

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 908**

51 Int. Cl.:

**A61L 24/00** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

**A61L 15/60** (2006.01)

**C07D 237/26** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2015 E 20176544 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3730160**

54 Título: **Hidrogeles reticulados por química clic y métodos de uso**

30 Prioridad:

**04.04.2014 US 201461975375 P**

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

**25.10.2023**

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (100.0%)  
17 Quincy Street  
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**DESAI, RAJIV;  
JOSHI, NEEL SATISH;  
MOONEY, DAVID J.;  
KOSHY, SANDEEP T. y  
STAFFORD, ALEXANDER G.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 951 908 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

Hidrogeles reticulados por química clic y métodos de uso

- 5 La invención se realizó con el apoyo del Gobierno de EE. UU. con la subvención R01 HL069957 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud y con W911NF-13-1-0242 otorgada por la Oficina de Investigación del Ejército de EE. UU. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

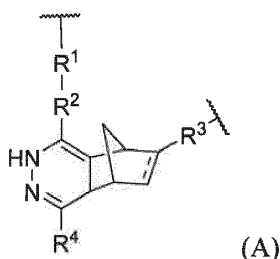
## Antecedentes de la invención

- 10 Un hidrogel es un gel polimérico que comprende una red de cadenas poliméricas reticuladas. La estructura reticulada de los hidrogeles les permite absorber cantidades significativas de agua. Algunos hidrogeles son altamente estirables y elásticos; otros son viscoelásticos. Los usos de los hidrogeles incluyen vehículos para suministrar células, vacunas contra el cáncer, ingeniería de tejidos (p. ej., como un armazón) y vehículos para suministrar proteínas/moléculas pequeñas. Los hidrogeles también son útiles como materiales estructurales. Algunos hidrogeles existentes se forman mediante la reticulación de polímeros a través de un enlace no covalente, tal como un enlace iónico, p. ej., a través de la reticulación de calcio. Los hidrogeles creados mediante enlaces no covalentes pueden no ser tan resistentes o estables a largo plazo como los hidrogeles creados mediante enlaces covalentes. Sin embargo, la química existente utilizada para crear hidrogeles con polímeros unidos mediante enlaces covalentes, es compleja y costosa. Las reacciones químicas son difíciles de controlar con respecto a las reacciones secundarias de la reacción, la reactividad cruzada y la obtención de hidrogeles con las propiedades físico-químicas/mecánicas deseadas, tales como elasticidad, resistencia, grado de hinchamiento y tasa de degradación. Algunos de los hidrogeles existentes también muestran citotoxicidad y/o la polimerización y la reticulación del hidrogel no se pueden obtener en presencia de células vivas sin causar una muerte celular significativa.

## Compendio de la invención

- 25 Hemos reconocido una necesidad de hidrogeles reticulados covalentes que se puedan crear utilizando reacciones químicas simples y finamente ajustables que no sean tóxicas para las células, que puedan tener lugar con una tasa rápida en condiciones biológicas, que sean más estirables y/o más fuertes que los hidrogeles existentes actualmente y que se puedan producir de forma rentable. Nuestra invención aborda esas necesidades. En un aspecto amplio, esta descripción proporciona una nueva pareja bioortogonal de grupos funcionales que reaccionan mediante química clic para formar agentes reticulantes que se pueden usar para formar hidrogeles biocompatibles.

- 35 Por lo tanto, en un aspecto, la descripción proporciona un hidrogel que comprende un primer polímero y un segundo polímero, en donde el primer polímero y/o el segundo polímero comprenden un polisacárido, y en donde el primer polímero está conectado con el segundo polímero mediante enlazadores de fórmula (A):



en donde

el enlace  $\text{--}$  es un enlace simple o doble;

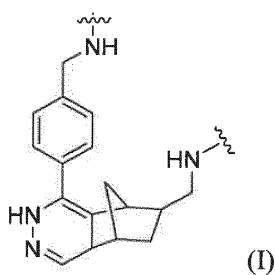
- 45  $R^1$  es -alquil  $C_0-C_6-NH-$ , -alquil  $C_0-C_6-O-$  o -alquil  $C_0-C_3-C(O)-$ ;

- $R^2$  es un enlace, arilo o heteroarilo, en donde el arilo y el heteroarilo están sustituidos opcionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , (alquil  $C_1-C_6$ )amino o di(alquil  $C_1-C_6$ )amino;

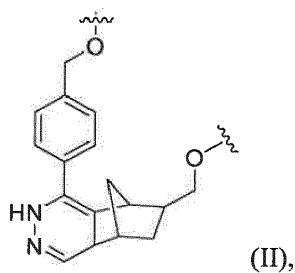
- 50  $R^3$  es -alquil  $C_0-C_6-NH-$ , -alquil  $C_0-C_6-O-$  o -alquil  $C_0-C_3-C(O)-$ ; y

- $R^4$  es hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$ , arilo o heteroarilo, en donde el arilo y el heteroarilo están sustituidos opcionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , (alquil  $C_1-C_6$ )amino o di(alquil  $C_1-C_6$ )amino.

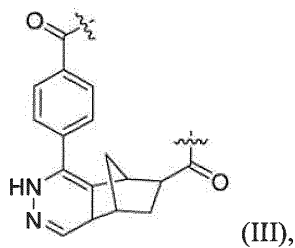
- 55 En una realización, el hidrogel de la descripción es en el que los enlazadores de fórmula (A) están en forma de fórmula (I):



o de fórmula (II):



o de fórmula (III):



en donde los enlazadores de fórmula (I), (II) o (III) están sustituidos opcionalmente en cualquier posición adecuada.

En una realización, los enlazadores de fórmula (A) son de modo que el enlace  $\text{--}$  es un enlace simple. En otra realización, el enlace  $\text{--}$  es un enlace doble.

Otra realización proporciona los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, en donde  $R^1$  es

- a.  $\text{--NH--}$ ,  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_6\text{--NH--}$ ,  $\text{--O--}$ ,  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_6\text{--O--}$ ,  $\text{--C(O)--}$  o  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_3\text{--C(O)--}$ ;
- b.  $\text{--alquil C}_0\text{--C}_6\text{--NH--}$ ;
- c.  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_6\text{--NH--}$ ;
- d.  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_3\text{--NH--}$ ;
- e.  $\text{--metil-NH--}$  o  $\text{--pentil-NH--}$ ;
- f.  $\text{--alquil C}_0\text{--C}_6\text{--O--}$ ;
- g.  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_6\text{--O--}$ ;
- h.  $\text{--alquil C}_1\text{--C}_3\text{--O--}$ ;
- i.  $\text{--metil-O--}$  o  $\text{--pentil-O--}$ ;
- j.  $\text{--alquil C}_0\text{--C}_3\text{--C(O)--}$ ;
- k.  $\text{--C(O)--}$ ;

**l.** -metil-C(O)-;

**m.** igual que R<sup>3</sup>.

5 Otra realización proporciona los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, en donde R<sup>2</sup> es un enlace.

En una realización, los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, son aquellos en los que R<sup>2</sup> es

10 **a.** arilo o heteroarilo, cada uno sustituido opcionalmente;

**b.** arilo sustituido opcionalmente;

15 **c.** fenilo;

**d.** heteroarilo sustituido opcionalmente; o

**e.** piridilo, pirimidilo o pirazinilo.

20 Otra realización proporciona los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, en donde R<sup>3</sup> es

25 **a.** -NH-, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-NH-, -O-, -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-O-, -C(O)- o -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-C(O)-;

**b.** -alquil C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-NH-;

**c.** -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-NH-;

30 **d.** -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-NH-;

**e.** -metil-NH- o -pentil-NH-;

**f.** -alquil C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>-O-;

35 **g.** -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-O-;

**h.** -alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-O-;

40 **i.** -metil-O- o -pentil-O-;

**j.** -alquil C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub>-C(O)-;

**k.** -C(O)-;

45 **l.** -metil-C(O)-; o

**m.** igual que R<sup>1</sup>.

50 En una realización, los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, son aquellos en los que R<sup>4</sup> es hidrógeno.

En una realización, los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, son aquellos en los que R<sup>4</sup> es

55 **a.** alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo o heteroarilo, en donde el arilo y el heteroarilo están sustituidos opcionalmente;

**b.** arilo o heteroarilo, en donde el arilo y el heteroarilo están sustituidos opcionalmente;

60 **c.** arilo sustituido opcionalmente;

**d.** fenilo;

**e.** heteroarilo sustituido opcionalmente; o

65 **f.** piridilo, pirimidilo o pirazinilo.

Otra realización proporciona los enlazadores de fórmula (A) según cualquier realización precedente, en donde R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o metilo.

- 5 En algunas realizaciones, el hidrogel comprende una pluralidad de enlazadores de fórmula (A); o de fórmula (I), fórmula (II) o fórmula (III).

La invención también incluye un hidrogel que comprende una red interconectada de una pluralidad de polímeros, por ejemplo, que incluyen un primer polímero y un segundo polímero. Por ejemplo, los polímeros están conecta-  
10 dos a través de una pluralidad de enlazadores de fórmula (A), o de fórmula (I), fórmula (II) o fórmula (III).

Algunas realizaciones de la descripción proporcionan hidrogeles en los que el primer polímero y el segundo polímero son independientemente polímeros solubles. En otras realizaciones, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente polímeros solubles en agua.

15 En algunos casos, la concentración de reticulaciones por hidrogel (p. ej., en donde cada reticulación comprende la fórmula I) es al menos de aproximadamente un 10 % (p/p), p. ej., al menos de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 99 % o un 100 % (p/p).

En algunas realizaciones, el primer polímero y el segundo polímero pueden comprender ambos un polisacárido. En algunas realizaciones, el primer polímero y/o el segundo polímero se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en alginato, quitosano, polietilenglicol (PEG), gelatina, ácido hialurónico, colágeno, condroitina, agarosa, poliacrilamida y heparina. En algunas realizaciones, el primer polímero y el segundo polímero son el mismo polímero seleccionados independientemente a partir del grupo que consiste en alginato, quitosano, ácido hialurónico, condroitina, agarosa y heparina.

25 Algunas realizaciones de la descripción proporcionan hidrogeles en los que el primer polímero y el segundo polímero se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en alginato, quitosano y gelatina. En una realización, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente alginato. En otra realización, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente quitosano. En otra realización, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente gelatina.

30 En algunas realizaciones, el primer polímero y/o el segundo polímero están modificados por un péptido adhesivo celular, p. ej., un componente de la matriz celular extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). En una realización, el primer y/o el segundo polímero modificado de ese modo es alginato. El péptido adhesivo celular puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD). Los ejemplos incluyen la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-aspartato-cisteína (RGDC) (SEQ ID NO: 1) y arginina-glicina-aspartato-serina (RGDS) (SEQ ID NO: 2). En otros ejemplos, el péptido adhesivo celular comprende la secuencia de aminoácidos lisina-glutamina-alanina-glicina-aspartato-valina (KQAGDV) (SEQ ID NO: 3) o valina-alanina-prolina-glicina (VAPG) (SEQ ID NO: 4). En algunos ejemplos, el péptido adhesivo celular es CGGGGRGDSP (SEQ ID NO: 5). Se pueden usar otros péptidos adhesivos celulares basándose en la aplicación deseada y serán evidentes para un experto en la materia.

35 En algunos casos, el péptido adhesivo celular se une covalentemente al polímero a través de una reacción de tiol-eno, p. ej., a través de la fotoquímica de tiol-eno. Por ejemplo, el péptido adhesivo celular puede estar unido covalentemente al polímero (p. ej., alginato) antes o después de la reticulación de los polímeros para formar un hidrogel. Ese uso de la reacción de tiol-eno para que el péptido adhesivo celular se una covalentemente con el polímero, es significativamente más rápido y más eficiente que los métodos descritos previamente, tales como los métodos que usan agentes activadores de carboxilo (p. ej., EDC) para acoplar el péptido con el polímero.

40 En algunos ejemplos, el hidrogel es elástico. Por ejemplo, el módulo de Young del hidrogel de la descripción puede tener de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 Pa, p. ej., de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 Pa, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000 Pa, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 5.000 Pa, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 Pa, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 50.000 Pa, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Pa, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Pa, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000 Pa, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 50.000 Pa, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 Pa, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Pa, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 20.000 Pa, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 20.000 Pa, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000 Pa, o hasta aproximadamente 40.000 Pa, o hasta aproximadamente 30.000 Pa, o hasta aproximadamente 20.000 Pa.

60 En algunas realizaciones, el hidrogel comprende además una célula, un factor biológico y/o una molécula pequeña.

ña.

Las células ejemplares incluyen mioblastos para la regeneración, reparación o reemplazo musculares; hepatocitos para la regeneración, reparación del hígado o trasplante del órgano, condrocitos para el reemplazo, regeneración o reparación de cartílago, islotes pancreáticos (p. ej., para el tratamiento de la diabetes) y osteoblastos para la regeneración, reemplazo o reparación ósea, diversas poblaciones de células madre (células madre embrionarias diferenciadas en varios tipos de células), células madre adultas obtenidas a partir de la médula ósea o el tejido adiposo, células madre cardíacas, células madre pancreáticas, progenitores endoteliales y células endoteliales de crecimiento, células madre mesenquimáticas, células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células satélite, células de una población secundaria, poblaciones de células diferenciadas que incluyen osteoprogenitoras y osteoblastos, condrocitos, queratinocitos para la piel, tenocitos para el tendón, células epiteliales intestinales, células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos para la regeneración, reparación o reemplazo de tejidos u órganos, y/o para la entrega de ADN. Preferiblemente, las células son de mamífero, p. ej., ser humano; sin embargo, el sistema también es adaptable a otras células animales eucariotas, p. ej., caninas, felinas, equinas, bovinas y porcinas, así como células procariotas tales como las células bacterianas.

Un "factor biológico" es una molécula que tiene algún tipo de actividad biológica *in vitro* o *in vivo*. En algunos ejemplos, el factor biológico es una proteína (p. ej., un péptido, polipéptido, anticuerpo o fragmento del mismo), un ácido nucleico (p. ej., ADN, ARN, ADN o ARN modificado, o un aptámero), un lípido (p. ej., un fosfolípido) o un carbohidrato (p. ej., un polisacárido o proteoglicano).

Algunos factores biológicos son capaces de mantener la viabilidad celular, promover la proliferación celular o prevenir una diferenciación terminal prematura de las células. Esos factores biológicos se usan solos o en combinación para lograr el resultado deseado.

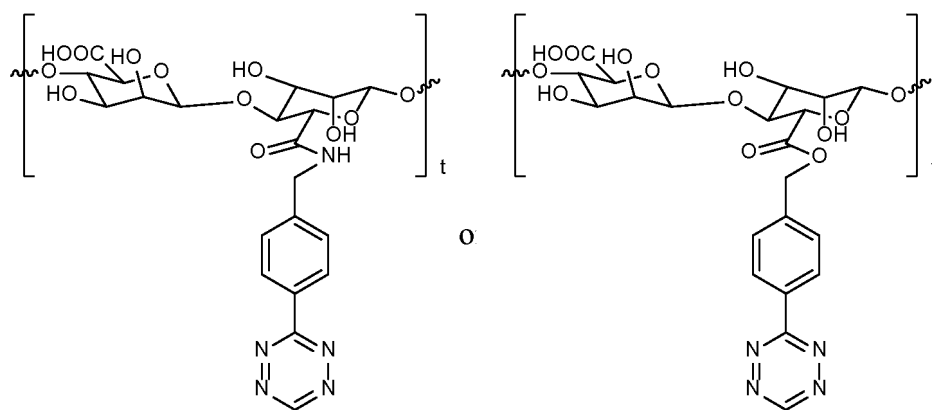
Los factores biológicos adecuados para un uso en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, receptores de neurotransmisores o de factores de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas, citocinas, factores estimuladores de colonias, factores quimiotácticos, sustrato sensible a MMP, componentes de la matriz extracelular; tales como hormona de crecimiento, hormona paratiroidea (PTH), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de dispersión/factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), fibrina, colágeno, fibronectina, vitronectina, ácido hialurónico, un péptido o polipéptido que contiene RGD, angiopoyetina y factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF). Las variantes por corte y empalme de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, y los agonistas de molécula pequeña o antagonistas de los mismos que se pueden usar ventajosamente para alterar el equilibrio local de las señales pro y anti-migración y de diferenciación también se contemplan en esta memoria.

Los ejemplos de citocinas tal y como se ha mencionado anteriormente, incluyen, entre otros, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón- $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN), IFN- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral (TNF), TGF- $\beta$ , ligando de FLT-3 y ligando de CD40.

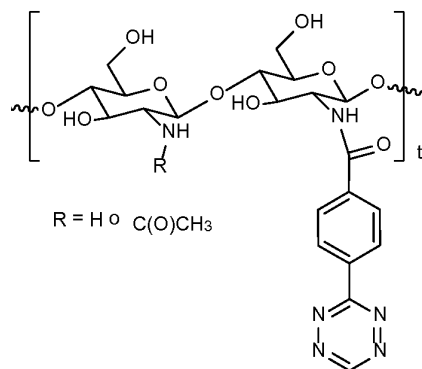
Los factores biológicos adecuados útiles de acuerdo con la invención también incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ADN, moléculas de ARN, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, plásmidos, vectores de expresión, proteínas marcadoras, factores de transcripción o elongación, proteínas de control del ciclo celular, cinasas, fosfatasa, proteínas de reparación de ADN, oncogenes, supresores de tumores, proteínas angiogénicas, proteínas antiangiogénicas, receptores de la superficie celular, moléculas de señalización accesorias, proteínas de transporte, enzimas, agentes antibacterianos, agentes antivirales, antígenos, inmunógenos, agentes inductores de apoptosis, agentes anti-apoptosis y citotoxinas.

La descripción también presenta un método para preparar un hidrogel que comprende:

- a) proporcionar un primer polímero que comprende un resto de tetrazina y un segundo polímero que comprende al menos un resto de norborneno. El número de restos de tetrazina en el primer polímero (indicado por 't' en los ejemplos a continuación) puede ser cualquier número entero entre 1 y 100.000:

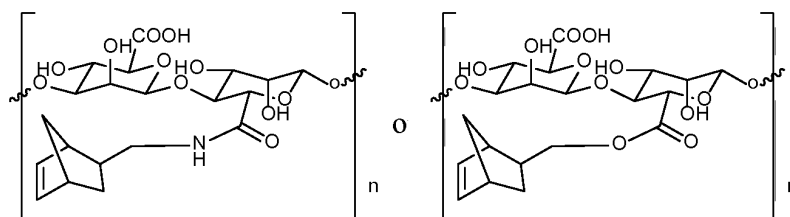


o



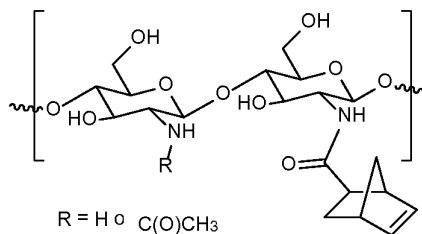
5

El número de restos de norborneno en el segundo polímero (indicado por 'n' en los ejemplos a continuación) puede ser cualquier número entero entre 1 y 100.000:



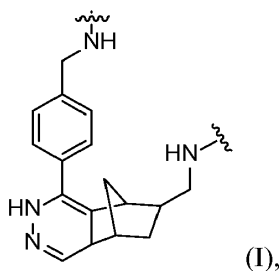
10

o

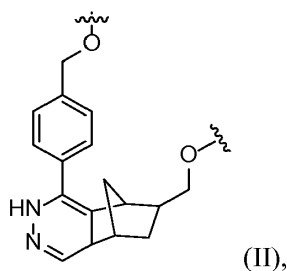


15

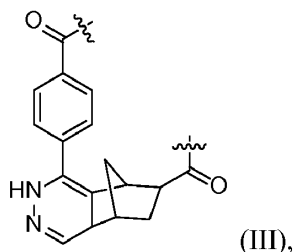
b) poner en contacto el segundo polímero con el primer polímero para formar un polímero reticulado que tiene reticulaciones de fórmula (A). En una realización, las reticulaciones de fórmula (A) están en forma de fórmula (I),



o fórmula (II),



o fórmula (III):



en donde los enlazadores de fórmula (I), (II) o (III) están sustituidos opcionalmente en cualquier posición adecuada.

En algunos casos, cada molécula del primer polímero comprende aproximadamente 1-50.000 restos de tetrazina, p. ej., aproximadamente 1-10.000, aproximadamente 1-5000, aproximadamente 1-1000, aproximadamente 5000-50.000, aproximadamente 5000-10.000, aproximadamente 1000-10.000, aproximadamente 1000-5000, aproximadamente 500-5000, aproximadamente 500-1000 o aproximadamente 1-500 restos de tetrazina. En algunos casos, cada molécula del segundo polímero comprende aproximadamente 1-50.000 restos de norborneno, p. ej., aproximadamente 1-10.000, aproximadamente 1-5000, aproximadamente 1-1000, aproximadamente 5000-50.000, aproximadamente 5000-10.000, aproximadamente 1000-10.000, aproximadamente 1000-5000, aproximadamente 500-5000, aproximadamente 500-1000 o aproximadamente 1-500 restos de norborneno. En algunas realizaciones, la etapa b) del método comprende poner en contacto un segundo polímero con un primer polímero en una relación de aproximadamente 1:104 a aproximadamente 10:1 (segundo polímero : primer polímero). Por ejemplo, la relación del segundo polímero con el primer polímero es de aproximadamente 1:10, o aproximadamente 1:9, o aproximadamente 1:8, o aproximadamente 1:7, o aproximadamente 1:6, o aproximadamente 1:5, o aproximadamente 1:4, o aproximadamente 1:3, o aproximadamente 1:2, o aproximadamente 1:1, o aproximadamente 2:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 7:1, o aproximadamente 8:1, o aproximadamente 9:1, o aproximadamente 10:1.

En algunos casos, el resto de tetrazina se acopla con el polímero haciendo reaccionar el polímero con bencilamina tetrazina y un agente de acoplamiento. En otros ejemplos, el resto de tetrazina se acopla con el alginato haciendo reaccionar el polímero con alcohol bencílico tetrazina o ácido benzoico tetrazina y un agente de acoplamiento. Los ejemplos de agentes de acoplamiento incluyen, pero no se limitan a, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), carbonil diimidazol, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU).

En algunos casos, el resto de norborneno se acopla con el polímero haciendo reaccionar el polímero con norborneno metanamina y un agente de acoplamiento. En otros ejemplos, el resto de norborneno se acopla con el polímero incubando el polímero con norborneno metanol o norborneno ácido carboxílico y un agente de acoplamiento. Los ejemplos de agentes de acoplamiento incluyen, pero no se limitan a, EDC, carbonil diimidazol, DCC, DIC y HBTU. En algunos casos, la N-hidroxisuccinimida (NHS) también se incluye en la reacción de acoplamiento.



to.

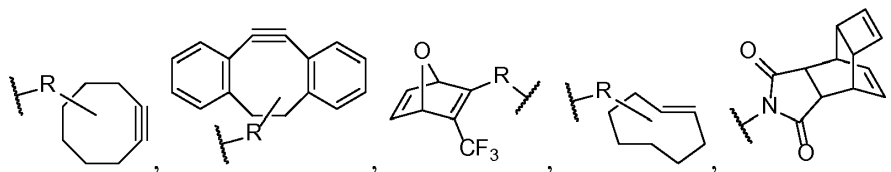
En algunas realizaciones, la capacidad de reticulación de los polímeros tiene un límite máximo basado en el grado de sustitución de grupos funcionales (p. ej., norborneno y tetrazina) sobre el (los) polímero(s). La capacidad de reticulación se puede caracterizar y medir, por ejemplo, mecánicamente demostrando que la densidad de reticulación teórica más alta (p. ej., el grado de sustitución o la relación entre el primer polímero : el segundo polímero) da como resultado una red de polímeros más rígida o más reticulada en el hidrogel.

En algunas realizaciones del método, la reacción de reticulación tiene lugar como una reacción química espontánea, como si no fuera necesario un aporte de luz, calor, radicales. La reacción de reticulación puede tener lugar en agua, en tampones acuosos o en medios de cultivo celular (p. ej., solución salina tamponada con fosfato, solución salina equilibrada de Hank, medio Eagle modificado con Dulbecco y similares), o en disolventes orgánicos (p. ej., metanol, etanol, diclorometano, dimetilformamida y similares). Además, la reacción de reticulación puede tener lugar en un amplio intervalo de temperaturas, como de aproximadamente -80 °C a al menos aproximadamente 50 °C, aproximadamente -80 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 37 °C o aproximadamente 50 °C. En algunos ejemplos, la reacción de reticulación tiene lugar en un intervalo de temperaturas utilizable y condiciones para formar hidrogeles y tiene lugar sin aportar energía externa.

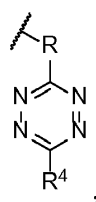
En algunas realizaciones del método, después de la reticulación, el norborneno y/o la tetrazina que no reacciona permanece sobre los polímeros. En algunos casos, los grupos funcionales de norborneno y/o tetrazina que no reaccionan sobre el hidrogel reticulado, se pueden usar para una modificación de la reacción posterior a la reticulación del gel. La cantidad de norborneno y/o tetrazina que no reacciona sobre los polímeros se puede modular variando las relaciones entre el primer polímero y el segundo polímero utilizados durante la reacción de reticulación.

La descripción también caracteriza un método para preparar un hidrogel que comprende:

a) proporcionar un primer polímero que comprende un resto dieno y un segundo polímero que comprende al menos un resto dienófilo, en el que el dieno se selecciona a partir de:

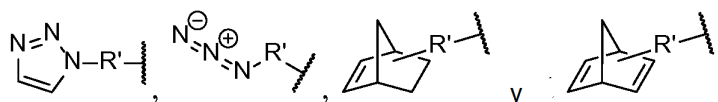


y



en donde R es un espaciador adecuado para unirse al primer polímero, y R<sup>4</sup> es como se ha definido anteriormente;

y el dienófilo se selecciona a partir de:

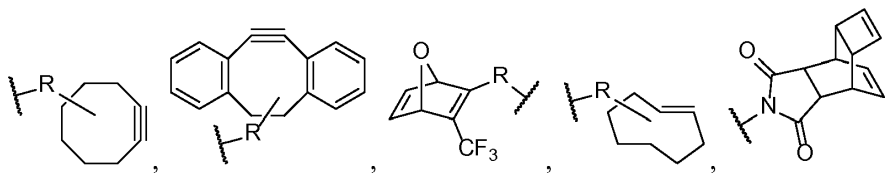


en donde R' es un espaciador adecuado para unirse al segundo polímero; y

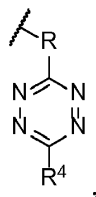
b) poner en contacto el segundo polímero con el primer polímero para formar un polímero reticulado.

En una realización, la descripción proporciona un hidrogel preparado por el método anterior, que comprende un primer polímero y un segundo polímero, en donde el primer polímero está conectado con el segundo polímero mediante enlaces que dan como resultado una adición Diels-Alder de un resto dieno y dienófilo, en donde el

dieno se selecciona a partir de:

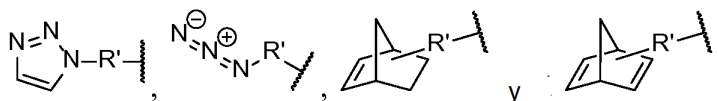


5 y



10 en donde R es un espaciador adecuado para unirse al primer polímero, y  $R^4$  es como se ha definido anteriormente;

y el dienófilo se selecciona a partir de:



15

en donde  $R'$  es un espaciador adecuado para unirse al segundo polímero.

En una realización, el hidrogel es aquel en el que R es el resto  $R^1-R^2$ , en donde  $R^1$  y  $R^2$  son como se han definido anteriormente; y  $R'$  es  $R^3$ , en donde  $R^3$  es como se ha definido anteriormente.

20

La descripción también proporciona un método para regenerar un tejido en un sujeto que lo necesita que comprende administrar a un sujeto un hidrogel descrito en esta memoria que comprende además células. Por ejemplo, las células pueden ser células de mamífero y el tejido un tejido de mamífero. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es del mismo tipo que el tejido que se va a regenerar. En otras realizaciones, la célula de mamífero es una célula madre. Unas realizaciones del método incluyen poner en contacto un tejido de mamífero con el hidrogel, en donde el hidrogel comprende además un primer componente que regula temporalmente la egresión de la célula desde el hidrogel y/o un segundo componente que regula espacialmente la egresión de la célula desde el hidrogel.

25

En otro ejemplo, un método para regenerar un tejido diana de un mamífero comprende proporcionar un hidrogel descrito en esta memoria, en donde el hidrogel comprende una célula de mamífero inmovilizada dentro del hidrogel (es decir, la célula de mamífero permanece dentro del hidrogel durante un período prolongado de tiempo sin salir del hidrogel). El método incluye poner en contacto un tejido de mamífero con el hidrogel, en donde la célula de mamífero se inmoviliza dentro del hidrogel, y en donde el hidrogel comprende un primer componente que regula temporalmente la egresión de una célula de mamífero desde el hidrogel y un segundo componente que regula espacialmente la egresión de la célula de mamífero desde el hidrogel. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula de la progenie. En algunas realizaciones, el hidrogel permanece estable y no permite una infiltración de la célula hospedadora.

35

En una realización, el hidrogel descrito en esta memoria es útil como una barrera inmunoprotectora, p. ej., para un trasplante de islotes pancreáticos. En algunos casos, el trasplante de islotes pancreáticos es un tratamiento para la diabetes, p. ej., diabetes de tipo I. Las células trasplantadas, tales como los islotes, se pueden destruir mediante reacciones inmunes, y los hidrogeles de la invención son capaces de encapsular células tales como las células de los islotes antes de la implantación/inyección del hidrogel. De esta manera, los hidrogeles sirven como una barrera inmunoprotectora en el cuerpo y minimizan un rechazo inmune de las células y tejidos trasplantados. Además, la descripción proporciona un método para modular una actividad de una célula en un mamífero, que comprende

45

a) administrar a un mamífero un hidrogel descrito en esta memoria, en donde el hidrogel comprende además una composición de reclutamiento incorporada en el mismo o sobre el mismo; y

50

b) poner en contacto la célula con una señal de implementación, en donde la señal de implementación induce la egressión de la célula, y en donde la actividad de la célula en la egressión difiere de la de antes de entrar en el hidrogel.

- 5 Por ejemplo, la célula puede ser una célula inmune y puede ser una célula dendrítica, un macrófago, un linfocito T o un linfocito B.

10 En otras realizaciones, los hidrogeles descritos en esta memoria son útiles para un trasplante celular a largo plazo, es decir, las células encapsuladas residen y proliferan en o sobre el hidrogel durante al menos 1 día (p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o 1, 2, 3, 4 años o más). Por ejemplo, menos del 50 % (p. ej., menos de aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 % o menos) de las células encapsuladas se liberan desde el hidrogel a un tejido circundante al menos 1 día (p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o 1, 2, 3, 4 años o más) después de la administración del hidrogel a un sujeto. En algunos casos, los hidrogeles son capaces de retener las células encapsuladas, en parte debido al alto nivel de estabilidad (en la estructura y la susceptibilidad a la degradación) de los hidrogeles.

20 Los hidrogeles y los métodos descritos en esta memoria proporcionan ciertas ventajas. Los hidrogeles reticulados por química clic de la invención son más fuertes y más resistentes que otros tipos de hidrogeles, por ejemplo, los hidrogeles que se crean mediante reticulaciones iónicas o una combinación de reticulaciones iónicas y reticulaciones covalentes. Los hidrogeles de la descripción también son resistentes y pueden conservar la integridad estructural durante meses *in vivo*. En contraste, los materiales compatibles con las células que se usan actualmente requieren una reticulación iónica (debido a los problemas bioortogonales covalentes indicados anteriormente), lo que no hace que se conserve una integridad estructural extensa. Hasta la fecha, no se ha realizado ninguna descripción de otra estrategia de reticulación covalente (por ejemplo, en alginato, gelatina, quitosano al menos) que tenga el nivel de biocompatibilidad y/o bioortogonalidad de los hidrogeles descritos en esta memoria.

30 Además, los hidrogeles descritos en esta memoria se pueden generar mediante la reticulación de polímeros en presencia de células y no se tienen que reticular necesariamente y formar antes de la introducción de las células en el hidrogel. Además, los hidrogeles descritos en esta memoria se pueden generar mediante una reticulación de polímeros en presencia de una amplia gama de factores biológicos (por ejemplo, morfógenos, citocinas y proteínas) sin dañar esos factores biológicos durante el proceso de reticulación.

35 Adicionalmente, los métodos de la invención utilizan la química clic entre los grupos funcionales norborneno y tetrazina, y se ha mostrado que esa reacción es rápida (gelificando en una hora) y permite una gelificación *in situ* de los biomateriales descritos. De manera bastante ventajosa, la química clic entre los grupos funcionales de norborneno y tetrazina de la descripción se puede emplear y es fiable en sistemas acuosos, tales como condiciones biológicamente compatibles (p. ej., pH, temperatura y contenido en agua de sistemas biológicos) y se puede aplicar a una amplia variedad de biomateriales. Además, la química clic entre el norborneno y la tetrazina de la descripción induce solubilidad a los hidrogeles a pHs fisiológicamente relevantes. Por ejemplo, el hidrogel de quitosano es más soluble a pH fisiológico, mientras que el polímero de quitosano es insoluble en agua y requiere una solubilización en ácido diluido, pH ~2.

45 Los métodos de la invención pueden utilizar un tipo de polímero, que proporciona más control sobre el ensamblaje del hidrogel y un mejor control sobre el proceso de reticulación, tal como controlando el porcentaje de cadenas laterales de tetrazina y norborneno que pueden reaccionar entre sí para formar un hidrogel, con las propiedades fisicoquímicas y mecánicas deseadas. Por el contrario, las estrategias de reticulación covalente de la técnica anterior usan biomateriales que pueden reaccionar de forma cruzada con células o agentes biológicos, o requieren iniciadores de la polimerización que pueden dañar esos materiales. Una reticulación covalente de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, se puede lograr en presencia de células y factores biológicos sin alterarlos o dañarlos de otro modo.

55 Además, los métodos de la invención proporcionan un control mejorado sobre las propiedades mecánicas del hidrogel (p. ej., elasticidad y resistencia, relaciones de hinchamiento y perfiles de degradación). Esas características mecánicas del hidrogel se pueden ajustar mediante una manipulación del peso o los pesos moleculares del polímero, el grado de sustitución por química clic y/o la estequiometría de los componentes de la química clic. Otra ventaja de los métodos y los hidrogeles es la capacidad de utilizar grupos funcionales que no han reaccionado sobre el (los) polímero(s), para acoplar covalentemente los agentes deseados (p. ej., péptidos adhesivos celulares) después de que se haya sintetizado el hidrogel. Otra ventaja más es la capacidad de los polímeros para ser reticulados *in situ* para formar el hidrogel reticulado por química clic sin la necesidad de catalizadores o agentes de acoplamiento externos. Esto es especialmente ventajoso para la formación y el uso de hidrogeles inyectables, es decir, hidrogeles que son inyectables como una composición fluida (p. ej., un líquido) pero que forman un gel en el cuerpo después de la inyección. El enfoque de conjugación de la descripción amplía la versatilidad de los hidrogeles de biomateriales.

Además, algunos geles disponibles anteriormente se basan en sistemas basados en péptidos PEG-plus de 4 brazos. Nuestra descripción proporciona ventajosamente un sistema de un componente (p. ej., un sistema de alginato o un sistema de quitosano o un sistema de gelatina), que es más simple y más barato que otros sistemas, tales como los sistemas de PEG-péptido. Esto se debe en parte a que el polímero (p. ej., alginato, gelatina o quitosano) es económico y en algunas realizaciones puede ser el polímero de base sencillo para los dos componentes de los hidrogeles de la invención. Además, la descripción proporciona la primera demostración de un material a base de polisacáridos, reticulado con tetrazina-norborneno por química clic. Además, la reacción de reticulación descrita en esta memoria puede tener lugar en un amplio intervalo de temperaturas y condiciones, lo que proporciona una resistencia que permite la generación de hidrogeles/crieges con un rendimiento similar y/o mejor que los disponibles previamente, incluyendo, por ejemplo, la capacidad de encapsular más moléculas y/o fármacos en el gel que los que anteriormente era posible, manteniendo los costes y la complejidad en un mínimo.

En los métodos de la descripción, el norborneno se puede conjugar eficazmente (p. ej., >95 %) con pequeñas moléculas, polímeros, péptidos y proteínas que contienen tiol (a través de cisteínas) en minutos, mediante una reacción radical fotoiniciada. Por el contrario, los métodos de la técnica anterior requieren tiempos de reacción largos (a menudo durante la noche) con una eficacia muy baja (p. ej., menos del 40 %). El conjugado de norborneno se puede incorporar en los geles de manera homogénea a través de los métodos de la descripción. Además, la conjugación de moléculas que contienen amina, tiol, hidroxilo o ácido carboxílico (pequeñas moléculas, péptidos, proteínas, etc.) puede permitir la reticulación covalente homogénea de esas moléculas con los hidrogeles durante la gelificación para biomateriales permanentes o hidrolizables.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma, y de las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, en la puesta en práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

## Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un esquema que muestra la preparación de hidrogeles de alginato mediante química clic. En la figura, se emplea química de carbodiimida acuosa para modificar los ácidos carboxílicos de la cadena principal de alginato con tetrazina o norborneno, dando como resultado polímeros Alg-T o Alg-N, respectivamente.

La **Figura 2** es un esquema que muestra una reacción de reticulación de polímero de alginato por química clic en donde los polímeros Alg-T y Alg-N se mezclan para crear una red de hidrogel de alginato reticulada covalentemente por química clic, con la pérdida de N<sub>2</sub>.

La **Figura 3A** ilustra un gráfico representativo de reometría dinámica *in situ* a 25 °C para 3 % de p/v de alginato por química clic con N:T = 1, lo que demuestra una evolución del módulo con el tiempo. La **Figura 3B** ilustra el módulo de Young por compresión, y la **Figura 3C** ilustra las relaciones de hinchamiento volumétrico para hidrogeles de alginato por química clic al 2 %, 3 % y 4 % de p/v con una relación N:T variable. Los valores representan la media y la desviación estándar ( $n = 4$ ).

Las Figuras 4A-C ilustran la encapsulación de fibroblastos 3T3 en hidrogeles de alginato reticulados por química clic (2 % de p/v de reticulación por química clic (N:T = 1)) y reticulados iónicamente, teñidos con homodímero de etidio-1 (rojo) para células muertas a las 4 horas y 3 días después de la encapsulación (barra de escala = 100  $\mu$ m) (**4A**). Análisis cuantitativo de la viabilidad celular (ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Sidak, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; los valores representan la media y la desviación estándar,  $n = 4$ ) y la actividad metabólica general medida por la reducción de AlamarBlue a lo largo del tiempo en cultivo ( $n = 6$ ) (**4B**).

Las Figuras 5A-E ilustran la adhesión celular, la propagación y la proliferación sobre hidrogeles de alginato por química clic, modificados con péptidos RGD después de la síntesis. Esquema de la reacción de acoplamiento del péptido CGGGGRGDSP sobre la superficie de un hidrogel de alginato por química clic usando química de tiol-eno fotoiniciado (**5A**). Imágenes representativas de la adhesión, propagación y proliferación de fibroblastos 3T3 sobre hidrogeles de alginato por química clic con densidad de péptido RGD variable (barra de escala = 200  $\mu$ m) (**5B**) y cuantificación (ANOVA de dos vías con la prueba post-hoc de Turkey, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , en relación con el control no RGD; los valores representan la media y la desviación estándar,  $n = 4-7$ ) mediante una expresión endógena de EGFP (verde) durante 3 días (**7C**). Tinción con faloidina (rojo) y Hoescht 33342 (azul) de filamentos de actina F y núcleos a los 3 días, para células adherentes a hidrogeles de alginato por química clic modificados con RGD (barra de escala = 100  $\mu$ m) (**5D**). Imágenes fluorescentes representativas de células 3T3 EGFP (verdes) cultivadas sobre hidrogeles de alginato por química clic, con

una densidad de ligando variable durante 3 días y teñidas con homodímero de etidio-1 (rojo) (barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ ) (**5E**). Las condiciones de Alta, Baja y Sin RGD se refieren a las soluciones peptídicas 2 mM, 0,2 mM y 0 mM utilizadas para modificar la superficie del hidrogel de alginato por química clic.

La **Figura 6A** ilustra la respuesta tisular después de una inyección subcutánea de hidrogeles reticulados iónicamente y por química clic *in vivo*. Tinción representativa con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones de tejido al cabo de 1 semana, 1 mes y 2 meses de la inyección en ratones BALB/cJ (barra de escala = 150  $\mu\text{m}$ ). Las imágenes se centran en la interfaz de gel-tejido, en donde las líneas discontinuas indican el borde entre el hidrogel y el tejido circundante. Los asteriscos indican la ubicación del hidrogel de alginato por química clic, que se separa del tejido durante el análisis histológico sin infiltración celular. La **Figura 6B** se centra en el interior del hidrogel, 2 meses después de la inyección subcutánea *in vivo* (barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ ).

La **Figura 7A** es un esquema que muestra una reacción de reticulación de polímero de gelatina por química clic en donde los polímeros Gel-Tz y Gel-Nb se mezclan entre sí para crear una red de hidrogel de alginato reticulada covalentemente por química clic, con la pérdida de  $\text{N}_2$ . La **Figura 7B** (izquierda) ilustra los rastreos a lo largo del tiempo del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) (en el reómetro) de hidrogeles de gelatina por química clic a 37 °C con 5 y 10 % de p/v y N:T = 1. El módulo de meseta se alcanzó en 45 minutos en ambos, en donde el recuadro muestra el tiempo hasta el 50 % del módulo de meseta. A la derecha, el módulo de almacenamiento en meseta se muestra como una función de la relación entre polímero N:T, en donde las propiedades mecánicas se controlan cambiando la relación entre los polímeros que se mezclan (en lugar de la cantidad de agente reticulante o la concentración de polímero).

Las Figuras 8A-B ilustran la adhesión, propagación y proliferación de fibroblastos 3T3 sobre hidrogeles de gelatina por química clic.

La **Figura 9** (arriba) muestra que los fibroblastos 3T3 conservaban una viabilidad elevada después de una encapsulación 3D en gelatina reticulada por química clic, con un aumento de la actividad metabólica durante un período de cultivo de tres días. La figura inferior muestra que las células NIH/3T3 encapsuladas asumen rápidamente una morfología extendida con encapsulación en gelatina reticulada por química clic, después de un día (longitud de la célula:  $80 \pm 6 \mu\text{m}$ ), mientras que las células tratadas con marisimat, un inhibidor de la matriz de metaloproteínasa (MMP) de amplio espectro no asumen una morfología extendida (longitud de la célula:  $16 \pm 2 \mu\text{m}$ ).

## Descripción detallada de la invención

Antes de describir los métodos y materiales referidos, debe entenderse que los aspectos descritos en esta memoria no están limitados a realizaciones, aparatos o configuraciones específicos y, por lo tanto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en esta memoria tiene el fin de describir aspectos particulares solamente y, a menos que se defina específicamente en esta memoria, no pretende ser limitante.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender" e "incluir" y variaciones (p. ej., "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye") se entenderá que implica la inclusión de un componente, característica, elemento o etapa establecidos, o un grupo de componentes, características, elementos o etapas, pero no la exclusión de ninguna otra entidad entera o etapa, o grupo de entidades enteras o etapas.

Tal y como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el o la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique lo contrario.

Los intervalos pueden expresarse en esta memoria como desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando ese intervalo se expresa, otro aspecto incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, e independientemente del otro punto final. Los valores cuantitativos descritos en esta memoria usando el modificador "aproximadamente" pueden incluir intervalos de  $\pm 10 \%$  del valor establecido.

Tal y como se usa en esta memoria, el término "arilo" representa un sistema de anillos aromáticos que tiene un único anillo (por ejemplo, fenilo) que está opcionalmente fusionado con otros anillos de hidrocarburos aromáticos o anillos de hidrocarburos no aromáticos. "Arilo" incluye sistemas de anillos que tienen múltiples anillos condensados y en los que al menos uno es carbocíclico y aromático (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, naftilo). Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, indanilo, indenilo, dihidronaftilo, fluorenilo, tetralinilo y 6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[a]cicloheptenilo. En ciertos ejemplos, los grupos arilo incluyen aquellos que tienen un primer anillo aromático carbocíclico fusionado con un heterociclo aromático o alifático, por ejemplo, 2,3-dihidrobenzofuranilo. Los grupos arilo en esta memoria no están sustituidos o, cuando se especifican como "sus-

tituidos opcionalmente".

Tal y como se usa en esta memoria, el término "alquilo" significa un hidrocarburo saturado que tiene un número indicado de átomos de carbono, tal como 1 a 6 carbonos (es decir, incluyendo 1 y 6), 1 a 6 carbonos, 1 a 3 carbonos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El grupo alquilo puede ser lineal o ramificado y, según el contexto, puede ser un radical monovalente o un radical divalente (es decir, un grupo alquileo). En el caso de un alquilo o grupo alquilo que tiene cero átomos de carbono (es decir, "alquilo C<sub>0</sub>"), el grupo es simplemente un enlace covalente simple si es un radical divalente, o es un átomo de hidrógeno si es un radical monovalente. Por ejemplo, el resto "-(alquil C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>)-O-" significa la conexión de un oxígeno a través de un enlace simple o un puente de alquileo que tiene de 1 a 6 carbonos, y alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>3</sub> representa un enlace, restos metilo, etilo y propilo. Los ejemplos de "alquilo" incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-, sec- y terc-butilo, pentilo y hexilo.

El término "alcoxi" representa un grupo alquilo con el número de átomos de carbono indicado fijados al resto molecular de origen a través de un puente de oxígeno. Los ejemplos de "alcoxi" incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi.

Los términos "halógeno" o "halo" indican flúor, cloro, bromo y yodo.

Tal y como se usa en esta memoria, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos mono o bicíclicos de un sistema de anillos de 3-14 átomos que contiene al menos un heteroátomo seleccionado a partir de nitrógeno, oxígeno y azufre en un anillo aromático. Más comúnmente, los grupos heteroarilo tendrán 1, 2, 3 o 4 heteroátomos. El heteroarilo puede fusionarse con uno o varios anillos no aromáticos, por ejemplo, anillos de cicloalquilo o heterocicloalquilo. En una realización de los presentes compuestos, el grupo heteroarilo está unido al resto de la estructura a través de un átomo en un anillo aromático del grupo heteroarilo. En otra realización, el grupo heteroarilo está unido al resto de la estructura a través de un átomo de anillo no aromático. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, piridilo, pirimidinilo, quinolinilo, benzotienilo, indolilo, indolinilo, piridazinilo, pirazinilo, isoindolilo, isoquinolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, imidazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, indolizínilo, indazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, benzo[1,4]oxazinilo, triazolilo, tetrazolilo, isotiazolilo, naftiridinilo, isocromanilo, cromanilo, tetrahidroisoquinolinilo, isoindolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isobenzotienilo, benzoxazolilo, piridopiridinilo, benzotetrahidrofuranilo, benzotetrahidrotienilo, purinilo, benzodioxolilo, triazinilo, pteridinilo, benzotiazolilo, imidazopiridinilo, imidazotiazolilo, dihidrobencisoxazinilo, bencisoxazinilo, benzoxazinilo, dihidrobencisotiazinilo, benzopiranilo, benzotipiranilo, cromonilo, cromanonilo, *N*-óxido de piridinilo, tetrahidroquinolinilo, dihidroquinolinilo, dihidroquinolinonilo, dihidroisoquinolinonilo, dihidrocumarinilo, dihidroisocumarinilo, isoindolinonilo, benzodioxanilo, benzoxazolinonilo, *N*-óxido de pirrolilo, *N*-óxido de pirimidinilo, *N*-óxido de piridazinilo, *N*-óxido de pirazinilo, *N*-óxido de quinolinilo, *N*-óxido de quinolinilo, *N*-óxido de indolilo, *N*-óxido de indolinilo, *N*-óxido de isoquinolilo, *N*-óxido de quinazolinilo, *N*-óxido de quinoxalinilo, *N*-óxido de ftalazinilo, *N*-óxido de imidazolilo, *N*-óxido de isoxazolilo, *N*-óxido de oxazolilo, *N*-óxido de tiazolilo, *N*-óxido de indolizínilo, *N*-óxido de indazolilo, *N*-óxido de benzotiazolilo, *N*-óxido de bencimidazolilo, *N*-óxido de pirrolilo, *N*-óxido de oxadiazolilo, *N*-óxido de tiadiazolilo, *N*-óxido de triazolilo, *N*-óxido de tetrazolilo, *S*-óxido de benzotipiranilo, *S,S*-dióxido de benzotipiranilo. Los grupos heteroarilo preferidos incluyen piridilo, pirimidilo, pirazinilo, quinolinilo, indolilo, pirrolilo, furanilo, tienilo, imidazolilo, pirazolilo, indazolilo, tiazolilo y benzotiazolilo. Los grupos heteroarilo en esta memoria no están sustituidos o, cuando se especifican como "sustituidos opcionalmente".

Tal y como se usa en esta memoria, el término "contacto" incluye el contacto físico de al menos una sustancia con otra sustancia, ya sea directa o indirectamente. Un ejemplo de contacto indirecto es inyectar un hidrogel en un mamífero para que el hidrogel entre en contacto con un tejido.

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "cantidad suficiente" y "tiempo suficiente" incluye una cantidad y un tiempo necesarios para lograr el resultado o resultados deseados, tal como disolver una porción del polímero.

Todos los porcentajes, relaciones y proporciones en esta memoria son en peso, a menos que se especifique lo contrario. Un porcentaje en peso (% en peso, también como % en p) de un componente, a menos que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente (p. ej., en la cantidad total del material activo).

Todas las temperaturas están en grados Celsius (°C) a menos que se especifique lo contrario.

A la vista de la presente descripción, los métodos y composiciones descritos en esta memoria los puede configurar una persona con conocimientos ordinarios en la técnica para lograr un objetivo deseado. En general, las composiciones y los métodos descritos proporcionan varias ventajas no cumplidas. Por ejemplo, las composiciones y los métodos descritos en esta memoria proporcionan un nuevo método para preparar hidrogeles a base de polisacáridos usando química bioortogonal. Como los polímeros e hidrogeles de alginato por química clic son biocompatibles y proporcionan una reacción de reticulación bioortogonal, existen muchas aplicaciones potenciales de estos biopolímeros modificados, que van desde una encapsulación *in vitro* y liberación de células, proteí-

nas y fármacos, hasta hidrogeles *in vivo* con estabilidad de larga duración. Aunque los sistemas de polímeros anteriores pueden ser capaces de algunas de estas aplicaciones, los polímeros por química clic de la descripción proporcionan capacidades adicionales distintas de los hidrogeles de polímeros canónicos, que antes eran inalcanzables debido a productos químicos o contaminantes incompatibles. Por ejemplo, los hidrogeles proporcionados por la descripción permiten el estudio del comportamiento biológico de células en 3 dimensiones (3D), lo que proporciona una plataforma para observar la propagación, proliferación, diferenciación en un sistema material que no interfiere con las células. Además, los polímeros/hidrogeles de la descripción se pueden usar en el campo de los hidrogeles súper resistentes que se habían generado previamente usando una combinación de polímeros de alginato reticulados iónicamente y por química clic. Véase, por ejemplo, Sun, *et al.* (2013). Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*, 489(7414), 133-136. Los métodos de la descripción crean un hidrogel de alginato más resistente en comparación con los hidrogeles anteriores, tales como hidrogeles reticulados iónicamente o iónicamente más química clic. Con este sistema también se pueden desarrollar otras aplicaciones de ingeniería como la impresión 3D de células/estructuras. Por ejemplo, la impresión 3D se puede lograr utilizando los polímeros de alginato por química clic como las "tintas" que se solidifican y/o que forman estructuras una vez que se mezclan e imprimen desde la impresora. En algunos ejemplos, durante el proceso de impresión, las células y/o los factores biológicos/moléculas pequeñas también se pueden encapsular dentro de la red de polímeros para formar el hidrogel. Los polímeros de alginato por química clic también son útiles, p. ej., solos, como agentes de carga. Por ejemplo, los hidrogeles de la descripción se pueden aplicar (p. ej., no en combinación con otros agentes) para aplicaciones cosméticas y estéticas, o en otras situaciones en las que se necesita aumentar el volumen de un tejido para una función, tal como el tratamiento de la incontinencia. Por ejemplo, los usos cosméticos incluyen el tratamiento de arrugas, el relleno de pequeños defectos tisulares con los hidrogeles descritos en esta memoria, p. ej., geles de alginato además de o que comprenden células formadoras de grasa (véanse, p. ej., los documentos US 2013-0195764; WO 12/148684; WO 12/167230; y WO 12/167230). En algunos ejemplos, los hidrogeles de la descripción son útiles para aumentar el volumen del tejido en la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), el tratamiento de la incontinencia y/o el reflujo urinario. En algunos casos, los hidrogeles se inyectan en el sitio del tejido apropiado, en donde el hidrogel proporcionará una expansión del tejido y el mantenimiento a largo plazo de ese volumen expandido, en parte debido al alto nivel de estabilidad del hidrogel.

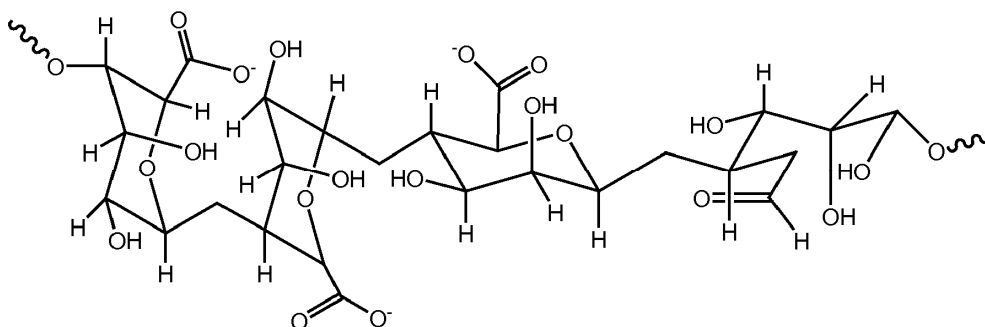
Actualmente existen métodos para generar hidrogeles basados en polietilenglicol (PEG). Véase, p. ej., Alge, *et al.* (2013). Synthetically Tractable Click Hydrogels for Three-Dimensional Cell Culture Formed Using Tetrazine-Norbornene Chemistry. *Biomacromolecules*, 14(4), 949-953. Sin embargo, si bien esos hidrogeles a base de PEG son capaces de encapsular células y modelar, ese sistema no se ha desarrollado en ninguna solicitud. A diferencia de la presente descripción, para preparar los hidrogeles basados en PEG, Alge injerta tetrazina sobre los polímeros de PEG, y luego usa un péptido escindible que es portador de norborneno en cada extremo, para reticular esos polímeros. Por el contrario, el sistema de polímero por química clic de la descripción, es un sistema de dos componentes en donde el polímero de base es el mismo, pero se ha modificado de manera diferente para formar los dos componentes. Este sistema de polímero por química clic de la descripción es beneficioso para disminuir significativamente la complejidad y los costes del sistema de materiales.

En algunas realizaciones, los polímeros, p. ej., polímeros de alginato, se modifican con grupos de tetrazina o norborneno que posteriormente se pueden reticular covalentemente para formar hidrogeles reticulados, p. ej., hidrogeles de alginato por química clic. Los hidrogeles reticulados por química clic son capaces de encapsular células, proteínas y otras moléculas biológicas con un daño mínimo. Por ejemplo, la viabilidad de una población de células después de una encapsulación en un hidrogel descrito en esta memoria, es de al menos aproximadamente un 10 %, p. ej., al menos aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 % o más. La viabilidad de las células se puede determinar por métodos convencionales en la técnica.

Otros grupos han mostrado previamente que la reacción de reticulación es altamente específica, bioortogonal y rápida (véanse, p. ej., Devaraj *et al.* *Bioconjugate Chem.* 19.12(2008):2297-2299; Karver *et al.* *Bioconjugate Chem.* 22.11(2011):2263-2270; y Alge *et al.* *Biomacromol.* 14.4(2013):949-953), lo que permite la incorporación de células con alta viabilidad de forma posterior a la encapsulación.

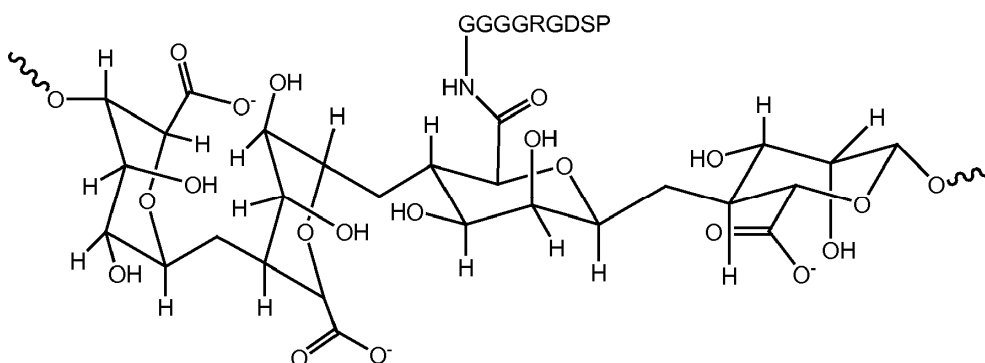
Los polímeros ejemplares incluyen, pero sin limitación, alginato, quitosano, polietilenglicol (PEG), gelatina, ácido hialurónico, colágeno, condroitina, agarosa, poli(acrilamida) y heparina.

El primer polímero y el segundo polímero se pueden formular para aplicaciones específicas, controlando el peso molecular, la tasa de degradación y el método de formación del armazón. Las reacciones de acoplamiento se pueden usar para fijar covalentemente epítopos bioactivos, tales como la secuencia de adhesión celular RGD a la cadena principal del polímero (por ejemplo, véase el alginato modificado a continuación). Las diferencias en la formulación de hidrogel controlan la cinética de la degradación del hidrogel. Las tasas de liberación de composiciones farmacéuticas, p. ej., moléculas pequeñas, morfógenos, proteínas, ácidos nucleicos u otras sustancias bioactivas, a partir de hidrogeles de alginato se controlan mediante una formulación de hidrogel para presentar las composiciones farmacéuticas de una manera controlada espacial y temporalmente. Esa liberación controlada elimina los efectos secundarios sistémicos.



Alginato parcialmente oxidado

5



Alginato con RGD modificada

10 Las moléculas de alginato están compuestas de monómeros de ácido  $\beta$ -D-manurónico (unidades M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (unidades G) unidas en (1-4), que pueden variar en proporción y distribución secuencial a lo largo de la cadena polimérica.

15 En una realización preferida, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente alginato, quitosano o gelatina. En otra realización, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente alginato. En otra realización, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente quitosano. En otra realización, el primer polímero y el segundo polímero son independientemente gelatina.

20 Por ejemplo, los polímeros (p. ej., alginatos) del hidrogel tienen aproximadamente un 50-100 % de reticulación, p. ej., al menos aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o están más reticulados. El polímero (p. ej., alginato) puede estar oxidado, reducido, o ninguno de los dos, o una mezcla de los mismos. En algunos casos, los polímeros oxidados o los polímeros parcialmente oxidados son biodegradables. Por ejemplo, los hidrogeles que comprenden alginato oxidado o parcialmente oxidado son biodegradables.

25 Los métodos para preparar un hidrogel descritos en esta memoria también se proporcionan a través de la descripción. Por ejemplo, una ilustración esquemática de un método para preparar un hidrogel se muestra en las Figuras 1 y 2.

30 Las propiedades mecánicas de los hidrogeles descritos en esta memoria, p. ej., hidrogeles de alginato por química clic o hidrogeles de gelatina por química clic, se pueden ajustar para establecer una concentración de polímero a través del grado de sustitución de grupos de norborneno o tetrazina en las cadenas del polímero o la relación entre los grupos de norborneno y tetrazina. Este ajuste permite la creación de hidrogeles elásticos con módulos de Young que varían desde aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 Pa.

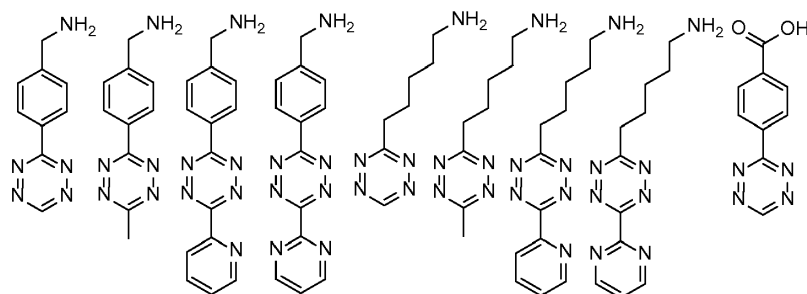
35 En algunos casos, los hidrogeles descritos en esta memoria son fuertes. Por ejemplo, después de una compresión o deshidratación, el hidrogel conserva la integridad estructural, es decir, después de la compresión o la deshidratación, el hidrogel recupera su forma después de que se rehidrata o se eliminan/retiren las fuerzas de cizallamiento de la compresión. El hidrogel también conserva la integridad estructural porque es flexible (es decir, no es quebradizo) y no se rompe bajo presión.

40 Los polímeros modificados con norborneno (p. ej., alginato modificado con norborneno) también se pueden modificar con moléculas o proteínas que contienen tiol mediante fotoquímica de tiol-eno, ya sea antes o después de la



reticulación en un hidrogel. Por ejemplo, la química de tiol-eno tiene lugar antes de la reticulación. En tales casos, el tiol reacciona con todos los grupos funcionales de norborneno en el (los) polímero(s). En otros casos, quedan grupos de norborneno sin reaccionar en el (los) polímero(s) después de la reacción con el tiol. La reactividad se puede controlar variando la cantidad de compuesto que contiene tiol y la cantidad de polímero que contiene grupos de norborneno (p. ej., incubando una cantidad menor de moles de tiol con una mayor cantidad de moles de polímero que contiene norborneno). Alternativamente, la reactividad se puede controlar variando el grado de sustitución del (de los) polímero(s) con grupos de norborneno y, p. ej., incubando una cantidad menor de moles de tiol con una mayor cantidad de moles de grupos de norborneno totales. De esa manera, los grupos de norborneno sin reaccionar en el polímero después de la reacción química con tiol-eno, están disponibles para reaccionar con tetrazina en la reacción de reticulación. En algunos ejemplos, el tiol no reacciona con el producto reticulado de norborneno-tetrazina después de la gelificación.

Tal y como se usa en esta memoria, los términos "tetrazina" y "resto de tetrazina" incluyen moléculas que comprenden 1,2,4,5-tetrazina sustituidas con un espaciador adecuado para unirse con el polímero (p. ej., alquilaminas tales como metilamina o pentilamina), y están opcionalmente sustituidas de forma adicional con uno o varios sustituyentes en cualquier posición disponible. Los restos de tetrazina ejemplares adecuados para las composiciones y los métodos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, las estructuras que se muestran a continuación (véase, p. ej., Karver *et al.* Bioconjugate Chem. 22(2011): 2263-2270 y el documento WO 2014/ 065860:



Tal y como se usa en esta memoria, los términos "norborneno" y "restos de norborneno" incluyen, pero no se limitan a, grupos de norbornadieno y norborneno que comprenden además un espaciador adecuado para unirse con el polímero (p. ej., alquilaminas tales como metilamina o pentilamina), y están sustituidos opcionalmente de forma adicional con uno o varios sustituyentes en cualquier posición disponible. Tales restos incluyen, por ejemplo, norbornen-5-metilamina y norbornadien-metilamina.

Una variedad de polímeros adecuados para la conjugación por química clic de la descripción permite una plataforma para la administración de fármacos que se puede utilizar para configurar objetivos específicos de la administración de fármacos a través de las características específicas del material que se proporcionan en esta memoria. Las aplicaciones ejemplares incluyen el uso como relleno dérmico, en la administración de fármacos, como vendaje para heridas, para la prevención de adherencias posquirúrgicas y para aplicaciones médicas de reparación y/o regenerativas tales como la terapia celular (p. ej., la terapia celular inmunoaislada), la terapia génica, la ingeniería de tejidos, la inmunoterapia.

Finalmente, los hidrogeles descritos en esta memoria son resistentes a defectos, es decir, el gel resistente no es propenso al desarrollo de lágrimas. Pero incluso si surge un defecto, el gel conserva su resistencia y no falla. Una ventaja de los hidrogeles descritos en esta memoria es que son biocompatibles con las células (p. ej., muestran una falta de degradación y de inflamación en las células) durante largos períodos de tiempo, p. ej., 3 días, 7 días, 14 días, 28 días, 56 días, 112 días o 224 días.

Los hidrogeles biocompatibles descritos en esta memoria ofrecen ventajas significativas, particularmente en aplicaciones médicas. Por ejemplo, los hidrogeles para el suministro de fármacos o los hidrogeles para el suministro de células que se usan para la generación o regeneración muscular, están sujetos a una aplicación de energía/fuerzas. Debido a que los hidrogeles descritos en esta memoria son más resistentes mecánicamente, más duraderos y se caracterizan por una mayor resistencia a la fractura en comparación con los hidrogeles anteriores, son más adecuados para las aplicaciones que implican el tejido muscular. También se mejoran otras aplicaciones con el uso de hidrogeles resistentes. Por ejemplo, materiales utilizados en procedimientos quirúrgicos (p. ej., vendas, mallas), reemplazo de cartílago, reemplazo de articulaciones, reparación de defectos ortopédicos/ortocondriales (p. ej., rellenos de hueso o cartílago), procedimientos espinales (p. ej., cirugía en la columna vertebral del núcleo pulposo), usos oftalmológicos (p. ej., lentes ópticamente transparentes, flexibles y duraderas, lentes de contacto o lentes implantables), así como usos no médicos (p. ej., rellenos en procedimientos quirúrgicos cosméticos).

Además de los usos clínicos, como la reparación y el reemplazo de tejidos, los hidrogeles también son útiles en entornos no médicos, tales como en la fabricación de robótica blanda que flota, se desliza, vuela o se escurre a

través de espacios pequeños sin romperse. Los hidrogeles también son útiles para hacer actuadores. Otros ejemplos incluyen músculos artificiales, lentes ajustables, actuadores y máscaras para robótica blanda, capas protectoras encapsuladas, membranas estirables para actuadores dieléctricos, membranas para altavoces, sistemas multicapa, hidrogel resistente reforzado con fibra, gel resistente reforzado con partículas y sistemas de filtración duraderos.

Los factores biológicos tales como polinucleótidos, polipéptidos u otros agentes (p. ej., antígenos) se purifican y/o aíslan. Específicamente, tal y como se usa en esta memoria, una molécula de ácido nucleico, un polinucleótido, un polipéptido o una proteína "aislada" o "purificada", está sustancialmente exenta de otro material celular o medio de cultivo, cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros agentes químicos, cuando se sintetiza químicamente. Los compuestos purificados tienen al menos 60 % en peso (peso seco) del compuesto de interés. Las preparaciones de esta memoria también pueden tener al menos un 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % en peso del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que tiene al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) está exento de los genes o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Purificado también define un grado de esterilidad que es seguro para la administración a un sujeto humano, p. ej., que carece de agentes infecciosos o tóxicos.

De manera similar, por "sustancialmente puro" se entiende que un nucleótido, polipéptido u otro compuesto se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente. Típicamente, los nucleótidos y los polipéptidos son sustancialmente puros cuando están al menos aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 %, o incluso 100 % en peso, exentos de las proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que están asociados de forma natural. Los ejemplos incluyen compuestos sintetizados, compuestos recombinantes (p. ej., péptidos, proteínas, ácidos nucleicos) o compuestos purificados, tales como los purificados mediante procedimientos convencionales que incluyen métodos cromatográficos.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico, cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico natural, o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico natural que incluye más de tres genes distintos. La expresión incluye, por ejemplo: (a) un ADN que forma parte de una molécula de ADN genómico natural, pero que no está flanqueado por las dos secuencias de ácido nucleico que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se encuentra de forma natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico naturales; (c) una molécula distinta tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la presente descripción incluyen además moléculas producidas sintéticamente, así como cualquier ácido nucleico que se haya alterado químicamente y/o que tenga la estructura principal modificada.

Una "señal de implementación" es una composición, tal como una proteína, un péptido o un ácido nucleico. Por ejemplo, las células que migran al hidrogel solo se encuentran con la señal de implementación una vez que han entrado en el hidrogel. En algunos casos, la señal de implementación es una molécula de ácido nucleico, p. ej., una secuencia que contiene un plásmido que codifica una proteína que induce la migración de la célula fuera del hidrogel y hacia los tejidos circundantes. La señal de implementación se produce cuando la célula se encuentra con el plásmido en el hidrogel, el ADN se internaliza en la célula (es decir, la célula se transfecta), y la célula produce el producto genético codificado por el ADN. En algunos casos, la molécula que señala la implementación es un elemento del hidrogel y se libera desde el hidrogel de manera retardada (p. ej., temporal o espacialmente) en relación con la exposición de la célula a la composición de reclutamiento. Alternativamente, la señal de implementación es una reducción o ausencia de la composición de reclutamiento. Por ejemplo, una composición de reclutamiento induce la migración de células al hidrogel, y una reducción de la concentración o un agotamiento, disipación o difusión de la composición de reclutamiento del hidrogel, da como resultado la egresión de las células fuera del hidrogel. De esta manera, las células inmunes, tales como los linfocitos T, los linfocitos B o las células dendríticas (DCs) de un individuo se reclutan en el hidrogel, se sensibilizan y se activan para organizar una respuesta inmune contra una diana específica de un antígeno. Opcionalmente, un antígeno correspondiente a una diana contra la que se desea una respuesta inmune, se incorpora en o sobre la estructura del hidrogel. Las citocinas, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) también son un componente del hidrogel para amplificar la activación inmune y/o inducir la migración de las células sensibilizadas a los ganglios linfáticos. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es útil para reclutar células angiogénicas.

La descripción se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la descripción descrita en las reivindicaciones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Síntesis de 3-(p-bencilamino)-1,2,4,5-tetrazina

Se mezclaron 50 mmol de clorhidrato de 4-(aminometil)benzonitrilo y 150 mmol de acetato de formamidina mientras se añadía 1 mol de hidrazina anhidra. La reacción se agitó a 80 °C durante 45 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente, seguido de la adición de 0,5 mol de nitrito de sodio en agua. Después se añadió gota a gota HCl al 10 % para acidificar la reacción para formar 3-(p-bencilamino)-1,2,4,5-tetrazina. La mezcla cruda ácida oxidada se extrajo luego con DCM. Después de descartar las fracciones orgánicas, la capa acuosa se basificó con NaHCO<sub>3</sub>, y se extrajo inmediatamente de nuevo con DCM. El producto final se recuperó luego por evaporación rotatoria y se purificó por HPLC. Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

### Ejemplo 2: Síntesis de polímero de alginato por química clic

Los biopolímeros de alginato por química clic se modificaron con 1-biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilmetanamina (Norborneno Metanamina; Matrix Scientific) o 3-(p-bencilamino)-1,2,4,5-tetrazina, permitiendo primero disolver el alginato de alto peso molecular, P<sub>M</sub> = 265 kDa (Protanol LF 20/40; FMC Technologies) en tampón agitado que contenía MES 0,1 M, NaCl 0,3 M, pH 6,5 a 0,5 % p/v. A continuación, N-hidroxisuccinimida (NHS; Sigma-Aldrich) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC; Sigma-Aldrich) se añadieron con un exceso molar de 5x de los grupos de ácido carboxílico del alginato. Luego se añadió norborneno o tetrazina con 1 mmol por gramo de alginato para obtener Alg-N o Alg-T, respectivamente. La reacción de acoplamiento se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, después de lo cual la reacción se inactivó con hidroxilamina (Sigma-Aldrich) y se dializó en un tubo de diálisis con MWCO de 12-14 kDa (Spectrum Labs) durante 4 días contra un gradiente salino decreciente de NaCl 150 mM a 0 mM en diH<sub>2</sub>O. Los polímeros de Alg-N y Alg-T purificados se trataron con carbón activado, se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se liofilizaron. Esto dio como resultado polímeros de Alg-N o Alg-T purificados con un grado de sustitución del 5 % de los grupos de ácido carboxílico de alginato disponibles.

### Ejemplo 3: Preparación y caracterización de hidrogeles de alginato por química clic

Los hidrogeles de alginato por química clic se prepararon resolviendo primero por separado los polímeros de Alg-N y Alg-T liofilizados hasta tener la concentración final deseada (2-4 % p/v) en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM; Gibco). Para las mediciones de la cinética de gelificación, las soluciones de polímero Alg-N y Alg-T se mezclaron en una relación deseada (es decir, 0,5-4:1 de N:T) y se pipetearon directamente sobre la placa inferior de un reómetro ARG2 de TA Instruments, equipado con geometría de la placa superior plana de 8 mm. Se usó un enfriador Peltier para controlar la temperatura para los experimentos dependientes de la temperatura, y se aplicó un aceite mineral a la periferia del gel para evitar que el hidrogel se secase durante la prueba. Las muestras de hidrogel se sometieron a una tensión del 1 % a 1 Hz, y los módulos de almacenamiento y pérdida (G' y G'') se controlaron durante 4 horas. Para las mediciones del módulo de Young, se formaron hidrogeles de alginato por química clic bajo placas de vidrio siliconizadas (Sigma-Aldrich) con espaciadores de 2 mm. Después de 2 horas de reticulación a temperatura ambiente, los discos cilíndricos se perforaron con un punzón de biopsia de 8 mm, se transfirieron a DMEM y se hincharon hasta alcanzar el equilibrio durante 24 horas a 37 °C. Las dimensiones de la muestra de hidrogel hinchado se midieron usando calibradores para mediciones de la relación de hinchamiento volumétrico, y luego se sometieron a pruebas de compresión no confinada (1 mm/min) usando una celda de carga de 10 N sin carga previa (Modelo Instron 3342). El módulo de Young, E, se calculó como la pendiente de la porción lineal (primer 10 %) de las curvas de tensión frente a la deformación.

Para preparar los polímeros de alginato por química clic, se introdujeron grupos de norborneno o tetrazina en biopolímeros de alginato de alto peso molecular, utilizando química convencional de carbodiimida (Figura 1). El grado de sustitución de los grupos de norborneno o tetrazina en los polímeros de alginato por química clic purificados, se determinó a partir de espectros de <sup>1</sup>H RMN. Se obtuvo un grado de sustitución del 5 % de norborneno (Alg-N) o tetrazina (Alg-T) sobre los grupos carboxilo de alginato usando ese método, y esos lotes de polímeros de alginato por química clic se usaron para todos los experimentos posteriores.

Para formar hidrogeles de alginato por química clic, las soluciones de polímero Alg-N y Alg-T se prepararon por separado y se mezclaron para formar un gel. Al mezclar los dos polímeros de alginato por química clic, se formó un gel estable a través de una reacción inversa de Diels-Alder con demanda de electrones entre los dos polímeros, que libera gas nitrógeno (Figura 2). El gas nitrógeno generado a partir de la reacción de reticulación conduce a la formación de unas pequeñas burbujas dentro del hidrogel. Se formó un gel estable al cabo de 1 hora a 25 °C (Figura 3A), aunque la cinética de gelificación se podía ajustar variando la temperatura o el grado inicial de sustitución de los polímeros de alginato por química clic (datos no mostrados). La cinética de gelificación a 25 °C es favorable porque permite al usuario lograr fácilmente una formulación de polímero bien mezclada antes de la gelificación, un reto común a otros métodos de reticulación de hidrogel de alginato.

Se ha mostrado que las propiedades mecánicas de la matriz extracelular afectan al destino y la función celular en entornos 2D y 3D. Con el fin de ajustar las propiedades mecánicas en un amplio rango, los polímeros de alginato por química clic se mezclaron con diferentes relaciones de Alg-N y Alg-T (relación N:T) para una concentración de polímero dada entre 2 y 4 % p/v. Esas muestras de hidrogel de alginato por química clic se sometieron a pruebas de compresión no confinada que dieron como resultado un módulo de Young por compresión que aumentaba previsiblemente con el aumento de la concentración de polímero y disminuía a medida que la relación entre los polímeros se desviaba de la relación N:T de 1 equilibrada estequiométricamente (Figura 3B). La capacidad para ajustar las propiedades mecánicas del gel resultante en un amplio rango, simplemente cambiando la relación de los dos polímeros, permite controlar la rigidez del gel a la vez que se mantienen constantes otros parámetros como la concentración del polímero y la densidad del ligando que pueden ser útiles para estudios de mecanobiología.

La relación de hinchamiento de los sistemas de hidrogel puede afectar a las propiedades mecánicas, el transporte de masa y la presentación de ligandos en la superficie del gel. Para investigar cómo cambiaría la hinchazón volumétrica con diferentes concentraciones de polímero y relaciones N:T, se prepararon hidrogeles de alginato por química clic como se ha descrito anteriormente y se dejó que se hincharan durante 24 horas a 37 °C. Se midió el volumen del hinchamiento y se comparó con el volumen fundido (Figura 3C). Para una concentración de polímero dada, la relación de hinchamiento volumétrico aumentaba a medida que la relación N:T se desviaba de 1, lo que demostraba una relación inversa entre las propiedades mecánicas y la relación de hinchamiento, tal y como se esperaba. Si bien la relación N:T tiene un efecto significativo sobre la relación de hinchamiento, la concentración de polímero no tiene un efecto significativo, lo que indica que la relación de hinchamiento del alginato por química clic está dominada por la densidad de reticulación en lugar de por la concentración de polímero (datos no mostrados).

#### **Ejemplo 4: Viabilidad de células encapsuladas en hidrogeles reticulados por química clic**

Las células NIH 3T3 (ATCC) se transdujeron con lentivirus producidos a partir de un vector lentiviral que contenía EGFP (pLCAG EGFP, laboratorio Inder Verma, plásmido Addgene 14857) y se seleccionaron durante 7 días en 1 µg/ml de diclorhidrato de puomicina (Millipore EMD). Se cultivaron células de fibroblastos 3T3 que expresaban EGFP en DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10 % (v/v), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) a 37 °C, en un ambiente con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se realizaron pases con las células aproximadamente dos veces por semana.

Para los estudios de adhesión celular, las bandas de hidrogeles de alginato por química clic se modificaron con péptidos de adhesión celular como se ha descrito anteriormente. Se perforaron discos de 6 mm, se colocaron en DMEM, se lavaron varias veces y se hincharon durante 4 horas antes de sembrar con células a 5 x 10<sup>4</sup> células/ml a una profundidad de aproximadamente 1 mm por encima de la superficie del gel. A las células se les concedieron 24 horas para adherirse y extenderse y después se visualizaron mediante fluorescencia EGFP, usando un microscopio de epifluorescencia. Se utilizaron imágenes de EGFP para cuantificar el área celular total usando el programa informático ImageJ. Después de 3 días de cultivo, las células se fijaron y se tiñeron usando faloidina de Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) y Hoechst 33342 (Molecular Probes) para visualizar los filamentos de actina F y los núcleos, respectivamente. Para visualizar la muerte celular, los geles se incubaron durante 20 minutos con una solución de homodímero de etidio-1 4 µM (Molecular Probes) en solución salina tamponada de Hanks (HBSS) y se tomaron imágenes con un microscopio de epifluorescencia.

Para los estudios de encapsulación celular, los polímeros de Alg-N se modificaron para tener aproximadamente 20 péptidos GGGGRGDSP adhesivos celulares (Peptide2.0) por cada cadena de alginato, como se ha descrito previamente. A continuación, se prepararon hidrogeles de alginato por química clic de 600 µm de espesor al 2 % p/v, N:T = 1, que contenían células a 3 x 10<sup>6</sup> células/ml. Los hidrogeles reticulados iónicamente se prepararon de manera similar al 2 % p/v, usando la misma densidad celular y los polímeros de Alg-N modificados con RGD. Una suspensión de CaSO<sub>4</sub> (0,21 g de CaSO<sub>4</sub>/mL de ddH<sub>2</sub>O) con una concentración final de 2 % p/v, se usó para reticular las muestras de hidrogel reticuladas iónicamente para que las propiedades mecánicas de los dos sustratos se ajustaran lo más posible. Para minimizar el tiempo en el que las células no tenían acceso a los medios de cultivo, se permitió que los geles se reticularan a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual se perforaron discos de 6 mm y se colocaron en medio de cultivo en donde se esperaba que la reacción de reticulación continuara hasta su finalización.

Las células se recuperaron de los hidrogeles de alginato mediante digestión en una solución con 5 U/ml de liasa de alginato (Sigma-Aldrich) en HBSS durante 20 minutos. Para las pruebas de viabilidad, las células se tiñeron con un kit "Muse Count and Viability" y se sometieron a ensayo en un Muse Cell Analyzer (EMD Millipore). Para evaluar la actividad metabólica celular total, los geles se transfirieron a pocillos que contenían AlamarBlue al 10 % (AbD Serotec) en medio de cultivo celular y se incubaron durante 4 horas. La reducción de AlamarBlue se evaluó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células 3T3 se encapsularon en hidrogeles generados a partir de Alg-N (alginato-norborneno) y Alg-T (algi-

nato-tetrazina) que tenían grados de sustitución bajos o altos con diferentes concentraciones de polímero (p. ej., 1,5 % o 3,0 % p/v; es decir, 1,5 g de alginato por 100 ml de DMEM o 3 g de alginato por 100 ml de DMEM). Las células se tiñeron con un kit comercial Live-Dead de Life Technologies. El grado de sustitución se mide por resonancia magnética nuclear (RMN), comparando la integración de picos de protones de alginato con picos de protones de alqueno sobre norborneno o protones de tetrazina. A partir de esto, se puede obtener una medición cuantitativa del grado de sustitución, utilizando la relación de protones entre norborneno/tetrazina con los protones de alginato, para calcular un grado de sustitución.

La viabilidad celular y la actividad metabólica de las células encapsuladas en los hidrogeles de alginato por química clic también se investigaron durante un período de cultivo de 3 días; se emplearon hidrogeles reticulados iónicamente para la comparación en esos estudios. Las imágenes representativas de células encapsuladas teñidas con homodímero de etidio-1 muestran una muerte celular mínima en ambos geles reticulados por química clic y iónicamente, 4 horas y 3 días después de la encapsulación (Figura 5A). La cuantificación reveló que los hidrogeles de alginato por química clic daban como resultado una viabilidad significativamente mayor de las células 3T3 encapsuladas, tanto inmediatamente después de la encapsulación ( $93 \pm 1$  % frente a  $87 \pm 2$  %) como después de 3 días de cultivo ( $84 \pm 2$  % frente a  $79 \pm 4$  %) (Figura 5B). Cabe señalar que se puede producir una pérdida de la viabilidad celular medida durante el proceso de recuperación celular mediante digestión enzimática de los hidrogeles. También se analizó la actividad metabólica total de las células encapsuladas en los diferentes hidrogeles, y se observó que aumentaba durante el período de cultivo de 3 días para ambas químicas de reticulación del hidrogel (resultados no mostrados).

#### **Ejemplo 5: Fotorreacción con tiol-eno después de la gelificación de hidrogeles reticulados por química clic**

Se prepararon hidrogeles de alginato por química clic como se ha descrito anteriormente (2 % p/v, N:T = 2) y luego se pipeteó una solución de péptido CGGGGRGDSP adhesivo celular (Peptide2.0) 0,2 o 2 mM que contenía 0,5 % p/v de fotoiniciador (Irgacure 2959; Sigma-Aldrich) en la parte superior y el gel se cubrió con un cubreobjetos de vidrio. Los geles se radiaron a 365 nm durante 60 segundos con 10 mW/cm<sup>2</sup>. Los geles se lavaron varias veces con DMEM para eliminar el exceso de fotoiniciador y el péptido sin reaccionar y se hincharon hasta alcanzar un equilibrio a 37 °C antes de sembrar las células.

Las moléculas que contenían tiol se injertaron en norbornenos sin reaccionar en hidrogeles de alginato por química clic formados previamente usando una reacción fotoiniciada con tiol-eno (Figura 5A). Se usaron geles con N:T = 2 para asegurar que los norbornenos sin reaccionar estuvieran disponibles para reaccionar después de la gelificación inicial. Las soluciones de péptido RGD con una concentración alta (2 mM) o baja (0,2 mM) reaccionaron sobre la superficie de esos hidrogeles de alginato por química clic y luego en los geles se sembraron fibroblastos NIH 3T3 que expresaban un marcador fluorescente citosólico (EGFP). Las células 3T3 se adhirieron fácilmente y se extendieron sobre los geles modificados con RGD, mientras que muy pocas células eran capaces de fijarse o elongarse sobre los geles de control sin RGD (Figura 5B). Las células sobre los hidrogeles de alginato por química clic que presentaban RGD podían formar redes interconectadas ramificadas, con un aumento significativo de 2-3 veces del recubrimiento de la superficie dependiente de la densidad de RGD, durante el cultivo de 3 días, mientras que se observó que los geles de alginato por química clic no modificados no eran adhesivos para las células y mostraban una disminución en el recubrimiento de la superficie con las células a lo largo del tiempo (Figura 5C). Después de 3 días de cultivo, las células también mostraron un aumento en la propagación y la formación de fibras de estrés de actina con una mayor concentración de RGD (Figura 5D). Además, la alta viabilidad de las células después de 3 días de cultivo, demostraba la citocompatibilidad de los hidrogeles de alginato por química clic para el cultivo de células 2D (Figura 5E).

#### **Ejemplo 6: Respuesta inflamatoria *in vivo* del hidrogel**

Un alginato ultrapuro con bajos niveles de endotoxina (alginato MVG, ProNova Biomedical AS) se modificó como se ha descrito anteriormente con norborneno y tetrazina, y posteriormente se preparó al 2 % p/v en DMEM después de una purificación. Los hidrogeles de alginato por química clic se prepararon mezclando polímeros ultrapuros de Alg-N y Alg-T con N:T = 1, conectando dos jeringas con un cierre tipo luer. Quince minutos después de mezclar, se inyectaron 50 µL de hidrogel de alginato por química clic por vía subcutánea a través de una aguja 18G. Para las muestras de hidrogel iónico, se preparó una solución de alginato ultrapuro al 2 % p/v en DMEM y se mezcló de manera similar en una jeringa con una suspensión de CaSO<sub>4</sub> con una concentración final del 2 %. También se inyectaron 50 µL del gel reticulado iónicamente por vía subcutánea en los mismos ratones. Ambas muestras de gel se recuperaron junto con la piel circundante después de 1 semana, 1 mes y 2 meses de la inyección y se fijaron durante la noche en solución de formalina tamponada neutra al 10 % (Sigma-Aldrich). Las muestras se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

La respuesta inflamatoria frente a la inyección de hidrogeles de alginato por química clic *in vivo* se investigó a continuación. Los hidrogeles de alginato reticulados por química clic y reticulados iónicamente se inyectaron por vía subcutánea y se recuperaron después de 1 semana, 1 mes y 2 meses. La cinética de gelificación de los hidrogeles de alginato por química clic permite que se mezclen e inyecten fácilmente, de manera similar a los hi-

drogeles reticulados iónicamente. Se encontró que una delgada cápsula fibrosa rodeaba ambos tipos de geles, 1 semana después de la inyección. La tinción con H&E reveló una cápsula muy delgada de colágeno y fibroblastos que rodeaba el material durante toda la duración del estudio con inflamación mínima (Figura 6A). Al cabo de un mes, se observó que los geles reticulados iónicamente perdían su integridad estructural y permitían una infiltración de fibroblastos y células inmunes en el gel, mientras que las muestras reticuladas por química clic no mostraban ninguna evidencia de descomposición ni de infiltración celular en el material durante 2 meses (véase la Figura 6B), y conservaban una capa delgada de fibroblastos que rodeaba el gel.

#### **Ejemplo 7: Preparación de hidrogeles de quitosano por química clic**

El ácido 4-(1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzoico se sintetizó de acuerdo con los métodos publicados previamente y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. El ácido 5-norbornen-2-carboxílico se adquirió en Sigma Aldrich. Los ácidos de tetrazina (Tz) y norborneno (Nb) se conjugan con aminas de quitosano solubilizando la Tz o el Nb en DMSO, añadiendo EDC y NHS. El quitosano, se solubilizó durante la noche en HCl 0,1 M y luego el pH se ajustó a ~6 mediante la adición de tampón MES 1 M pH 6,5, se añadió después gota a gota a la solución de Tz/Nb en DMSO. Se permite que la reacción tenga lugar durante la noche a temperatura ambiente con agitación. La solución resultante se dializa frente a agua y luego se liofiliza. Los materiales resultantes se resuspenden en una solución tamponada con pH fisiológicamente relevante o WFI reacciona para producir los hidrogeles.

Los polímeros de quitosano-Nb, quitosano-Tz y quitosano sin modificar se disolvieron en óxido de deuterio (Sigma-Aldrich) al 1,5 % p/v. Los espectros de <sup>1</sup>H-NMR se obtuvieron en un espectrómetro de RMN de 400 MHz (Varian). El grado de sustitución se calcula comparando la integral del pico en  $\delta$  3,0 de los protones de la cadena principal de quitosano con los picos de protones de alqueno de norborneno en  $\delta$  6,2-5,9 o con el pico de tetrazina en  $\delta$  10,4 (s, 1H).

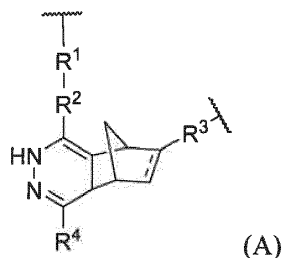
#### **Ejemplo 8: Preparación de hidrogeles de gelatina por química clic**

De manera similar a los hidrogeles de alginato y quitosano, la gelatina se modificó para preparar gelatina-tetrazina (Gel-Tz) y gelatina-norborneno (Gel-Nb). Los polímeros de Gel-Tz y Gel-Nb se mezclan para crear una red de hidrogel de gelatina por química clic reticulada covalentemente, con la pérdida de N<sub>2</sub>. (Figura 7A). Los barridos de tiempo del módulo de almacenamiento (G') de los hidrogeles de gelatina por química clic al 5 y 10 % p/v y N:T = 1, muestran que el módulo de meseta se alcanzó en 45 minutos en ambos materiales, con una inserción que muestra el tiempo hasta el 50 % del módulo de meseta. Las Figuras 8A y 8B muestran la adhesión, propagación y proliferación de los fibroblastos 3T3 sobre hidrogeles de gelatina por química clic. Las secuencias de péptido adhesivo celular intrínsecas de la gelatina se conservaban ya que se observó que las células se adherían fácilmente y se extendían muy rápidamente sobre la superficie del gel (ensayo 2D). La tinción de la actina F y los núcleos usando faloidina y Hoescht de la adhesión, propagación y proliferación de fibroblastos 3T3 en la Figura 8B, muestra una fuerte tracción de las células sobre la matriz subyacente.

La Figura 9 muestra que los fibroblastos 3T3 conservaban una viabilidad elevada después de la encapsulación 3D en la gelatina reticulada por química clic, con un aumento en la actividad metabólica durante un período de cultivo de tres días. Los fibroblastos 3T3 encapsulados asumieron rápidamente una morfología de diseminación dentro de la gelatina reticulada por química clic después de un día (longitud de la célula:  $80 \pm 6 \mu\text{m}$ ), un fenotipo que se inhibía en presencia de marimastat, un inhibidor de la metaloproteínasa de matriz de amplio espectro (MMP) (longitud de la célula:  $16 \pm 2 \mu\text{m}$ ), lo que sugiere que la propagación de las células 3D en la gelatina reticulada por química clic dependía de la degradación mediada por MMP de la matriz de gelatina.

## REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel que comprende un primer polímero y un segundo polímero, en el que el primer polímero y/o el segundo polímero comprenden un polisacárido, y en el que el primer polímero está conectado con el segundo polímero mediante enlazadores de fórmula (A):



en donde

el enlace  $--$  es un enlace simple o doble;

$R^1$  es -alquil  $C_0-C_6-NH-$ , -alquil  $C_0-C_6-O-$  o -alquil  $C_0-C_3-C(O)-$ ;

$R^2$  es un enlace, arilo o heteroarilo, en donde el arilo y el heteroarilo están sustituidos opcionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , (alquil  $C_1-C_6$ )amino o di(alquil  $C_1-C_6$ )amino;

$R^3$  es -alquil  $C_0-C_6-NH-$ , -alquil  $C_0-C_6-O-$  o -alquil  $C_0-C_3-C(O)-$ ; y

$R^4$  es hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$ , arilo o heteroarilo, en donde el arilo y el heteroarilo están sustituidos opcionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , (alquil  $C_1-C_6$ )amino o di(alquil  $C_1-C_6$ )amino.

2. El hidrogel según la reivindicación 1, en el que:

el enlace  $--$  es un enlace simple;

$R^1$  es -alquil  $C_0-C_6-NH-$  o -alquil  $C_0-C_3-C(O)-$ ;

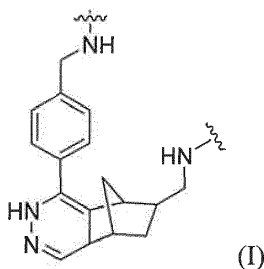
$R^2$  es un enlace o arilo sustituido opcionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , (alquil  $C_1-C_6$ )amino o di(alquil  $C_1-C_6$ )amino;

$R^3$  es -alquil  $C_0-C_6-NH-$  o -alquil  $C_0-C_3-C(O)-$ ; y

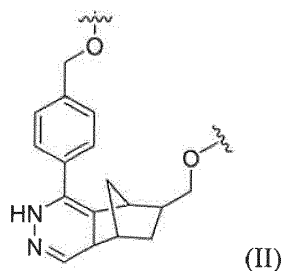
$R^4$  es hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  o heteroarilo, en donde el heteroarilo está sustituido opcionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , (alquil  $C_1-C_6$ )amino o di(alquil  $C_1-C_6$ )amino.

3. El hidrogel según la reivindicación 2, en donde  $R^1$  y  $R^3$  son ambos -metil- $NH-$ ; o  $R^1$  y  $R^3$  son ambos  $-C(O)-$ .

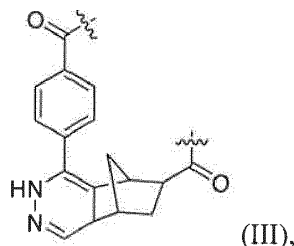
4. El hidrogel según la reivindicación 1, en el que los enlazadores de fórmula (A) están en forma de fórmula (I):



o de fórmula (II):



o de fórmula (III):



en donde los enlazadores de fórmula (I), (II) o (III) están sustituidos opcionalmente.

5. El hidrogel según la reivindicación 1, en el que el primer polímero y el segundo polímero
  - (i) son independientemente polímeros solubles en agua;
  - (ii) se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en alginato, quitosano, polietilenglicol (PEG), gelatina, ácido hialurónico, colágeno, condroitina, agarosa, poliácridamida y heparina;
  - (iii) comprenden un polisacárido; o
  - (iv) se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en alginato, quitosano y gelatina.
6. El hidrogel según la reivindicación 1, en el que el primer polímero o el segundo polímero comprenden adicionalmente un péptido adhesivo celular; opcionalmente en donde el péptido adhesivo celular comprende la secuencia de aminoácidos RGD; opcionalmente en donde el péptido adhesivo celular comprende la secuencia de aminoácidos RGDC; opcionalmente en donde el péptido adhesivo celular está unido covalentemente con el polímero mediante una reacción de tiol-eno.
7. El hidrogel según la reivindicación 1, en donde el módulo de Young del hidrogel es de 50 a 50.000 Pa.
8. El hidrogel según la reivindicación 1, en donde el hidrogel comprende adicionalmente una célula, un factor biológico y/o una molécula pequeña; opcionalmente en donde (i) la célula es una célula de mamífero o (ii) el factor biológico es una proteína, un ácido nucleico, un lípido o un carbohidrato; opcionalmente en donde la proteína es un factor de crecimiento o un fragmento del mismo o un anticuerpo o un fragmento del mismo.
9. Un método para preparar un hidrogel según la reivindicación 1, que comprende,
  - a) proporcionar un primer polímero que comprende un resto de tetrazina y un segundo polímero que comprende un resto de norborneno;
  - b) poner en contacto el segundo polímero con el primer polímero para formar el hidrogel según la reivindicación 1.
10. El método según la reivindicación 9, en el que (i) cada molécula del primer polímero comprende 1-50.000 restos de tetrazina; o (ii) cada molécula del segundo polímero comprende 1-50.000 restos de norborneno.
11. El método según la reivindicación 9, en donde (i) la etapa b) comprende poner en contacto un segundo polímero con un primer polímero en una relación de 1:10 a 10:1; o (ii) el método comprende adicionalmente hacer reaccionar el primer polímero con a) bencilamina tetrazina, alcohol bencílico tetrazina o ácido benzoico tetrazina, y un b) agente de acoplamiento para proporcionar el primer polímero que comprende



un resto de tetrazina; opcionalmente en donde el agente de acoplamiento es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

- 5 12. El método según la reivindicación 9, que comprende adicionalmente hacer reaccionar el segundo polímero con a) norborneno metanamina, norborneno metanol o norborneno ácido carboxílico, y b) un agente de acoplamiento para proporcionar el segundo polímero que comprende un resto de norborneno; opcionalmente en donde el agente de acoplamiento comprende 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y opcionalmente N-hidroxisuccinimida (NHS).
- 10 13. El hidrogel según la reivindicación 8, para uso en la regeneración de un tejido en un sujeto que lo necesita; opcionalmente en donde el hidrogel comprende un primer componente que regula temporalmente la egresión de la célula y un segundo componente que regula espacialmente la egresión de la célula desde el hidrogel; opcionalmente en donde la célula de mamífero está inmovilizada dentro del hidrogel, y en donde el hidrogel comprende un primer componente que regula temporalmente la egresión de una célula de la progenie de la célula de mamífero desde el hidrogel y un segundo componente que regula espacialmente la egresión de la progenie de la célula de mamífero desde el hidrogel.
- 15 14. El hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende adicionalmente una composición de reclutamiento incorporada dentro del mismo o sobre el mismo para uso en la modulación de una actividad de una célula en un mamífero, poniendo en contacto dicha célula con una señal de implementación, en donde dicha señal de implementación induce la egresión de dicha célula, y en donde la actividad de la célula en la egresión difiere de la anterior a la entrada en el hidrogel; opcionalmente en donde dicha célula es una célula inmune; opcionalmente en donde dicha célula inmune se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula dendrítica, un macrófago, un linfocito T y un linfocito B.
- 20 15. El hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en la administración de una composición farmacéutica a un sujeto, en donde el hidrogel comprende una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico, una proteína y/o una molécula pequeña, y en donde después de la administración del hidrogel, la composición farmacéutica se libera desde el hidrogel en un tejido circundante del sujeto, entregando de este modo la composición farmacéutica al sujeto.
- 25 30

FIGURA 1

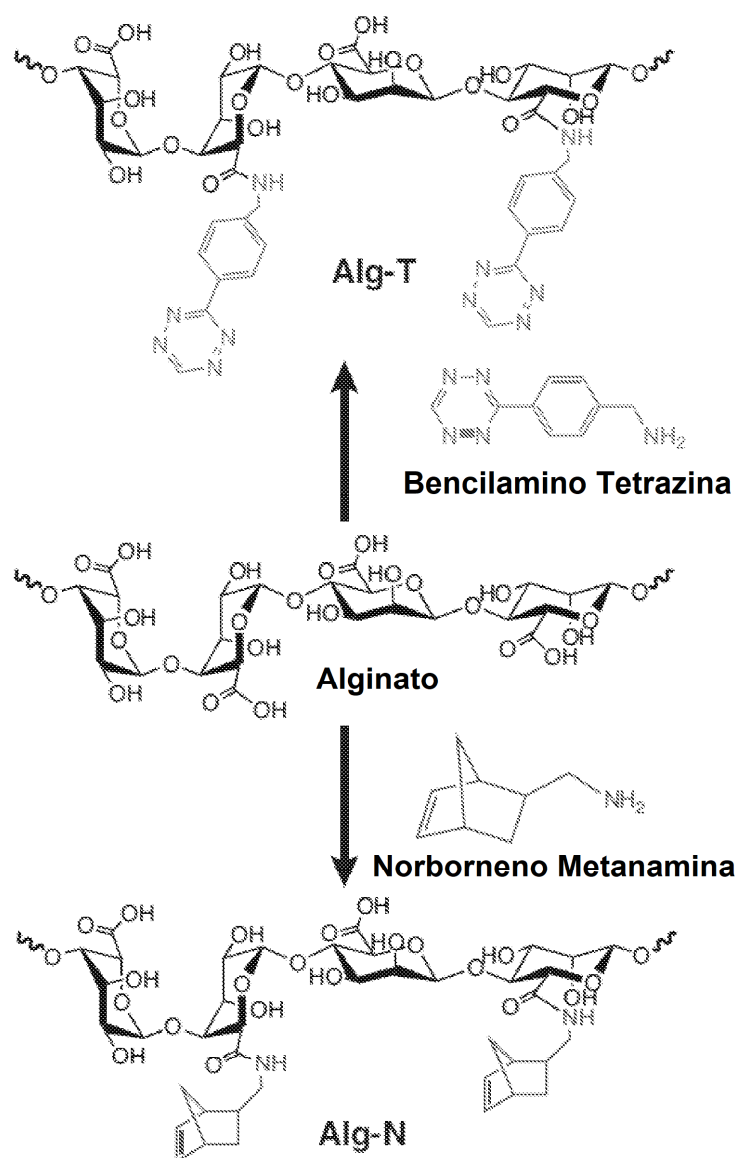
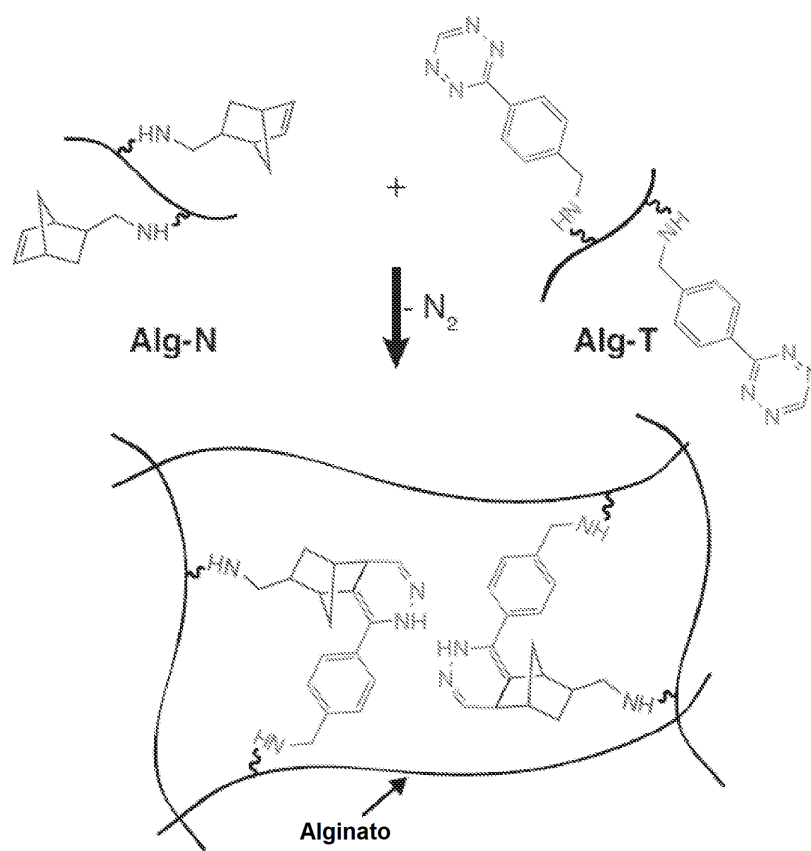


FIGURA 2



Hidrogel de alginato por química clic

FIGURA 3

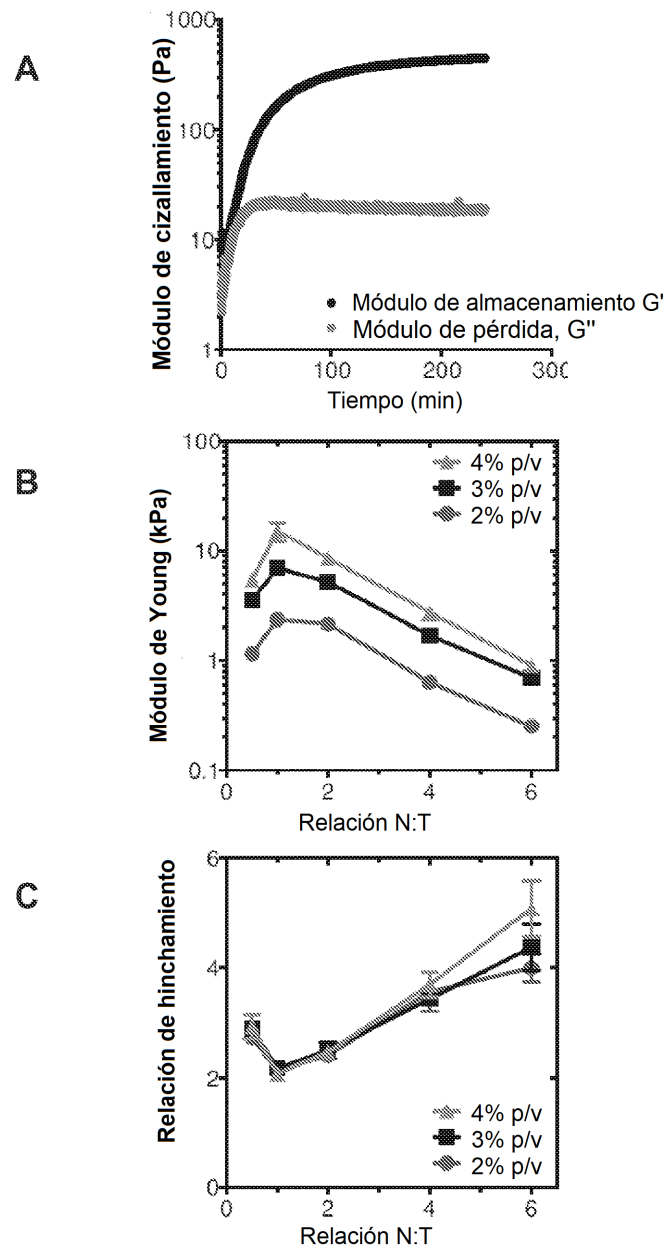


FIGURA 4

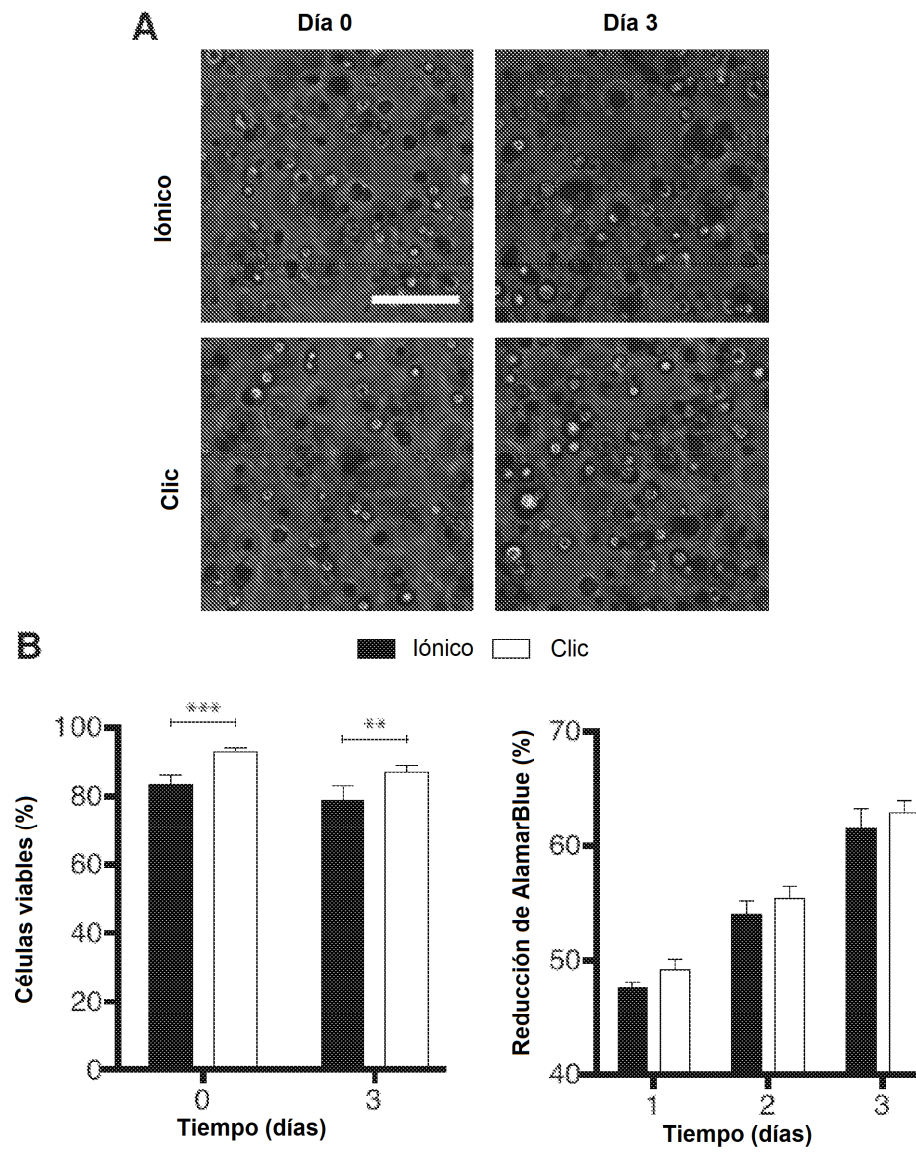


FIGURA 5

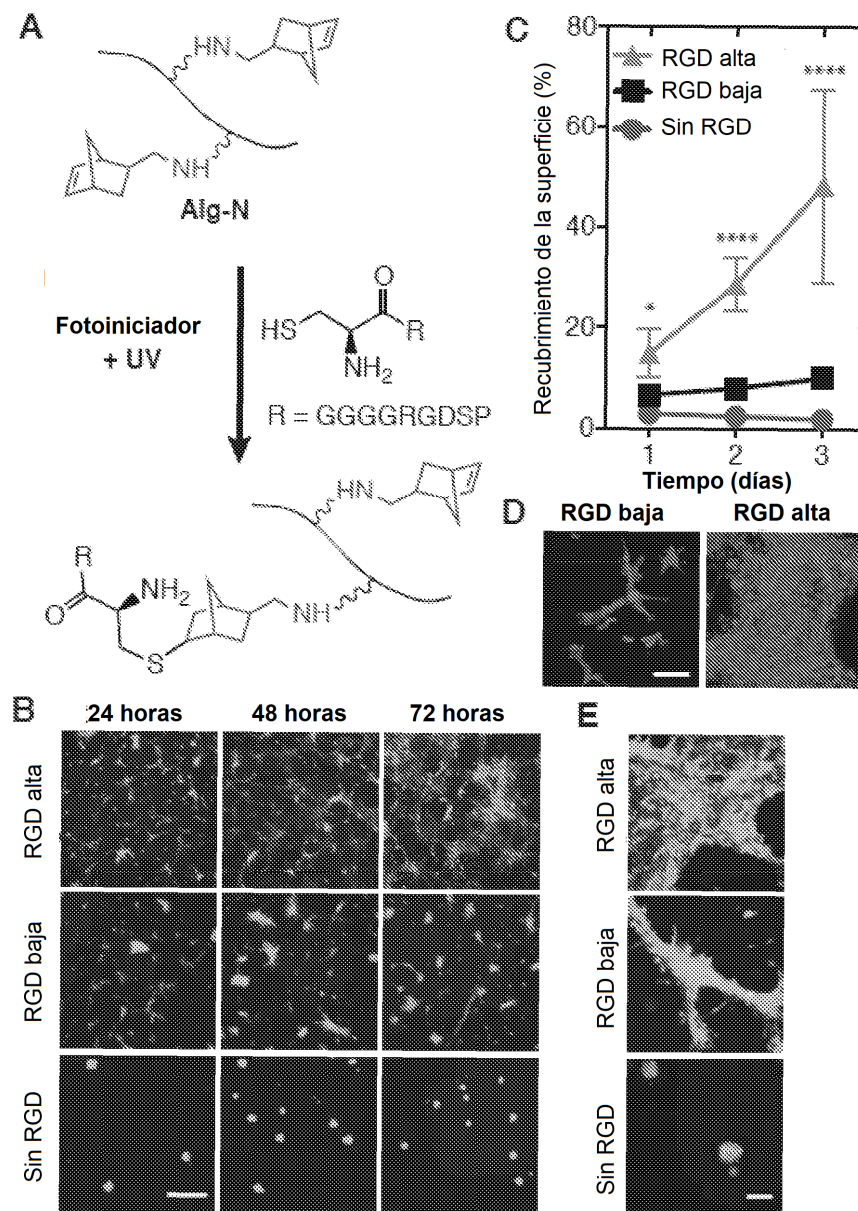


FIGURA 6

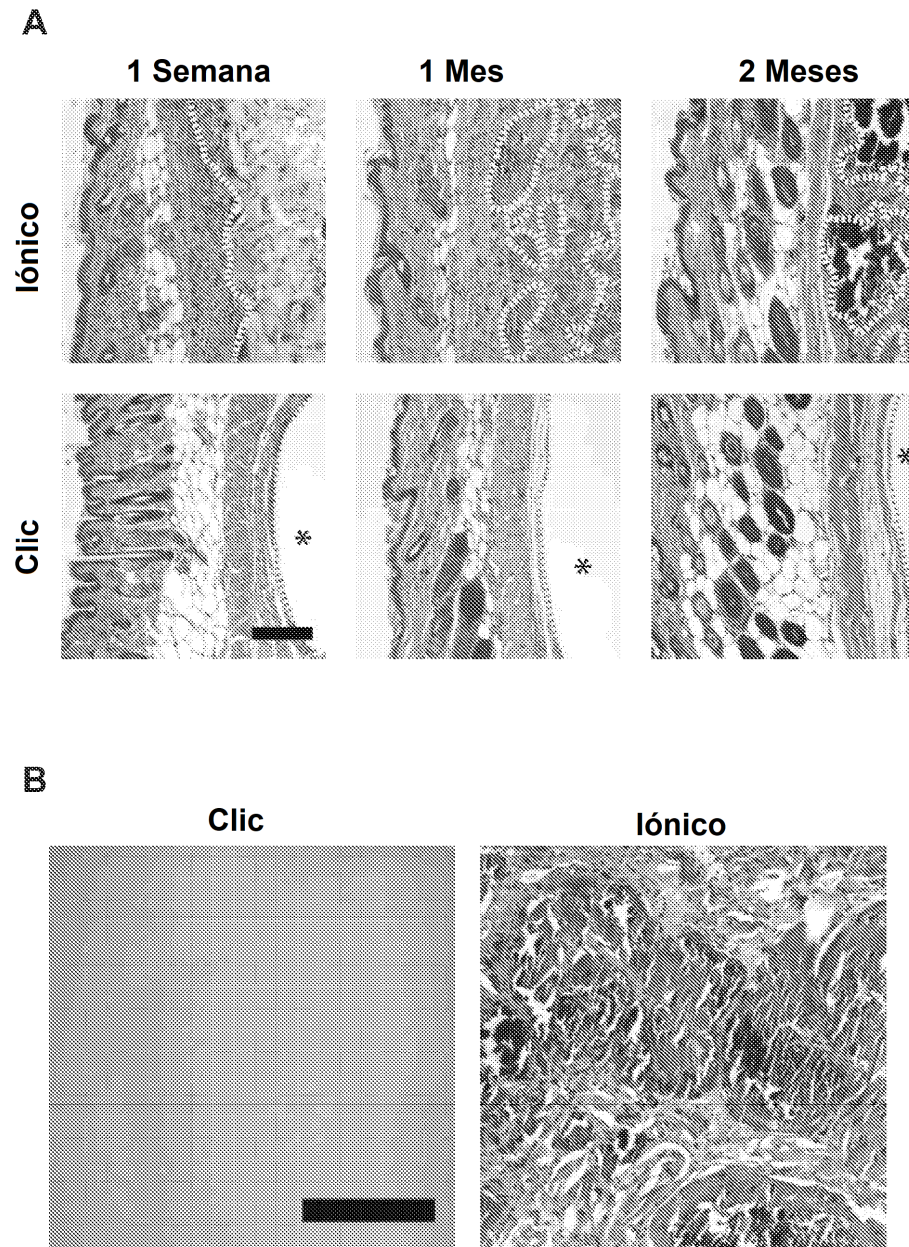


FIGURA 7

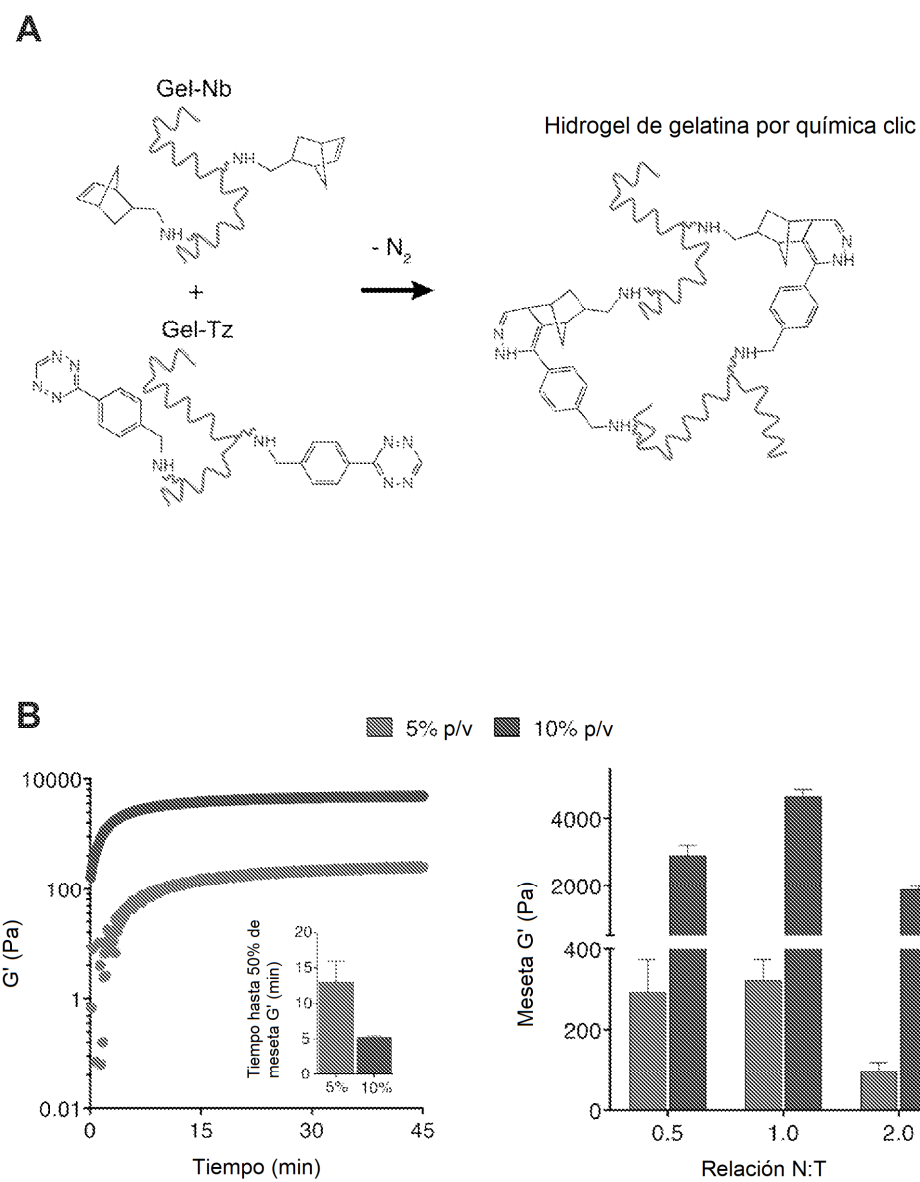
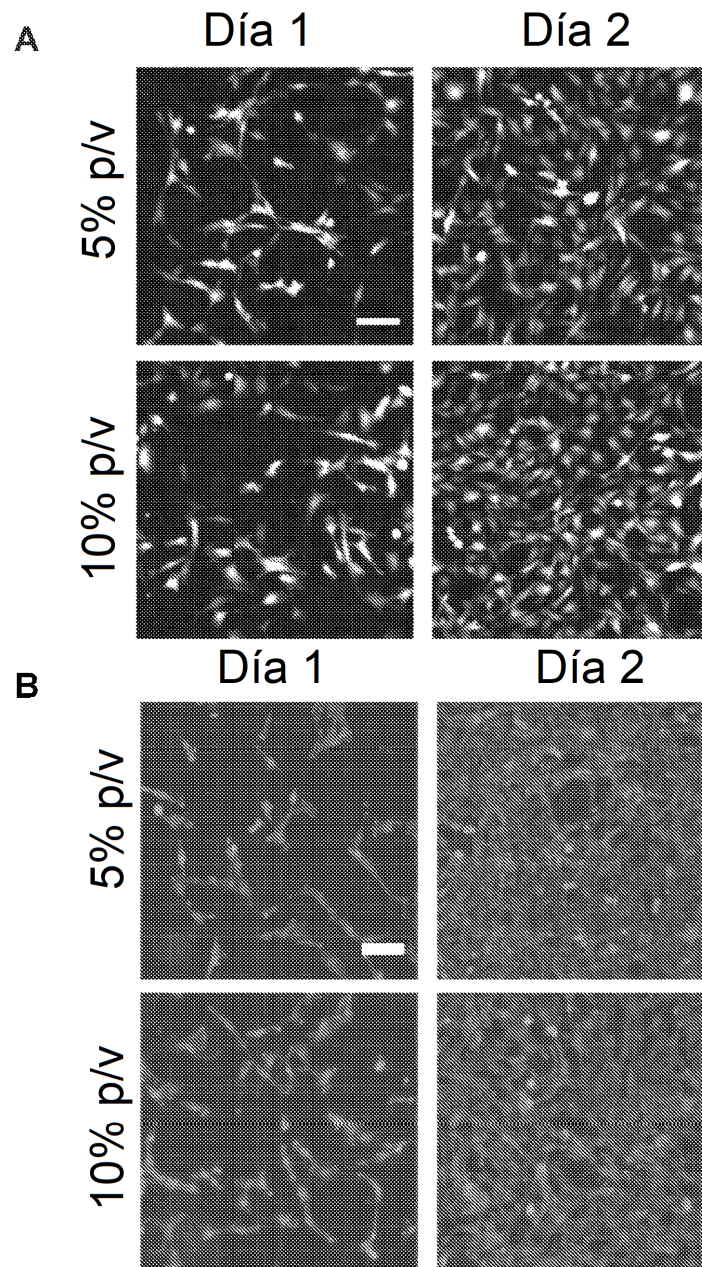




FIGURA 8



**FIGURA 9**

