

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 259**

51 Int. Cl.:

C08L 5/10 (2006.01)

C08L 25/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2018** **E 21170125 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023** **EP 3872128**

54 Título: **Material de hidrogel**

30 Prioridad:

10.03.2017 DE 102017105195

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.03.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 961 259 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Material de hidrogel

La invención se refiere a hidrogeles que están basados en poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como componente de red y moléculas de reticulación que contienen amina o tiol como componente de red adicional, que pueden obtenerse sintéticamente, pueden caracterizarse y pueden utilizarse como material para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias. Los grupos de sustancias A y B no son grupos de sustancias químicamente definidos, sino que pueden contener diferentes sustancias según el tipo de hidrogel, que en la constelación y composición correspondientes dan lugar al secuestro diferenciado según la invención dentro del sistema general. Por lo tanto, los grupos de sustancias A y B se definen por su comportamiento en el sistema general.

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

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

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

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

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

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

A este respecto, las fuerzas de atracción principalmente electrostáticas entre los dominios cargados positivamente de las moléculas de señalización y los grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato cargados negativamente en el hidrogel desempeñan un papel importante, para cuya estimación se puede utilizar a menudo el punto isoeléctrico (IEP) de una proteína. Además de la carga neta que se puede estimar utilizando el IEP en condiciones fisiológicas, desempeñan un papel la distribución de la carga, por ejemplo la presencia de agrupaciones de carga cargadas positivamente, así como interacciones secundarias provocadas por el tamaño y la estructura de la proteína, así como la formación de fuerzas intermoleculares no iónicas más débiles, tales como, por ejemplo, interacciones hidrófobas, enlaces de puente de hidrógeno o interacciones dipolares, por lo que hasta la fecha no ha sido posible predecir la unión absoluta o relativa de las proteínas a los hidrogeles. Además, se producen procesos de competencia adicionales que a menudo no se

habían tenido en cuenta hasta la fecha y que se deben, por ejemplo, a interacciones de las proteínas diana con la albúmina, que es responsable del control de la presión osmótica y la regulación de los procesos de transporte, así como a interacciones entre la albúmina y el hidrogel. Además, las constantes de unión utilizadas a menudo en la literatura para predecir las interacciones moleculares entre polímeros cargados y proteínas solo son adecuadas para describir la interacción de complejos molécula-proteína individuales en solución, mientras que en los hidrogeles existe una fuerte influencia de las cadenas poliméricas adyacentes y de la distribución tridimensional de los centros de carga o, respectivamente, de afinidad en la red polimérica sobre las interacciones resultantes y, por tanto, sobre la unión de las proteínas en el hidrogel.

Por lo tanto, hasta la fecha no se ha podido esclarecer la selectividad de la unión entre hidrogeles que contienen componentes (elementos constituyentes) sulfatados y/o sulfonados y componentes moleculares de biofluidos complejos. En consecuencia, con los métodos y procedimientos establecidos, el control selectivo de los niveles de moléculas de señalización mediante hidrogeles que contienen componentes (elementos constituyentes) sulfatados o, respectivamente, sulfonados en biofluidos relevantes para la aplicación solo es posible de forma limitada.

Uno de los objetivos consiste en proponer un procedimiento que permita influir selectivamente en la concentración de determinadas sustancias en biofluidos.

Se trata de un procedimiento para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias A y B en un hidrogel sulfatado y/o sulfonado y el empobrecimiento de las sustancias del grupo de sustancias A en un biofluido con liberación diferenciada simultánea de sustancias de los grupos de sustancias A o B desde el hidrogel sulfatado y/o sulfonado en el biofluido o la unión reducida de las sustancias del grupo de sustancias B en el hidrogel sulfatado y/o sulfonado, en el que el hidrogel sulfatado y/o sulfonado se selecciona de un grupo de hidrogeles del tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4 y los hidrogeles están constituidos por elementos constituyentes no cargados y elementos constituyentes cargados y se caracterizan por que los elementos constituyentes cargados se caracterizan mediante un parámetro calculado a partir del número de grupos sulfato y/o sulfonato por unidad de repetición dividido por la masa molar de la unidad de repetición para el tipo 1 de 0,0040-0,0060 mol/g, para el tipo 2 de 0,0025-0,0040 mol/g, para el tipo 3 de 0,0005-0,0025 mol/g y para el tipo 4 de 0,0040-0,0100 mol/g y los hidrogeles hinchados presentan un módulo de almacenamiento inferior a 20 kPa y las propiedades de los hidrogeles hinchados presentan una concentración de grupos sulfato o sulfonato en mmol/ml para el tipo 1 de 0,09 a 0,20, para el tipo 2 de 0,05 a 0,18, para el tipo 3 de 0,01 a 0,12 y para el tipo 4 de 0,16 a 0,8 y por que se influye en la concentración de sustancias del grupo de sustancias A y de sustancias del grupo de sustancias B en el biofluido mediante la elección del tipo de hidrogel.

Los elementos constituyentes cargados de los hidrogeles pueden presentar un número de grupos sulfato y/o sulfonato por unidad de repetición dividido por la masa molar de la unidad de repetición para el tipo 1 de 0,0050 mol/g, para el tipo 2 de 0,0035 mol/g o 0,0038 mol/g, para el tipo 3 de 0,0019 mol/g y para el tipo 4 de 0,0045 mol/g y las propiedades de los hidrogeles hinchados presentan una concentración de sulfato o sulfonato en mmol/ml para el tipo 1 de 0,12 y para el tipo 2 de 0,12 o 0,14 y para el tipo 3 de 0,06 y para tipo 4 de 0,28 o 0,16.

Alternativamente, se trata de un procedimiento para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias A y B en un hidrogel sulfatado y/o sulfonado y el empobrecimiento de las sustancias del grupo de sustancias A en un biofluido con liberación diferenciada simultánea de sustancias del grupo de sustancias B desde el hidrogel sulfatado y/o sulfonado en el biofluido o la unión reducida de las sustancias del grupo de sustancias B en el hidrogel sulfatado y/o sulfonado, en el que el hidrogel sulfatado y/o sulfonado se selecciona de un grupo de hidrogeles de tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4 y los hidrogeles están constituidos por elementos constituyentes no cargados (ENC) y elementos constituyentes cargados (EC) y se caracterizan por que los elementos constituyentes cargados presentan una concentración de moles de grupos sulfato o sulfonato por mol de polímero para el tipo 1 de 60 a 80, para el tipo 2 de 30 a 75, para el tipo 3 de 10 a 30 y para el tipo 4 de 80 a 120 y los elementos constituyentes cargados en el hidrogel presentan una concentración EC en mmol/ml para el tipo 1 de 0,0015 a 0,0025, para el tipo 2 de 0,0015 a 0,0030, para el tipo 3 de 0,0010 a 0,0040 y para el tipo 4 de 0,0018 a 0,0050 y los hidrogeles hinchados presentan un módulo de almacenamiento inferior a 20 kPa, en el que los grupos sulfato o sulfonato presentan una concentración en mmol por ml en el hidrogel para el tipo 1 de 0,09 a 0,20, para el tipo 2 de 0,05 a 0,18, para el tipo 3 de 0,01 a 0,12 y para el tipo 4 de 0,16 a 0,80 y por que se influye en la concentración de sustancias del grupo de sustancias A y de sustancias del grupo de sustancias B en el biofluido mediante la elección del tipo de hidrogel.

A este respecto, los elementos constituyentes cargados pueden presentar una concentración de moles de grupos sulfato o sulfonato por mol de polímero para el tipo 1 de 70,2 y para el tipo 2 de 48,4 o 75,0 y para el tipo 3 de 23,4 y para el tipo 4 de 90,0 y los elementos constituyentes cargados en el hidrogel presentan una concentración EC en mmol/ml para el tipo 1 de 0,0018, para el tipo 2 de 0,0025 o 0,0018, para el tipo 3 de 0,0027 y para el tipo 4 de 0,003 o 0,0018 y los hidrogeles hinchados presentan un módulo de almacenamiento inferior a 20 kPa, siendo la concentración de grupos sulfato o sulfonato en mmol por ml en el hidrogel para el tipo 1 de 0,12 para el tipo 2 de 0,12 o 0,14, para el tipo 3 de 0,06 y para el tipo 4 de 0,28 o 0,16.

La reticulación de los elementos constituyentes para formar el hidrogel se puede realizar mediante la reacción de grupos funcionales adecuados en el EC y/o el ENC de la clase de aminas, tioles, carboxilos, anhídridos, maleimidias, vinilsulfonas, acrilatos, hidroxilos, isocianatos, epóxidos y aldehídos o grupos que pueden formar enlaces no

covalentes basados en fuerzas electrostáticas o interacciones hidrófobas, enlaces de puente de hidrógeno o interacciones dipolares.

La reticulación de los elementos constituyentes cargados para formar el hidrogel se puede realizar mediante reticulación directa utilizando una molécula de reticulación bifuncional pequeña con una masa molar ENC < 500 g/mol.

Como elementos constituyentes cargados se pueden seleccionar glicosaminoglicanos sulfatados obtenidos de fuentes naturales, tales como heparina y heparinas desulfatadas selectivas, sulfato de condroitina, sulfato de heparán, sulfato de queratán, ácido hialurónico sulfatado, así como glicopolímeros sulfatados a base de manosa, lactosa, dextrano y compuestos polisulfonados, que portan ácido estirenosulfónico (SS), ácido vinilsulfónico (VS), ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS), ácido aminopropanosulfónico (APS) o ácido anetolsulfónico (AS) como monómeros que contienen azufre y también en copolímeros con unidades que contienen los grupos de reticulación mencionados anteriormente. Como elementos constituyentes no cargados se pueden seleccionar polietilenglicoles, poli(2-oxazolininas), polivinilpirrolidonas (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PVA) y/o poli(acrilamidas) (PAM) o una molécula reticulante bifuncional corta.

Para los hidrogeles de tipo 1 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias A al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma, IL-12p40, IL-4, esclerostina y/o DKK1, en los que las sustancias se empobrecen en el biofluido hasta más del 50% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.

Para los hidrogeles de tipo 1 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancia B al menos una de las sustancias FGF-2, TGFb1, EGF, HGF, PLGF, GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-6 y/o TNF-alfa, en los que las sustancias solo se unen hasta el 50% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan desde el mismo.

Para los hidrogeles de tipo 2 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias A al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma, IL-12p40, IL-4 y/o DKK1, en los que las sustancias se empobrecen en el biofluido hasta más del 50% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.

Para los hidrogeles de tipo 2 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias B al menos una de las sustancias FGF-2, TGFb1, EGF, HGF, PLGF, GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-6, TNF-alfa y/o esclerostina, en los que las sustancias solo se unen hasta el 50% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan desde el mismo.

Para los hidrogeles de tipo 3 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias A al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IP-10, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma y/o IL-4, en los que las sustancias se empobrecen en el biofluido hasta más del 50% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.

Para hidrogeles de tipo 3 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias B al menos una de las sustancias FGF-2, TGFb1, EGF, HGF, PLGF, IL-8, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-12p40, IL-6, TNF-alfa, esclerostina y/o DKK1, en los que las sustancias solo se unen hasta el 50% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan desde el mismo.

Para los hidrogeles de tipo 4 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias A al menos una de las sustancias bNGF, PDGF-BB, VEGF-A, eotaxina, GRO-alfa, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, Rantes, SDF1-alfa, IFN-gamma, IL-1 beta, IL-10, IL-12p40, IL-4, IL-6 y/o TNF-alfa, en los que las sustancias se empobrecen en el biofluido hasta más del 60% de la concentración inicial de la solución y se secuestran en el hidrogel.

Para los hidrogeles del tipo 4 se pueden seleccionar como sustancias del grupo de sustancias B al menos una de las sustancias EGF, PLGF y/o GM-CSF, en los que las sustancias solo se unen hasta el 40% de la concentración inicial de la solución en el hidrogel o se liberan desde el mismo.

Los hidrogeles del tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4 se pueden precargar con al menos una sustancia del grupo de sustancias A y/o B a una concentración elevada y después estas sustancias se pueden liberar del hidrogel en paralelo e independientemente para un cambio de concentración en el biofluido.

Los hidrogeles se forman preferentemente a partir de materiales multifásicos, es decir, a partir de mezclas de los diferentes tipos 1 a 4 de materiales de hidrogel o, respectivamente, diferentes formas de procesamiento (micropartículas e hidrogeles en masa) o, respectivamente, se precargan con diferentes sustancias o cantidades de sustancias.

La liberación diferenciada de sustancias del grupo de sustancias A o B del hidrogel sulfatado y/o sulfonado al biofluido y la unión reducida de las sustancias del grupo de sustancias B al hidrogel sulfatado y/o sulfonado pueden realizarse simultáneamente.

El objetivo de la invención consiste en proporcionar un material de hidrogel adecuado para el procedimiento propuesto anteriormente que permita influir selectivamente en la concentración de determinadas sustancias en biofluidos.

El objetivo se logra utilizando un material de hidrogel con las características según la reivindicación 1. Como material adecuado para llevar a cabo el procedimiento pudo utilizarse un sistema de hidrogel totalmente sintético basado en poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como componente sintético cargado negativamente en condiciones fisiológicas y por lo tanto con afinidad por biomoléculas parcialmente cargadas positivamente para el secuestro diferenciado de sustancias de diferentes grupos de sustancias. Otros desarrollos del material se indican en las reivindicaciones dependientes. Totalmente sintético significa que no se requieren componentes de origen biológico para la formación del hidrogel. Por lo tanto, se puede excluir el riesgo de reacciones inmunogénicas adversas.

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

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

Los centros de afinidad, grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato cargados negativamente están distribuidos de forma determinada solo a lo largo del EC según lo previsto, mientras que como ENC, por el contrario, se utiliza un elemento constituyente que minimiza la adsorción de proteínas. Los grupos carboxilo eventualmente presentes en el EC y que no se utilizan para la reacción de reticulación no se consideran relevantes para la unión de las proteínas en el hidrogel, debido a los grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato del EC con una actividad significativamente más ácida en comparación con los mismos y que, por lo tanto, están preferentemente desprotonados.

Las condiciones fisiológicas son soluciones acuosas que corresponden en pH y fuerza iónica a tejidos humanos con un contenido fisiológico de sal y, por lo tanto, se ajustan a aproximadamente el 0,9% de NaCl con tampón de fosfato a un pH de 7,4.

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

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

El concepto de la invención consiste en que las diferencias en la unión de las proteínas que controlan el metabolismo,

el transporte y las funciones de señalización (por ejemplo, moléculas de señalización y enzimas) a hidrogeles que contienen componentes (EC) sulfatados o, respectivamente, sulfonados se determina, por una parte, mediante las interacciones electrostáticas entre EC y proteínas, así como al tamaño y la estructura de las proteínas (por ejemplo, la presencia de dominios proteicos característicos) y, por otra parte, en gran medida mediante los parámetros de red de los hidrogeles. A este respecto, como parámetros de red determinantes se obtuvieron (1) la concentración de sulfato o, respectivamente, sulfonato en el hidrogel hinchado (mmol de sulfato o, respectivamente, sulfonato por ml) en el hidrogel hinchado en condiciones fisiológicas y (2) el número de grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato por unidad de repetición del EC dividido por la masa molar de las unidades de repetición del EC (número de grupos / (g/mol)) como una magnitud característica de la carga del EC. El parámetro (1) está correlacionado con el número de centros de interacción (correspondientes a grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato cargados negativamente) en la red tridimensional del hidrogel hinchado y, por lo tanto, determinará en gran medida la unión de las proteínas (moléculas de señalización, enzimas) en el hidrogel. Este parámetro incluye interacciones intermoleculares (es decir, interacciones entre cadenas poliméricas adyacentes) del EC con proteínas (moléculas de señalización, enzimas). El parámetro (2), por otra parte, describe la densidad y la distribución de los centros de interacción (correspondientes a grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato cargados negativamente) a lo largo de los diferentes EC y, por lo tanto, determinará en gran medida las interacciones de las proteínas con los respectivos EC individuales y por lo tanto, incluye también, a través de la modulación espacial de los centros de carga a lo largo de la cadena polimérica, interacciones específicas, que se conocen, por ejemplo, para las interacciones proteína-glucosaminoglicano (véase Capila, I.; Linhardt, R. J. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002, 41 (3), 391-412). Según la invención, el comportamiento de unión y liberación de los hidrogeles para proteínas (moléculas de señalización) se determina en gran medida mediante una superposición de las propiedades de la red de hidrogel resultantes de ambos parámetros (1) y (2) y, por lo tanto, también se puede describir detalladamente especificando estos parámetros (véanse también los resultados para los ejemplos de realización ENC1-EC1 01 a ENC1-EC4 04).

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

Mediante la puesta en contacto de biofluidos con hidrogeles cuya estructura de red y cuyo grado de sulfatación o, respectivamente, sulfonación pueden graduarse específicamente, la concentración de moléculas de señalización relevantes en el biofluido se puede ajustar por medio de una selectividad característica de la unión de las moléculas de señalización al hidrogel y, por lo tanto, puede controlarse en una aplicación biológica o biotecnológica. A este respecto, la aplicación biológica puede realizarse en el contexto médico en la modulación de moléculas de señalización solubles para el control de la angiogénesis, el brote de vasos sanguíneos, la respuesta inmunitaria, entre otras cosas para la curación de enfermedades neurodegenerativas, autoinmunitarias y cancerosas, diabetes, en la cicatrización de heridas cutáneas y la regeneración ósea, para la inhibición de la proliferación de tumores, así como para tratamientos antisépticos y antimicrobianos en o sobre el cuerpo. Las aplicaciones biotecnológicas consisten en el cultivo *in vitro* de células y órganos de células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS), así como otras células madre y progenitoras que no pueden asignarse a ES e iPS, células primarias obtenidas de pacientes, líneas celulares inmortalizadas, así como tejido cardíaco, muscular, renal, hepático y nervioso, así como en el enriquecimiento o empobrecimiento y, por tanto, en la separación de mezclas de proteínas, en particular de mezclas de moléculas de señalización o de enzimas.

La invención se refiere, como ya se ha mencionado, a un material de hidrogel reticulado covalentemente para llevar a cabo el procedimiento mencionado anteriormente, que se basa en elementos constituyentes cargados en forma de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y elementos constituyentes no cargados en forma de polímeros que contienen grupos amina o grupos tiol o moléculas reticulantes con al menos dos grupos amino o tiol. A este respecto, los elementos constituyentes cargados y no cargados se reticulan para formar una red polimérica, que se puede obtener mediante la activación de los grupos carboxilo del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) y o bien una reticulación directa con los polímeros que contienen grupos amina o las moléculas reticulantes con los, al menos dos, grupos amino, en cada caso con formación de amida o bien una funcionalización de los grupos carboxilo activados por medio de moléculas reticulantes bifuncionales, cada una de las cuales contiene un grupo amino y un grupo capaz de una adición de tipo Michael, y la reticulación posterior con los polímeros que contienen grupos tiol o las moléculas reticulantes con los, al menos dos, grupos tiol, en cada caso mediante una adición de tipo Michael. El grupo capaz de una adición de tipo Michael se selecciona preferentemente de entre grupos maleimida, vinilsulfona y acrilato. Los polímeros que contienen grupos amina o tiol como elementos constituyentes no cargados se seleccionan preferentemente de la clase de polietilenglicoles (PEG), poli(2-oxazolininas) (POX), polivinilpirrolidonas (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PVA) y/o poliacrilamidas (PAM). Las moléculas reticulantes cortas que contienen grupos amina o tiol utilizadas alternativamente son preferentemente moléculas reticulantes bifuncionales no poliméricas. El poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como elemento constituyente cargado se selecciona ventajosamente con relaciones molares variables de ácido 4-estirenosulfónico a ácido maleico en el intervalo de 6:1 a 1:6 y masas molares en el intervalo de 5.000 a 100.000 g/mol. Según una forma de realización particularmente preferida de la invención se utilizan polímeros con péptidos escindibles enzimáticamente como elementos constituyentes no cargados para la formación de redes poliméricas. Estos péptidos escindibles enzimáticamente presentan preferentemente o bien lisina, con un grupo amino

en la cadena lateral, o bien cisteína, con un grupo tiol en la cadena lateral, como aminoácido reactivo en la secuencia peptídica. Los péptidos escindibles enzimáticamente los pueden escindir ventajosamente proteasas humanas o bacterianas, en particular los sensibles a metaloproteasas de matriz (MMP) tales como, por ejemplo, PQGIWGQ, IPVSLRSG o VPMSMRGG, los sensibles a cathepsina, tales como VPMSMRGG, los sensibles a elastasa, tales como, por ejemplo, AAPV o APEIMDRQ, los sensibles a enzimas de coagulación de la sangre, tales como, por ejemplo, GGF-ácido pipercolico-RYSWGCG sensible a trombina o GG-ciclohexilalanina-ARSWGCG, los sensibles a FXa, tales como, por ejemplo, GGIEGRMGGWCG, los sensibles a calicreína, tales como, por ejemplo, CGGGPFRIGGWCG, o los sensibles a proteasas bacterianas, tales como, por ejemplo, ADVFEA sensible a aureolisina o AAEEA, AAPV sensible a elastasa o la secuencia MKATKLVLGAVILGSTLLAG sensible a la proteasa IV. Los hidrogeles construidos de esta manera permiten mecanismos autorreguladores de liberación y degradación. Según otra forma de realización de la invención, se unen moléculas bioactivas y/o antiadhesivas con un grupo amino o carboxilo y/o péptidos instructivos de células, seleccionados en particular de entre KCWG-RGDSP, KCWG-EIDGILT, KCWG-IKLLI, KGCWGGRNIAEIIKDI, KGCWGGSDPGYIGSRSDDSA, KGCWGGPQVTRGDVFTMP, KGCWGGKGGNGEPRGDTYRAY por medio de lisina o cisteína en la secuencia al elemento constituyente cargado poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) o a sus derivados con grupos capaces de una adición de tipo Michael con la formación de un enlace covalente a la red de hidrogel. Las moléculas bioactivas pueden ser sustancias antimicrobianas, por ejemplo antibióticos o antisépticos, o principios activos farmacéuticos. Las moléculas antiadhesivas son preferentemente polietilenglicoles (PEG) o poli(2-oxazolina) (POX). Los péptidos instructivos de células son preferentemente péptidos derivados de proteínas estructurales y funcionales de la matriz extracelular, por ejemplo péptidos derivados de colágeno, laminina, tenascina, fibronectina y vitronectina. Según una forma de realización ventajosa, los péptidos bioactivos y/o antiadhesivos y/o instructivos de células se acoplan covalentemente a las redes de hidrogel por medio de secuencias peptídicas escindibles enzimáticamente. Los péptidos escindibles enzimáticamente son, como ya se ha mencionado, preferentemente sensibles a proteasas humanas o bacterianas, por ejemplo MMP, cathepsinas, elastasas y enzimas de coagulación de la sangre. Los hidrogeles diseñados de esta manera permiten mecanismos autorreguladores de liberación y degradación incluso con el mantenimiento de la red de hidrogel. Preferentemente, el material de hidrogel presenta un módulo de almacenamiento de 0,2 a 22 kPa. La concentración de sulfonato en la red hinchada y el número de grupos sulfonato por unidad de repetición (UR) dividido por la masa molar (MW) de la unidad de repetición en (g/mol) se puede variar independientemente según los intervalos definidos en la tabla 5.1 (véase más adelante).

La invención proporciona, por lo tanto, un hidrogel totalmente sintético y fuertemente hidratado con propiedades físicas y bioquímicas específicamente graduables, que porta centros de afinidad para grupos de sustancias que se van a separar por medio de los grupos sulfonato del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) como elemento constituyente cargado (EC). A este respecto, como elemento constituyente cargado (EC) se utiliza el poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) en el sentido del material de hidrogel descrito anteriormente. Este material ofrece la posibilidad de representar todas las funciones importantes de la matriz extracelular natural (MEC) de forma modular, es decir, en gran medida independientemente unas de otras. Estas funciones son en detalle la función de andamiaje, de soporte y de protección para las células en crecimiento como primera función, el control de la adhesión celular como segunda función, el secuestro graduado y la liberación reversible de moléculas de señalización terapéuticamente relevantes como tercera función, así como la posibilidad de remodelación adaptada a las necesidades mediante células en crecimiento como cuarta función. Las propiedades físicas, tales como la rigidez y la hidratación del material, se pueden ajustar en un amplio intervalo. Para ello, según una forma de realización preferida de la invención, se obtuvieron hidrogeles reticulados covalentemente mediante reacción de grupos carboxilo de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico)) activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), y los grupos amino terminales de un polietilenglicol lineal o ramificado en forma de estrella como un componente no cargado por medio de grupos amida estables. En una forma de realización alternativa, que se prefiere para embeber células vivas, en una primera etapa, se graduaron los grupos carboxilo de poli(4-ácido estirenosulfónico-co-ácido maleico) activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/sulfo-NHS) mediante la molécula reticulante bifuncional corta N-(2-aminoetil)maleimida, es decir, con 6 a 10 moléculas de N-(2-aminoetil)maleimida por molécula de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), se funcionalizaron y después se purificaron y se aislaron. Estos derivados del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con N-(2-aminoetil)maleimida permiten la reacción bioortogonal espontánea cuando se mezclan en soluciones acuosas o en biofluidos complejos con células vivas y biomoléculas sin su cambio funcional por medio de una adición de tipo Michael entre los grupos maleimida de los derivados funcionalizados de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y los grupos tiol de las moléculas reticulantes bifuncionales que contienen grupos tiol o polímeros que contienen grupos tiol como elementos constituyentes no cargados en el sentido de la estructura de hidrogel descrita anteriormente. Estos elementos constituyentes pueden ser, por ejemplo, péptidos escindibles enzimáticamente, que presentan en la secuencia el aminoácido cisteína (que porta un grupo tiol en la cadena lateral) y que previamente se han conjugado con uno o varios brazos de un polietilenglicol de cuatro brazos. (PEG), tal como se describe por Tsurkan et al. 2013 (Adv. Mater. 2013, 25, 2606-2610). La ventaja de este tipo de reticulación consiste en que, debido a la rápida reacción de las maleimidias con los grupos tiol libres, se lleva a cabo una reacción dirigida sin reacciones secundarias no deseadas con otras biomoléculas o con proteínas de las superficies celulares, por lo que la adición de tipo Michael se puede utilizar como reacción de reticulación bioortogonal para la polimerización de células vivas. Los hidrogeles también se pueden funcionalizar por medio de los grupos maleimida de los derivados de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) por medio de péptidos instructivos de células, por ejemplo la secuencia de aminoácidos CWGRGDSP. Además, los materiales de hidrogel se pueden funcionalizar con sustancias

antimicrobianas, por ejemplo con antibióticos cargados positivamente.

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

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

Mediante la variación específica de las propiedades de la red, también se pueden establecer otras relaciones de concentración ventajosas y mediante una ampliación del análisis de moléculas de señalización adicionales, el procedimiento propuesto también se puede utilizar para controlar la concentración de estas especies en cualquier biofluido.

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

Denominación	Mezcla de hidrogeles durante la reticulación		Relación molar ENC:EC	Propiedades del hidrogel en condiciones fisiológicas, hinchado			RR
	Concentración de ENC en mmol/l	Concentración de EC en mmol/l		Hinchamiento	Concentración de EC en mmol/l	Concentración de sulfato/sulfonato en mmol/l	
				Promedio	SD	Promedio	SD
ENC1-EC1 01	0.0091	0.0030	3	1.77	1.70	0.0018	1.9
ENC1-EC2 02	0.0079	0.0040	2	1.62	0.03	0.0025	1.1
ENC1-EC3 03	0.0073	0.0045	1.5	1.71	0.04	0.0027	0.0
ENC1-EC4 04	0.0067	0.0038	1.5	1.23	0.01	0.0031	1.9
ENC1-EC4 05	0.0078	0.0026	3	1.54	0.54	0.0017	1.6
ENC1-EC4 06	0.0030	0.0020	1.5	1.54	0.05	0.0013	0.2
ENC1-EC4 07	0.0041	0.0014	3	1.12	0.03	0.0012	0.5
ENC1-EC4 08	0.0052	0.0009	6	0.95	0.03	0.0009	2.0
ENC1-EC4 09	0.0021	0.0014	1.5	1.25	0.18	0.0011	0.6
ENC1-EC4 10	0.0030	0.0010	3	1.01	0.12	0.0010	0.7
ENC1-EC4 11	0.0037	0.0026	6	0.86	0.11	0.0007	0.4
ENC1-EC5 12	0.0057	0.0038	1.5	1.68	0.035	0.0023	1.7
ENC1-EC5 13	0.0079	0.0026	3	1.46	0.23	0.0018	0.7
ENC1-EC5 14	0.0030	0.0020	1.5	1.81	0.04	0.0011	1.4
ENC1-EC5 15	0.0041	0.0014	3	1.28	0.08	0.0011	1.2
ENC1-EC5 16	0.0052	0.0009	6	0.99	0.04	0.0009	0.8
ENC1-EC5 17	0.0021	0.0014	1.5	1.58	0.08	0.0009	0.2
ENC1-EC5 18	0.0030	0.0010	3	1.05	0.10	0.0009	0.7
ENC1-EC5 19	0.0037	0.0006	6	0.90	0.04	0.0007	1.3
ENC2-EC4 20	0.0015	0.0022	1.5	1.22	0.03	0.0018	0.5
ENC2-EC4 21	0.0015	0.0015	1	1.62	0.20	0.0009	1.1
ENC2-EC4 22	0.0015	0.0011	0.75	2.20	0.19	0.0005	0.2
ENC2-EC5 23	0.0015	0.0022	1.5	1.19	0.17	0.0018	1.5
ENC2-EC5 24	0.0015	0.0015	1	1.56	0.07	0.0010	1.2
ENC2-EC5 25	0.0015	0.0011	0.75	1.95	0.72	0.0006	0.3
ENC2-ENC3 26	0.0018	0.0000	1	1.26	0.25	0.0000	4.4

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

Polímero	Abreviatura	MWP en g/mol	MWUR en g/mol	Número de sulfatos/sulfonatos por unidad	Número de sulfatos/sulfonatos por molécula de polímero
Heparina (HEP)	EC1	14.000	540	2,7	70,2
Heparina N-desulfatada (N-DSH)	EC2	13.600	523	1,8	48,4
6O, heparina N-desulfatada (6ON-DSH)	EC3	12.320	474	0,9	23,4
Poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico), relación molar de ácido sulfónico a ácido maleico: 3:1	EC4	20.000	660	3,0	90,0
Poli(ácido 4-estirenosulfónico-ácido co-maleico), relación molar de ácido sulfónico a ácido maleico: 1:1	EC5	20.000	265	1,0	75,0
PEG de 4 brazos terminado en amina	ENC1	10.000	44	0,0	0,0
PEG de 4 brazos terminado en tiol	ENC2	10.000	44	0,0	0,0
PEG de 4 brazos terminado en maleimida	ENC3	10.000	44	0,0	0,0
PEG de 4 brazos terminado con una secuencia peptídica escindible enzimáticamente	ENC4	15.600	44	0	0

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

Denominación	Uniprot ID	Propiedades físico-químicas			Propiedades estructurales	Unión de proteínas en % de hidrogel con la denominación											
		Peso molecular en daltons	EP	Número aminoácidos cargados		ENC1-EC1 01	ENC1-EC2 02	ENC2-EC3 23	ENC1-EC3 03	ENC1-EC4 04	ENC2-EC4 20	ENC2-ENC3 26					
Factores de crecimiento	FGF-2	P502247	3.6	26	P502247	31.0%	3.2%	5.4%	5.7%		0.7%	19.7%					
	IGF-1	P502250	3.6	15	P502250	18.0%	4.2%	0.9%	2.0%		0.0%	5.3%					
	DNF	P302248	3.0	21	P302248	93.5%	7.3%	75.6%	4.5%	56.6%	0.8%	71.4%	3.5%	2.2%	100.0%	0.0%	
	EGF	P01133	3.394.2	7	P01133	7.2%	5.1%	11.1%	3.0%	11.5%	9.8%	11.0%	0.9%	3.0%	96.6%	3.4%	
	HGF	P14210	6322.0	4.8	P050326	41.7%	4.0%	48.3%	5.2%	49.8%	14.6%	20.6%	1.5%	41.3%	11.8%	62.2%	
	PDGF-BB	P11127	52834.4	7.4	P050278	100.0%	10.1%	100.0%	6.5%	82.8%	8.5%	100.0%	2.2%	103.6%	5.5%	100.0%	
	HGF	P07059	23703.9	3.4	P050278	2.3%	3.3%	5.9%	5.3%			7.7%	1.1%	25.1%	1.7%		
	VEGF-A	P15892	23964.4	9.2	P050280	90.0%	1.1%	55.6%	1.1%	96.3%	3.3%	68.4%	4.3%	95.4%	63.7%	2.0%	
	EGF	P01671	8504.8	3.9	P050472	100.0%	0.0%	86.0%	0.4%	98.4%	1.0%	91.8%	2.5%	100.0%	0.0%	89.2%	
	RGD	P09341	7995.1	9.5	P050471	38.4%	0.5%	75.3%	0.9%	96.8%	2.1%	57.9%	2.7%	100.0%	0.0%	97.3%	
Quimioquinas	IL-8	P10145	832.3	3.2	P050471	94.2%	1.3%	53.6%	2.1%	94.3%	7.3%	44.7%	2.5%	89.0%	0.5%	97.8%	
	P-10	P02776	8645.2	10.2	P050471	88.2%	0.5%	92.7%	2.5%	94.7%	4.1%	86.5%	7.7%	98.0%	0.8%	93.7%	
	MCP-1	P13548	8684.9	9.4	P050472	94.8%	1.8%	89.4%	0.7%	99.6%	1.8%	46.3%	4.3%	98.7%	0.7%	97.4%	
	MIP-1a	P10147	7716.5	4.8	P050472	48.2%	2.7%	41.1%	1.2%	61.6%	12.1%	20.7%	3.7%	97.8%	0.8%	84.8%	
	MIP-1b	P13296	7618.7	4.8	P050472	56.1%	3.2%	38.0%	2.7%	78.0%	15.7%	33.3%	3.1%	85.4%	0.7%	94.0%	
	RANTES	P13501	7803.8	9.3	P050472	98.0%	0.2%	95.2%	0.8%	94.0%	2.4%	92.5%	0.5%	93.5%	0.2%	97.0%	
	SDF-1a	P40061	6836.1	10.1	P050471	96.6%	0.3%	90.5%	0.6%	99.3%	1.4%	80.6%	1.5%	89.7%	0.3%	97.2%	
	G-CSF	P04141	14477.4	5.2	P050702	6.4%	2.1%	3.5%	1.0%	7.5%	14.1%	11.1%	2.6%	24.2%	1.7%	36.0%	
	MIP-1a	P01579	16177.3	3.5	P050472	89.5%	0.1%	52.6%	2.0%			75.8%	14.0%	90.0%	0.3%		
	IL-1beta	P01584	17376.7	5.9	P050253	27.0%	3.7%	25.2%	0.6%	5.5%	6.1%	26.2%	3.6%	73.0%	1.9%	58.6%	
Citocinas	IL-10	P23381	18042.2	7.6	P050259	32.7%	9.7%	14.7%	6.1%	15.7%	11.8%	15.0%	5.0%	98.8%	0.9%	95.4%	
	IL-12a	P30460	34696.6	5.4	P050472	99.9%	5.1%	65.1%	1.8%			45.8%	1.3%	62.5%	1.3%		
	IL-4	P05112	14063.0	3.3	P050472	96.5%	0.3%	62.4%	2.0%	95.9%	7.2%	72.6%	0.7%	98.1%	0.5%	96.8%	
	IL-6	P05131	20812.6	6.2	P050254	24.3%	4.8%	4.9%	4.8%	49.4%	26.7%	17.9%	7.6%	83.5%	1.3%	63.2%	
	TNF-alfa	P01375	17355.5	7.0	P050251	38.9%	3.5%	24.7%	3.3%			24.6%	3.7%	97.8%	1.1%		
	Eotaxina	G04874	21522.1	9.6	P050472	65.0%	3.1%	42.0%	11.1%			5.0%	9.8%				
	DNF	G04507	25777.8	3.7	P050472	64.0%	6.2%	76.6%	3.2%			36.0%	10.1%				

Clasificado como TPO2 según la tabla 5.1

Clasificado como TPO según la tabla 6.1

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

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

Tabla 5.1 Tipos de gel con intervalos de parámetros

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

Tabla 5.2 Tipos de gel de ejemplos de realización preferidos

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

Tabla 6.1

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

Tabla 6.2.

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

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

Según las suposiciones realizadas en los procedimientos, el módulo de almacenamiento de 20 kPa corresponde aproximadamente a una anchura de malla de 6 nm y, por lo tanto, debería permitir la accesibilidad estérica de todas las moléculas de señalización estructuralmente similares enumeradas en el presente documento en los hidrogeles.

Tabla 7

Denominación	Concentración / pg/ml
FGF-2	550
TGFβ1	4047
bNGF	29500
FEAG	11986
FGH	30600
PDGF-BB	26000
PLGF	9971
VEGF-A	48290
Eotaxina	2500
GRO-alfa	9500
IL-8	12386
IP-10	8800
MCP-1	6500
MIP-1 alfa	6400
MIP-1 beta	13500
RANTES	3600
SDF-1 alfa	39800
GM-CSF	41000
IFN-gamma	50700
IL-1beta	8250
IL-10	9250
IL-12p40	13500
IL-4	36200
IL-6	44368
TNF-alfa	31363
Esclerostina	13300
DKK1	864

En la tabla 7 se enumeran sustancias de los grupos de sustancias A y B en concentraciones relevantes en los biofluidos.

Por ejemplo, se ha demostrado que los hidrogeles de ENC1-EC1 01 según la tabla 1 (AB1) son especialmente ventajosos para ajustar las concentraciones de diferentes moléculas de señalización (véase la tabla 3). La clase de quimiocinas presenta una alta similitud estructural de la estructura terciaria, que se estabiliza mediante la interacción de cuatro cisteínas a través de puentes de disulfuro (correspondiente a PROSITE ID: PS00471 y PS00472). Además,

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

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

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

En el presente documento se divulga un tipo de hidrogel ENC 1-EC2 02 (véase la tabla 2), que, excepto por la unión más reducida de las dos quimiocinas MIP-1 alfa y MIP-1 beta y esclerostina (aproximadamente el 40% cada una, tabla 3) y la unión más ventajosamente reducida de IL-10 (15%), IL-6 (8%), TNF alfa (25%), véase la tabla 3, y la aún más ventajosamente casi nula unión de FGF-2 (5%) y TGF β 1 (0%) y la falta de interacción de EC2 con las enzimas de coagulación de la sangre trombina y antitrombina (véase Uwe Freudenberg et al., "Journal of Controlled Release", Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society 220, N° Parte A (28 de diciembre de 2015): 79-88, doi:10.1016/j.jconrel. 2015.10.028) presenta un patrón de unión o secuestro casi idéntico al tipo de hidrogel ENC1:EC1 01 (véase la tabla 3). Otro ejemplo de realización ventajoso lo representa ENC2-EC5 23 (AB 23, véase la tabla 1), que, al igual que AB 2, presenta una característica de carga que puede asignarse al tipo 2 según la tabla 5.1, pero con un contenido de sulfonato ligeramente diferente de 0,14 mmol/ml (tabla 1 o tabla 5.2 columna B) y un número ligeramente diferente de grupos sulfonato por unidad de repetición (UR) dividido por la masa molar (MW) de la UR en [mol/g] de 0,0038, aunque ambos parámetros se encuentran en la tabla 5.1 dentro del marco especificado para un hidrogel del tipo 2. Sin embargo, el hidrogel se formó a partir de otro elemento constituyente de gel sintético cargado (EC5) con otra reacción de reticulación (tipo de reticulación 2, tabla 1) y, aparte de la unión ligeramente más fuerte de las dos quimiocinas MIP-1 alfa y MIP-1 beta, presenta un patrón de unión o, respectivamente, de secuestro casi idéntico que el AB 2 (véase la tabla 3). Esto confirma la clasificación de los hidrogeles con los patrones de carga característicos según la tabla 5.1 y también representa un patrón de secuestro particularmente ventajoso.

En el presente documento también se divulga un tipo de hidrogel ENC1-EC3 03 (véase la tabla 2), que debido a la concentración significativamente inferior de grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel (tabla 5.2, columna B, 0,06 en comparación con 0,12 mmol/ml para AB 1 o AB 2) y también el número más reducido de grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato por UR dividido por la masa molar de la UR de 0,0019 en comparación con 0,005 o 0,0035 para AB 1 o AB 2 (véase la tabla 5.2, columna A) en comparación con AB 1 y AB 2 presenta una unión considerablemente más reducida a muchas proteínas (moléculas de señalización).

En este tipo de hidrogel, bNGF, PDGF-BB y VEGF A, eotaxina, GRO-alfa, IP-10, Rantes, SDF-1 alfa, IFN-gamma e

IL-4 se unen en más del 50% al hidrogel y por lo tanto se empobrecen en un biofluido, mientras que IL-8, MCP-1 e IL-12p40 se unen solo aproximadamente el 45% (véase la tabla 3), HGF, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, IL-1 beta, IL -10, IL -6, TNF alfa y DKK1 solo de forma reducida con el 16-36% (véase la tabla 3) y FGF-2, TGFb1, EGF, PLGF, GM-CSF y esclerostina casi no se unen (< 12%) (véase la tabla 3) y, por lo tanto, la mayor parte de las moléculas de señalización se unen al hidrogel en una cantidad significativamente inferior que AB 1 y AB 2. Con este tipo de gel es posible, por ejemplo, una separación muy selectiva de bNGF, PDGF-BB y VEGF A, eotaxina, GRO-alfa, IP-10, Rantes, SDF-1 alfa, IFN-gamma e IL-4 de cualquier biofluido.

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

En particular, con este hidrogel se produce un empobrecimiento de todos los factores investigados y estructuralmente similares (IEP y la presencia de similitudes estructurales), especialmente de la clase de las quimiocinas, que presentan una alta similitud estructural de la estructura terciaria, que están caracterizados por la interacción de cuatro cisteínas a través de puentes de disulfuro (correspondientes a PROSITE ID: PS00471 y PS00472), por una carga neta fuertemente positiva IEP > 9 o dominios cargados positivamente tales como en el caso de MIP1 alfa y MIP1 beta y un peso molecular inferior a 10 kDa (véanse las propiedades de proteínas de la tabla), FGF-2 (IEP 9,58), TGFb1 (IEP 8,59), así como proteínas estructuralmente similares de la familia FGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00247), la familia TGF (correspondiente a PROSITE ID: PS00250), así como moléculas de señalización asignadas a la clase de las citocinas con un IEP ligeramente básico tales como IL-10 (IEP 7,65), así como moléculas de señalización con un IEP en el intervalo neutro (pH 5,5-7) tales como IL1β, IL6 y TNF y proteínas estructuralmente similares de la familia de proteínas IL-1β (correspondiente a PROSITE ID: PS00253) y la familia de proteínas IL-10 (correspondiente a PROSITE ID: PS00520) de biofluidos adyacentes. Otro ejemplo de realización ventajoso, ENC2-EC4 20 (véase la tabla 1), que presenta una característica de carga que se puede asignar al tipo 4 según la tabla 5.1, al igual que el AB 4, que presenta el mismo EC5, véase la tabla 5.1 columna A: 0,0045, pero que presenta una concentración de sulfonato más reducida de 0,16 mmol/ml, que todavía puede asignarse al marco del tipo 4 (véase la tabla 1 y la tabla 5.1), pero que se formó, a este respecto, con una reacción de reticulación diferente (RR: 2 en la tabla 1), presenta un patrón de unión o de secuestro casi idéntico al del ENC1-EC4 04 (véase la tabla 3). Este hallazgo también confirma el poder predictivo eficaz de las características de carga de los tipos 1-5 según la tabla 5.1 para el secuestro diferenciado de sustancias o grupos de sustancias.

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

Simultáneamente, sin embargo, mediante una precarga específica de los hidrogeles de los tipos 1 a 3 de la tabla 5, se pueden liberar selectivamente factores individuales en el biofluido, de forma paralela e independiente del secuestro y, por tanto, del empobrecimiento de los otros factores. Por lo tanto, con los distintos tipos de hidrogel se puede ajustar casi cualquier nivel de moléculas de señalización individuales en biofluidos complejos mediante la precarga específica de los hidrogeles o si no el secuestro (empobrecimiento) casi cuantitativo de las moléculas de señalización (por ejemplo, uso para la separación de moléculas de señalización de cualquier solución que contenga proteínas).

Sobre la base de ENC1-EC1 01 a ENC2-ENC3 26 se pueden observar las siguientes relaciones entre las propiedades de las proteínas, las propiedades del hidrogel y la unión de las proteínas en la red del hidrogel, que son importantes para la descripción de la invención: Una fuerte unión de las moléculas de señalización según la tabla 3 se correlaciona con una carga neta positiva en el lado de las proteínas (y, a este respecto, con un IEP básico elevado como parámetro correspondiente) e inversamente con el peso molecular (un IEP alto y un peso molecular reducido potencian la unión), véase la tabla 3, las quimiocinas cargadas de forma fuertemente positiva y al mismo tiempo relativamente pequeñas (< 9 kDa) son las que más fuertemente se unen y en el lado de las redes de hidrogel actúa una (1) alta concentración de grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel (tabla 1 y 5.2, columna B) y (2) un número elevado de grupos sulfato o, respectivamente, sulfonato por UR dividido por la masa molar de la UR que potencia la unión de las moléculas de señalización. Según estos parámetros, se obtiene para los hidrogeles el siguiente orden de la unión más fuerte ENC1-EC4 04 ≈ ENC2-EC4 20 < ENC1-EC1 01 < ENC 1-EC2 02 ~ ENC2-EC5 23 < ENC1-EC3 03 << ENC2-ENC3 26 a la unión más débil; este hallazgo está respaldado por los valores de unión encontrados experimentalmente (véase la

tabla 3). Además, mediante diferentes combinaciones de los dos parámetros de la red de hidrogel (1) y (2) mencionados anteriormente también se pueden ajustar interacciones fuertes entre proteínas y polielectrolitos cargados negativamente (por ejemplo glucosaminoglicanos) que se conocen en la literatura como "interacciones específicas", es decir, una coincidencia espacial de los diferentes centros de interacción, y, por lo tanto, pueden utilizarse también en el lado de las proteínas otras propiedades estructurales aparte del peso molecular y la carga neta para modular la unión a los hidrogeles. Estas relaciones también explican la reducida unión de las moléculas de señalización fuertemente básicas y relativamente pequeñas FGF-2, TGFb1 y PLGF a los tipos de hidrogel ENC1-EC1 01, ENC1-EC2 02, ENC1-EC3 03 y ENC1-EC4 04.

Otras opciones de control de los niveles de moléculas de señalización solubles consisten en el uso secuencial o combinado de los diferentes tipos de hidrogel para ajustar con precisión una amplia diversidad de propiedades específicas de secuestro y liberación. Mediante la variación selectiva de las propiedades de la red (en particular los parámetros (1) y (2) descritos anteriormente y también la combinación de micropartículas de hidrogel de diferente composición (por ejemplo, carga con moléculas de señalización individuales) en los denominados materiales de hidrogel multifásicos (es decir, mediante el mezclado de tipos de hidrogel de diferentes tipos o precarga con moléculas de señalización o proteínas) también se pueden ajustar otras relaciones de concentración ventajosas en biofluidos adyacentes.

Al ampliar el análisis a otras moléculas de señalización, el procedimiento propuesto también permite el control de la concentración de estas sustancias en cualquier biofluido.

Para poder controlar eficazmente las funciones biológicas complejas de las moléculas de señalización, por ejemplo para conceptos terapéuticos, además de la liberación mantenida de moléculas de señalización individuales a partir de hidrogeles precargados con las moléculas de señalización, es necesaria una gestión activa de diversas moléculas de señalización del entorno biológico inmediato de las células o, respectivamente, de la aplicación biológica. Por lo tanto, las interacciones con una pluralidad de moléculas de señalización relevantes deben considerarse de manera integral. Si los hidrogeles con componentes sulfatados o sulfonados se cargan, por ejemplo, con una molécula de señalización para una liberación mantenida, pueden secuestrarse y, por lo tanto, inactivarse otras moléculas también terapéuticamente importantes del entorno biológico al mismo tiempo que se produce la liberación terapéuticamente deseada de las moléculas de señalización, es decir, puede obtenerse un efecto secundario no deseado. Por otra parte, no obstante, también pueden secuestrarse y, por lo tanto, inactivarse específicamente moléculas de señalización terapéuticamente no deseadas en el hidrogel que porta grupos sulfatados o, respectivamente, sulfonados. En general, son posibles escenarios de liberación y secuestro muy complejos, que en su conjunto determinan el efecto biológico, en particular las propiedades de separación molecular, de los materiales.

También se divulga en el presente documento el uso de hidrogeles correspondientes a los tipos 1-4 de la tabla 5 para modular la concentración o, respectivamente, el nivel de proteínas biológicamente activas en niveles generales reducidos.

Una ventaja clave del proceso es la universalidad de sus posibilidades de uso. El procedimiento puede utilizarse ventajosamente tanto para la purificación biotecnológica como para la separación de mezclas de proteínas de biofluidos o en los mismos mediante el uso de hidrogeles con componentes sulfatados o, respectivamente, sulfonados.

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

Durante la cicatrización de heridas, las quimiocinas, en su mayor parte con actividad proinflamatorias (por ejemplo, eotaxina, GRO-a, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-3, MCD, Rantes y SDF-1) se secuestran dentro de los hidrogeles, mientras que los factores prorregenerativos (por ejemplo, EGF, FGF-2, TGFb1, IL-10, HGF y PLGF) permanecen en gran medida inalterados.

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

En un sentido más amplio, el uso según la invención de los hidrogeles con componentes sulfatados o, respectivamente, sulfonados permite una purificación selectiva de las moléculas de señalización examinadas en el presente documento o estructuralmente similares a partir de mezclas de proteínas complejas. Por lo tanto, los sistemas de gel descritos pueden utilizarse biotecnológicamente para la purificación selectiva de proteínas a partir de lisados celulares de origen microbiano o eucariota. A este respecto, dichos lisados celulares se hacen pasar a través de hidrogeles según la invención para unir las moléculas de señalización. En una segunda etapa, las sustancias unidas se pueden eliminar

de nuevo de los hidrogeles y, por lo tanto, separarse de los mismos, para su uso posterior enjuagándolas con soluciones con alto contenido de sal o polielectrolitos cargados positivamente (por ejemplo, quitosano). Además, una selección negativa para la separación de las moléculas de señalización que se unen de forma reducida a los hidrogeles de los tipos 1-3 en las condiciones mencionadas, por ejemplo, EGF, FGF-2, TGF- β , IL-10, HGF y PLGF, es posible mediante la utilización de sobrenadantes después de 24 horas de unión.

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

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

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

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

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

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

Mediante el uso de los ejemplos 04 - 5, es posible, sorprendentemente, producir hidrogeles totalmente sintéticos con todo un abanico de propiedades y combinaciones de propiedades ventajosas sin reacciones inmunogénicas adversas. Se puede ajustar en gran medida independientemente entre sí una amplia concentración de grupos sulfonato en el hidrogel hinchado de 0,04 a 0,28 mmol/ml y una variación igualmente grande del módulo de almacenamiento de 0,2 a 21,8 kPa. Por ejemplo, los hidrogeles ENC2-EC4 21, ENC1-EC5 14, ENC1-EC5 15 y ENC1-EC4 08 presentan una concentración constante de grupos sulfonato en el hidrogel hinchado de 0,08 mmol/ml pero al mismo tiempo módulos de almacenamiento crecientes de 1,1, 5,5, 12,5 y 19,6 kPa, es decir, la concentración de sulfonato y la rigidez de los hidrogeles se pueden modular independientemente entre sí en un amplio intervalo. También, con la selección del ENC1-EC5 19 con una concentración de sulfonato de 0,05, del ENC1-EC4 11 con una concentración de sulfonato de 0,06 y del ENC1-EC4 10 con una concentración de sulfonato de 0,09 con un módulo de almacenamiento casi constante de 8,0-8,5 kPa, la concentración de sulfonato se puede variar independientemente de la rigidez de los hidrogeles (véase la tabla 1). Además, mediante una variación adicional de las relaciones molares ENC:EC en los intervalos de entre 1,5 y 3, así como de entre 3 y 6 para RR1 y de entre 0,5 y 0,75, así como 1 y 1,5, así como 1,5 y 2 para RR2 y otro variación de la concentración de EC y ENC, se puede obtener una pluralidad de otras combinaciones de propiedades.

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

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

También se divulgan hidrogeles de tipo 1 (ENC1-EC1 01), tipo 4 (ENC1-EC4 20), tipo 2 (ENC1-EC5 23) y tipo 5 no cargados (ENC1-ENC3 26) utilizados para la polimerización de células estromales mesenquimales humanas. Los hidrogeles respondían a las células, es decir, además de la funcionalización de los hidrogeles con el péptido mediador de la adhesión CWGRGDSP, se preconjugó con el respectivo elemento constituyente no cargado la secuencia peptídica GCGGPQGIWGQGGCG, que podía escindir-se enzimáticamente mediante metaloproteasas de matriz secretadas por estas células, y se utilizó para la reticulación según RR2. Después de 24 horas, se caracterizó la actividad metabólica de las células embebidas como prueba de viabilidad por medio de una prueba PrestoBlue®. A este respecto, la actividad metabólica, medida como unidades de fluorescencia relativa, de las células estromales mesenquimales humanas polimerizadas dentro del hidrogel de tipo 1 era de 7112 ± 3924 , del tipo 2 de 3704 ± 2945 , del tipo 4 de 3160 ± 6023 y del tipo 5 no cargado de 2316 ± 446 . En consecuencia, las células estromales mesenquimales humanas embebidas en geles de tipo 2, mostraron la mayor actividad metabólica y, las embebidas en geles del gel de referencia no cargado, la más reducida. Los hidrogeles, especialmente los de tipo 2, resultaron ser especialmente ventajosos para el cultivo en 3D de células estromales mesenquimales humanas vivas.

También se divulgan ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20, ENC2-EC5 23, ENC2-ENC3 26 funcionalizados con el antibiótico gentamicina que porta grupos cargados positivamente mediante secuestro diferenciado. Después, se midió la inhibición mediante la liberación de la gentamicina de los diferentes hidrogeles utilizando las dos cepas bacterianas patógenas relevantes que provocan enfermedades, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus epidermidis* (*Staph. epidermidis*). El efecto antimicrobiano se midió por el tamaño de la zona de inhibición (eliminación del hidrogel en la placa de cultivo, véase Material y procedimientos). Para los hidrogeles de los tipos ENC1-EC1 01, ENC2-EC4 20, ENC2-EC5 23, ENC2-ENC3 26 sin secuestro previo de gentamicina no se detectaron zonas de inhibición, es decir, los hidrogeles no tenían efecto antimicrobiano. En el caso del secuestro diferenciado previo de gentamicina por los hidrogeles, se midieron las siguientes zonas de inhibición graduadas: ENC1-EC1 01: $3,08 \pm 0,33$ mm, ENC2-EC4 20 *E. coli*: $3,08 \pm 0,33$ mm, *S. epidermidis*: $2,94 \pm 0,35$ mm, ENC2-EC4 20: *E. coli*: $1,78 \pm 0,27$ mm, *S. epidermidis*: $1,76 \pm 0,45$ mm; ENC2-EC5 23 *E. coli*: $2,18 \pm 0,38$ mm, *S. epidermidis*: $1,81 \pm 0,51$ mm y para los geles de referencia no cargados ENC2-ENC3 26 *E. coli*: $0,48 \pm 0,36$ mm, *S. epidermidis*: $0,90 \pm 0,28$ mm. Por lo tanto, en los geles de referencia no cargados ENC2-ENC3 26, como era de esperar, solo se secuestran de forma inespecífica cantidades mínimas de gentamicina y después se liberan de nuevo. Para los otros hidrogeles, se podría encontrar un efecto antimicrobiano graduado en el orden ENC2-EC4 20 < ENC2-EC5 23 < ENC1-EC1 01. Este hallazgo respalda las afirmaciones sobre el secuestro diferenciado de moléculas de principio activo cargadas positivamente. Además, se pueden ajustar diferentes efectos antimicrobianos variando la concentración de secuestro de gentamicina.

Material y procedimientos:

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

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

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

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

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

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

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

El peso molecular y el número de grupos sulfonato por unidad de repetición o, respectivamente, por mol de polímero de EC4 y EC 5 (poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico)) se basan en la información del fabricante (Sigma-Aldrich, N° del fabricante: 434566, Alemania).

El peso molecular y la estructura de ENC1, ENC2, ENC3, PEG de cuatro brazos terminado en amino, tiol o maleimida se basan en la información del fabricante (Jenkem technology, Estados Unidos). El peso molecular y la estructura de ENC4 (PEG de cuatro brazos terminado en un péptido escindible enzimáticamente) se realiza según el procedimiento tal como se describe, se produce y se utiliza por Tsurkan et al. 2013 (Adv. Mater. 2013, 25, 2606-2610).

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

Para la activación de EC1 a EC3, se añadieron EDC y sulfo-NHS (relación 2:1 de EDC:sulfo-NHS) al EC disuelto (4 moles de sulfo-NHS, 8 moles de EDC por mol de ENC1 de la mezcla de reacción terminada) y se incubaron según los tiempos indicados en la tabla 4 a 4°C. Después del tiempo de activación de EC1, EC2, EC3, se añadió adicionalmente

el PEG de 4 brazos terminado en amino (ENC1) disuelto y se mezcló durante 30 segundos a 500 rpm con un mezclador de vórtice (IKA, Alemania).

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

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

Producción de hidrogeles para cultivo celular con células endoteliales humanas:

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

Cultivo de células:

Se hicieron pasar células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC, Lonza, Alemania) en matraces de cultivo celular recubiertos con fibronectina en Promocell C-22010 con una mezcla complementaria (PromoCell GmbH, Alemania) a 37 °C y 5% de CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. En experimentos posteriores se utilizaron células de los pases 2 a 6.

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

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

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

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

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

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

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

Para este estudio se utiliza una columna BioSEP-SEC S2000 de Phenomenex (Alemania), que se inserta en el sistema HPLC Agilent 1100 (Alemania). Como eluyente se utiliza una solución salina tamponada con fosfato con un caudal de 0,5 ml/min. El volumen de inyección es de 50 μ l.

La determinación de los grupos maleimida se lleva a cabo también en las mismas condiciones de elución. A este respecto, se mezclan 35 μ l de una concentración de RGD con 35 μ l de la solución de derivado de maleimida EC4/EC5 en el recipiente de muestra. El procedimiento permite la determinación exacta de la conversión de maleimida a EC4 o EC5.

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

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

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

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

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

Cultivo de células:

Se cultivaron células estromales mesenquimales (MSC, ATCC, aisladas de tejido adiposo, Alemania) en DMEM con suero de ternera fetal al 10 % y penicilina/estreptomycin al 1% en condiciones de cultivo estándar (5% de CO_2 y 37 °C). En los experimentos se utilizaron MSC de los pases 2 a 4.

Se mezclaron derivados de EC4 o EC5 y los ENC con 1 mol de CGWGGRGDSP por mol de EC y se disolvieron en

solución salina tamponada con fosfato (la concentración de los derivados de EC4 o EC5 correspondió a 3 veces la concentración según la tabla 1). Después del mezclado, la solución se incubó durante 10-15 minutos a 37 °C y a continuación se mezcló una suspensión celular concentrada en un tercio del volumen final del gel con 6×10^6 células/ml extrapoladas a la mezcla de reacción final. El ENC4 (3 veces la concentración de la tabla 1) se disolvió en un tercio adicional del volumen total del gel en solución salina tamponada con fosfato y se añadió a la mezcla de derivados de EC4/5 con células y se mezcló mediante pipeteo. Después de la formación del gel durante 5 minutos, se añadió el medio de cultivo celular descrito anteriormente y los hidrogeles se incubaron durante 24 h a 37 °C tal como se ha descrito anteriormente.

Prueba PrestoBlue®: la prueba PrestoBlue® se realiza después de un tiempo de incubación de 24 h después de llevar a cabo el cultivo de las células en los hidrogeles. Para ello se añade una solución de colorante PrestoBlue® al 10% disuelto en medio de cultivo celular a cada muestra de hidrogel y se incuba en placas de microvaloración durante 1 h a 37 °C. A continuación se realiza la medición de la fluorescencia en un fotómetro de microplacas (Tecan Spark®, Alemania). La longitud de onda de excitación es de 560 nm y la medición de la fluorescencia se realizó a una longitud de onda de 590 nm. La actividad metabólica de las células se indicó mediante los valores relativos de fluorescencia (RFU). Se evaluaron 10 experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado ($n = 40$) y se encontraron diferencias significativas (anova unidireccional) para todas las condiciones.

Prueba de zona de inhibición antibacteriana:

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

Determinación de las propiedades físico-químicas de los hidrogeles:

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

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

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

véase la tabla 1.

Los datos notificados se obtienen mediante promediación (Pr) de, en cada caso, al menos cuatro muestras independientes. Adicionalmente se notificó la desviación estándar (SD).

Además, el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida de los hidrogeles se determinaron mediante reometría oscilatoria (en kilopascales) utilizando un reómetro de tipo Ares de la empresa TA Instruments, Reino Unido. Para ello se punzonaron discos de 8 mm de hidrogeles hinchados en condiciones fisiológicas (solución salina tamponada con fosfato (PBS), NaCl al 0,9% tamponado a pH 7,4 (Sigma-Aldrich, Alemania)) durante 24 h y se midieron en una disposición de medición placa-placa de 9 mm con frecuencia creciente de 1 a 100 rad/s a temperatura ambiente con una deformación reducida (2%) y se determinó el valor promedio a lo largo del intervalo de frecuencia (1 valor de medición en una muestra). Los valores notificados son los valores promedio de cuatro discos de hidrogel independientes y se indican como +/- la desviación estándar (SD). El módulo de almacenamiento de los cuatro tipos de hidrogel se proporcionó en la tabla 1, el módulo de pérdida fue de varios órdenes de magnitud inferior en cada caso

(datos no mostrados).

La tabla 1 muestra las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles.

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

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

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

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

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

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

- 40 La tabla 4 muestra el tiempo de activación de los grupos carboxilo de EC1 a 4 en minutos y el volumen de gel utilizado para los estudios de unión.

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

- 50 La concentración de los grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel no hinchado se calculó a partir de la concentración de EC en el hidrogel no hinchado x número de unidades de repetición x número de grupos sulfato o sulfonato por unidad de repetición. La concentración de grupos sulfato o sulfonato en el gel hinchado (tabla 1) se calculó a partir de la concentración de grupos sulfato o sulfonato en el hidrogel no hinchado dividida por el hinchamiento (véase la tabla 1). Los ensayos de extracción no dieron como resultado ninguna elución medible de los elementos constituyentes del gel, por lo que se considera justificado el supuesto de la incorporación completa de los elementos constituyentes del gel.

- 60 En la tabla 3 se indican las cantidades porcentuales de moléculas de señalización en los hidrogeles normalizadas a la concentración de factores solubles antes de la incubación, tal como se ha explicado anteriormente. Los datos en porcentaje se refieren a porcentajes en masa.

El tamaño molecular de las sustancias, también denominadas sustancias de señalización o factores, se expresa en kilodaltons (kDa).

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

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

10 Los parámetros estructurales de las proteínas se determinaron utilizando el banco de datos ExPASy PROSITE basándose en los números de identificación UniProt (<http://prosite.expasy.org/>; Sigrist, CJA et al. New and continuing developments at ExPASy PROSITE; Referencias: (1) Nucleic Acids Res. 41, (2013)); (2) Sigrist, CJA et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. Brief. Bioinform. 3, 265-274 (2002)).

15

REIVINDICACIONES

1. Material de hidrogel reticulado covalentemente, basado en elementos constituyentes cargados en forma de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y elementos constituyentes no cargados en forma de polímeros que contienen grupos amina o grupos tiol o moléculas reticulantes con al menos dos grupos amino o grupos tiol, en el que los elementos constituyentes cargados y no cargados están reticulados para formar una red polimérica, que se puede obtener mediante la activación de los grupos carboxilo del poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con EDC/sulfo-NHS y o bien una reticulación directa con los polímeros que contienen grupos amina o las moléculas reticulantes con los, al menos dos, grupos amino, en cada caso con formación de amida o bien una funcionalización de los grupos carboxilo activados mediante moléculas reticulantes bifuncionales, que contienen cada una un grupo amino y un grupo capaz de una adición de tipo Michael, y la posterior reticulación con los polímeros que contienen grupos tiol o las moléculas reticulantes con al menos dos grupos tiol, en cada caso mediante adición de tipo Michael.
2. Material de hidrogel reticulado covalentemente según la reivindicación 1, caracterizado por que el grupo capaz de una adición de tipo Michael se selecciona de entre grupos maleimida, vinilsulfona o acrilato.
3. Material de hidrogel reticulado covalentemente según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que los polímeros que contienen grupos amina y grupos tiol se seleccionan como elementos constituyentes no cargados de la clase de polietilenglicoles (PEG), poli(2-oxazolina) (POX), polivinilpirrolidonas (PVP), poli(alcoholes vinílicos) (PVA) y/o poliarilamidas (PAM), y por que las moléculas reticulantes que contienen grupos amina o grupos tiol son moléculas reticulantes bifuncionales no poliméricas.
4. Material de hidrogel reticulado covalentemente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que como elemento constituyente cargado se selecciona poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) con relaciones molares variables de ácido 4-estirenosulfónico a ácido maleico en el intervalo de 6:1 a 1:6 y masas molares en el intervalo de 5.000 a 100.000 g/mol.
5. Material de hidrogel reticulado covalentemente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que como elementos constituyentes no cargados para la formación de la red polimérica se utilizan polímeros con péptidos conjugados escindibles enzimáticamente, que presentan lisina o cisteína como aminoácido reactivo en la secuencia peptídica.
6. Material de hidrogel reticulado covalentemente según la reivindicación 5, caracterizado por que los péptidos escindibles enzimáticamente pueden escindirse mediante proteasas humanas o bacterianas, en particular MMP, catepsinas, elastasas, aureolisina y/o enzimas de coagulación de la sangre.
7. Material de hidrogel reticulado covalentemente según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que moléculas bioactivas y/o antiadhesivas con un grupo amino o un grupo carboxilo y/o péptidos instructivos de células están unidos al elemento constituyente cargado poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) o a sus derivados con grupos capaces de una adición de tipo Michael a través de lisina o cisteína en la secuencia con formación de un enlace covalente a la red de hidrogel.
8. Material de hidrogel reticulado covalentemente según la reivindicación 7, caracterizado por que las moléculas bioactivas son sustancias antimicrobianas, por ejemplo antibióticos o antisépticos, o principios activos farmacéuticos.
9. Material de hidrogel reticulado covalentemente según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que las moléculas antiadhesivas son polietilenglicoles (PEG) o poli(2-oxazolin) (POX).
10. Material de hidrogel reticulado covalentemente según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que los péptidos instructivos de células son péptidos derivados de proteínas estructurales y funcionales de la matriz extracelular, tales como, por ejemplo, colágeno, laminina, tenascina, fibronectina y vitronectina.
11. Material de hidrogel reticulado covalentemente según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por que los péptidos bioactivos y/o antiadhesivos y/o instructivos de células están unidos covalentemente a las redes de hidrogel a través de secuencias peptídicas escindibles enzimáticamente.
12. Material de hidrogel reticulado covalentemente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que el material de hidrogel tiene un módulo de almacenamiento de 0,2 a 22 kPa.
13. Material de hidrogel físicamente reticulado, basado en interacciones físicas entre elementos constituyentes cargados en forma de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-ácido maleico) y elementos constituyentes no cargados en forma de polímeros, en el que secuencias peptídicas cargadas de forma fuertemente positiva están conjugadas con los polímeros.
14. Hidrogeles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en la gestión *in vivo* de factores para controlar la angiogénesis, enfermedades inmunitarias, cánceres, diabetes, enfermedades neurodegenerativas,

enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide o cicatrización de heridas cutáneas y regeneración ósea.

- 5 15. Uso de hidrogeles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el cultivo *in vitro* de células y órganos de células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes inducidas (iPS), así como otras células madre y progenitoras no asignadas a células ES e iPS, células primarias derivadas de pacientes, líneas celulares inmortalizadas, así como tejido cardíaco, muscular, renal, hepático y nervioso.

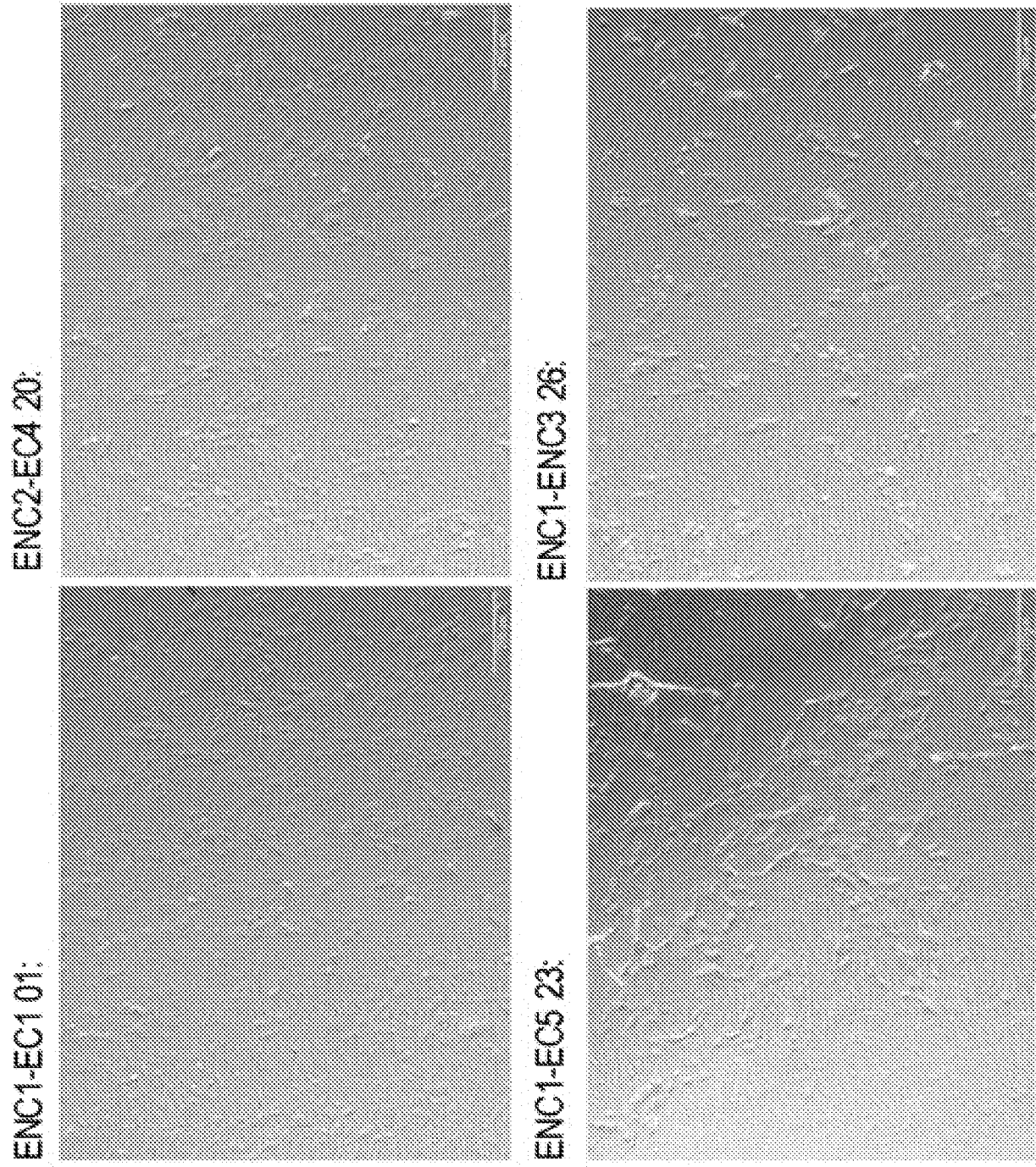


Fig. 1