de alcohol-ácido carboxílico que da como resultado enlaces ésteres, acoplamiento de tetrazina- trans-cicloocteno y NHS-éster (N-hidroxisuccinimida éster)-amina.

35

d. poner el hidrogel dentro de 10 minutos a la temperatura de reticulación deseada para la formación de gel (rápido) a temperaturas por encima de LCST o temperatura de gelificación y la reacción con un compuesto de reticulación (más lento).

13. El proceso según la reivindicación 12, en donde la temperatura de reacción varía entre 20 y 50 °C, preferiblemente entre 22 y 40 °C.

35

14. Uso de los hidrogeles poliméricos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la ingeniería de tejidos y robótica suave (*soft robotics*).
  15. Cultivos celulares que comprenden células, medio de cultivo celular y el hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 5

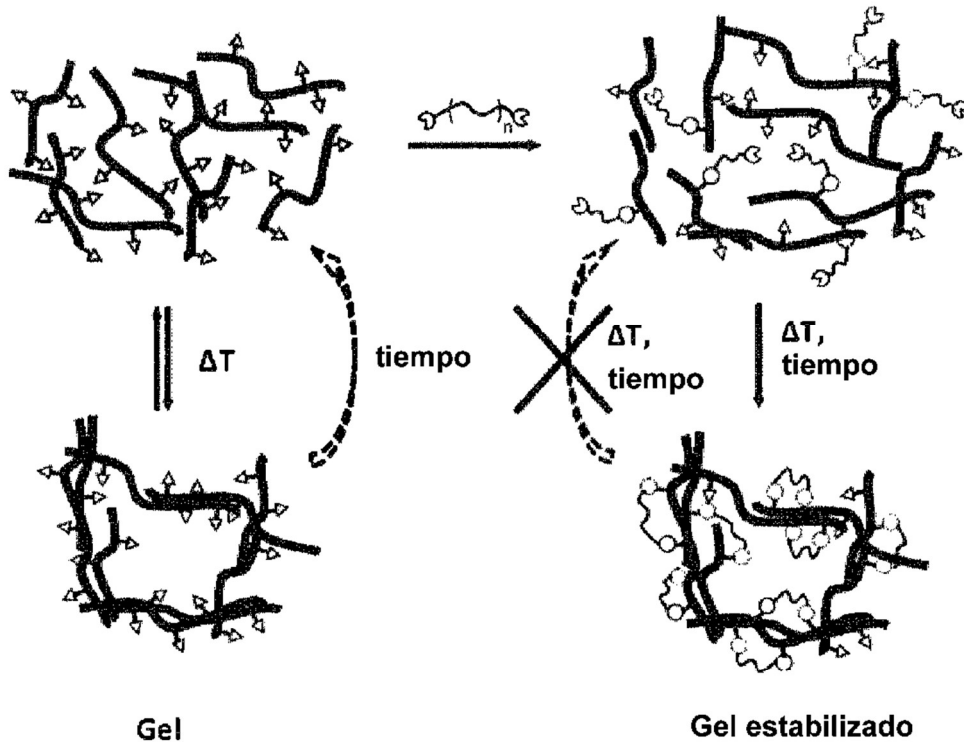


Figura 1

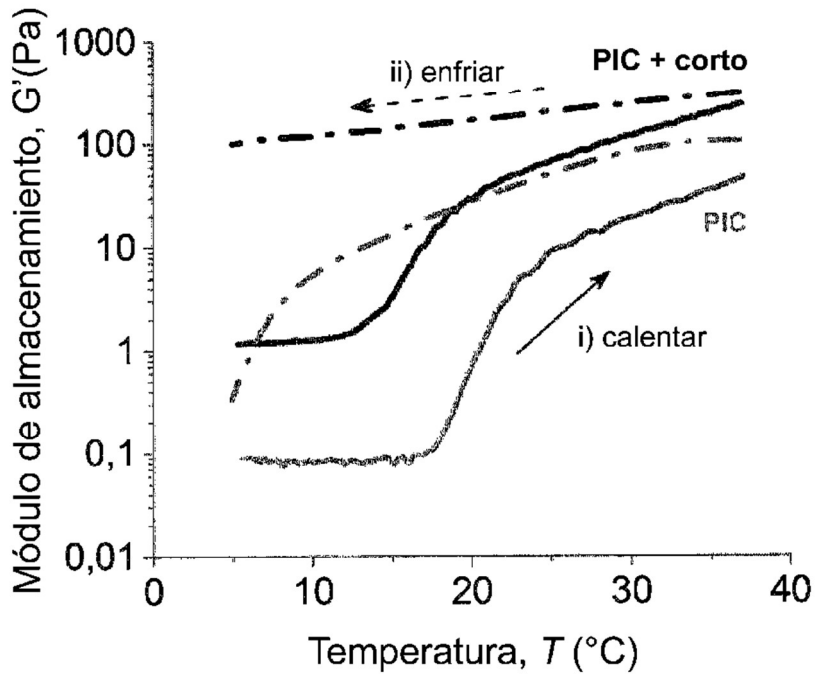


Figura 2

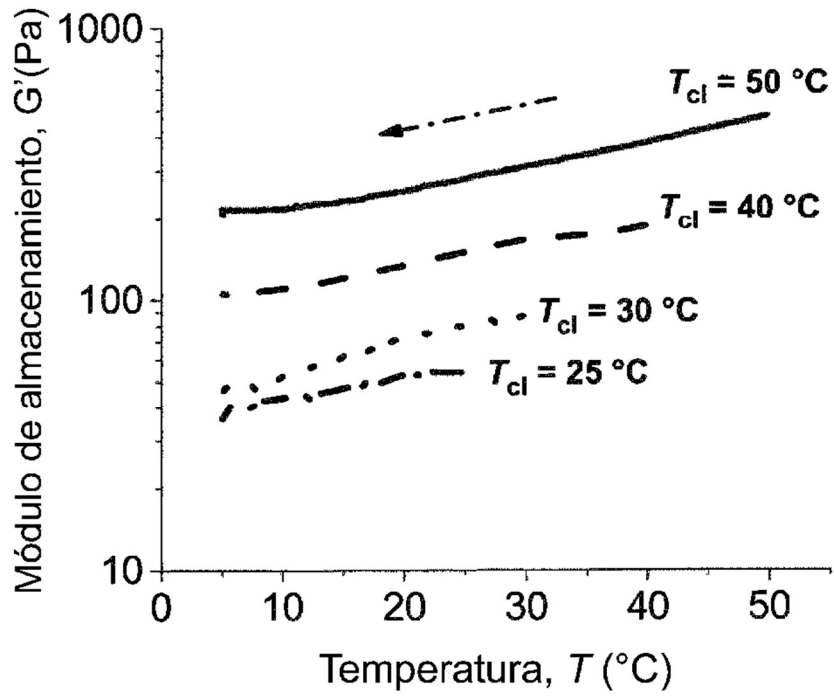


Figura 3

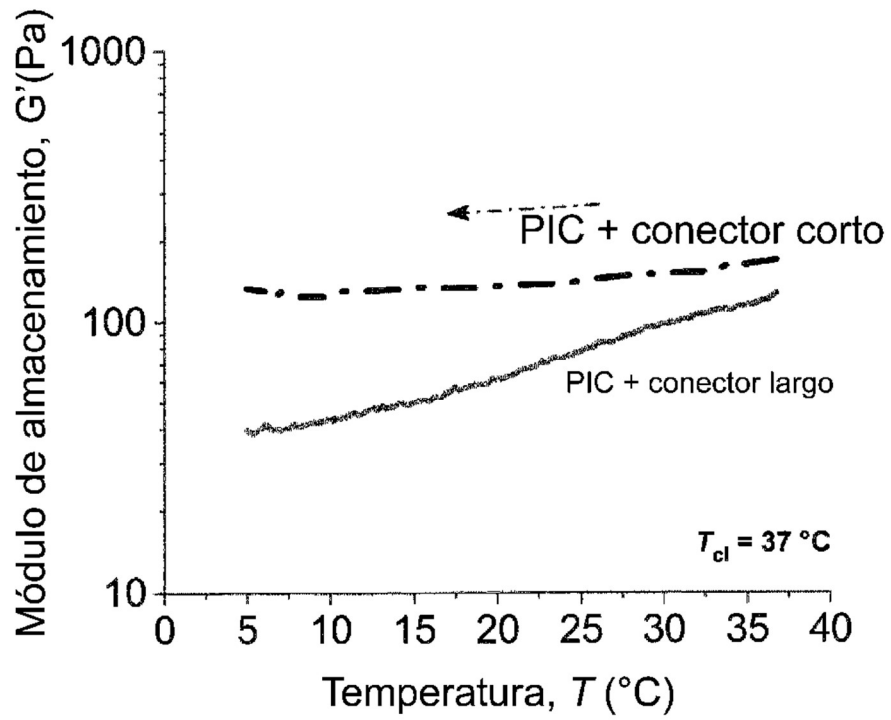


Figura 4

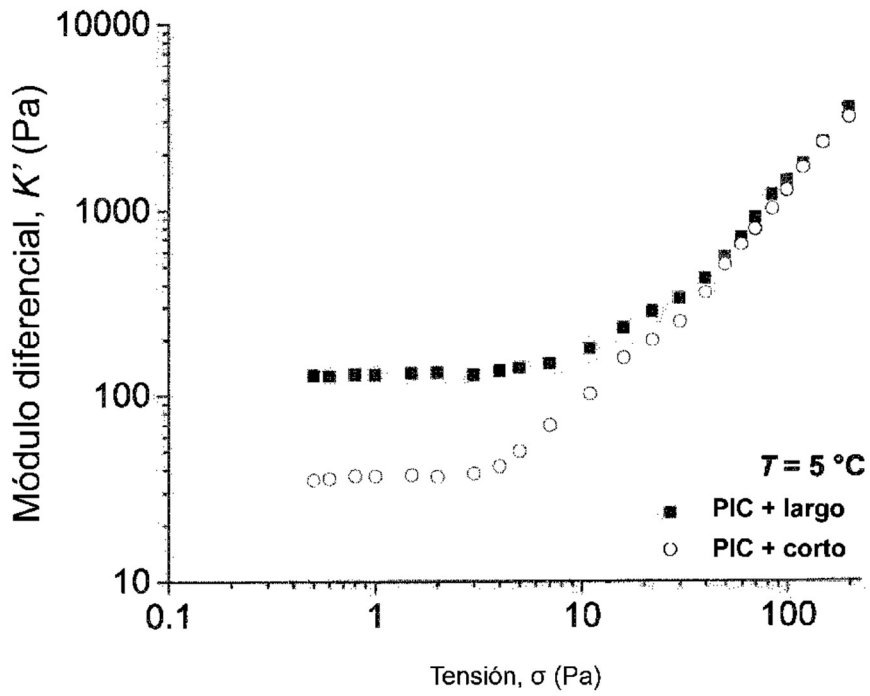


Figura 5

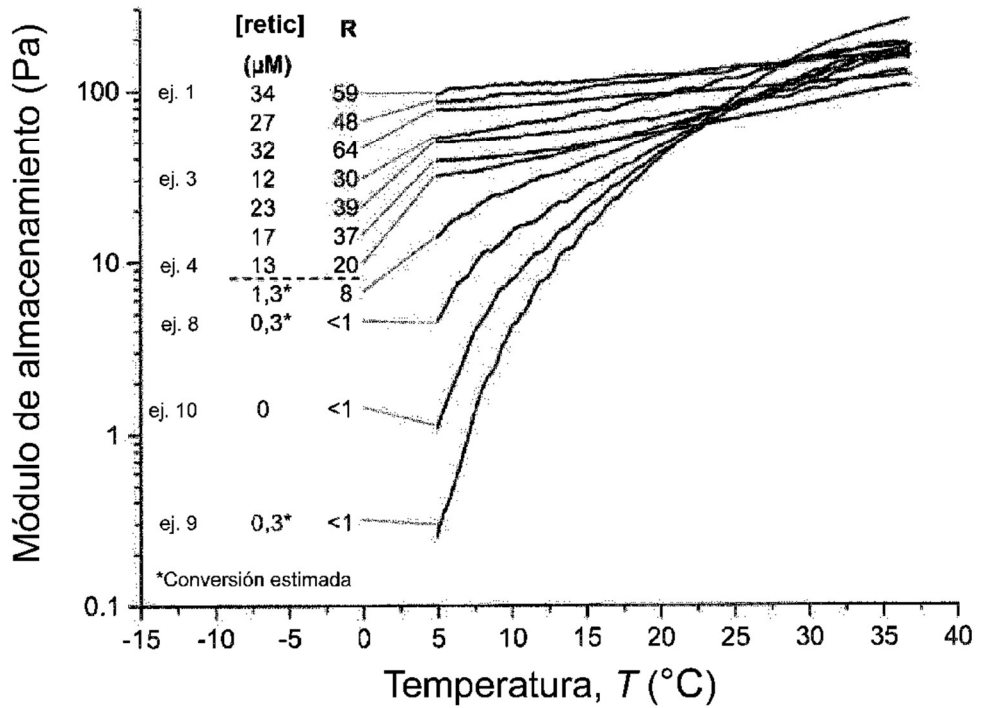


Figura 6