

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 509**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/DE2015/100130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15149753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15716726 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3126489**

54 Título: **Sistema de hidrogel autoorganizante físico para aplicaciones biotecnológicas**

30 Prioridad:

01.04.2014 DE 102014104566

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

22.02.2019

73 Titular/es:

**LEIBNIZ-INSTITUT FÜR POLYMERFORSCHUNG
DRESDEN E.V. (50.0%)**

Hohe Strasse 6

01069 Dresden, DE y

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (50.0%)

72 Inventor/es:

THOMPSON, MICHAEL;

WIEDUWILD, ROBERT;

REDDAVIDE, FRANCESCO;

TSURKAN, MIKHAIL;

ANDRADE, HELENA;

WERNER, CARSTEN y

ZHANG, YIXIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 701 509 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

Sistema de hidrogel autoorganizante físico para aplicaciones biotecnológicas

La invención se refiere a un sistema de hidrogel autoorganizante físico para aplicaciones biotecnológicas. La formación de hidrogel tiene lugar aquí con cinética controlada basada en una interacción proteína-ligando.

5 La interacción avidina/estreptavidina-biotina es el par proteína-ligando utilizado más frecuentemente en la biotecnología. Por ejemplo, se utilizan biomateriales basados en la interacción avidina/estreptavidina-biotina en el cultivo de células o para la liberación controlada de sustancias activas. Hasta la fecha, en la investigación se han utilizado reacciones químicas para incorporar biotina o estreptavidina a un material o una superficie. Recientemente, se ha desarrollado un sistema de hidrogel covalente que está combinado con una reacción fotoquímica bifotónica.
10 Este método permite incluir sustancias biotiniladas en matrices tridimensionales. Para muchas aplicaciones basadas en células, los métodos que prescinden de reacciones químicas son ventajosos a la hora de integrar funciones biológicas.

No obstante, las reacciones químicas son difíciles de controlar en una región extensa y poco fructíferas. Aparte de esto, también es muy difícil formar un hidrogel físico que, por ejemplo, se base en una interacción
15 avidina/estreptavidina-biotina, ya que cuando se reúnen estos componentes a menudo tienden a formar precipitados y aglomerados.

A partir de la publicación de Huaping Tan *et al.*: "Injectable Nanohybrid Scaffold for Biopharmaceuticals Delivery and Soft Tissue Engineering", *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, n.º 23, 13 de diciembre de 2012 (2012-12-13), páginas 2015-2022, XP055200555, ISSN: 1022-1336, DOI: 10.1002/marc.201200360; son conocidos
20 materiales de soporte de hidrogel de nanofibras para encapsular células y para su uso en la tecnología tisular. Estos materiales se preparan por conjugación de extremos de biotina, que están unidos a moléculas de PEG, a grupos de estreptavidina de ácido hialurónico funcionalizado con estreptavidina.

En la publicación de Liu Y. *et al.*: "Biodegradable PEG hydrogels cross-linked using biotin-avidin interactions", *Australian Journal of Chemistry* 2010 CSIRO AUS, vol. 63, n.º 10, 2010, páginas 1413-1417, XP008176911, DOI: 10.1071/CH10168; se describen hidrogeles de PEG biológicamente degradables que están reticulados entre sí
25 por interacciones biotina-avidina.

En la publicación de Børsting C. *et al.*: "SNP typing on the NanoChip electronic microarray", *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Inc., US, vol. 297, 1 de noviembre de 2004 (2004-11-01), páginas 155-167, XP001248547, ISSN: 1064-3745; se da a conocer un protocolo de tipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) desarrollado para una micromatriz electrónica de nanochips. En este caso, la matriz de nanochips
30 consta de cien electrodos que están cubiertos con una delgada capa de hidrogel que contiene estreptavidina. Se puede aplicar una corriente eléctrica a uno, varios o todos los electrodos al mismo tiempo. El ADN biotinilado se alinea a lo largo de los campos electrónicos y se une a la estreptavidina de la capa de hidrogel.

A partir del documento WO 2012/155110 A1 se conocen microgeles y microtejidos para su empleo en la tecnología tisular. En particular, se describe un dispositivo de microencapsulación para preparar microgeles y/o microtejidos mediante una tecnología de emulsión. Además, se exponen métodos para preparar estructuras altamente ordenadas que imitan estructuras de tejido *in vivo*.
35

A partir de la publicación de Hiroyuki Inoue *et al.*: "Disintegration of Layer-by-Layer Assemblies Composed of 2-Iminobiotin-Labeled Poly(ethyleneimine) and Avidin", *Biomacromolecules*, vol. 6, n.º 1, 1 de enero de 2005 (2005-01-01), páginas 27-29, XP055211842, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm0495856; se describe una película delgada estructurada en capas, preparada a partir de avidina y una polietilenimina marcada con 2-iminobiotina (ib-PEI), y se estudia su sensibilidad frente al valor de pH del entorno y la biotina.
40

Es misión de la invención crear condiciones que eviten la generación de pequeñas partículas de polímero y posibiliten la formación de un hidrogel coherente o una biopelícula.

45 La solución de la misión de la invención consiste en un sistema de hidrogel autoorganizante físico para aplicaciones biotecnológicas según la reivindicación 1. El mismo está constituido por una red no covalente basada en una interacción proteína-ligando y comprende como ligando biotina o uno de sus derivados, estando la biotina o uno de sus derivados conjugado covalentemente en cada caso a un extremo de una cadena polimérica de un oligonucleótido de filamento sencillo o doble, y como proteína una proteína tetramérica, ascendiendo el contenido de sólidos referido al hidrogel en su totalidad al menos a 3% en masa, preferiblemente al menos a 4% en masa, y estando reticulados los conjugados por la proteína tetramérica. Según la invención, se prevé una proporción de mezcla, como proporción de equivalentes entre la proteína y el número de extremos biotinilados terminales de las cadenas poliméricas en el conjugado biotina-polímero, de 1:2 a 1:8. Se prefiere una proporción de equivalentes de 1:4, lo que corresponde, en el caso de dos extremos terminales por cadena polimérica, a una proporción molar 1:2
50 entre proteína y conjugado polímero-biotina. Como proteína tetramérica que reticula el conjugado se prevé, preferiblemente, avidina, estreptavidina o una mutante de estas proteínas. Es especialmente ventajoso un contenido de sólidos de al menos 6% en masa, preferiblemente al menos 9% en masa. Como proteína tetramérica que reticula
55

el conjugado se prevé, preferiblemente, avidina, estreptavidina o una mutante de estas proteínas. Por lo tanto, preferiblemente ninguna de estas proteínas debe estar unida covalentemente entre sí.

5 La reticulación está regulada por los procesos de las interacciones fisicoquímicas entre las cadenas poliméricas. Sorprendentemente, el diseño molecular seleccionado y las condiciones de reticulación según la invención conducen a que se evite la producción de pequeñas partículas de polímero y a que se forme un hidrogel cohesionado o una película de biomatriz.

Además, con el uso ventajoso de traptavidina, una forma mutada de estreptavidina, se puede incrementar notablemente la estabilidad del hidrogel en comparación con los sistemas de conjugado estreptavidina/avidina-polímero-biotina.

10 Según la invención, se prevé como cadena polimérica un oligonucleótido que, según una configuración ventajosa, puede emplearse en forma de un oligonucleótido ramificado, es decir, un oligonucleótido con más de dos extremos. En una forma de realización especialmente preferida de la invención, la cadena polimérica de oligonucleótido consiste en un ADN de filamento doble, es decir, en lugar de un oligonucleótido de filamento sencillo se emplea ADN de filamento doble. Esto permite un proceso de gelificación aún más controlado.

15 Los métodos optimizados no solo mejoran la estabilidad del hidrogel, sino que también permiten formar delgadas películas de hidrogel con un mínimo empleo de material. Así pues, se puede utilizar el sistema para formar películas delgadas de hidrogel cuya preparación tenga un coste favorable, lo que permite el revestimiento de grandes superficies con los biomateriales deseados. El sistema de hidrogel conforma asimismo una plataforma simple para producir muchas películas de biomatriz con diferentes condiciones y, por lo tanto, poder realizar un cribado de alta capacidad, por ejemplo. Otra característica interesante del nuevo sistema de hidrogel es que puede ser reconstituido por completo después de secado. Esta propiedad permite un fácil transporte del material.

20 El sistema de hidrogel según la invención se puede formar *in situ* sin reacciones químicas. Esto es novedoso en comparación con hidrogeles convencionales ya conocidos, basados en interacciones estreptavidina-biotina. La erosión se puede acelerar sin proteasas mediante la adición de biotina. Una posible aplicación consiste en el análisis de proteínas de matriz extracelulares intactas, segregadas por células incrustadas en el hidrogel.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de reticulación que se basa en una interacción biotina-avidina. La reticulación se controla a través de los procesos de las interacciones fisicoquímicas entre las cadenas poliméricas. Como ya se ha mencionado, se han podido establecer un diseño molecular y condiciones de reticulación que conducen a evitar la producción de pequeñas partículas de polímero y permiten que se forme un hidrogel cohesionado o una película de biomatriz. En el procedimiento para preparar el hidrogel según la invención, incluidas todas sus formas de realización mencionadas, se mezclan entre sí los componentes a reticular, es decir, la proteína y el conjugado, con un contenido de sólidos de al menos 3% en masa y en una proporción molar de equivalentes entre la proteína y el número de extremos biotinilados terminales de las cadenas poliméricas en el conjugado biotina-polímero de 1:2 a 1:8. La mezcla de los dos componentes, preferiblemente en un mezclador vorticial de alta velocidad, evita que se produzca una formación de partículas en lugar de la formación de hidrogel.

30 El ligando de bajo peso molecular biotina, o respectivamente uno de sus derivados, como por ejemplo iminobiotina o destiobiotina, se conjuga a los extremos de la cadena polimérica. El polímero puede ser un oligonucleótido de filamento sencillo o doble. El polímero también puede ser una estructura oligonucleotídica ramificada que tenga más de dos extremos. Los conjugados polímero-biotina resultantes se reticular por una proteína tetramérica. Como proteína tetramérica se pueden utilizar aquí estreptavidina o avidina o mutantes de estreptavidina y avidina. Se prefiere especialmente en este caso la mutante de estreptavidina, traptavidina, que posee una afinidad hacia la biotina mayor que la estreptavidina.

35 Los sistemas de biomaterial pueden modificarse adicionalmente, o bien por inserción de secuencias peptídicas en la cadena polimérica, o bien por adición de péptidos biotinilados, sustancias activas biotiniladas, oligosacáridos biotinilados, oligonucleótidos biotinilados o proteínas biotiniladas al hidrogel. Como ya se ha indicado, también se puede reemplazar el grupo de biotina por los análogos de biotina, destiobiotina o iminobiotina, de los cuales se espera que aumenten las tasas de liberación de los péptidos, sustancias activas, oligosacáridos, oligonucleótidos y proteínas. Además, también se pueden combinar las diversas modificaciones covalentes o no covalentes mencionadas en lo que antecede, lo que origina un número ilimitado de nuevos biomateriales que se pueden utilizar para el cribado y la optimización de biomateriales mediante un enfoque combinatorio.

40 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un sistema de hidrogel autoorganizante físico según la invención para un cultivo celular. Es decir, los sistemas de biomaterial resultantes pueden utilizarse para cultivar células sobre los biomateriales, así como para encapsular células en el hidrogel.

45 Otros detalles, características y ventajas de la invención se desprenden de la siguiente descripción de ejemplos de realización, haciendo referencia a los dibujos correspondientes. Estos muestran:

50 en la Figura 1: una representación esquemática del control cinético y termodinámico de la reticulación, que no es parte de la invención,

- en la Figura 2a: una representación esquemática de una matriz bidimensional de hidrogel en forma de una serie de cuadrados unidos entre sí, que no es parte de la invención,
- en la Figura 2b: una imagen fotográfica de una red enlazada, que no es parte de la invención,
- en la Figura 2c: una imagen fotográfica de una red enlazada, que no es parte de la invención,
- 5 en la Figura 3a: un diagrama con una comparación de la dureza relativa del gel entre hidrogeles con distinto contenido de sólidos, que no es parte de la invención,
- en la Figura 3b: un diagrama que muestra la erosión del hidrogel en función del contenido de sólidos, que no es parte de la invención,
- 10 en la Figura 3c: un diagrama que muestra el hinchamiento del hidrogel en función de la fuerza iónica, que no es parte de la invención,
- en la Figura 3d: un diagrama que muestra la durabilidad del hidrogel en función de la fuerza iónica, que no es parte de la invención,
- en la Figura 4: una cromatografía de exclusión por tamaño de una solución de hidrogel con un contenido de sólidos de 1% en masa, que no es parte de la invención,
- 15 en la Figura 5a: una cromatografía de exclusión por tamaño para soluciones de hidrogel después de la erosión con reorganización de partículas, que no es parte de la invención,
- en la Figura 5b: una cromatografía de exclusión por tamaño de hidrogel erosionado con un contenido de sólidos de 9% en masa después de concentrar la muestra, que no es parte de la invención,
- en la Figura 6: una imagen fotográfica de un ensayo vivo/muerto, que no es parte de la invención,
- 20 en la Figura 7a: una toma microscópica de una célula no expansionante típica, que no es parte de la invención,
- en la Figura 7b: una toma microscópica de una célula parcialmente expansionante, que no es parte de la invención,
- en la Figura 7c: una toma microscópica de una célula ampliamente expansionante, que no es parte de la invención,
- en la Figura 7d: toma microscópica en campo brillante del hidrogel 0%-B-II, que no es parte de la invención,
- 25 en la Figura 7e: toma microscópica en campo brillante del hidrogel 50%-B-II, que no es parte de la invención,
- en la Figura 7f: toma microscópica en campo brillante del hidrogel 100%-B-II, que no es parte de la invención,
- en la Figura 7g: una toma microscópica de una distribución completa de la expansión celular, que no es parte de la invención, y
- 30 en la Figura 8: un ensayo de transliteración de células T de ratón estimuladas, utilizando citometría de flujo basada en CsA-azo-biotina, que no es parte de la invención,

La Figura 1 muestra esquemáticamente una hidrogelificación cinéticamente controlada, basada en la interacción proteína-ligando. El control cinético significa: dependiendo del volumen, se forman solamente uniones intramoleculares de la PEG-biotina a una proteína, por ejemplo a avidina, estreptavidina o una mutante de estas proteínas, a baja concentración, véase la ilustración a), pequeñas partículas con uniones intra e intermoleculares a mayor concentración, véase la ilustración b), o hidrogeles con uniones casi exclusivamente intermoleculares a la máxima concentración, véase la ilustración c). El control cinético y termodinámico significa: dado que las uniones se encuentran en reordenamiento dinámico, es decir, cinético, los "estadios" mostrados en las ilustraciones a), b), c) pueden transformarse unos en otros por cambios en el volumen o cambios en la concentración. Además, el sistema alcanza siempre (en cada estadio) el mínimo energético y entrópico que, dependiendo de la concentración o el volumen termina en la formación de partículas o en la formación de hidrogel.

35

40

Ejemplo I: Hidrogel de estreptavidina/avidina-PEG-biotina, que no es parte de la invención

Por motivo de la creciente aplicación de sistemas de hidrogel no covalentes para aplicaciones biotecnológicas, se ha sintetizado un hidrogel autoorganizante que está reticulado únicamente por interacción receptor-ligando entre biotina y avidina.

45 Este sistema modelo se ha utilizado para determinar y racionalizar el comportamiento de receptores-ligandos basados en redes supramoleculares. La formación y la erosión del hidrogel están determinadas por la química física de interacciones receptor-ligando. La formación de gel está, por un lado, controlada cinéticamente y aparece solamente por encima de una concentración crítica c^* y, por otro lado, debido a los efectos combinados del

reordenamiento de ligando, hinchamiento de la red y entropía, se llega a la erosión con más rapidez de lo esperado. Aparece una erosión como reordenamiento progresivo del gel para dar partículas cada vez más pequeñas. Sin embargo, este proceso depende de la concentración y puede revertirse si se concentra la solución de hidrogel erosionado. Por último, como prueba de la utilidad de tal sistema, se han incorporado motivos peptídicos con la intención de promover la adhesión y la expansión de células madre.

Se han desarrollado hasta la fecha muchos sistemas de hidrogel basados en interacciones no covalentes, por ejemplo interacciones hidrofóbicas, interacciones proteína-proteína o interacciones péptido-oligosacárido. En contraste, el aprovechamiento de uniones ligando-receptor simples constituye una vía de reticulación mucho menos utilizada. Dado que las reticulaciones son procesos complejos, hasta ahora no se entendía bien cómo la cinética de unión y la energía de unión influyen en la reticulación, así como en las propiedades físicas, mecánicas y bioquímicas resultantes. La rápida unión y las particularidades de la unión biotina-avidina, por ejemplo, se han aprovechado para la formación de nanopartículas y para la modificación y funcionalización de hidrogeles pero, llamativamente, permanecía en gran parte sin explorar su uso como reticulante único en una red macroscópica. Sorprendentemente, se ha encontrado que esta red autoorganizante aparentemente simple solo podía formarse en condiciones finamente ajustadas. Aunque generalmente se considera la unión biotina-avidina casi irreversible, la química física de la unión proteína-ligando y la disociación conducen a una red dinámica. Además, la red se puede funcionalizar fácilmente, para en este caso influir en la morfología de células madre mesenquimales encapsuladas en la matriz tridimensional.

La reticulación del hidrogel depende de la concentración. En un retículo autoorganizante ideal, sirven como centro de enlace tetrámeros de avidina, que se reticulan mediante cadenas lineales de polietilenglicol (PEG) biotiniladas en ambos extremos. La simplicidad estructural del hidrogel permite modelar la matriz bidimensionalmente como una serie de cuadrados conectados entre sí, tal como se muestra en la Figura 2a. Debido a la acusada constante de unión biotina-avidina, K_{on} , la concentración de los componentes adquiere una importancia decisiva para la reticulación. Para formar una red completa, los intersticios entre los puntos de unión a avidina deben ser similares o más pequeños que la distancia promedio teórica entre los extremos del enlazador de PEG biotinilado. Cuando la topología es adecuada, una cadena de PEG puede unirse a dos tetrámeros de avidina distintos, lo que se cumple en la denominada "conformación en red". Cuanto más se reducen las concentraciones y aumentan las distancias, más crece la probabilidad de que una cadena de PEG se una dos veces al mismo tetrámero de avidina en una denominada "conformación cerrada", de modo que el primer evento de unión limita la zona en la cual puede buscar otro sitio de enlace la cadena de PEG. Así se forma una red fragmentada, incompleta, que consiste en una mezcla de constituyentes de red y partículas de conformación cerrada, si los intersticios son demasiado grandes, aunque solo sea por poco, para que se puedan cubrir las distancias. Si los espacios para el PEG son demasiado grandes para que se puedan cubrir las distancias, no se forma una red cohesionada, sino solamente una distribución de micro- y nanopartículas de gel con bordes de conformación cerrados. Suponiendo que la cadena de PEG de 10 kDa tiene una longitud de contorno de 33,2 nm, se podría formar un hidrogel con un contenido de sólidos de 0,21% en masa (avidina 27 μ M y biotini-PEG 54 μ M). Sin embargo, bajo estas condiciones no se forma ningún hidrogel, ya que los polímeros libres prefieren, desde el punto de vista energético, una estructura de bobina al azar semiarrollada. Se ha calculado la distancia media entre los extremos de una cadena de PEG de 10 kDa mediante la modelización del polímero, utilizando el "modelo de una cadena vermiforme". Los cálculos muestran una distancia media de extremo a extremo de 5,0 nm para una cadena de PEG de 10 kDa. Suponiendo una distribución ideal de avidina en la solución, se ha calculado que un contenido de sólidos de hidrogel de 9% en masa, que corresponde a avidina 1,27 mM, origina huecos de 5,1 nm entre los tetrámeros de avidina y, por lo tanto, corresponde aproximadamente al contenido mínimo de sólidos requerido para formar una red conectante, tal como se muestra en las Figuras 2b y 2c. Aunque se pueden formar hidrogeles con un contenido de sólidos tan bajo como 4% en masa, debido al carácter de mosaico de la red incompleta dichos hidrogeles son claramente más blandos, como muestra la Figura 3a, y menos estables que los geles con mayor contenido de sólidos. Las mezclas con un contenido de sólidos inferior a 4% en masa no forman una red cohesionada. Así, la cromatografía de exclusión por tamaño de la Figura 4 para una solución de gel con un contenido de sólidos de 1% en masa, muestra una dispersión de pequeñas partículas de gel.

La erosión del hidrogel es un proceso lineal y dependiente de la concentración. Al ser generalmente considerada la interacción biotina-avidina similar a un enlace covalente desde el punto de vista de la estabilidad, ha resultado sorprendente que la erosión de los hidrogeles en el sobrenadante aparezca ya en una escala de tiempo de días a semanas, mientras que los hidrogeles permanecen estables durante meses en ausencia de sobrenadante, como se aprecia en la Figura 3b. Mediante el ajuste del contenido de sólidos se podría extender la estabilidad del hidrogel desde una vida útil de cuatro días en el caso de un contenido de sólidos de 4% en masa hasta una vida útil de 20 días en el caso de un contenido de sólidos de 14% en masa. En todos los casos, los hidrogeles se erosionan linealmente, lo que es típico de los hidrogeles físicos. Tal como muestra la ilustración precedente de las distintas conformaciones posibles de las interacciones biotini-PEG/avidina, también es posible describir el mecanismo físico de la erosión. Cuando se rompe una unión biotina-avidina de una conformación de red, el conjugado PEG-biotinilo puede unirse a una avidina en una conformación de red o a otro sitio disponible del mismo tetrámero, colocándose en una conformación cerrada que lleva a la erosión por difusión hacia fuera del cuerpo de gel. Suponiendo que la energía de unión entre avidina y biotina es la misma en cualquier conformación de red, la diferencia entre la entropía del estado erosionado y la de la estructura en retículo se incrementa de la misma manera que se incrementa el

volumen de todo el sistema si se añade solución tampón al hidrogel. Por consiguiente, por un lado en el sobrenadante se encuentra favorecida termodinámicamente la erosión de la estructura ordenada. Por otro lado, la cinética del reordenamiento estructural también está influenciada por el hinchamiento del hidrogel y por la disociación de la biotina con respecto a la avidina.

5 Además, un hinchamiento afecta a la vida útil del hidrogel. El hidrogel de biotilil-PEG/avidina experimenta un hinchamiento si se coloca en el sobrenadante. El hinchamiento está impulsado por la presión osmótica, debido a la mayor concentración de sustancias disueltas en el interior del hidrogel que en el exterior, y termina si se alcanza el equilibrio osmótico, o bien si las fuerzas elásticas originadas por la dilatación del componente de hidrogel pueden oponerse a la presión osmótica. Con el fin de estudiar los efectos del hinchamiento del hidrogel, se ajustaron la fuerza iónica del hidrogel y la del sobrenadante. Así, se comparó el hinchamiento del hidrogel en agua desionizada (ddH₂O) con el hinchamiento del hidrogel en distintas soluciones de cloruro sódico tamponadas con fosfato (PBS), cada una con distinta concentración, a saber, PBS 1x, PBS 5x y PBS 10x. Tal como se muestra en la Figura 3c, si se traslada el hidrogel desde agua desionizada (agua Milli-Q®, ddH₂O) a solución de cloruro sódico tamponada con fosfato (PBS) 10x es posible reducir desde ~ 74% a 35% la magnitud del hinchamiento que se produce, en un espacio de tiempo de 24 horas, en un hidrogel con un contenido de sólidos de 9% en masa. Llamativamente, los hidrogeles con hinchamiento reducido tienen una vida útil más larga que los ejemplos comparativos con mayor hinchamiento, como se demuestra al compararlos con la Figura 3d. Obviamente, el hinchamiento del hidrogel contribuye a la erosión en dos aspectos. En primer lugar, las cadenas de PEG se estiran a causa del hinchamiento más allá de su longitud de equilibrio. Cuando se rompe una unión biotina-avidina, el PEG se retrae a su longitud de equilibrio y, por lo tanto, es más adecuado establecer uniones en una conformación cerrada que formar nuevamente una red.

Además, el hinchamiento tensiona las cadenas a causa de la dilatación del polímero más allá de su longitud de equilibrio. En PBS 1x, un hidrogel con contenido de sólidos de 9% en masa se hincha 60% en volumen en el transcurso de 24 horas, alargándose el PEG desde 5,0 nm a 5,8 nm. Considerando de nuevo el polímero como una cadena vermiforme, la tensión efectiva debida al alargamiento del polímero se ha calculado en 3,2 pN. La velocidad de deformación era aproximadamente 0,32 pN por hora. A pesar de la resistencia a la rotura de la unión biotina-avidina, de la que a menudo se dice que se sitúa en el entorno de centenares de pN, se consiguen los valores mencionados de alta velocidad de deformación. De acuerdo con los cálculos, en caso de existir una velocidad de deformación muy pequeña, la unión biotina-avidina podría romperse con solo ~ 3 pN de fuerza directamente aplicada, mientras que las mediciones con una trampa óptica a velocidades de deformación de 7,7 pN por segundo podrían denotar una ruptura a fuerzas tan bajas como 3,4 pN. Llamativamente, aunque una unión sólida a una velocidad de deformación elevada es de la máxima importancia para las distintas aplicaciones de biotina-avidina en el campo de la biotecnología, en el experimento de erosión de hidrogel se pone de manifiesto la débil interacción del par de unión cuando se estira con menor velocidad de deformación. El hidrogel de biotina-avidina es estable bajo una exigencia mecánica elevada, por ejemplo en el caso de tratamiento con ultrasonidos, mientras que la carga física resultante del lento proceso de hinchamiento puede perturbar la interacción entre el par receptor-ligando que, en otros casos, es muy fuerte.

La erosión es progresiva y reversible. Aunque la erosión del hidrogel es un proceso favorecido termodinámicamente de las partículas de conformación cerrada, que se difunden desde el hidrogel al sobrenadante, mediante la cromatografía de exclusión por tamaño se ha podido comprobar que, en las soluciones de hidrogel erosionado, incluso cuando ya no existe un hidrogel cohesionado, las partículas en solución se reorganizan con el tiempo para dar fragmentos más pequeños, como también se deduce de la Figura 5a. Tiene extraordinaria importancia el hecho de que los procesos de gelificación/erosión sean reversibles. Se volvieron a concentrar a sus volúmenes originales las soluciones de hidrogel erosionado, y se encontró que se formaron nuevamente hidrogeles en el transcurso de 72 horas. Este es un período de tiempo relativamente largo en comparación con la formación casi instantánea de los hidrogeles originales. En una investigación adicional de este proceso, se concentró hasta 100 µl un volumen de 1 ml de solución de hidrogel erosionado de 30 µl, con un contenido de sólidos de 9% en masa, lo que llevó a un contenido de sólidos algo inferior al contenido de sólidos crítico para la formación de hidrogel, y se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño. El resultado de la misma se muestra en la Figura 5b. Inmediatamente antes de concentrar la muestra, el pico principal eluía a $8 \pm 0,02$ minutos. Transcurridas 168 y 336 horas después de concentrar la muestra, el pico principal eluía con el pico de inyección. Estos datos muestran que la reticulación resulta favorecida con una concentración elevada.

Los hidrogeles son biocompatibles y adecuados para el cultivo tridimensional de células madre. Un hidrogel que se autoorganice rápidamente es el medio de elección para el cribado de condiciones óptimas para aplicaciones de cultivo celular tridimensional. Se ha investigado si podrían sobrevivir y expandirse células en las matrices tridimensionales. Se prepararon PEG modificados que contenían conjugados biotina-péptido. El primer conjugado, biotina-GRGDSPGWC, denominado BI en lo sucesivo, contenía únicamente el motivo de adhesión celular RGDSP. El segundo conjugado, biotina-GRGDSPQGIWGQC, denominado B-II en lo sucesivo, contenía el motivo de adhesión celular y también el punto de escisión de metaloproteinasa de matriz (MMP), PQG \uparrow \downarrow IWGQ, de modo que las células escindían químicamente la red. Las soluciones de componentes de hidrogel se mezclaron con células madre mesenquimales (MSC) humanas, lo que dio lugar a células encapsuladas en una red autoorganizante. Tras una incubación de 24 horas se ensayaron los hidrogeles en un ensayo vivo/muerto, que reveló 98,10% de células supervivientes (n = 157) (véase la Figura 6).

A continuación se investigó si los hidrogeles permitían la expansión y el crecimiento celular. Primeramente se mezclaron BI y B-II, es decir, se preparó una premezcla, para producir hidrogeles con 0%, 50% y 100% de B-II. En la Figura 7a se ilustra una célula inmune típica, no expansionante. En la Figura 7b se ilustra una célula parcialmente expansionante. En la Figura 7c se representa una célula ampliamente expansionante. En cada una de las figuras 7d, 7e y 7f se muestran tomas microscópicas en campo brillante representativas de los hidrogeles con 0%, 50% y 100% de B-II. En la Figura 7g se reproduce una distribución completa de la expansión celular. Tras 48 horas en el hidrogel al 0%, una fracción de 6,55% de las células muestra expansión ($n = 121$), mientras que en el hidrogel al 5% muestra expansión una fracción de 31,95% de las células ($n = 131$) y en el hidrogel al 100% una fracción de 25,15% de las células ($n = 130$). El sistema de hidrogel de biotín-PEG/avidina es biocompatible y adecuado para las aplicaciones de cultivo celular con la secuencia escindible por MMP en B-II, que es necesaria para la expansión de MSC.

Ahora se ha puesto a disposición un nuevo hidrogel no covalente que está reticulado por la interacción receptor-ligando entre biotina y avidina. La característica más destacable de este hidrogel es que la formación y erosión del hidrogel están determinadas por la química física de la interacción receptor-ligando. Por un lado, la formación de hidrogel es un proceso controlado cinéticamente y aparece solamente por encima de una concentración crítica, y, por otro lado, la tensión de estiramiento de las cadenas de polímero, así como una mayor probabilidad, conducen a que después de la rotura de la unión durante la expansión del hidrogel, un PEG adquiera una conformación de unión cerrada y, en consecuencia, a una erosión del hidrogel. Ha sido igualmente interesante la observación de que la erosión, a través de un reordenamiento progresivo de las partículas de hidrogel, da como resultado un número creciente de partículas que tienen regiones centrales más pequeñas. Además, este reordenamiento es bidireccional y se puede revertir si se concentra el hidrogel erosionado. El sistema de hidrogel muestra que redes basadas en interacciones receptor-ligando proporcionan vías adecuadas para el desarrollo de nuevos biomateriales que poseen propiedades interesantes. Los hidrogeles se autoorganizan en condiciones suaves y presentan tasas de erosión lineales y ajustables. Las condiciones para promover un cultivo tridimensional de células madre podrían coordinarse mediante la investigación de los efectos sinérgicos de las diversas secuencias peptídicas. Dado que la biotilación es el método más extendido para inmovilizar biomoléculas, el novedoso sistema representa una forma sencilla de diseñar y supervisar biomatrices altamente funcionalizadas.

En lo que sigue se exponen los métodos aplicados:

Preparación del componente de hidrogel

Se obtuvo avidina (Affiland, Bélgica) como polvo liofilizado. Se preparó PEG biotilado disolviendo biotina-NHS y PEG de 10 kDa terminado en amino (Rapp Polymers, Alemania) en una proporción molar de 12:1, en agua Milli-Q con un valor de pH ajustado a 9,5. La concentración total era 31 mg/ml. Se agitó la disolución durante una noche. Luego se dializó frente a agua destilada, durante dos días, la mezcla de reacción (corte de peso molecular 8 kDa) para eliminar la biotina no unida. Después se liofilizó la solución.

Formación de hidrogel

Para formar los hidrogeles, se disolvieron biotín-PEG y avidina en disoluciones del mismo volumen, en una proporción molar de 2:1, en una concentración adecuada para el contenido de sólidos deseado. Se pipetearon 15 μ l de disolución de avidina en un tubo de microcentrífuga y se colocaron en un mezclador vorticial de alta velocidad. Mientras se mezclaba, se agregaron 15 μ l de disolución de biotín-PEG, lo que llevó a una formación casi instantánea de hidrogel.

Rigidez del hidrogel

Se utilizó una centrífuga de sobremesa (5424R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para comparar pequeñas cantidades de hidrogel en un procedimiento de alta capacidad. Se prepararon hidrogeles de 30 μ l en PBS 1x. La rigidez relativa de los hidrogeles se analizó por medio de un rotor de centrífuga a 45° y la penetración de bolitas metálicas de 275 μ m en función de la fuerza aplicada por la centrífuga.

Erosión del hidrogel

Para investigar la erosión del hidrogel se formaron geles como se ha descrito más arriba, con la adición de 10 μ l (0,18 nmol) de estreptavidina marcada con cianina-5 (Invitrogen). La cianina 5, abreviada en lo sucesivo Cy5, es un colorante fluorescente azul. Después de la formación del hidrogel, se añadió cuidadosamente 1 ml de sobrenadante a la superficie de cada hidrogel. Luego se colocaron los geles en un mezclador rotatorio a 5 revoluciones por minuto y protegidos de la luz. Cada 24 horas se tomaron 125 μ l de sobrenadante de cada hidrogel y se midió la actividad fluorescente en un lector de placas Synergy H1, con emisión a 645 nm y excitación a 675 nm. El sobrenadante extraído se reemplazaba luego con 125 μ l de sobrenadante fresco y, para determinar la erosión, se compararon los datos de fluorescencia con una curva estándar.

Ensayo vivo/muerto

La viabilidad de las células en los hidrogeles de PEG se investigó por medio de un ensayo vivo/muerto. Se enjuagaron una vez con PBS geles que contenían células. Se aplicó durante 3 minutos sobre los geles una

solución 10 μM de yoduro de propidio (PI) (Molecular Probes, Invitrogen, Alemania) y diacetato de fluoresceína (FDA) 0,15 μM (Fluka, Alemania) en PBS, seguidos de un paso de lavado con PBS. Se tomaron imágenes de las células con un microscopio confocal (Leica SP5, 10x/0,4). Se tomaron imágenes cada 10 μm en una sección de gel de 100 μm de espesor y se presentó la proyección de la intensidad máxima de las imágenes. El brillo y el contraste se ajustaron en la versión Fuji de ImageJ.

Medición de la expansión celular

48 horas después de la formación del gel, se tomaron imágenes de varios planos z de los hidrogeles. Se identificaron células individuales y se marcaron con elipses utilizando la versión Fuji de ImageJ. Las excentricidades de las elipses medidas se utilizaron para evaluar la expansión. Células MSC con excentricidades $> 1,5$ se clasifican como expansión.

Ejemplo II: Hidrogel de traptavidina-PEG-biotina, que no es parte de la invención

Dado que la erosión del hidrogel de avidina/estreptavidina es ocasionada por la disociación de biotina con relación a las proteínas tetraméricas, y va seguida del reordenamiento de la red, con lo que se reduce la velocidad de disociación, se espera que la estabilidad de la matriz mejore. Aunque la interacción avidina/estreptavidina-biotina posee una de las afinidades más altas entre una proteína y un ligando en la naturaleza, recientemente se ha publicado que la mutante de estreptavidina, traptavidina, da lugar a una velocidad de disociación de biotina 10 veces menor.

En este ejemplo se aprovechan las propiedades biofísicas ventajosas de la traptavidina para mejorar la estabilidad del hidrogel. Se expresó en *E. coli* la proteína y se utilizó la proteína purificada para formar el hidrogel con PEG-biotina. Tal como se esperaba, el hidrogel autoorganizante pudo formarse, al igual que en el sistema avidina-PEG-biotina, solamente por encima de la concentración crítica de un contenido de sólidos de 4% en masa. Además, los hidrogeles se mantuvieron estables durante un período de tiempo de varios meses sin adición de sobrenadante.

Cuando se incubaron los hidrogeles de traptavidina-PEG-biotina con el sobrenadante, no se produjo ninguna erosión visible en un período de tiempo de dos meses. Se añadió estreptavidina marcada con Cy5 al 1% a traptavidina no marcada, para formar el hidrogel. En el sistema avidina-hidrogel, la liberación de estreptavidina marcada con Cy5 se correlacionó bien con el proceso de erosión y con la pérdida de la masa del hidrogel, mientras que se pudo detectar traptavidina marcada con Cy5 durante un período de tiempo de 2 meses. El resultado de este experimento demostró que la lenta velocidad de disociación entre traptavidina y biotina produjo sorprendentemente un aumento drástico de la estabilidad de la red de matriz autoorganizante.

Ejemplo III: Hidrogel de estreptavidina/avidina/traptavidina-ADN-biotina, ejemplo de realización de la invención

También se puede preparar el hidrogel reemplazando el enlazador de PEG biotilado por ADN de filamento doble biotilado. Debido a su rigidez acrecentada, los filamentos de ADN disminuyen el hinchamiento del hidrogel y protegen a los ligandos de una cadena polimérica de la eventualidad de que se enlacen más de una vez a la misma proteína tetramérica, lo que conduce sustancialmente a una reducción, sorprendentemente en su magnitud, de la erosión y a un aumento de la vida útil del hidrogel. La gran longitud de persistencia del ADN de doble filamento conduce a una longitud de cadena media más larga de un extremo a otro, en comparación con la longitud de contorno creciente del PEG, lo que lleva a la posibilidad de preparar hidrogeles con una cantidad reducida de avidina. Constituye otra ventaja la regulación del tiempo de gelificación por medio del calor. Se pueden calentar las soluciones madre por encima de la temperatura de fusión del ADN de doble filamento y luego enfriarse lentamente, con el fin de enlentecer la gelificación.

Los hidrogeles de ADN se prepararon sintetizando en un primer paso filamentos de ADN complementarios. Después se biotinila cada filamento en el extremo 5'. Se divide en dos poblaciones iguales la avidina-proteína del gel y luego se incubó brevemente con un filamento de ADN. A continuación se calientan las soluciones por encima de la temperatura de fusión del ADN, se mezclan y se enfrían, para producir el hidrogel. Como se ha descrito antes, el gel puede prepararse como masa de hidrogel o como una película delgada. La película delgada se prepara pipeteando primeramente sobre la superficie calentada una pequeña cantidad de una solución de avidina-ADN precalentada. Después se pipetea sobre la superficie una cantidad igual de la segunda solución de avidina-ADN con la secuencia de ADN complementaria, precalentada, se mezcla y se distribuye con la pipeta por la superficie, para obtener una solución homogénea. Es posible producir películas con volúmenes de soluciones por debajo de un microlitro, de modo que la producción masiva de películas tiene un coste favorable. Las películas también son elásticas y resisten múltiples ciclos de deshidratación y rehidratación.

Al igual que los hidrogeles de avidina/estreptavidina/traptavidina-biotina-PEG, el gel puede incorporar cualquier unidad biotilada. Esta tecnología posibilita la preparación de matrices de hidrogel de ADN-avidina que contengan cualquier combinación de péptidos u otras moléculas dentro de una amplia gama de concentraciones deseadas por el usuario final. La matriz de hidrogel también se puede adaptar individualmente, de modo que el usuario puede elegir matrices de distinta concentración y rigidez. Las posibles aplicaciones de una tecnología semejante incluyen cribado general por afinidad, cribado de dianas farmacológicas, ensayos de optimización para condiciones de cultivo

celular y la liberación controlada de la carga acoplada.

Ejemplo IV: Liberación de biomoléculas a partir de hidrogel, que no es parte de la invención

La biotilación constituye el método más ampliamente extendido para la detección de la afinidad y la inmovilización de biomoléculas de interés. Recientemente se ha desarrollado un sistema de hidrogel covalente, en combinación con una reacción fotoquímica bifotónica, que permite la determinación espacial de sustancias biotiladas en matrices tridimensionales. En comparación con la preparación química mediante el injerto de estreptavidina en una red polimérica, un hidrogel físico que ha sido reticulado por una interacción estreptavidina (y sus análogos)-biotina conduce a una gelificación *in situ*, a la inmovilización de ligandos y la encapsulación de células, así como a un amplio abanico de concentraciones para la carga con sustancias biotiladas de interés. Además, la densidad de carga resultante de las biomoléculas biotiladas puede controlarse y determinarse con precisión, ya que se correlaciona con la proporción entre polímero biotilado y biomoléculas biotiladas de interés. Por lo tanto, el sistema resultante conduce a un número ilimitado de combinaciones de ligandos en una matriz tridimensional a lo largo de un amplio abanico de concentraciones (hasta 1 mM) para investigar la interacción célula-ligando en un entorno tridimensional. Además, el hidrogel también se puede usar como sistema de liberación de sustancias de bajo peso molecular biotiladas y productos terapéuticos proteínicos.

Se describe ahora un sistema para desligar derivados biotilados del inmunosupresor ciclosporina A (CsA-biotina). La CsA-biotina es tan activa como su compuesto precursor CsA, lo que se demuestra tanto en un ensayo de inhibición de calcineurina como en un ensayo inmunosupresor contra células T de Jurkat, mononucleocitos de sangre periférica humana y células T de ratón. Cuando se incorpora CsA-biotina en los hidrogeles avidina-biotina-PEG, la liberación de la sustancia activa inmunosupresora no se produce por erosión del hidrogel, sino que se regula mediante la disociación de CsA con respecto a la avidina-biotina. Se incubaron a 37 °C los hidrogeles cargados con CsA-azo-biotina, o bien con suero humano únicamente, o bien con suero humano más biotina. Después de que se hubieran erosionado definitivamente los hidrogeles, se utilizaron las soluciones resultantes para realizar un ensayo inmunosupresor contra células T de ratón.

La Figura 8 muestra un ensayo de proliferación con células T de ratón estimuladas con anticuerpos anti-CD3/CD28, utilizando citometría de flujo basada en CsA-azo-biotina, emitida desde el hidrogel. El testigo indica la proliferación celular sin la acción de CsA. La superficie blanca muestra células T estimuladas y la superficie negra células T no estimuladas. Cuanto más a la izquierda queda la superficie en el diagrama, más proliferación se produce. Una cantidad de 1 μ M del medicamento inmunosupresor CsA inhibe la proliferación de células T. Se trataron adicionalmente las células T con CsA-azo-biotina, es decir, CsA biotilada, 1 μ M, que había salido del hidrogel. Este hidrogel tenía un contenido de sólidos de 9% en masa, existiendo en el hidrogel una proporción molar 1:2 entre avidina y (PEG de 5 kDa)-biotina. Casi no se aprecia ninguna diferencia con respecto al testigo. Con la ayuda de la biotina se puede deshacer la unión de CsA-azo-biotina con estreptavidina/avidina/mutante (CsA-azo-biotina 1 μ M, con biotina). Esto conduce a una inhibición de las células T similar al testigo positivo, CsA. La proliferación se determinó al cabo de tres días.

Tal como se muestra en la Figura 8, el hidrogel erosionado en presencia de biotina es igual de activo en la inmunosupresión que el compuesto precursor CsA, mientras que el hidrogel erosionado en ausencia de biotina no tiene efecto inmunosupresor. Llamativamente, la CsA y el análogo de CsA biotilado muestran una selectividad similar frente los distintos subtipos de células T. Presentan claros efectos sobre las células T no activadas previamente ("naive"), mientras que no tienen ningún efecto supresor sobre células T reguladoras.

Sin la adición de biotina, las pequeñas partículas del hidrogel erosionado aún pueden captar CsA-biotina y evitar que entre intensamente en las células. Por el contrario, en presencia de biotina se puede disociar CsA-biotina de la estreptavidina y provocar un efecto inmunosupresor en las células. Dado que la biotina CsA que es captada en el hidrogel erosionado inhibe la actividad de peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa de la ciclofilina, que es la principal finalidad de la CsA, el presente procedimiento puede llevar a una función controlada de la sustancia activa, ya sea por inhibición del efecto biológico de ciclofilinas extracelulares o por inhibición de la calcineurina intracelular. Además, si se reemplaza la biotina con destiobiotina o iminobiotina se puede acelerar tanto la erosión del gel como la liberación de ligandos activos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema de hidrogel autoorganizante físico para aplicaciones biotecnológicas constituido por una red no covalente basada en una interacción proteína-ligando, que comprende como proteína una proteína tetramérica y como ligando biotina o uno de sus derivados, estando conjugada covalentemente la biotina o uno de sus derivados en cada caso a un extremo de una cadena polimérica de un oligonucleótido de filamento sencillo o doble, y ascendiendo el contenido de sólidos referido al hidrogel en su totalidad al menos a 3% en masa y estando reticulados los conjugados por la proteína tetramérica, en donde en el sistema de hidrogel existe una proporción de mezcla, como proporción molar de equivalentes entre la proteína y el número de extremos biotinilados terminales de las cadenas poliméricas en el conjugado biotina-polímero, de 1:2 a 1:8.
- 10 2. Sistema de hidrogel autoorganizante físico según la reivindicación 1, en donde el contenido de sólidos referido al hidrogel en su totalidad asciende al menos a 4% en masa.
3. Sistema de hidrogel autoorganizante físico según la reivindicación 2, en donde el contenido de sólidos referido al hidrogel en su totalidad asciende al menos a 6% en masa.
- 15 4. Sistema de hidrogel autoorganizante físico según la reivindicación 3, en donde el contenido de sólidos referido al hidrogel en su totalidad asciende al menos a 9% en masa.
5. Sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde como proteína tetramérica que reticula los conjugados está prevista avidina, estreptavidina o una mutante de estas proteínas.
- 20 6. Sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según la reivindicación 5, caracterizado por que como proteína tetramérica que reticula los conjugados está prevista la mutante de estreptavidina, traptavidina.
7. Sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que como derivados de biotina están previstas iminobiotina o destiobiotina.
8. Sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que como oligonucleótido para las cadenas poliméricas se emplea un oligonucleótido ramificado, es decir, un oligonucleótido con más de dos extremos.
- 25 9. Sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que las cadenas poliméricas consisten en cada caso en un ADN de filamento doble.
10. Sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que está modificado por inserción de secuencias peptídicas en las cadenas poliméricas o por adición de péptidos biotinilados, sustancias activas biotiniladas, oligosacáridos biotinilados, oligonucleótidos biotinilados o proteínas biotiniladas al hidrogel.
- 30 11. Procedimiento para preparar un hidrogel según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual se mezclan entre sí los componentes a reticular, es decir, la proteína y el conjugado, con un contenido de sólidos de al menos 3% en masa y en una proporción molar de equivalentes entre la proteína y el número de extremos biotinilados terminales de las cadenas poliméricas en el conjugado biotina-polímero de 1:2 a 1:8.
- 35 12. Uso de un sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 10, para cultivar células.
13. Uso de un sistema de hidrogel autoorganizante no covalente físico según una de las reivindicaciones 1 a 10, para encapsular células.

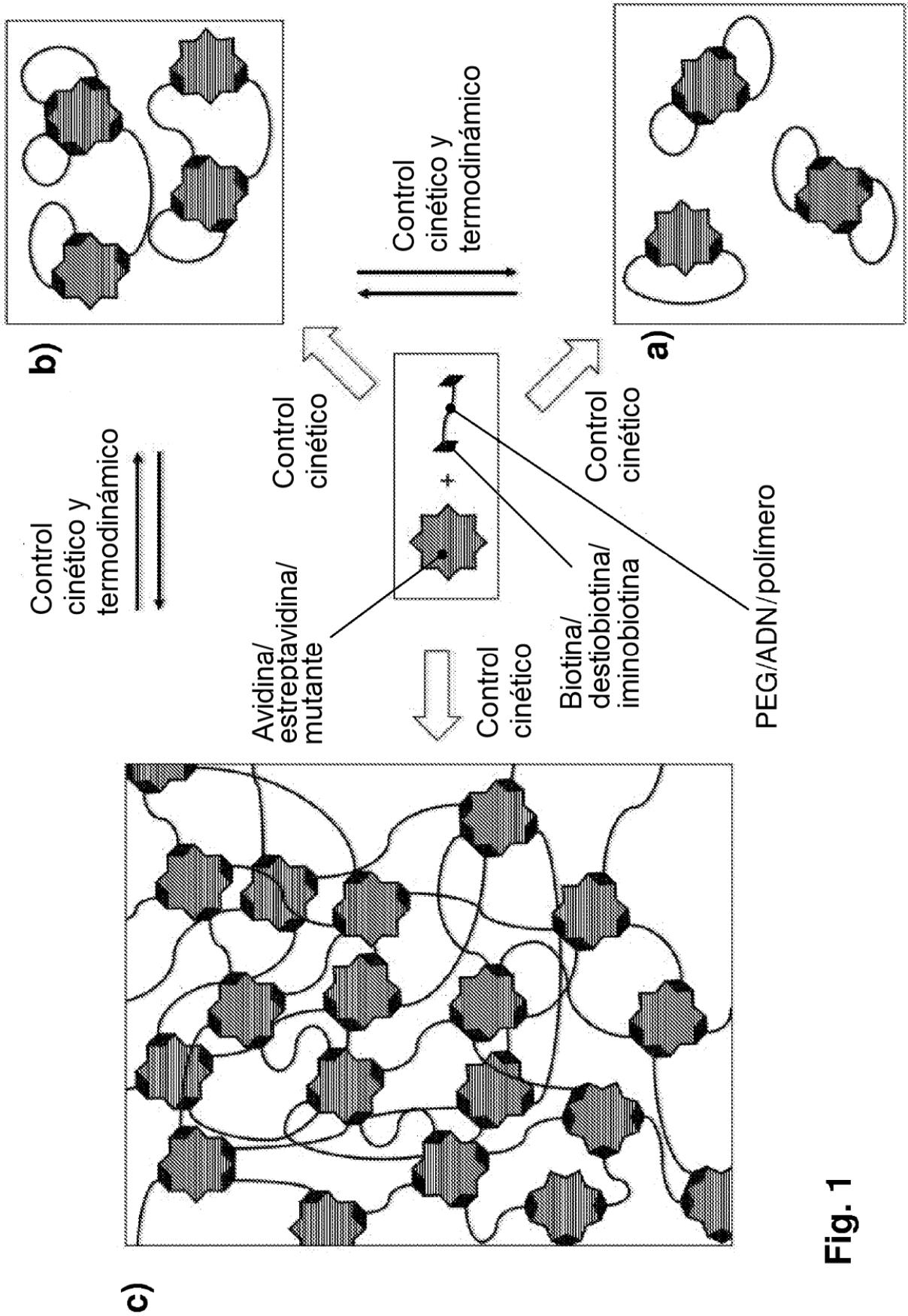


Fig. 1

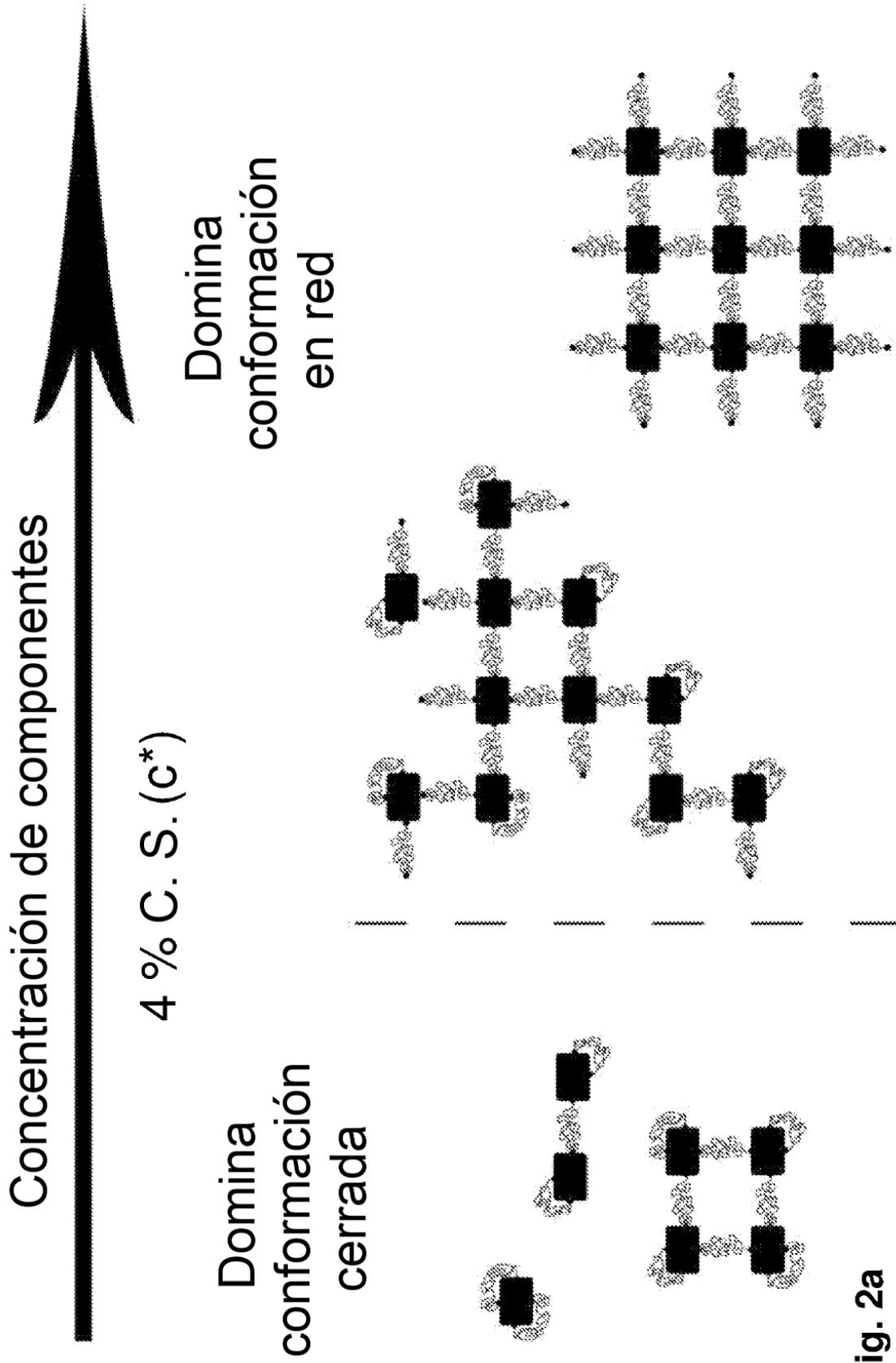


Fig. 2a

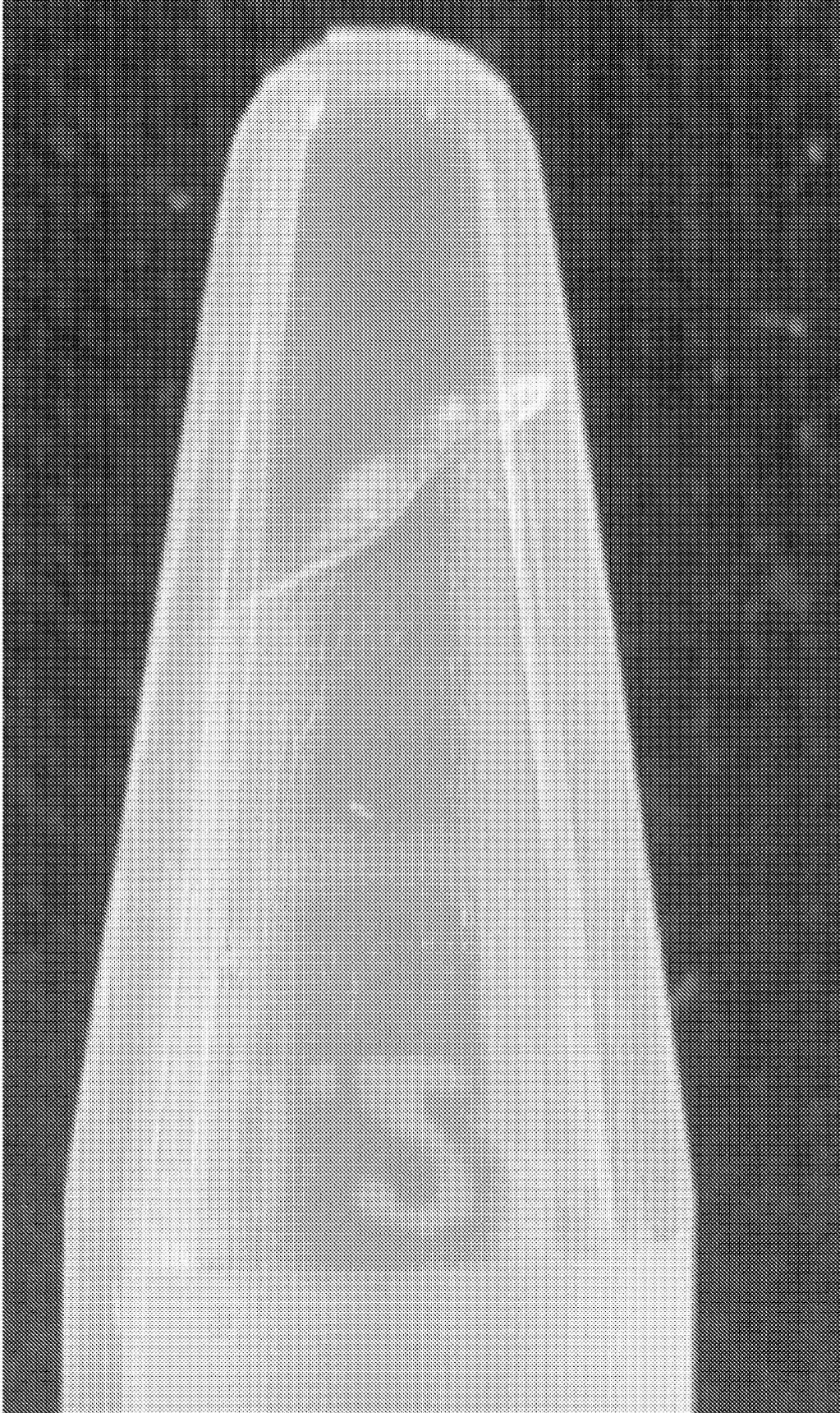


Fig. 2b

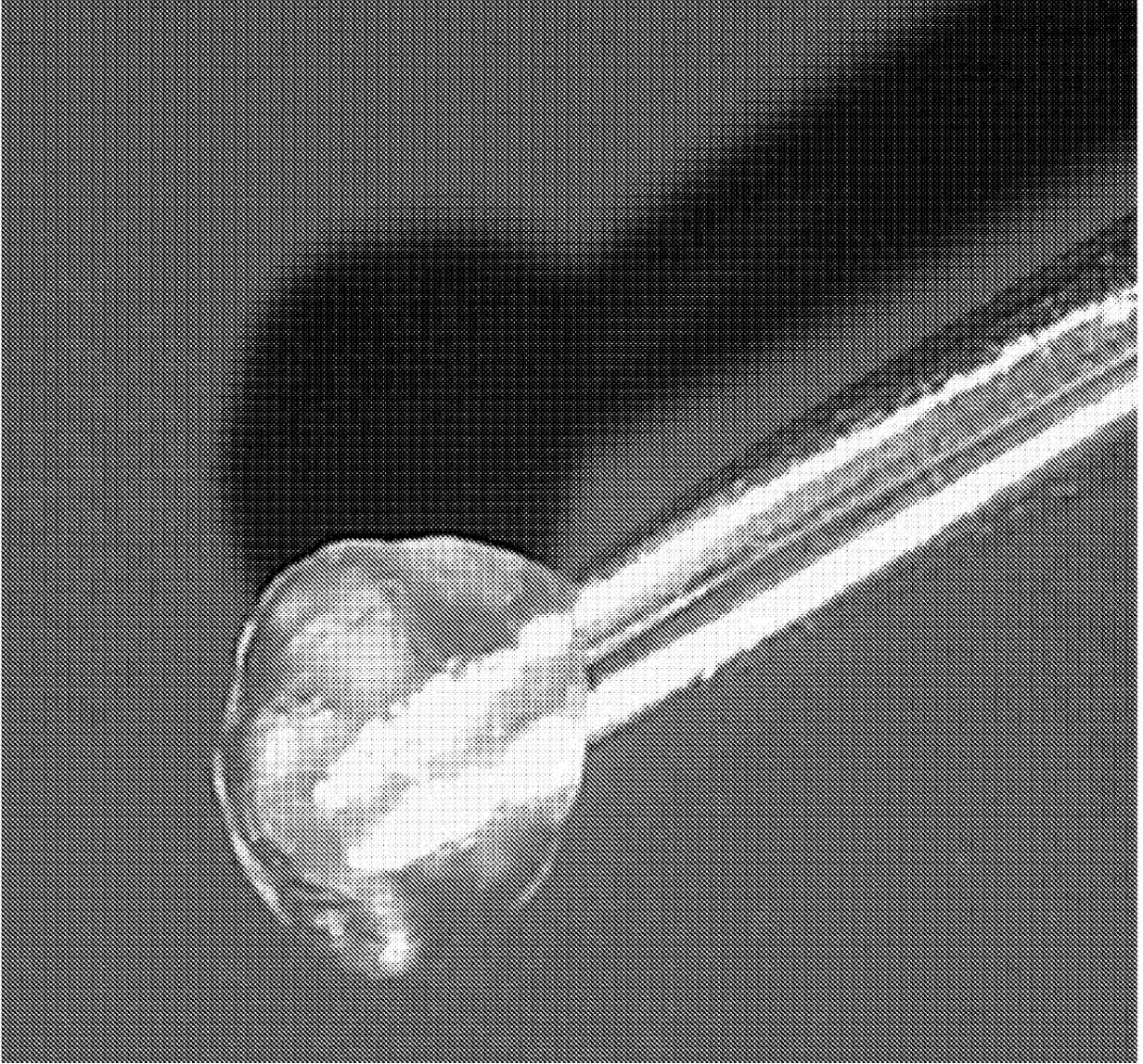


Fig. 2c

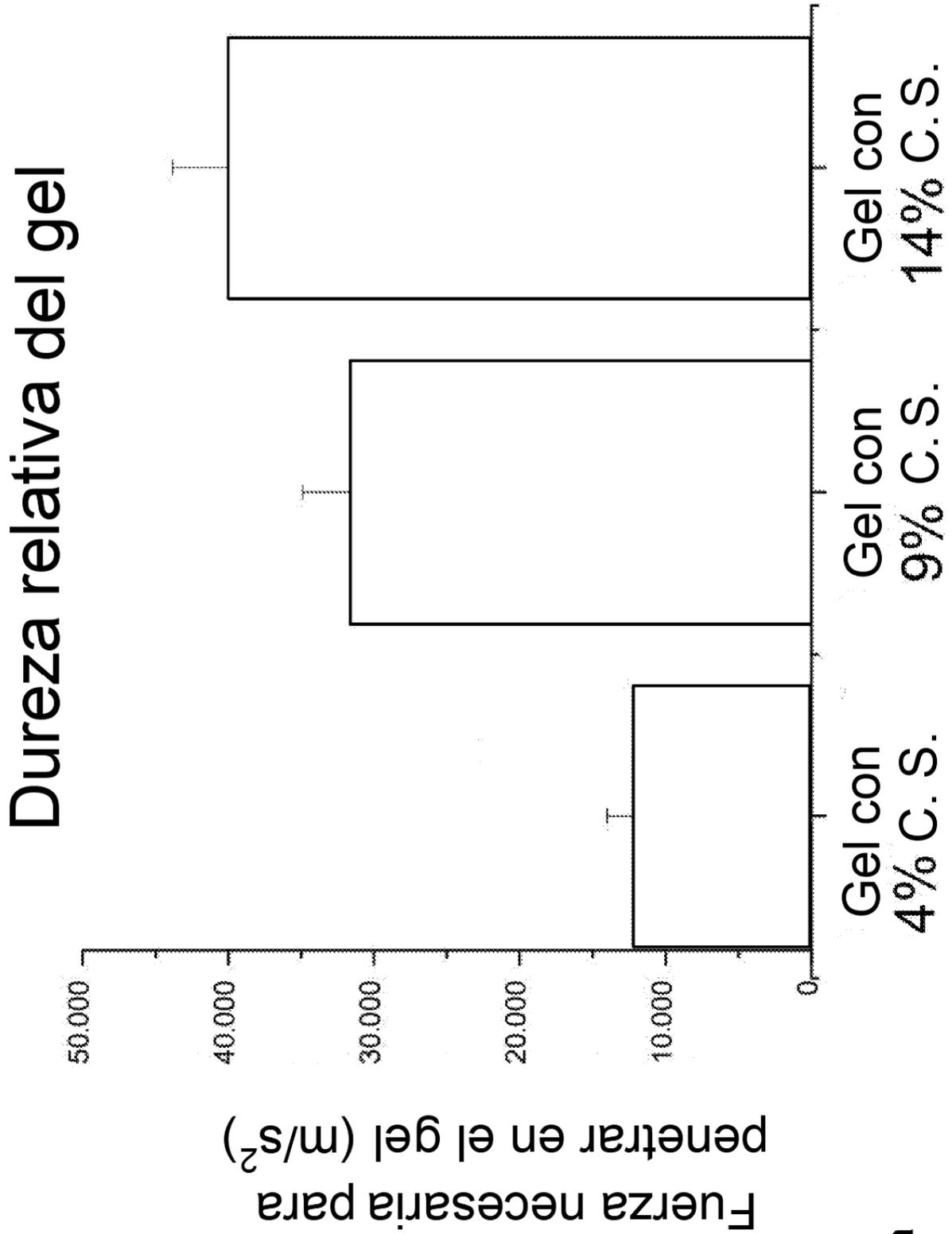


Fig. 3a

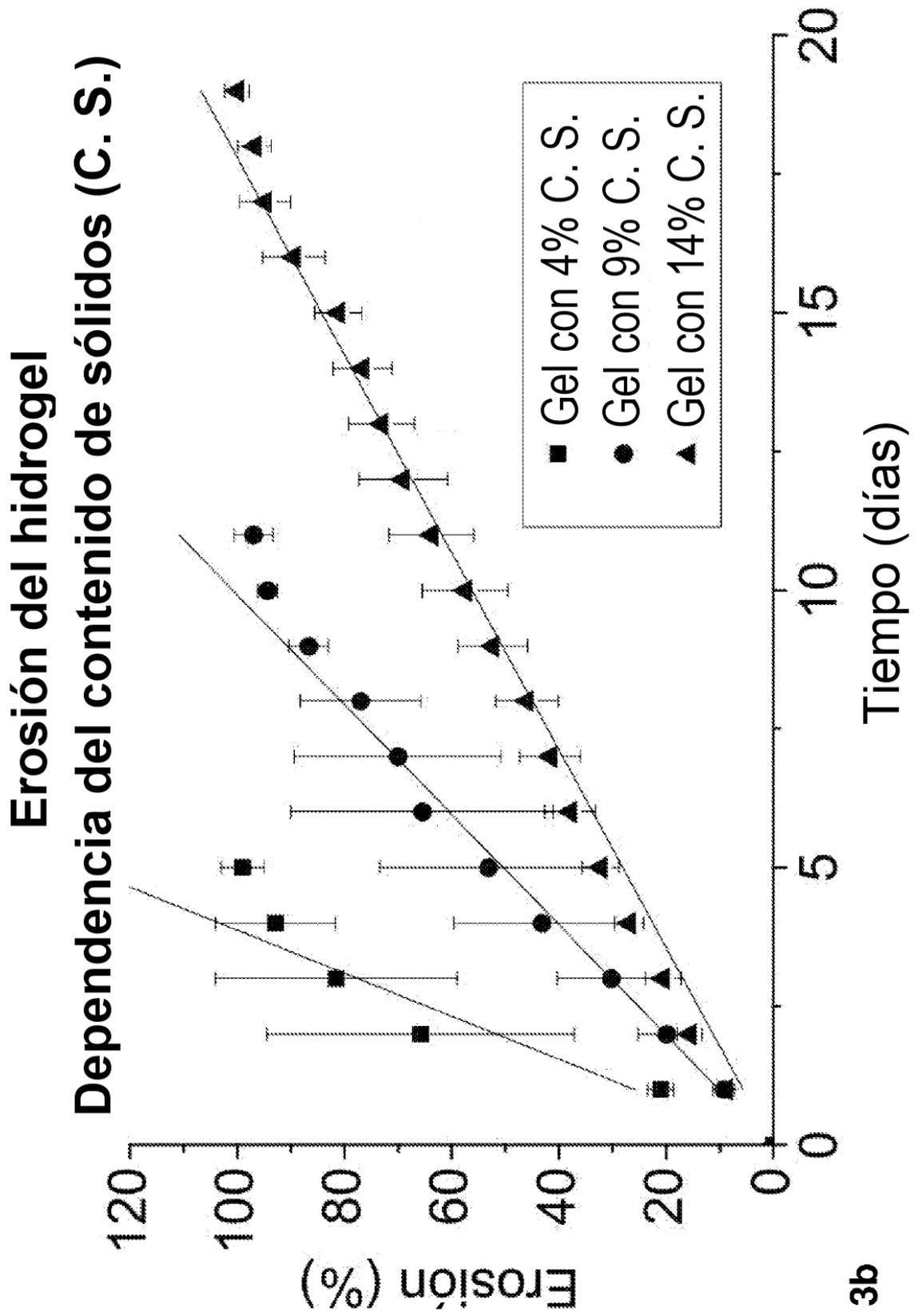


Fig. 3b

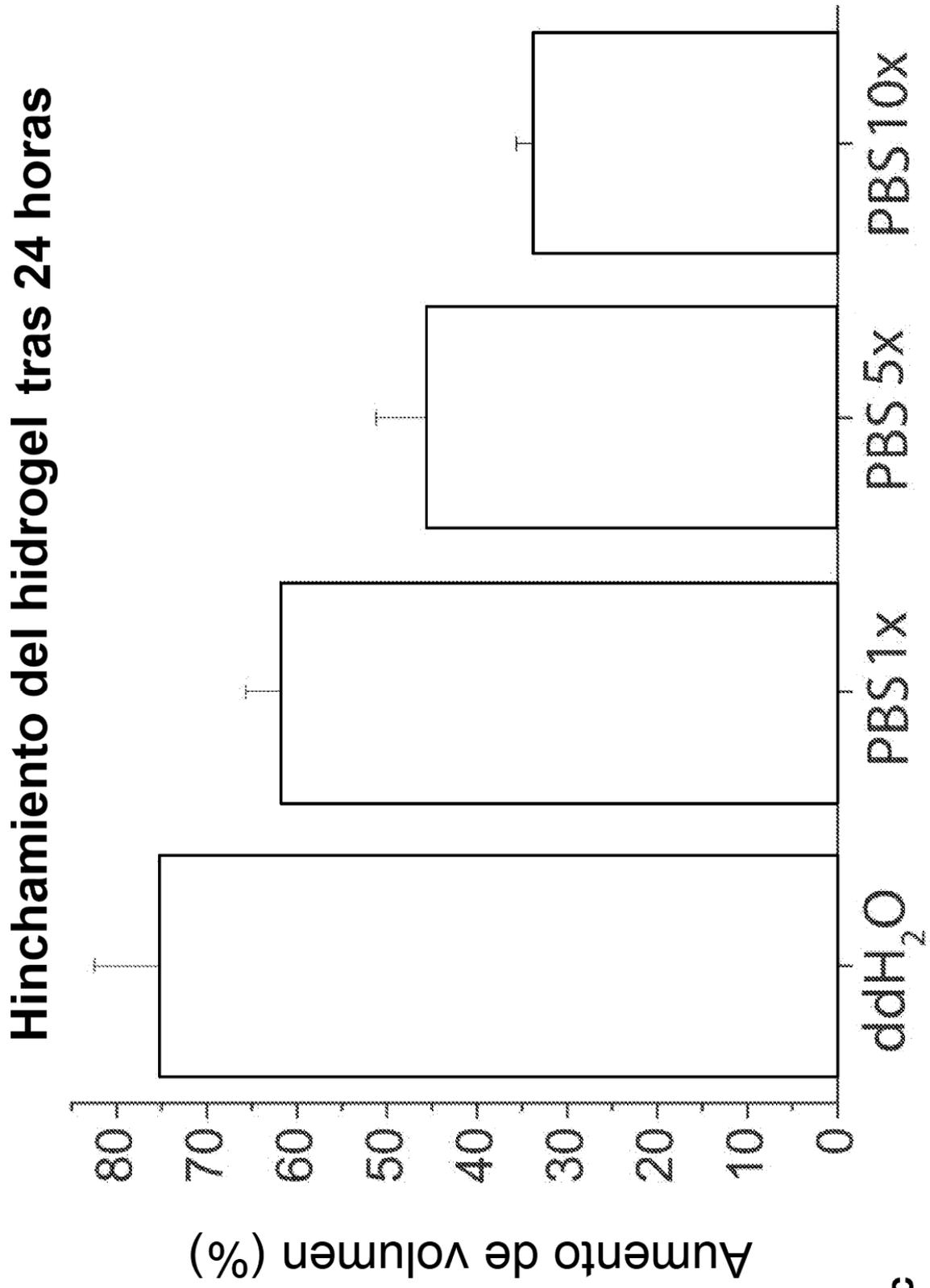


Fig. 3c

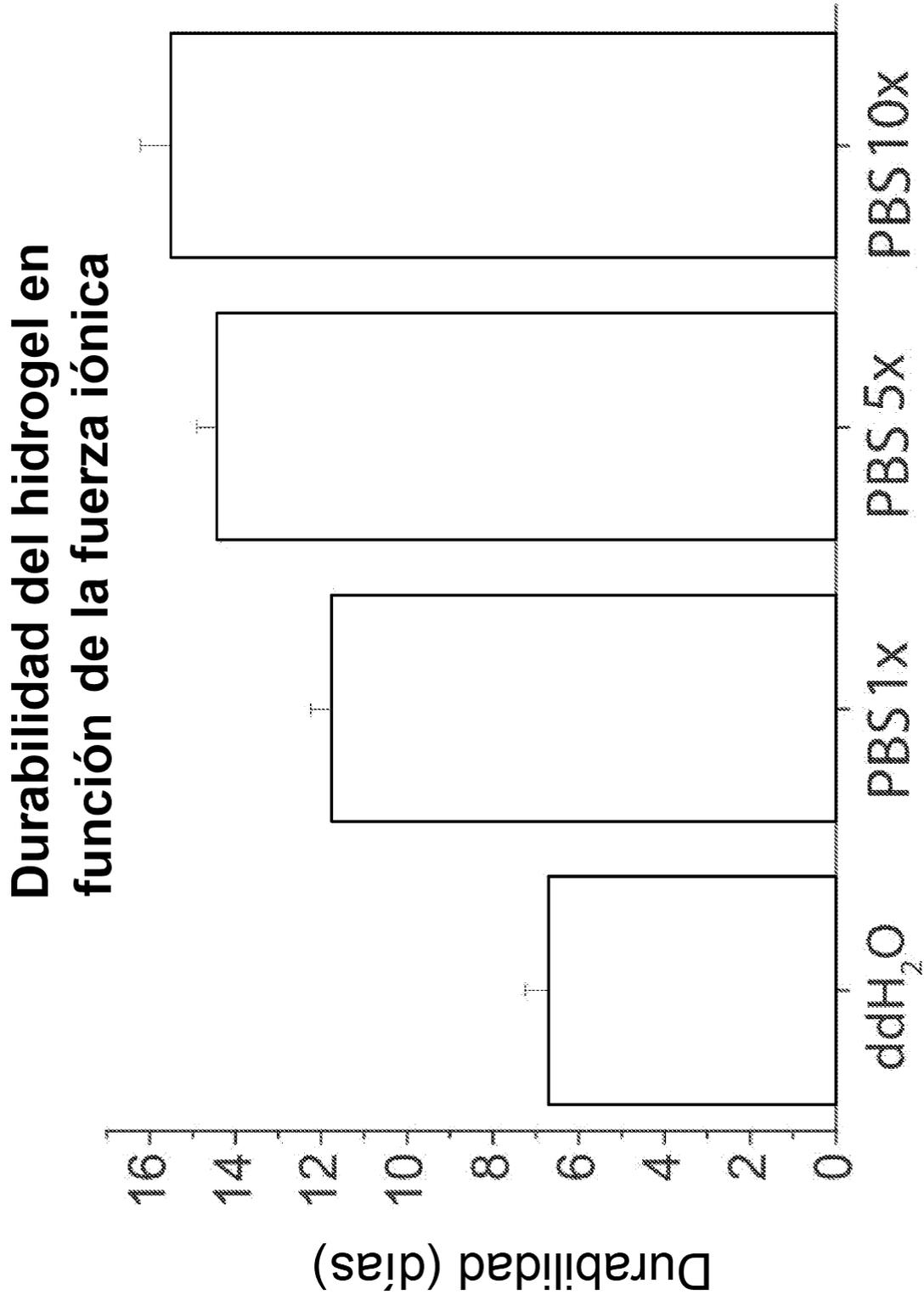


Fig. 3d

Cromatografía de exclusión por tamaño para solución de hidrogel con 1% C. S.

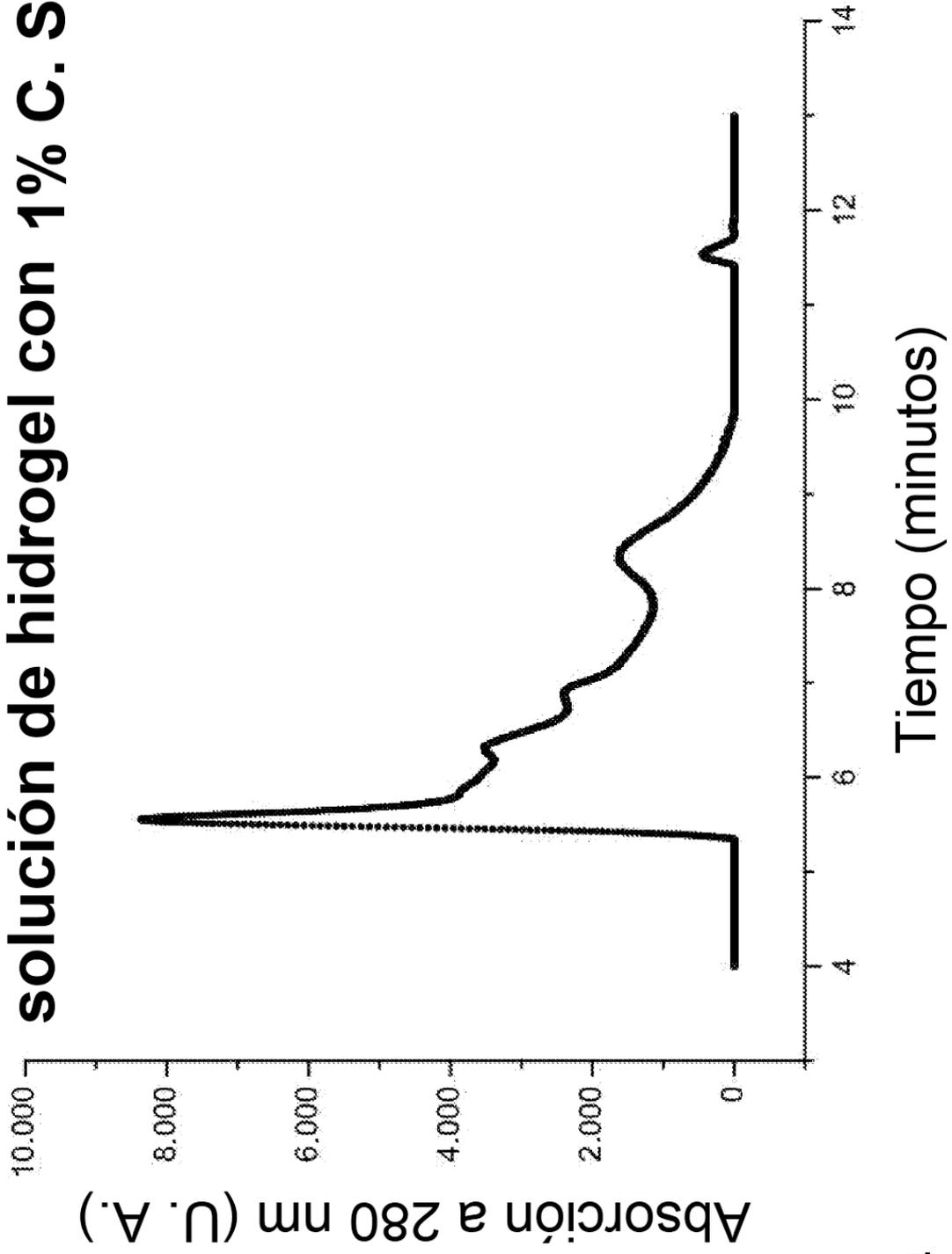


Fig. 4

Cromatografía de exclusión por tamaño para soluciones de hidrogel tras erosión

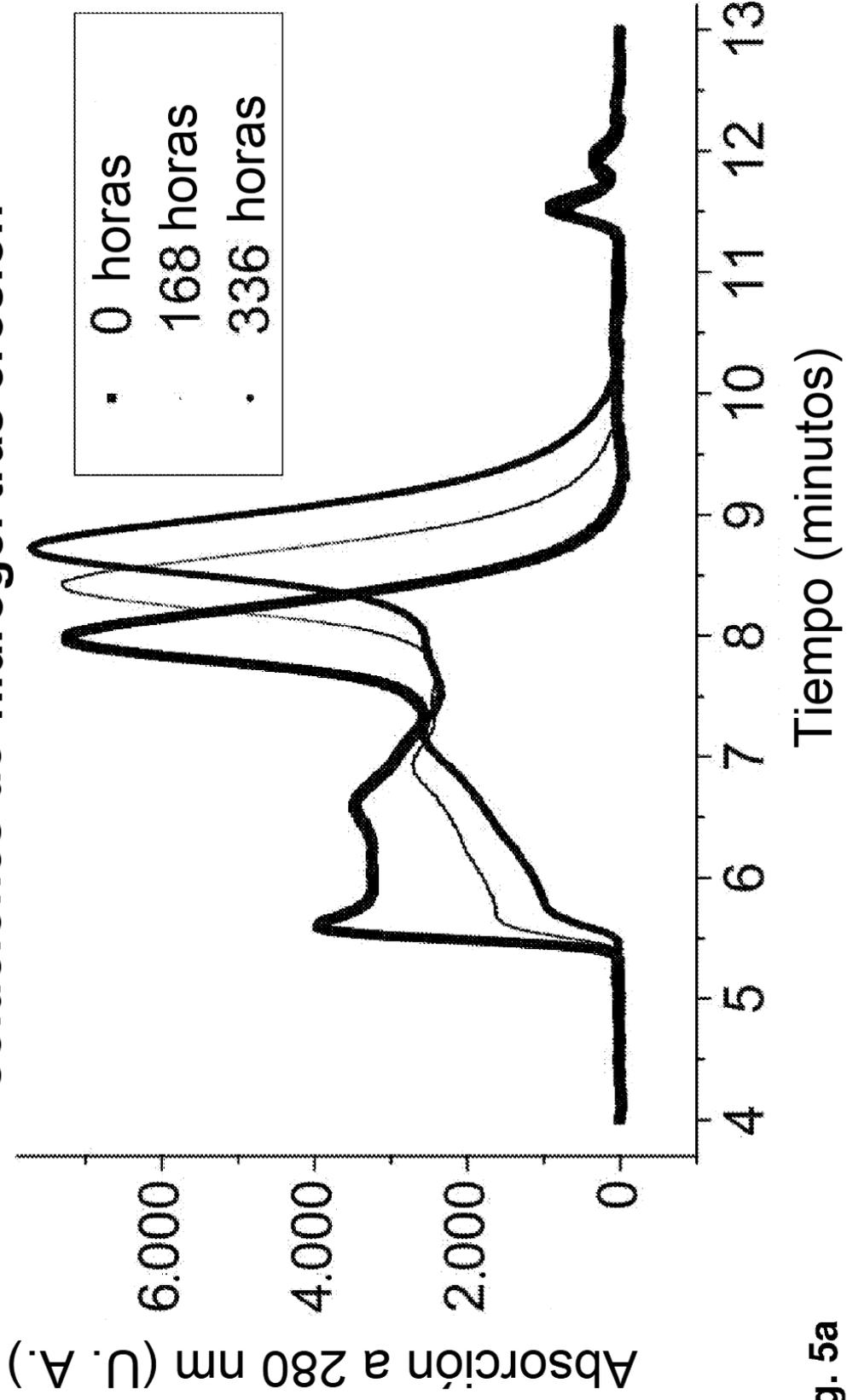


Fig. 5a

**Cromatografía de exclusión por tamaño para
soluciones de hidrogel tras erosión concentradas**

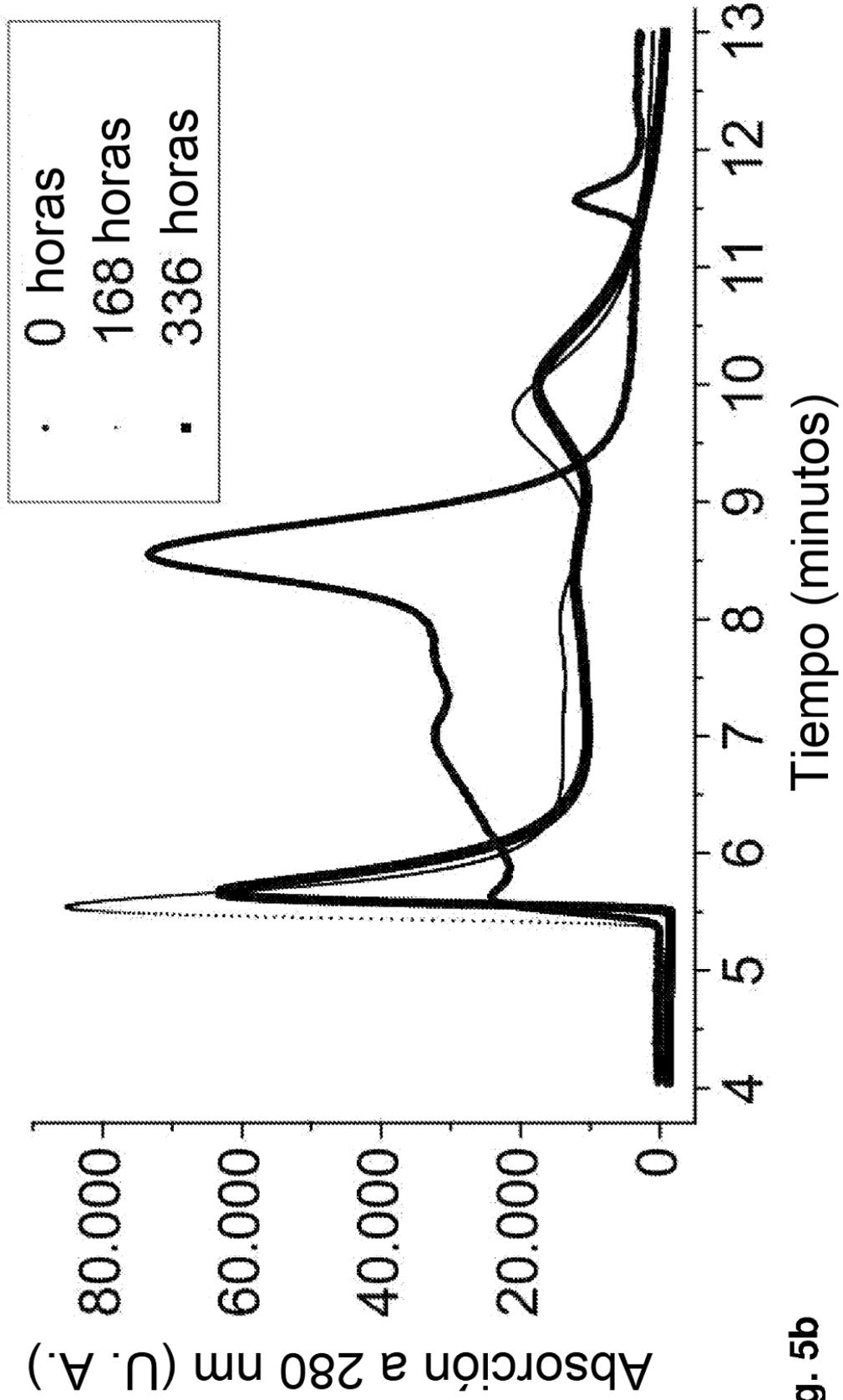


Fig. 5b

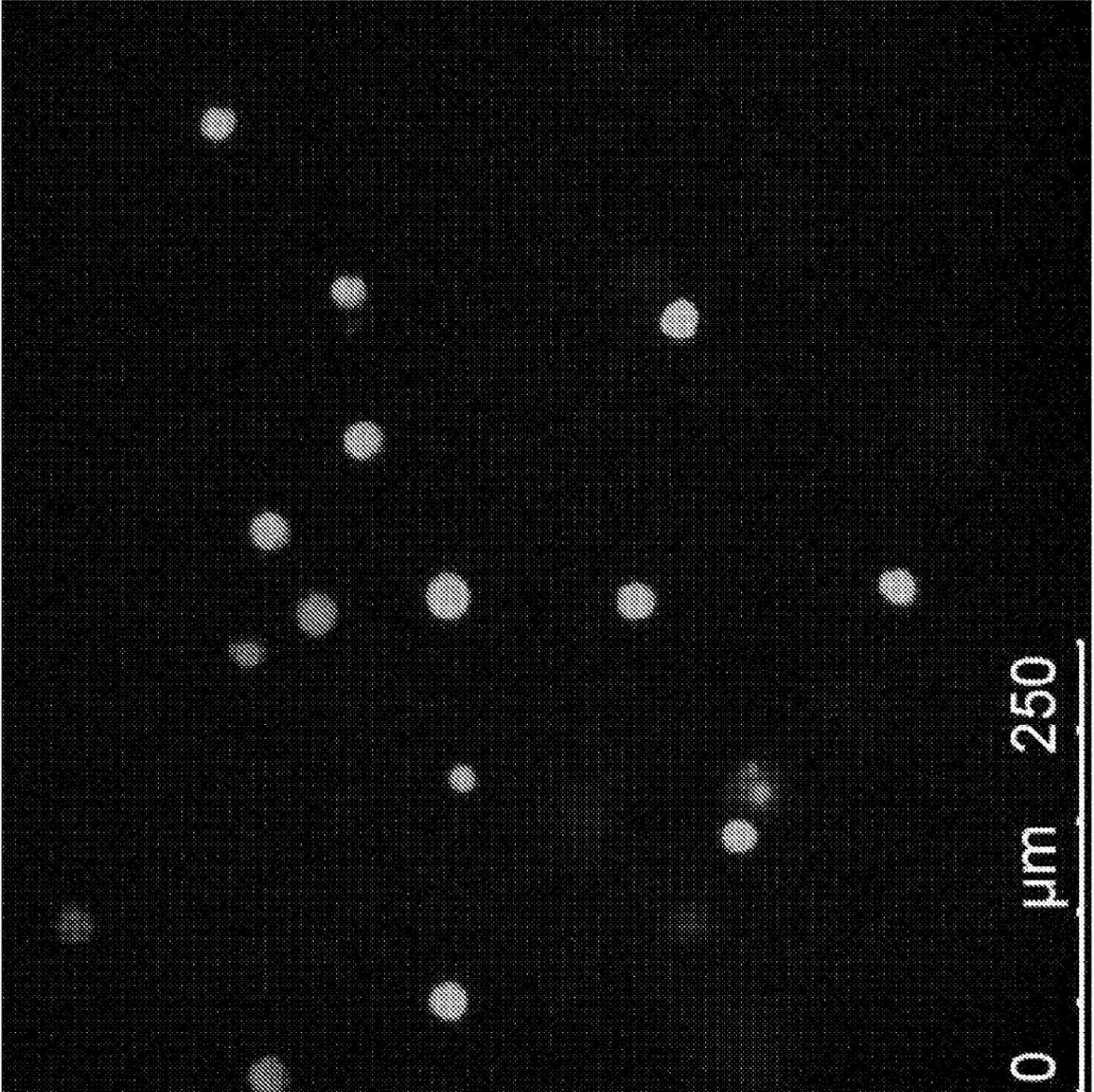


Fig. 6

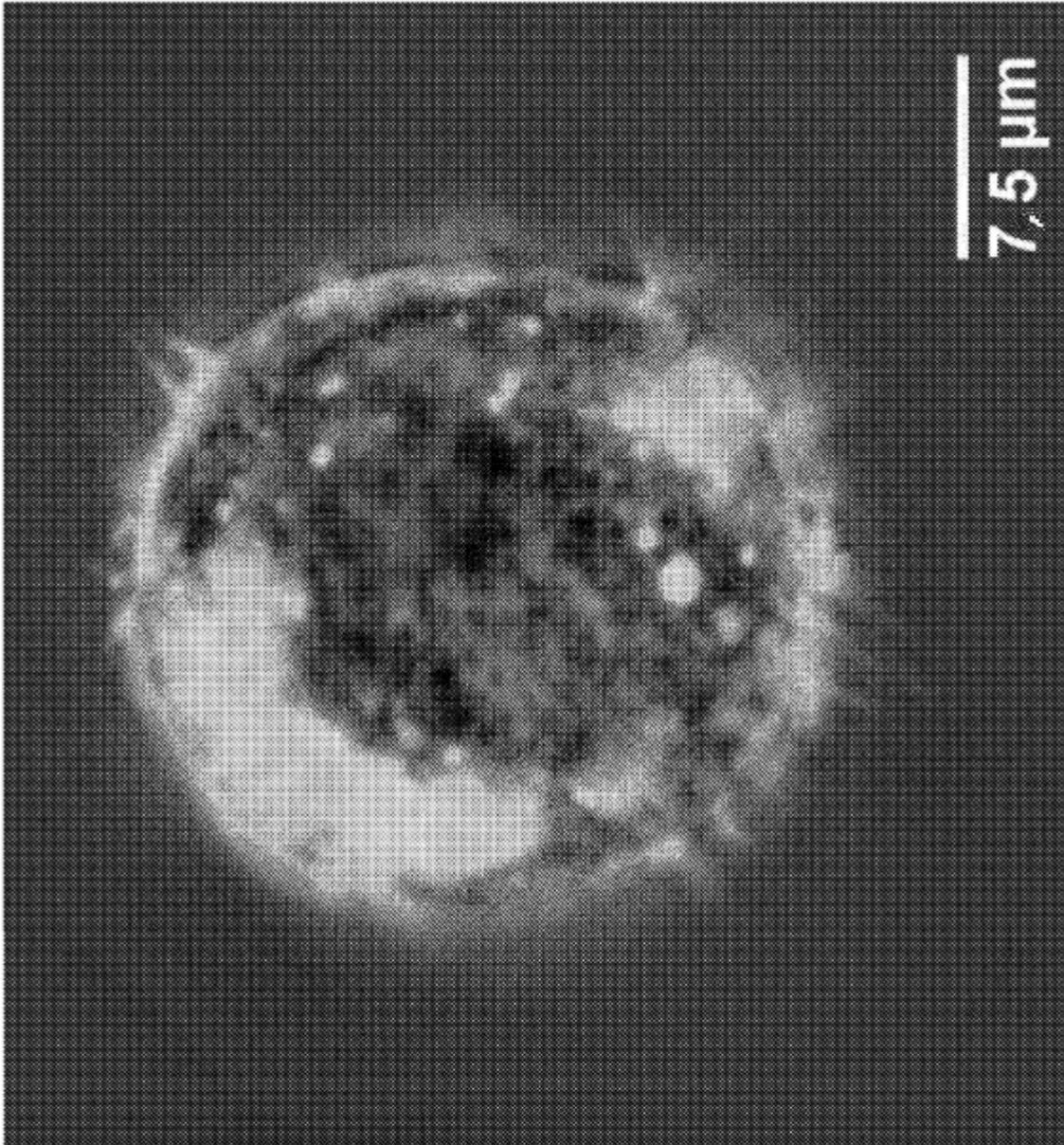


Fig. 7a

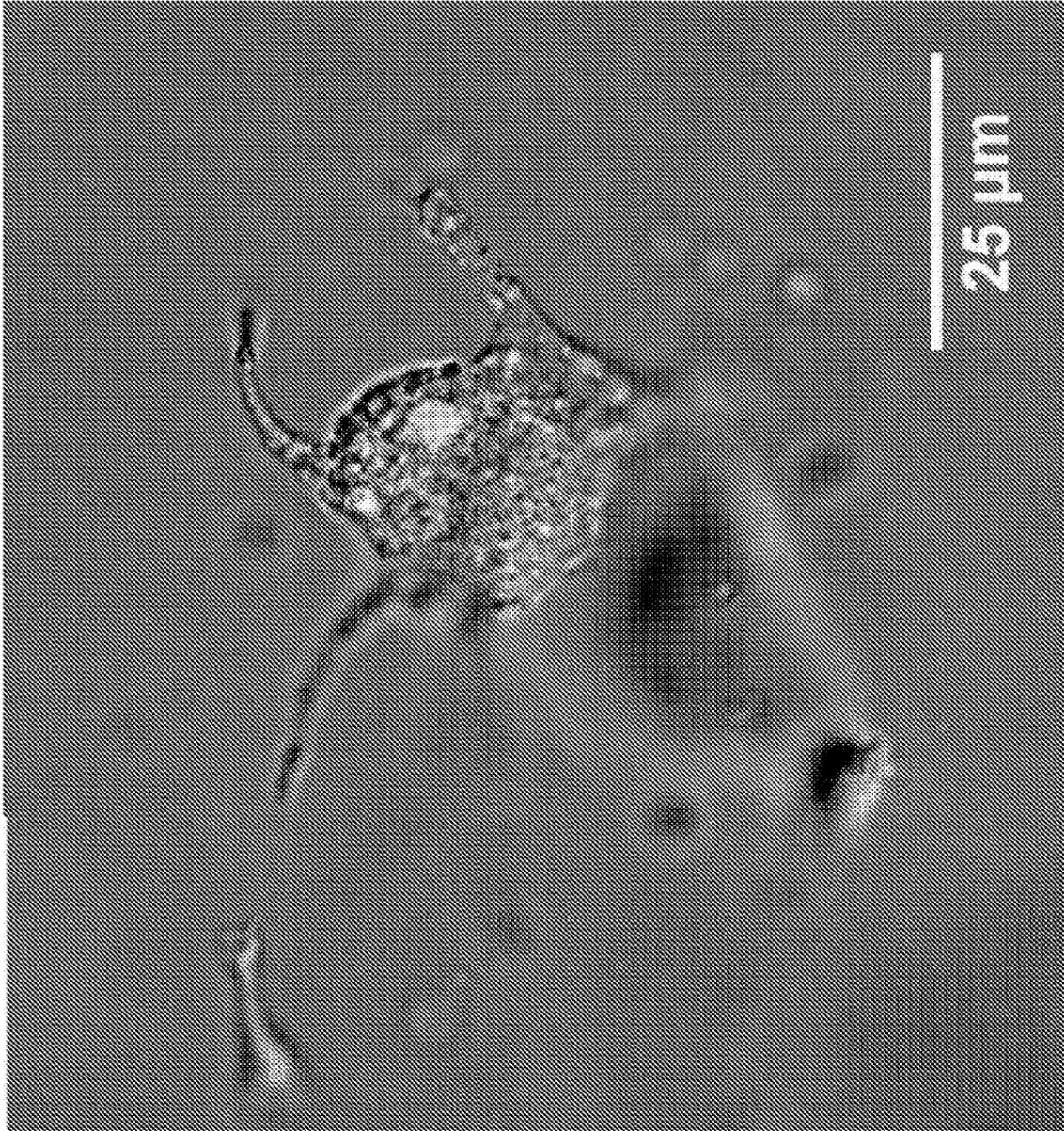


Fig. 7b

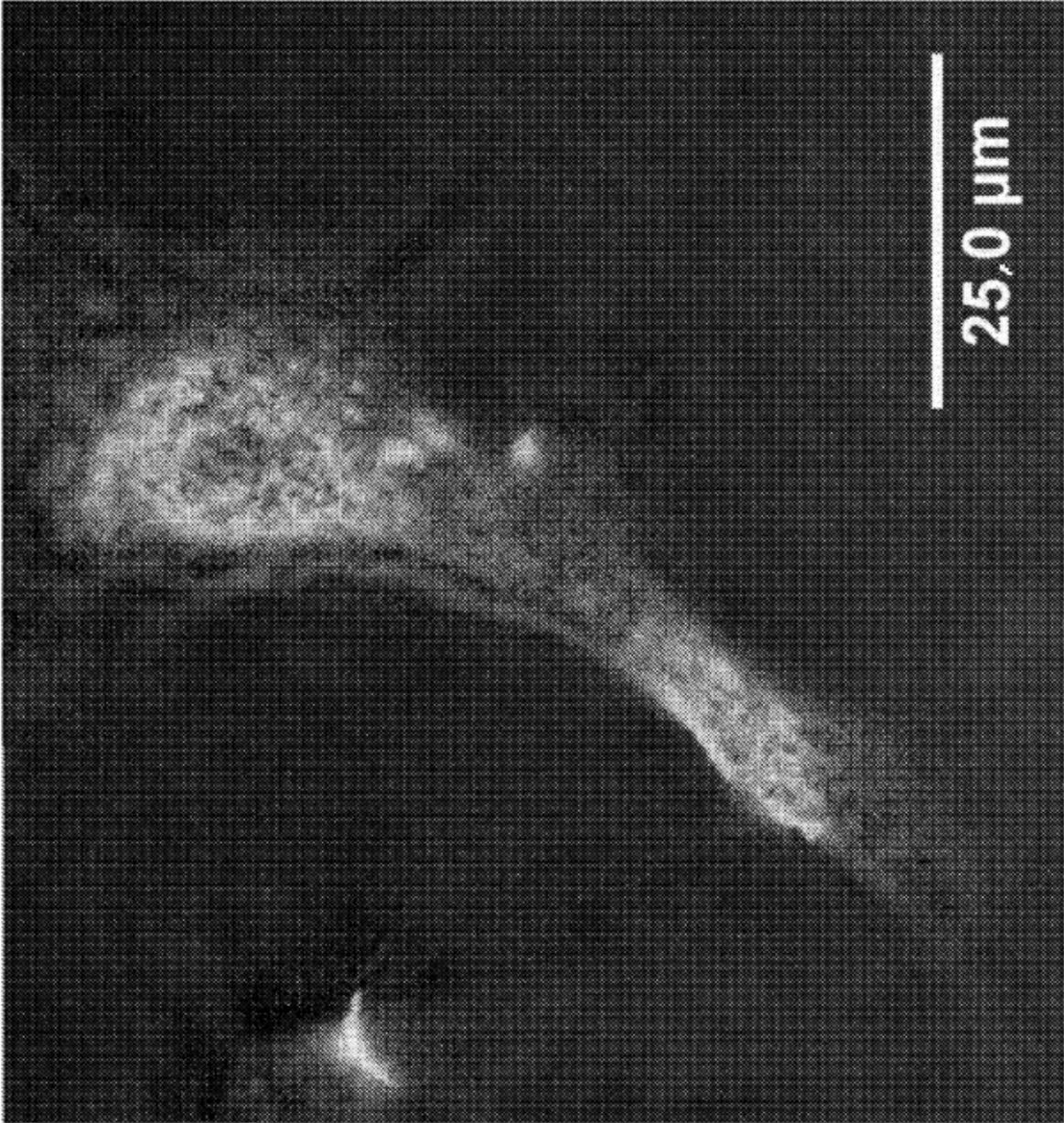


Fig. 7c

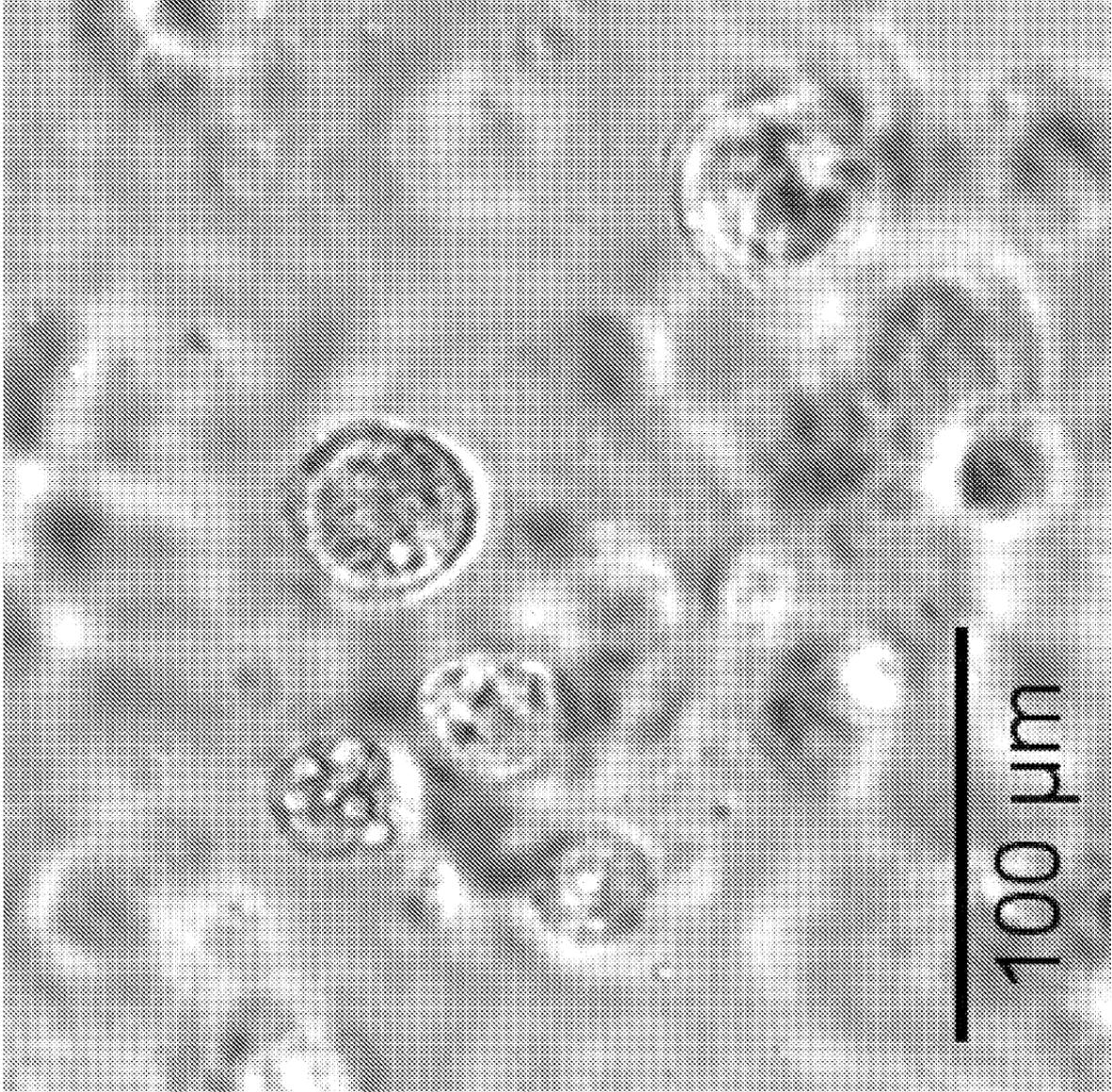


Fig. 7d

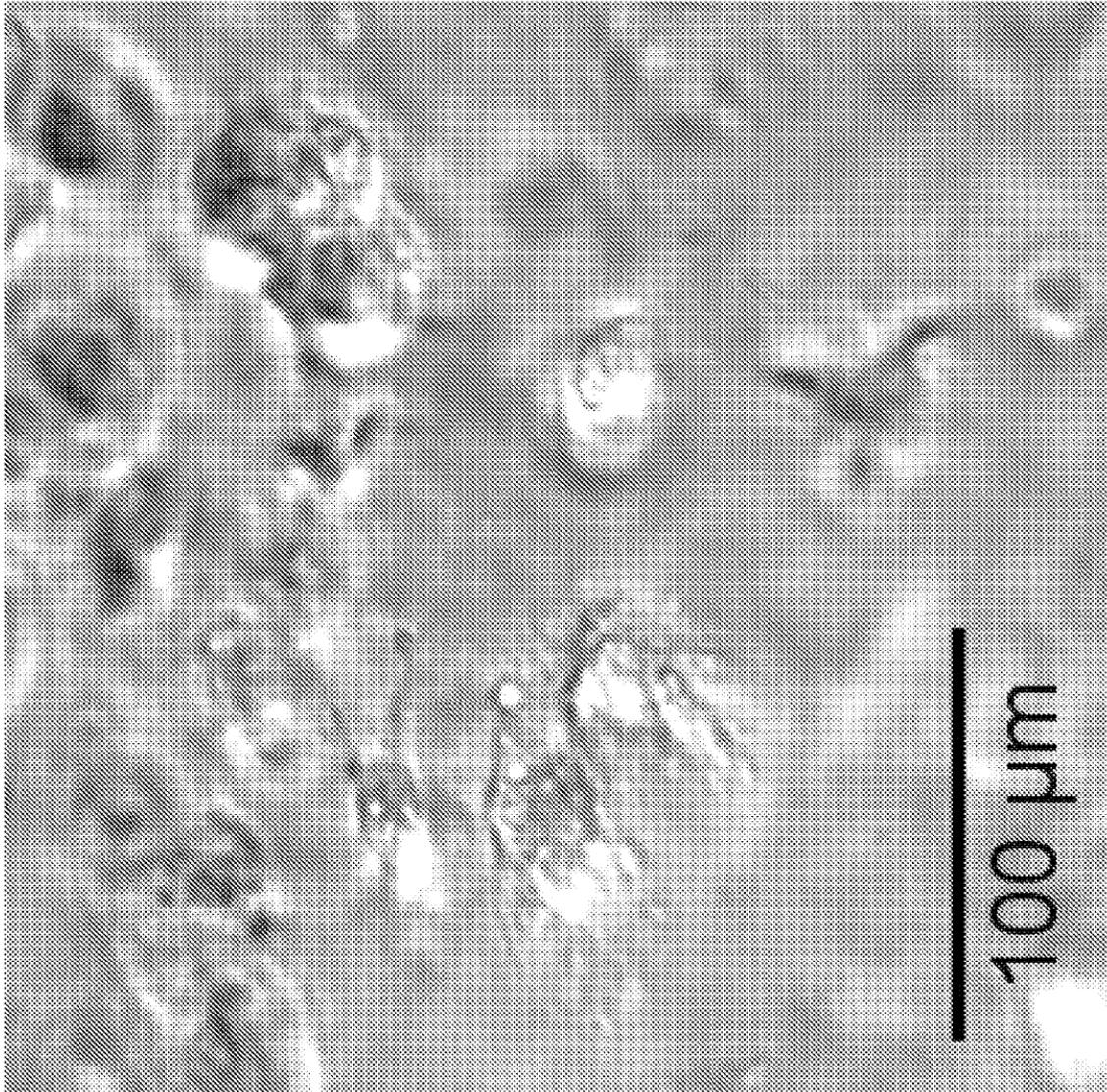


Fig. 7e

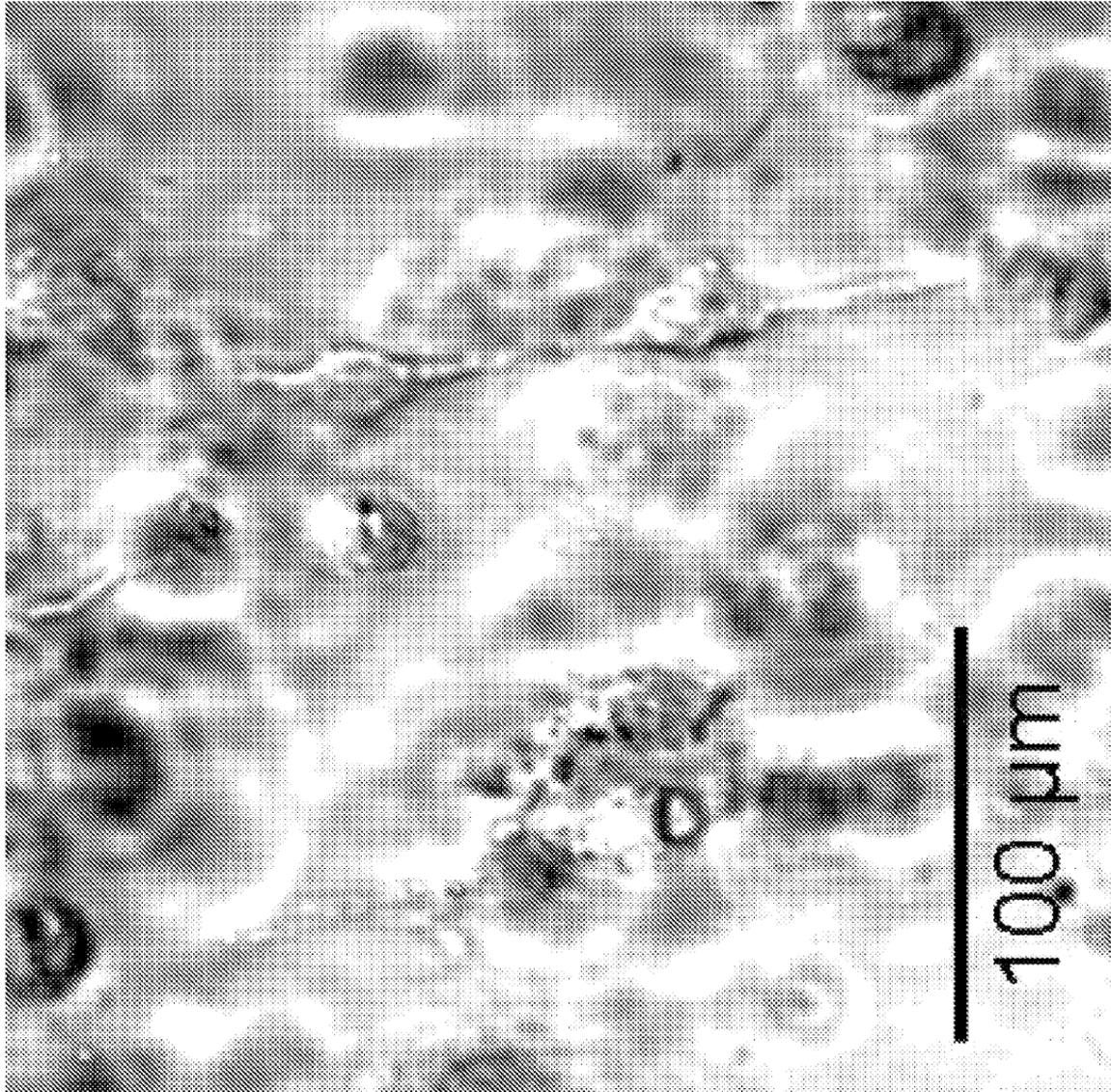


Fig. 7f

Expansión celular en función del contenido de B-II

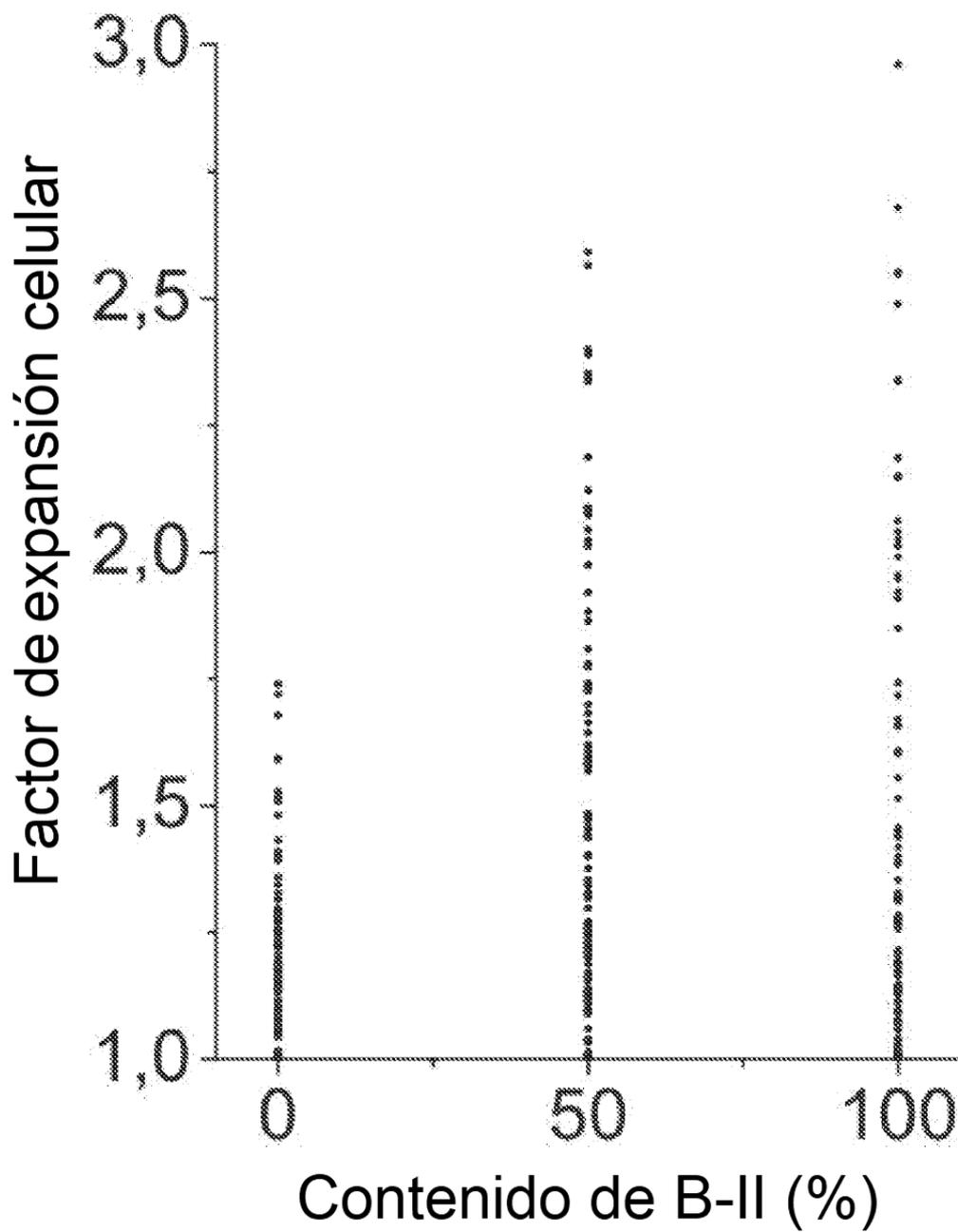


Fig. 7g

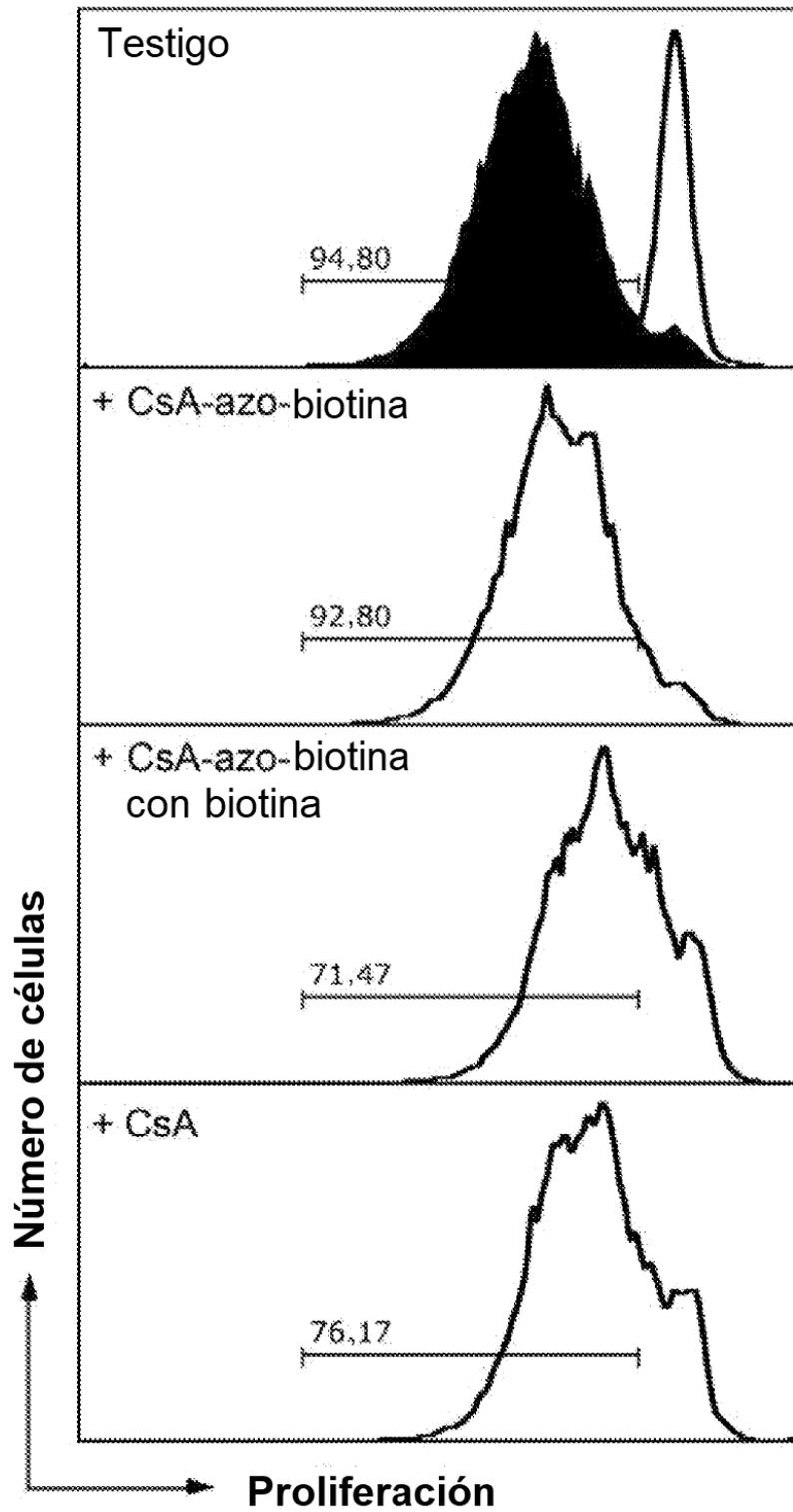


Fig. 8