

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/195552 A1

(43) Fecha de publicación internacional
11 de diciembre de 2014 (11.12.2014) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C08L 33/10 (2006.01) **A61K 47/32** (2006.01)
C08L 39/06 (2006.01) **A61L 27/26** (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01) **A61L 27/52** (2006.01)
C08L 51/08 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070459

(22) Fecha de presentación internacional:

4 de junio de 2014 (04.06.2014)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 201330851 7 de junio de 2013 (07.06.2013) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avda. de Séneca, nº 2, Vice-Rectorado de Investigación, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: **GALLARDO RUIZ, Alberto**; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **ARANAZ CORRAL, Inmaculada**; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **NASH, María**; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **GÓMEZ TARDAJOS, Myriam**; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **ELVIRA PUJALTE, Carlos**; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006

Madrid (ES). **REINECKE, Helmut**; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **MARTÍNEZ CAMPOS, Enrique**; Instituto de Estudios Bursátiles (IEB), C/Alfonso XI, 6, E-28014 Madrid (ES). **RAMOS LINO, Viviana**; Instituto de Estudios Bursátiles (IEB), C/Alfonso XI, 6, E-28014 Madrid (ES). **LÓPEZ LACOMBA, José Luis**; Instituto de Estudios Bursátiles (IEB), C/Alfonso XI, 6, E-28014 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: MULTICOMPONENT VINYLPIRROLIDONE HYDROGELS AND USE THEREOF IN TISSUE ENGINEERING AND/OR REGENERATIVE MEDICINE

(54) Título : HIDROGELES MULTICOMPONENTES BASADOS EN VINILPIRROLIDONA Y SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS Y/O MEDICINA REGENERATIVA

(57) Abstract: The invention relates to a hydrogel having a cross-linked multicomponent polymer network structure, characterised in that said hydrogel includes: a) blocks derived from vinylpyrrolidone (V) and blocks derived from an anionic or anionisable alkene monomer (A), wherein the reactivity ratios in binary radical copolymerisation of (V) and (A) have maximum and minimum values of 0.5, respectively; and b) blocks derived from at least one cross-linking agent; as long as the one or more cross-linking agents are i) two cross-linking agents E1 and E2, wherein E1 is at least partially homologous with (A) and E2 is at least partially homologous with (V); or ii) a cross-linking agent E3 which is homologous with (A) and (V). The invention also relates to a method for obtaining the aforementioned hydrogel, which includes placing the monomers (A) and (V) in contact with the cross-linking agents E1 and E2, or the cross-linking agent E3, under radical polymerisation conditions. The invention further relates to the use of the hydrogel in biological, biomedical or biotechnology applications that require non-toxic hydrogel-cell interaction.

(57) Resumen: Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, caracterizado porque comprende: a) unidades derivadas de vinilpirrolidona (V) y unidades derivadas de un monómero alquénico aniónico o anionizable (A), donde las relaciones de reactividad en copolimerización radical binaria de (V) y (A) tienen valores máximo y mínimo de 0.5 respectivamente; y b) unidades derivadas de al menos un entrecruzante; siempre que el ó los entrecruzantes sean i) dos entrecruzantes E1 y E2, donde E1 presenta homología al menos parcial respecto a (A) y E2 presenta homología al menos parcial respecto a (V); ó ii) un entrecruzante E3 que presenta homología respecto a (A) y (V). Procedimiento de obtención del mencionado hidrogel que comprende poner en contacto los monómeros (A) y (V) con los entrecruzantes E1 y E2, o el entrecruzante E3, en condiciones de polimerización radicalaria. Uso del hidrogel en aplicaciones biológicas, biomédicas o biotecnológicas que requieran una interacción no tóxica hidrogel-célula.

WO 2014/195552 A1



Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

DESCRIPCIÓN

HIDROGELES MULTICOMPONENTES BASADOS EN VINILPIRROLIDONA Y SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS Y/O MEDICINA 5 REGENERATIVA

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un hidrogel con estructura de red polimérica
10 multicomponente entrecruzada que comprende vinilpirrolidona, un monómero
alquénico aniónico o anionizable, preferiblemente un monómero acrílico
aniónico, y uno o más entrecruzantes. También se refiere a un procedimiento
de obtención del hidrogel donde la red multicomponente se forma en una única
etapa de polimerización. Adicionalmente, la presente invención también se
15 refiere al uso del hidrogel en ingeniería de tejidos y/o medicina regenerativa,
preferiblemente en cultivo celular y trasplante de monocapas celulares.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20 Las metodologías tradicionales usadas para el despegado celular implican el
uso casi genérico de enzimas proteolíticas agresivas, siendo la más común la
tripsina, o métodos de raspado celular. Ambas aproximaciones pueden ser
perjudiciales para las células recolectadas. Hay estudios que muestran que el
daño causado está asociado a la disrupción de la membrana celular que puede
25 originar una cascada de fallos en la funcionalidad celular. Por ejemplo, se ha
descrito que el despegado proteolítico causa alteraciones en la expresión
proteómica, concretamente con una mayor expresión de proteínas relacionadas
con la apoptosis y una menor expresión de proteínas relacionadas con el
metabolismo y el crecimiento. El despegado mecánico de células causa
30 pérdida de DNA intracelular, da lugar a un bajo número de células y además
son células con una matriz de tipo cristalina rodeando las células recuperadas,
lo cual es indicativo de fuga intracelular debido a la ruptura de la membrana.

[Nash, M. E.; Carroll, W.; Healy, D.; Elvira, C.; Rochev, Y. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22, 19376]. Esta disrupción celular constituye una deficiencia muy significativa en estas aproximaciones de desagregado celular, y por tanto existe una búsqueda de métodos alternativos de despegado celular más
5 suaves. A principios de los 90 se desarrollaron plataformas termosensibles capaces de albergar células hasta confluencia y de despegarlas mediante un cambio de la temperatura. Esta aproximación de despegado celular representa un modo más suave y no destructivo de recolección de células que supera las limitaciones de las técnicas tradicionales.

10

El alto número de publicaciones de las últimas dos décadas dedicadas al desarrollo y optimización de este tipo de plataformas termosensibles habla de la importancia de este campo en biomedicina. La gran mayoría de estas publicaciones describen sustratos tipo poli-N-isopropilacrilamida (pNIPAm),
15 los cuales poseen de forma inherente un comportamiento termosensible en un rango fisiológicamente relevante. A temperaturas por encima de la LCST (lower critical solution temperature) los sustratos de pNIPAm asumen un estado hidrofóbico colapsado que bajo ciertas condiciones dan lugar a adhesión y proliferación celular. Algunas de estas condiciones pueden ser bastante
20 estrictas como, por ejemplo, el espesor del sustrato que debe ser muy pequeño. Una vez que el crecimiento celular ha alcanzado el nivel deseado de confluencia, una capa de células puede ser despegada mediante un simple descenso de temperatura por debajo de la LCST. Este descenso convierte el pNIPAm en hidrofílico de forma que la capa polimérica se expande repeliendo
25 la capa celular. Tras este proceso se recolecta la capa celular. La manipulación exitosa de la capa celular requiere el desarrollo de un 'superstrato' celular, es decir, una membrana superior plana, que se usa para facilitar el recolectado de la capa celular evitando que se doble sobre sí misma e impidiendo su contracción. [Nash, M. E.; Carroll, W.; Healy, D.; Elvira, C.; Rochev, Y. *Journal*
30 *of Materials Chemistry* **2012**, 22, 19376].

Las ventajas de despegar células de esta manera, desde un punto de vista biomédico, son fundamentalmente tres. En primer lugar, se ha observado que las células recolectadas de sustratos termosensibles mediante modulación térmica retienen su funcionalidad específica y su metabolismo, además no sufren los daños asociados con las técnicas de despegado tradicionales. En segundo lugar, mientras que los métodos clásicos de despegado rinden células individuales o pequeños grupos de células ya que se rompen o separan físicamente las uniones célula-célula, célula-sustrato o célula-ECM (proteínas de la matriz extracelular), los despegados obtenidos usando superficies termosensibles solo afectan a las uniones célula-sustrato, manteniendo las uniones célula-célula y célula-ECM. Es por tanto posible despegar una capa celular completa junto al ECM asociado. Las capas de células recolectadas pueden así ser usadas en aplicaciones de ingeniería de tejidos tales como el la reparación de tejido dañado o en la preparación de constructos biomédicos 2D o 3D. Por poner unos pocos ejemplos, esta aproximación de ingeniería de capas celulares ha resultado en la recolección de capas celulares compuestas de células epiteliales de la mucosa oral, epiteliales de la córnea, queratinocitos epidérmicos, mioblastos del tejido esquelético o miocardiocitos. Además, capas celulares se han superpuesto para conseguir sistemas 3D similares a tejidos, usando una o más tipos de células y manteniendo su integridad fisiológica y morfológica. [Nagase, K.; Kobayashi, J.; Okano, T. *The Royal Society Society, Interface* **2009**, 3, 293]. Las capas celulares obtenidas de este modo se han propuesto para muchas aplicaciones clínicas, como miocardiopatía dilatada, cirugía plástica reconstructiva y regenerativa, ulceración del esófago y oftalmología. El trasplante de capas celulares autólogas recolectadas de pNIPAm a pacientes humanos ha sido descrito recientemente. Estas terapias de capas celulares se han usado en el trasplante de capas celulares epiteliales de mucosa oral a córneas para evitar la opacificación corneal del paciente y mantener transparencia de la córnea, así como en el trasplante de capas celulares de mioblastos autólogos en multicapas para tratar miocardiopatía dilatada en un paciente, enfermedad coronaria habitual. En el primer estudio el trasplante sin sutura se restableció la transparencia óptica en los 4 pacientes

- tratados y en el segundo se mejoró significativamente la función cardíaca del paciente. Ya que esta aproximación empleó células autólogas se evitaron los problemas de rechazo inmunológico presentes en otras terapias alternativas. Es importante resaltar que se deben realizar otros ensayos clínicos antes de
- 5 que estas terapias puedan ser ampliamente adoptadas. [Kobayashi, J.; Okano, T. *Science and Technology of Advanced Materials* **2010**, 11, 1. Sawa, Y.; Miyagawa, S.; Sakaguchi, T.; Fujita, T.; Matsuyama, A.; Saito, A.; Shimizu, T.; Okano, T. *Surgery Today* **2012**].
- 10 Por último, los requisitos clínicos en ingeniería de tejidos han sufrido un desplazamiento colectivo hacia la adopción de prácticas en cultivo celular que eviten el uso de productos derivados de animales tales como tripsina debido al riesgo asociado con la exposición involuntaria a patógenos inesperados presentes en la fuente animal. Por tanto, un despegado de células que no use
- 15 productos derivados de animales cumpliría los requerimientos de seguridad en aquellos cultivos celulares en los que las células van a ser usadas en aplicaciones clínicas/terapéuticas.

- El hecho de que tales sustratos estén ahora disponibles en el mercado a nivel
- 20 mundial apoya los esfuerzos dedicados al desarrollo de este tipo de plataformas, aunque el alto coste de los sustratos disponibles comercialmente hace su uso prohibitivo como material de rutina en cultivo celular. [Nash, M. E.; Carroll, W.; Healy, D.; Elvira, C.; Rochev, Y. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22, 19376]. Ya que los sustratos puros de pNIPAm son pobres soportes
- 25 celulares, se han desarrollado diversas técnicas para producir recubrimientos en base pNIPAm que propicien bioadhesión. Hay que destacar la polimerización mediante haz electrónico de NIPAm para formar una capa ultrafina de pNIPAm que se ha descrito como apropiada para el crecimiento celular para un amplio rango de líneas celulares. Si el recubrimiento de pNIPAm
- 30 supera los ~30nm de espesor el recubrimiento se considera biorepulsivo, es decir, pocas células se unen y proliferan. [Nagase, K.; Kobayashi, J.; Okano, T. *The Royal Society Society, Interface* **2009**, 3, 293. Kobayashi, J.; Okano, T.

Science and Technology of Advanced Materials **2010**, 11, 1]. Otras técnicas para producir recubrimientos de pNIPAm describen correlaciones similares entre el espesor y la adhesión celular y por tanto la gran mayoría de tecnologías exitosas de despegado celular a través de pNIPAm usan métodos
5 tecnológicamente y económicamente costosos para la formación de filmes ultra-finos. Por ello, sigue existiendo la necesidad de desarrollar alternativas para el despegado suave de células y capas celulares.

Por otro lado, en el estado de la técnica se conocen materiales poliméricos con
10 estructura de redes dobles (RD). Éstas pueden describirse como redes poliméricas interpenetradas (IPNs según sus siglas en inglés) en las que las dos redes independientes tienen un entrecruzamiento altamente asimétrico, es decir, una red está mucho más entrecruzada que la otra. La primera RD fue descrita por Gong et al y consiste en una primera red iónica altamente
15 entrecruzada de poli-ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (PAMPS) y una segunda red neutra ligeramente entrecruzada del polímero soluble poliacrilamida (PAAm), en la que la relación molar global de monómeros (AMPS/AA) varía entre 1 y 0.05. En particular, la primera red presenta un 4 % molar de entrecruzante, mientras que la segunda red contiene únicamente un
20 0,1 % de entrecruzante. [Gong, J. P.; Katsuyama, Y.; Kurokawa, T.; Osada, Y. *Advanced Materials* **2003**, 15, 1155].

Se ha descrito que las redes dobles presentan, a altos valores de hinchamiento, propiedades mecánicas superiores a las correspondientes a sus
25 redes sencillas. Hasta el momento, estas redes dobles se preparan en dos pasos para obtener la primera y la segunda red, respectivamente.

Investigadores del mismo grupo que los inventores han descrito teóricamente que las propiedades topológicas de una red formada por dos monómeros M1 y M2 con alta reactividad diferencial, siendo M1 mucho más reactivo que M2,
30 puede ser controlada por la naturaleza del entrecruzante utilizado. [Reinecke, H.; Gallardo, A. *Macromolecular Theory and Simulations* **2009**, 18, 25]. Esta alta reactividad diferencial hace que se formen dos principales familias de

cadenas, o dos tipos de componentes macromoleculares: un primer componente que comprende mayoritariamente unidades derivadas del monómero M1 y se forma al principio de la reacción de polimerización; mientras que el segundo componente comprende mayoritariamente unidades derivadas del monómero M2, y se forma una vez que M1 se ha consumido en el medio de reacción. En la formación de la red un único entrecruzante asimétrico con homología a M1 y M2 daría lugar a una red multicomponente con una estructura que tiende a una cored; mientras que una mezcla de dos entrecruzantes, el primero de ellos con homología hacia M1 y el segundo con homología hacia M2, daría lugar a una red multicomponente con una estructura que tiende a una IPN.

Investigadores pertenecientes al mismo grupo también han descrito la copolimerización radicalaria de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y acrilamida (AA) en presencia de varios agentes de entrecruzamiento, entre ellos, una mezcla de etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) y bisacrilamida (BIS), siendo EGDMA homólogo a HEMA y BIS homólogo a AA; o acrilamidaetilenmetacrilato (METAA según sus siglas en inglés), compuesto asimétrico que comprende simultáneamente funcionalidad acrilamida y metacrilato. Los resultados obtenidos muestran que el hidrogel obtenido en presencia de METAA presenta un aumento significativo del módulo elástico, mientras que el uso de la mezcla EGDMA y BIS únicamente lo incrementa ligeramente. [Demirgöz D.; Navarro R.; Pérez M.; Reinecke H.; Gallardo A. *Journal of Applied Polymer Science*, **2009**, 115, 896-900].

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, preferiblemente

que tiende a una estructura de red doble (RD), caracterizado porque comprende:

- a) unidades derivadas de vinilpirrolidona (V) y unidades derivadas de un monómero alquénico aniónico o anionizable (A), donde las relaciones de reactividad en copolimerización radical binaria de (V) y (A) tienen unos valores máximo y mínimo de 0.5 respectivamente, es decir, $r_V \leq 0.5$, $r_A \geq 0.5$; y
- b) unidades derivadas de al menos un entrecruzante; siempre que el o los entrecruzantes sean:
 - i) dos entrecruzantes E1 y E2, donde E1 presenta homología al menos parcial respecto a (A) y E2 presenta homología al menos parcial respecto a (V); o
 - ii) un entrecruzante E3 que presenta homología respecto a (A) y (V).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente, donde dicho procedimiento comprende poner en contacto los monómeros (A) y (V) con los entrecruzantes E1 y E2, o el entrecruzante E3, en condiciones de polimerización radicalaria.

De esta forma, la formación del hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada de la presente invención, preferiblemente que tiende a una estructura de red doble, hidrogel basado en vinilpirrolidona y con propiedades mecánicas mejoradas a alto hinchamiento respecto al hidrogel monocomponente de solo vinilpirrolidona, se puede obtener en una única etapa de polimerización debido a la gran diferencia de reactividad entre (A) y (V), ya que la vinilpirrolidona es un monómero con muy baja reactividad en polimerización radicalaria, en comparación con otros monómeros alquénicos como, por ejemplo, monómeros acrílicos o estirénicos.

El procedimiento en una sola etapa es muy simple: una polimerización radical convencional, que puede ser iniciada térmicamente, mediante iniciación redox o mediante irradiación UV.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al hidrogel tal como se describe en el primer aspecto de la presente invención, preferiblemente cuando (A) es un monómero acrílico aniónico, en aplicaciones biológicas, biomédicas o biotecnológicas que requieran una interacción no tóxica hidrogel-célula. Preferiblemente, en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa.

En una de las realizaciones preferidas, el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente puede utilizarse en cultivo celular.

10

En otra de las realizaciones preferidas, el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente puede utilizarse en trasplante de monocapas celulares crecidas sobre dicho hidrogel a las localizaciones deseadas.

Los hidrogeles con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada de la presente invención, preferiblemente con una estructura que tiende a una red doble, son capaces de albergar células hasta confluencia, aunque el aspecto más sorprendente de esta invención es que las capas celulares pueden ser despegadas rápidamente, preferiblemente en segundos, mediante simple agitación mecánica. Además, las capas celulares pueden ser trasplantadas simplemente mediante el crecimiento de las células en el hidrogel hasta que el nivel de confluencia deseado ha sido alcanzado, seguido por el volteo del mismo sobre la superficie de trasplante deseada. Después de un tiempo apropiado para permitir que las células se unan al nuevo soporte, el hidrogel se puede retirar y la capa celular permanece en el lugar de trasplante.

Los resultados descritos en esta solicitud de patente muestran que estos hidrogeles pueden utilizarse como alternativa a los sistemas termosensibles que se usan actualmente. Además de compartir las ventajas de los soportes tipo pNIPAm frente a los métodos de despegado tradicionales, los hidrogeles de la presente invención presentan ventajas sobre los hidrogeles basados en pNIPAm. En primer lugar, la preparación de hidrogel de la presente invención a

través del procedimiento que comprende una única etapa de polimerización es simple y barata si se compara con las complicadas y laboriosas técnicas de injerto. Además, el crecimiento celular sobre estos hidrogeles da lugar a la formación de monocapas celulares, sin necesidad de considerar aspectos como el grosor de las membranas donde se realizan los cultivos celulares. En segundo lugar, el hecho de que los sustratos no están ligados a ningún soporte, a diferencia de las superficies injertadas de pNIPAm, permite una fácil manipulación de los hidrogeles como por ejemplo su transporte al lugar de trasplante elegido. Además, ya que las células son trasplantadas directamente del hidrogel al lugar de trasplante, no hay necesidad de desarrollar o emplear un 'superstrato' para prevenir el doblado de la capa sobre sí misma. Finalmente, ya que las células se despegan mediante agitación suave, no hay necesidad de aplicar una reducción en la temperatura para iniciar el despegado.

Por otra parte, una vez separada la monocapa del hidrogel, la incubación posterior del hidrogel en medio de cultivo celular no produce señales detectables de ninguna actividad celular (Alamar Blue, MTS), lo cual nos indica que las células no han penetrado en el interior del hidrogel. Además, la observación al microscopio del hidrogel, aunque no permite una gran profundidad de campo, no detecta la presencia de ningún tipo celular. Por todo ello, estos hidrogeles tal y como se describen en esta solicitud de patente pueden utilizarse como sistemas barrera en aplicaciones in vivo.

25 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, caracterizado porque comprende:

- 30 a) unidades derivadas de vinilpirrolidona (V) y unidades derivadas de un monómero alquénico aniónico o anionizable (A), donde las relaciones de

reactividad en copolimerización radical binaria de (V) y (A) presentan valores máximo y mínimo de 0.5 respectivamente, es decir, $r_V \leq 0.5$, $r_A \geq 0.5$; y

b) unidades derivadas de al menos un entrecruzante; siempre que el o los entrecruzantes sean:

- 5 i) dos entrecruzantes E1 y E2, donde E1 presenta homología al menos parcial respecto a (A) y E2 presenta homología al menos parcial respecto a (V); o
- ii) un entrecruzante E3 que presenta homología respecto a (A) y (V).

- 10 En esta solicitud de patente se entiende por “unidades derivadas de”, la estructura química obtenida al someter a polimerización radicalaria el monómero o entrecruzante al que se esté haciendo referencia.

- Adicionalmente, se usa el término “componente” para definir cualquiera de las
- 15 dos familias de cadenas poliméricas que se forman en la copolimerización binaria de dos monómeros con alta reactividad diferencial como (A) y (V): una familia de cadenas ricas en (A) y la familia de cadenas ricas en (V).

- Una reactividad diferencial de (A) y (V) suficientemente alta en la
- 20 copolimerización, como la que se da por ejemplo cuando (A) es un monómero acrílico aniónico, da lugar a dos tipos principales de familias de cadenas poliméricas o dos tipos de componentes. En concreto, y usando el modelo terminal para describir composicionalmente la copolimerización radicalaria binaria de (A) y (V), la invención requiere que la relación de reactividad de (A)
 - 25 sea mayor o igual que 0.5 y que la relación de reactividad de (V) sea menor o igual que 0.5, es decir, $r_A \geq 0.5$ y $r_V \leq 0.5$. La primera familia de cadenas o el primer componente comprende mayoritariamente unidades derivadas del monómero (A) y se forma al principio de la reacción de polimerización; mientras que la segunda familia de cadenas o el segundo componente comprende
 - 30 mayoritariamente unidades derivadas del monómero (V), preferiblemente está compuesta básicamente por vinilpirrolidona, y se forma una vez que (A) se ha consumido en el medio de reacción. Después del entrecruzamiento, estas

primera y segunda familias de cadenas, se convierten, respectivamente, en el primer y segundo componente de la estructura de red polimérica entrecruzada, con tendencia a estructura tipo red doble en el caso de usar mezcla de E1 y E2, o con tendencia a estructura tipo co-red si se usa E3.

5

Adicionalmente los términos “relaciones de reactividad r_1 y r_2 ”, aplicados a una copolimerización radical binaria de dos monómeros 1 y 2 descrita composicionalmente por el modelo terminal, son los parámetros que definen la reactividad de las diferentes especies durante la polimerización. El modelo terminal es el modelo que considera que la reactividad del radical en crecimiento depende de la naturaleza de la unidad terminal. Estas relaciones de reactividad vienen dadas por $r_1 = k_{11}/k_{12}$ y $r_2 = k_{22}/k_{21}$, donde k_{ij} ($i,j=1,2$) es la constante cinética de la reacción de adición del monómero M_j a una cadena en crecimiento acabada en i , $\sim M_i$. Por ejemplo, una relación de reactividad r_1 mayor o menor que 1, significa que una cadena en crecimiento acabada en 1, $\sim M_1$, es más reactiva hacia el monómero 1 o hacia el monómero 2 respectivamente. [Gallardo, A.; Aguilar, M.R.; Abraham, G.A.; San Román, J. Chain Copolymerization Reactions. An Algorithm to Predict the Reaction Evolution with Conversion. *J. Chem. Edu.* **2004**, 81, 1210].

20

Adicionalmente, el término “homología” ha de entenderse que hace referencia a que el entrecruzante comprende grupos funcionales polimerizables, en particular dobles enlaces, con reactividad comparable a los monómeros (A) y/o (V) en las reacciones de copolimerización radicalaria descritas en esta invención. La homología de reactividad generalmente está asociada con la existencia de homología estructural, es decir, con la presencia de grupos funcionales cercanos al doble enlace polimerizable equivalentes en reactividad durante la copolimerización de monómero y entrecruzante. A modo de ejemplo, sin carácter limitante, entrecruzantes que comprenden grupos vinílicos en los que el doble enlace está unido a un oxígeno o nitrógeno, como por ejemplo viniléteres, vinilésteres como el grupo vinilo del vinilmetacrilato, vinilaminas o vinilamidas como los derivados de vinilpirrolidona, muestran homología de

30

reactividad respecto a la propia vinilpirrolidona (V); mientras que entrecruzantes que comprenden grupos metacrilato de alquilo presentan homología de reactividad respecto monómeros acrílicos aniónicos (A) como, por ejemplo, sales alcalinas de alquilsulfonato de metacrilato.

5

Adicionalmente, el término “homología parcial” aplicado a un entrecruzante hace referencia a que al menos uno de los grupos polimerizables del entrecruzante presenta homología tal como se ha definido en el párrafo anterior.

10

En particular, la expresión “E1 presenta homología al menos parcial respecto a (A)” ha de entenderse en el sentido que el entrecruzante E1 es un compuesto con al menos dos dobles enlaces polimerizables, de los cuales al menos uno posee reactividad en copolimerización radicalaria con (V) comparable al monómero alquénico aniónico o anionizable (A). Preferiblemente, (V) y uno de los grupos polimerizables del entrecruzante E1 presentan, en copolimerización radical binaria, relaciones de reactividad máxima y mínima de 0.5 respectivamente, $r_V \leq 0.5$, $r_{E1} \geq 0.5$.

De forma análoga, la expresión “E2 presenta homología al menos parcial respecto a (V)” ha de entenderse en el sentido que el entrecruzante E2 es un compuesto con al menos dos dobles enlaces polimerizables, de los cuales al menos uno posee reactividad en copolimerización radicalaria con (A) comparable a la vinilpirrolidona (V). Preferiblemente, uno de los grupos polimerizables del entrecruzante E2 y (A) presentan, en copolimerización radical binaria, relaciones de reactividad máxima y mínima de 0.5 respectivamente, $r_{E2} \leq 0.5$, $r_A \geq 0.5$.

Adicionalmente, la expresión “E3 presenta homología respecto a (A) y (V)” ha de entenderse en el sentido que el entrecruzante E3 es un compuesto con al menos dos dobles enlaces polimerizables, donde al menos uno de ellos presenta reactividad en polimerización radicalaria comparable a (A) y al menos

30

otro de ellos presenta reactividad en polimerización radicalaria comparable a (V).

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere al hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, donde (A) se selecciona del grupo que consiste en monómero acrílico y monómero estirénico, comprendiendo en ambos casos al menos un grupo aniónico o anionizable.

10 En la presente invención se usa el término acrílico para englobar a la familia de monómeros cuyo doble enlace polimerizable es un metacrilato, acrilato, metacrilamida o acrilamida.

15 En una realización aún más preferida, (A) es un monómero acrílico aniónico o anionizable que comprende al menos una cadena alquílica C_1 - C_{10} que puede ser lineal o ramificada.

20 En otra realización preferida, el hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada tal como se describe en esta solicitud de patente comprende unidades derivadas del monómero (A) donde el grupo aniónico o anionizable es sulfonato o un grupo sulfónico anionizable. El grupo sulfonato puede encontrarse en el hidrogel en forma de sal alcalina o amónica; o en forma de ácido sulfónico. Como sales alcalinas se prefieren especialmente la sal sódica o potásica.

25

En una realización aún más preferida, el hidrogel de la presente invención comprende unidades derivadas de (A), donde (A) es un sulfonato acrílico que comprende al menos una cadena alquílica C_1 - C_{10} lineal o ramificada. Por ejemplo, sal potásica de metacrilato de propilsulfonato o sal sódica de
30 acrilamido-2-metil-1-propanosulfonato.

En una realización especialmente preferida, el hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada de la presente invención comprende unidades derivadas de (A), donde (A) es una sal alcalina o amónica de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, donde el alquilo puede ser lineal o
5 ramificado. Preferiblemente, una sal sódica, potásica o amónica de metacrilato de propilsulfonato.

Los inventores han observado que los hidrogeles que comprenden unidades de entrecruzante E3 presentan peores propiedades mecánicas que los obtenidos
10 empleando la mezcla de entrecruzantes E1 y E2. Así por ejemplo, cuando se utiliza la técnica de fotopolimerización para obtener los hidrogeles con relación molar $[A]/[V] = 0.17$ empleando un porcentaje de entrecruzante E3 del 4% mol respecto (A), cuyo equivalente empleando la mezcla de entrecruzantes E1 y E2 sería el gel tipo 4 del ejemplo, se obtienen hidrogeles poco manejables que se
15 rompen en las mordazas antes de iniciar el ensayo de elongación.

Por otra parte, si se emplea un porcentaje de entrecruzante E3 del 12% mol respecto al monómero (A), cuyo equivalente en la preparación que usa mezcla de entrecruzantes E1 + E2 sería el gel tipo 7 del ejemplo, se obtienen redes
20 con pobres propiedades mecánicas mostrando una elongación máxima del 5% y una tensión máxima de 11 KPa. Tal y como se observa en la tabla 1 del ejemplo, las prestaciones mecánicas de los geles tipo 4 y tipo 7, que usan mezcla de entrecruzantes E1 + E2, son muy superiores. Este hecho no excluye que los hidrogeles que comprenden el entrecruzante E3 sean manipulables
25 para las aplicaciones indicadas en esta solicitud de patente, en particular como soportes en cultivo celular; por lo que estos hidrogeles también se consideran parte de la presente invención.

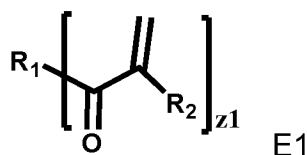
En otra realización preferida, el hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada tal como se define en esta solicitud de patente,
30 comprende unidades derivadas de vinilpirrolidona (V), unidades derivadas de un monómero acrílico aniónico (A), unidades derivadas de un entrecruzante E1

con homología al menos parcial respecto a (A) y unidades derivadas de un entrecruzante E2 con homología al menos parcial respecto a (V). Preferiblemente, (A) se describe tal como se ha indicado anteriormente en esta solicitud de patente.

5

En una realización aún más preferida, el hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada tal como se describe en esta solicitud de patente comprende unidades derivadas de E1, donde este entrecruzante es un oxi-, oxi-amino- o amino-derivado de un precursor con dos
10 o más alcoholes y/o aminas primarias o secundarias en los que al menos dos de dichos alcoholes o aminas han sido derivatizados a acrílicos para formar el entrecruzante E1.

En una realización especialmente preferida, el entrecruzante E1 es un
15 compuesto con grupos polimerizables de fórmula



donde

z1 tiene un valor entre 2 y 5, preferiblemente entre 2 y 4;

cada R₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y CH₃;

20 y

R₁ se selecciona del grupo que consiste en:

a) oxialquilo C₁-C₃₀ lineal, ramificado o cíclico con al menos dos grupos oxi de extremo de cadena;

b) amino-oxi-alquilo C₁-C₂₀ lineal, ramificado o cíclico con al menos un
25 grupo oxi de extremo de cadena y al menos un grupo amino de extremo de cadena;

c) amino-alquilo C₁-C₂₀ lineal, ramificado o cíclico con al menos dos grupos amino de extremo de cadena;

d) amino-alquilo C₁-C₁₀ cíclico con al menos dos aminas formando parte del ciclo y al menos dos de estas aminas estando unidas a grupos polimerizables formando las funcionalidades acrílicas de la estructura E1;

e) derivado oxi de Bisfenol A o Bisfenol F; y

- 5 f) derivado etoxilado o propoxilado de alguna de las estructuras oxi-propuestas en a) o e), donde al menos dos de los grupos oxi de extremo de cadena de estas estructuras propuestas en a) o e) están etoxilados o propoxilados con entre 1 y 20 unidades etoxi o propoxi, más preferiblemente entre 1 y 5 unidades.

10

El grupo alquilo presente en una cualquiera de las definiciones de R₁ según se describe en esta solicitud de patente, puede comprender uno o más heteroátomos. En particular, puede comprender uno o más grupos hidroxilo y/o uno o más éteres alquílicos.

15

En esta solicitud de patente se entiende por “grupo oxi de extremo de cadena”, un átomo de oxígeno (–O–) que en el entrecruzante E1 está unido al grupo polimerizable formando la funcionalidad acrílica.

- 20 Adicionalmente, en esta solicitud de patente se entiende por “grupo amino de extremo de cadena”, un grupo amino de fórmula –NR–, donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₂₀ lineal, ramificado o cíclico, que en el entrecruzante de fórmula E1 está unido al grupo polimerizable formando la funcionalidad acrílica.

25

Por otro lado, cuando R₁ es un derivado etoxilado o propoxilado tal como se describe en la opción f), el átomo de oxígeno (–O–) correspondiente a la última unidad etoxi o propoxi corresponde al grupo oxi de extremo de cadena que está unido al grupo polimerizable formando la funcionalidad acrílica del

30 entrecruzante de fórmula E1.

Preferiblemente, el oxialquilo de la opción a) se selecciona del grupo que consiste en:

- a1) $-O-[CH_2-CH_2-O]_{z2}-CH_2-CH_2-O-$, donde $z2$ es un valor entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 5;
- 5 a2) $-O-[CH_2-CH_2-CH_2-O]_{z3}-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, donde $z3$ es un valor entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 3;
- a3) $-O-R_3-O-$, donde R_3 es un grupo alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico; y
- a4) derivado oxi seleccionado del grupo que consiste en glicerol,
- 10 trimetilolpropano, neopentilglicol, pentaeritrol, triglicerol, di(trimetilolpropano) y di(pentaeritrol).

Preferiblemente, el amino-oxi-alquilo de la opción b) tiene una estructura $-O-R_4-NH-$, donde R_4 es un grupo alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico.

15

Preferiblemente, el amino-alquilo de la opción c) tiene una estructura $-HN-R_5-NH-$, donde R_5 es un grupo alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico.

Preferiblemente, el amino-alquilo de la opción d) es una piperazina o una

20 hexahidrotiazina.

Más preferiblemente, el grupo R_3 , R_4 o R_5 es un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado.

25 Así, el entrecruzante E1 puede comprender más de dos funcionalidades acrílicas tal como, por ejemplo, derivados acrílicos de glicerol, trimetilolpropano o de pentaeritrol.

En otra realización especialmente preferida, el hidrogel de la presente

30 invención comprende unidades derivadas del entrecruzante E1 tal como se describe, siendo éste un compuesto simétrico. Preferiblemente, E1 se selecciona del grupo que consiste en etilénglicoldimetacrilato y bisacrilamida.

En otra realización aún más preferida, el hidrogel con estructura de redes poliméricas entrecruzadas interconectadas tal como se describe en esta solicitud de patente comprende unidades derivadas de E2, donde los grupos
 5 polimerizables de E2 presentan homología con (V), como es el caso de los viniléteres, vinilaminas, vinilamidas o vinilesteres, de forma que las relaciones de reactividad en copolimerización radical binaria de cualquiera de los grupos polimerizables de E2 y (A) presentan valores máximos y mínimos de 0.5 respectivamente, $r_{E2} \leq 0.5$, $r_A \geq 0.5$.

10

En una realización especialmente preferida, el entrecruzante E2 es un oxi-, oxi-amino-, carboxi- o amino-derivado de un precursor con dos o más alcoholes, uno o más alcoholes y una o más aminas primarias o secundarias, dos o más ácidos, o dos o más aminas primarias o secundarias; en los que al menos dos
 15 de dichos alcoholes, al menos un alcohol y una amina, al menos dos ácidos, o al menos dos aminas han sido derivatizados a vinílicos para formar el entrecruzante E2.

20

Más preferiblemente, E2 tiene estructura E2a o E2b, siendo E2a un compuesto de fórmula:



donde

25

$z4$ tiene un valor entre 2 y 5, preferiblemente entre 2 y 4; y

R_6 se selecciona del grupo que consiste en:

a) oxialquilo C_1 - C_{20} lineal, ramificado o cíclico con al menos dos grupos oxi de extremo de cadena;

30

b) amino-alquilo C_1 - C_{20} lineal, ramificado o cíclico con al menos dos grupos amino de extremo de cadena;

c) amino-alquilo C_1-C_{10} cíclico con al menos dos aminas formando parte del ciclo y al menos dos de estas aminas estando unidas a grupos polimerizables formando las funcionalidades vinílicas de la estructura E2a; y

d) carboxi-alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico con al menos dos
5 grupos carboxi de extremo de cadena.

El grupo alquilo presente en una cualquiera de las definiciones preferidas de R_6 según se describe en esta solicitud de patente, puede comprender uno o más heteroátomos. En particular, puede comprender uno o más grupos hidroxilo y/o
10 uno o más éteres alquílicos.

En esta solicitud de patente se entiende por “grupo oxi de extremo de cadena”, un átomo de oxígeno ($-O-$) que en el entrecruzante de fórmula E2a está unido a uno de los grupos vinílicos.

15

Adicionalmente, en esta solicitud de patente se entiende por “grupo amino de extremo de cadena”, un grupo amino de fórmula $-NR-$ donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico, que en el entrecruzante de fórmula E2a está unido a uno de los grupos
20 vinílicos.

De forma análoga, se entiende por “grupo carboxi de extremo de cadena”, un grupo carboxilo ($-COO-$) que en el entrecruzante de fórmula E2a está unido a uno de los grupos vinílicos a través de un enlace oxi ($-O-$).

25

Preferiblemente, R_6 es un oxialquilo seleccionado del grupo que consiste en:

a1) $-O-[CH_2-CH_2-O]_{z5}-CH_2-CH_2-O-$, donde $z5$ es un valor entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 5;

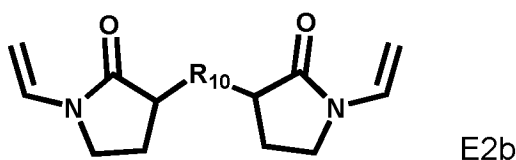
a2) $-O-[CH_2-CH_2-CH_2-O]_{z6}-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, donde $z6$ es un valor
30 entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 3; y

a3) $-O-R_7-O-$, donde R_7 es un grupo alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico.

Preferiblemente, R_6 es un carboxi-alquilo de estructura $-\text{OOC}-R_9-\text{COO}-$, donde R_9 es un grupo alquilo C_1-C_{20} lineal, ramificado o cíclico.

- 5 Más preferiblemente, el grupo R_7 , R_8 o R_9 es un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado.

Y E2b es un compuesto de fórmula



- 10 donde

R_{10} se selecciona del grupo que consiste en:

- alquilo alifático C_1-C_{20} lineal o ramificado;
- estructura $-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{-O]}_{z7}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, donde $z7$ es un valor entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 5;
- 15 estructura $-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O]}_{z8}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, donde $z8$ es un valor entre 1 y 20, más preferiblemente entre 1 y 3; y
- estructura $R_{11}\text{-O-}R_{12}$, donde R_{11} y R_{12} son independientemente alquilo alifático C_1-C_{20} lineal o ramificado.

- 20 Más preferiblemente, el grupo R_{10} , R_{11} o R_{12} es un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado.

Preferiblemente, E2 es un compuesto de fórmula (E2b) seleccionado del grupo que consiste en 3,3'-propil di-vinilpirrolidona y 3,3'-oxidietil-di-vinilpirrolidona.

- 25

En otra realización preferida, el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente comprende una mayor cantidad de unidades derivadas del entrecruzante E1 que del entrecruzante E2. Así, la polimerización de (A) y (V) en presencia de un alto porcentaje del entrecruzante E1 con homología el

30 menos parcial respecto al monómero (A) y una pequeña cantidad del

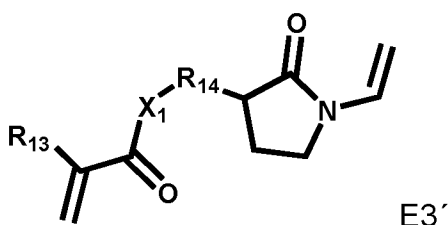
entrecruzante E2 con homología al menos parcial con respecto al monómero (V), da lugar a la formación de una estructura formada por un primer componente que comprende mayoritariamente unidades derivadas del monómero (A) y altamente entrecruzado por medio del entrecruzante E1, y a un segundo componente que comprende mayoritariamente unidades derivadas del monómero (V) ligeramente entrecruzado por medio del entrecruzante E2, ambos formados en una polimerización en un solo paso; es decir, da lugar a la formación de una estructura que tiende a una red doble. Una ilustración de esta reacción se muestra en la figura 1.

En otra realización preferida, el hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada tal como se describe en esta solicitud de patente comprende unidades derivadas de E3, donde:

al menos uno de grupos polimerizables de E3 presenta homología con (V), como por ejemplo el grupo vinilo del vinilmetacrilato o las vinilamidas de los derivados de (V), de forma que las relaciones de reactividad en copolimerización radical binaria de uno de esos grupos polimerizables de E3 y (A) presentan valores máximos y mínimos de 0.5 respectivamente, $r_{E3a} \leq 0.5$, $r_A \geq 0.5$; y

al menos uno de grupos polimerizables de E3 presenta homología con (A), como son los grupos acrílicos, de forma que las relaciones de reactividad en copolimerización radical binaria de uno de esos grupos polimerizables de E3 y (V) presentan valores mínimos y máximos de 0.5 respectivamente, $r_V \leq 0.5$, $r_{E3b} \geq 0.5$.

Más preferiblemente, E3 se selecciona del grupo que consiste en vinilmetacrilato y un compuesto de fórmula:



donde:

X_1 se selecciona del grupo que consiste en O y NH;

R_{14} se selecciona del grupo que consiste en H y CH_3 ; y

R_{13} es alquilo C_1 - C_{10} lineal o ramificado.

5

Preferiblemente, E3' es metacrilato de 3-etil-vinilpirrolidona.

La polimerización de (A) y (V) en presencia de E3 da lugar a la formación de una estructura formada por un dos componentes que comprenden mayoritariamente unidades derivadas del monómero (A) y unidades derivadas del monómero (V), respectivamente, entrecruzados por medio del entrecruzante E3; ambos formadas en una polimerización en un solo paso y con una estructura que tiende a una co-red.

10

La presente invención proporciona un hidrogel que combina las propiedades mecánicas mejoradas en condiciones de alto hinchamiento de la estructura de dos componentes, que preferiblemente tiende a una estructura de red doble, con la biocompatibilidad de la polivinilpirrolidona, polímero utilizado en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas y cuyo uso está aprobado en alimentación y medicina por la FDA.

15

20

En un segundo aspecto, la presente invención también proporciona un procedimiento de obtención del hidrogel tal como se define en esta solicitud de patente, donde dicho procedimiento comprende poner en contacto los monómeros (A) y (V) con los entrecruzantes E1 y E2, o el entrecruzante E3, en condiciones de polimerización radicalaria. De esta forma, la polimerización de los dos componentes que forman la estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada del hidrogel tiene lugar en una única etapa de polimerización.

25

30

En el procedimiento de la presente invención se prefiere que tanto los monómeros (A) y (V), como los entrecruzantes E1, E2 o E3 tengan el

significado indicado en el primer aspecto de la presente invención. En particular, se prefiere que (A) sea un monómero acrílico aniónico ó anionizable. Más preferiblemente, una sal alcalina o amónica de C₁-C₁₀-alquilsulfonato de metacrilato.

5

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel de la presente invención puede realizarse en presencia de al menos un disolvente, preferiblemente en medio acuoso. Otros disolventes preferidos son disolventes polares capaces de disolver sales como dimetilsulfóxido, dimetilformamida, 10 dimetilacetamida o alcoholes como metanol, etanol, isopropanol. Más preferiblemente, etanol o dimetilsulfóxido debido a su menor toxicidad.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada que se describe en 15 esta solicitud de patente tiene lugar en agua, donde la concentración inicial de monómero alquénico aniónico o anionizable (A), en moles por litro de la mezcla total, está en el rango $0.01 \text{ mol/L} \leq [A] \leq 5 \text{ mol/L}$. Más preferentemente en el rango $0.5 \text{ mol/L} < [A] < 1 \text{ mol/L}$.

20 En otra realización preferida, el procedimiento de la presente invención comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de monómero alquénico aniónico o anionizable (A) y vinilpirrolidona (V) tal que la relación molar entre ellos es $0.001 \leq [A]/[V] \leq 2$.

25 En una realización aún más preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de entrecruzante E1 entre 0.1-100% molar respecto a la cantidad inicial de monómero (A); y una cantidad inicial de entrecruzante E2 entre 0.001-10% molar respecto a la cantidad inicial 30 de vinilpirrolidona. Estas cantidades también pueden expresarse mediante la siguiente relación molar: $1 \leq [A]/[E1] \leq 1000$; y $10 \leq [V]/[E2] \leq 10000$.

En una realización especialmente preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada de la presente invención comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de monómero alquénico aniónico o anionizable (A), vinilpirrolidona (V) y entrecruzantes E1 y E2 tal que la relación molar entre ellos sea:

$$0.05 \leq [A]/[V] \leq 1;$$

$$5 \leq [A]/[E1] \leq 50; \text{ y}$$

$$100 \leq [V]/[E2] \leq 10000.$$

- En las realizaciones descritas en los párrafos anteriores indicando las cantidades preferidas de los diferentes reactivos del procedimiento de la invención, se prefiere adicionalmente que (A) sea una sal alcalina de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, E1 sea etilénglicoldimetacrilato o bisacrilamida y E2 un compuesto de estructura E2b tal como se ha definido anteriormente.

- En otra realización aún más preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de entrecruzante E3 entre 0.1-100% molar respecto a la cantidad inicial de monómero (A). Estas cantidades también pueden expresarse mediante la siguiente relación molar: $1 \leq [A]/[E3] \leq 1000$. Más preferentemente $5 \leq [A]/[E3] \leq 100$.

- En una realización especialmente preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel con estructura de redes poliméricas entrecruzadas interconectadas de la presente invención comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de monómero alquénico aniónico o anionizable (A), vinilpirrolidona (V) y entrecruzante E3 tal que la relación molar entre ellos sea:

$$0.05 \leq [A]/[V] \leq 1; \text{ y}$$

$$5 \leq [A]/[E3] \leq 50.$$

En las realizaciones descritas en los párrafos anteriores indicando las cantidades preferidas de los diferentes reactivos del procedimiento de la invención, se prefiere adicionalmente que (A) sea una sal alcalina de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato y E3 sea un compuesto de estructura E3' tal como se ha definido anteriormente.

Los hidrogeles de la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento tal como se describe en esta solicitud de patente empleando cualquier técnica de polimerización radical convencional, por ejemplo, por fotopolimerización, iniciación térmica, o iniciación redox.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del hidrogel tal como se define en esta solicitud de patente comprende poner en contacto los monómeros (A) y (V) con los entrecruzantes E1 y E2, o el entrecruzante E3, en condiciones de fotopolimerización, donde la polimerización tiene lugar en presencia de un disolvente, preferiblemente agua, ya que el monómero (A) generalmente no es soluble en vinilpirrolidona.

Al preparar las muestras fototérmicas algunas muestras tienen gran afinidad por el molde de polipropileno y se tienen que hinchar en presencia de dicho molde, del que se despegan durante el hinchamiento en agua.

Una vez se ha obtenido la estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, ésta se pueden hinchar en agua y lavar para eliminar cualquier residuo o resto sin reaccionar.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, preferentemente con tendencia estructural a red doble, tal como se describe en el primer aspecto de la presente invención, obtenido por el procedimiento en una única etapa de polimerización tal como se describe en el segundo aspecto de la presente invención. Preferiblemente, cuando la relación de (A), (V), y los

entrecruzantes E1 y E2, o el entrecruzante E3, son las indicadas en el segundo aspecto de la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un producto que
5 comprende el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente, preferiblemente donde (A) es una sal alcalina de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, E1 sea etilénglicoldimetacrilato o bisacrilamida y E2 un compuesto de estructura E2b tal como se ha definido anteriormente.

10 En una realización aún más preferible, este producto se selecciona del grupo que consiste en una plataforma para cultivo celular, un kit para cultivo celular, un apósito para proteger heridas y un medicamento de liberación controlada.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso del hidrogel tal
15 como se describe en el primer aspecto de la presente invención, siendo especialmente preferiblemente que (A) sea una sal alcalina de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, E1 sea etilénglicoldimetacrilato o bisacrilamida y E2 sea un compuesto de estructura E2b tal como se ha definido anteriormente, en aplicaciones biológicas, biomédicas o biotecnológicas *in vitro* que requieran
20 una interacción no tóxica hidrogel-célula.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada tal como se describe en esta solicitud de patente en ingeniería de tejidos o medicina
25 regenerativa. Preferiblemente, en aquellas aplicaciones que requieran una alta biocompatibilidad celular y/o elevada capacidad de difusión acuosa de solutos.

En una realización aún más preferida, el hidrogel de la presente invención puede utilizarse en aplicaciones que requieran un efecto barrera para impedir
30 la penetración de tipos celulares indeseados.

En otra realización aún más preferida, el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente puede utilizarse en cultivo celular *in vitro*.

La presencia del grupo aniónico en el hidrogel de la presente invención
5 colabora a mejorar sus propiedades mecánicas, a la vez que facilita el despegado de las células.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso del hidrogel tal como se describe en el primer aspecto de la presente invención, siendo especialmente
10 preferiblemente que (A) sea una sal alcalina de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, E1 sea etilénglicoldimetacrilato o bisacrilamida y E2 sea un compuesto de estructura E2b tal como se ha definido anteriormente, para fabricar un producto para utilizar en aplicaciones biológicas, biomédicas o biotecnológicas que requieran una interacción no tóxica hidrogel-célula.

15 En una realización aún más preferible, la presente invención se refiere al uso del hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente para fabricar un soporte para el trasplante celular *in vivo*, preferiblemente de monocapas celulares.

20 En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso del hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente para fabricar un producto para actuar de sistema de barrera en el tratamiento de heridas. Preferiblemente, para fabricar un apósito para el tratamiento de heridas.

25 En otra realización aún más preferida, el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente puede utilizarse para fabricar un medicamento de liberación controlada de fármacos para el tratamiento de una enfermedad.

30 Adicionalmente, ha de entenderse que forma parte de la presente invención el hidrogel tal como se describe en el primer aspecto de la presente invención, siendo especialmente preferiblemente que (A) sea una sal alcalina de

metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, E1 sea etilénglicoldimetacrilato o bisacrilamida y E2 sea un compuesto de estructura E2b tal como se ha definido anteriormente, para utilizar en aplicaciones biológicas, biomédicas o biotecnológicas que requieran una interacción no tóxica hidrogel-célula.

5

En una realización aún más preferible, la presente invención se refiere al hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente como soporte para el trasplante celular *in vivo*. Así como también se refiere a un soporte que comprenda el hidrogel de la invención para el trasplante celular *in vivo*.

10 Preferiblemente, para el trasplante de monocapas celulares.

En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere al hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente como sistema de barrera en el tratamiento de heridas. Así como también se refiere a un apósito

15 que comprende el hidrogel de la invención para el tratamiento de heridas.

En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere a un medicamento de liberación controlada de fármacos que comprende el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente, para el tratamiento de una

20 enfermedad.

Adicionalmente, ha de entenderse que forma parte de la presente invención un método para utilizar el hidrogel tal como se describe en el primer aspecto de la presente invención, siendo especialmente preferiblemente que (A) sea una sal

25 alcalina de metacrilato de C₁-C₁₀ alquilsulfonato, E1 sea etilénglicoldimetacrilato o bisacrilamida y E2 sea un compuesto de estructura E2b tal como se ha definido anteriormente, en aplicaciones biológicas, biomédicas o biotecnológicas que requieran una interacción no tóxica hidrogel-célula.30 En una realización aún más preferible, la presente invención se refiere a un método para realizar trasplante celular *in vivo*, preferiblemente trasplante de

monocapas celulares, que comprende hacer crecer las células en el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente.

En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere a un
5 método para proteger heridas que comprende utilizar el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente como sistema de barrera. Preferiblemente, comprende suspender el hidrogel en un apósito.

En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere a un
10 método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar un medicamento de liberación controlada de fármacos que comprende el hidrogel tal como se describe en esta solicitud de patente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Figura 1: Esquema ilustrativo de la formación de la estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según el procedimiento de la invención, donde se utiliza una relación molar de E1 significativamente superior a E2.

20 Figura 2: Las micrografías muestran el crecimiento celular en un hidrogel tipo 4 a las 24h (fig. 2A), 48h (fig. 2B) y 168h (fig. 2C) de incubación, respectivamente. La adhesión inicial y proliferación celular está inicialmente retardada pero después de algunos días de incubación el número de células comienza a crecer en los hidrogeles y tras 168 h se observa crecimiento
25 confluyente sobre los geles.

Figura 3: Ensayo metabólico AlamarBlue en el séptimo día de cultivo de las células sobre los hidrogeles.

30 Figura 4: Despegado de células del hidrogel tipo 2 (fig. 4A), hidrogel tipo 3 (fig. 4B), hidrogel tipo 4 (fig. 4C) y hidrogel tipo 5 (fig. 4D). En los hidrogeles 3, 4 y 5 se recuperó una monocapa completa de células. En el caso del hidrogel 2 en

los que no se llegó a confluencia se recuperaron pequeños aglomerados celulares.

Figura 5: Las micrografías presentan las células despegadas, disgregadas y
5 resembradas en TCP a partir de los hidrogeles 1 (fig. 5A), 2 (fig. 5B) y 4 (fig. 5C). Las monocapas celulares se disgregaron por pipeteo repetido y se incubaron 24h después de ser resembradas en pocillos de TCP. Las células se despegaron y proliferaron en los pocillos de TCP y retuvieron su morfología
10 elongada característica.

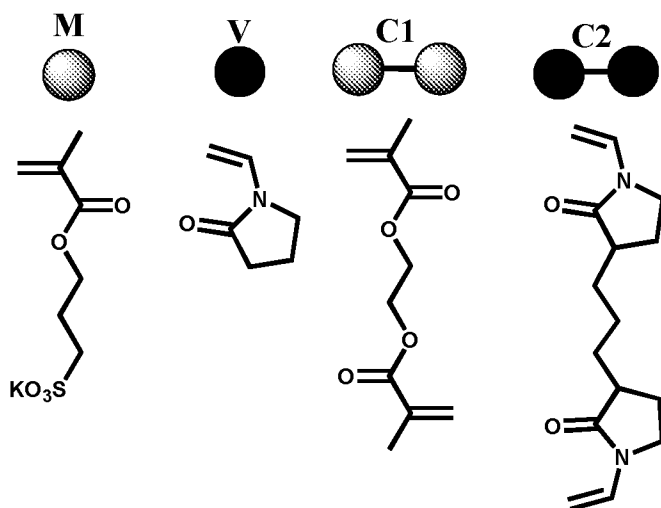
Figura 6: Imágenes mostrando las monocapas trasplantadas en pocillos de
TCP después de eliminar el hidrogel. (3 imágenes superiores; fig. 6A hidrogel
Tipo 1; fig. 6B hidrogel Tipo 3 y fig. 6C hidrogel Tipo 4). Las células se
despegan de los hidrogeles y pasan a los pocillos de plástico inferiores
15 asumiendo una morfología que es típica de este tipo de células cuando se pegan a un soporte. Después de la reincubación durante 24h las células continúan proliferando (3 imágenes centrales; fig. 6D hidrogel Tipo 1; fig. 6E
hidrogel Tipo 3 y fig. 6F hidrogel Tipo 4) y todavía crecen más después de 48h
(3 imágenes inferiores; fig. 6G hidrogel Tipo 1; fig. 6H hidrogel Tipo 3 y fig. 6I
20 hidrogel Tipo 4).

EJEMPLOS

Materiales y tratamientos previos

25 Sulfopropilmetacrilato potásico (M; monómero tipo A), vinilpirrolidona (V), etilenglicol dimetacrilato (C1, entrecruzante tipo E1), 1-hidrox ciclohexilfenilcetona (HCPK) y azobisisobutironitrilo (AIBN) fueron adquiridos en Sigma. El monómero (V) fue destilado antes de ser usado y
30 almacenado a 4 °C. AIBN fue recrystalizado en etanol y almacenado a 4 °C. El compuesto divinílico C2 (entrecruzante tipo E2) que se muestra en el esquema 1, el cual es un derivado de (V), fue sintetizado en nuestro laboratorio de

acuerdo a [Tardajos, M. G.; Nash, M.; Rochev, Y.; Reinecke, H.; Elvira, C.; Gallardo, A. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2012**, 213, 529]. C2C12-GMP fueron suministrados por ATTC, el suero fetal bovino se adquirió en GIBCO, UK, y Penicillin-Streptomycin Lonza.



5

Esquema 1

Síntesis de los hidrogeles

En este trabajo se han preparado hidrogeles con diferentes relaciones molares
 10 iniciales M/V y M/C1 (ver Tabla 1). Todos los hidrogeles se prepararon
 utilizando una concentración inicial de M de 1 mol/L y 1% molar de C2 con
 respecto a V. La relación molar V/C2 fue siempre de 1000. Los hidrogeles se
 sintetizaron mediante polimerización radical convencional en una única etapa,
 usando agua como disolvente. Para ello, se preparó una disolución acuosa de
 15 V en concentración apropiada (entre 1 y 7 mol/L) y se añadió C2 en un
 porcentaje de 0.1 % molar con respecto a V. A esta disolución se añadió M
 según la relación M/V elegida y finalmente su entrecruzante homólogo C1 en el
 porcentaje molar seleccionado con respecto al contenido de M. En el caso de
 reacciones iniciadas térmicamente, se añadió AIBN ($1.5 \cdot 10^{-2}$ M) como iniciador;
 20 tras burbujear la mezcla con N_2 los viales se cerraron y las reacciones se
 llevaron a cabo a 60 °C durante 24 horas. En el caso de reacciones foto-
 iniciadas, se añadió HCPK (0.5 % en peso); tras burbujear con N_2 la disolución
 de traspasó con una jeringa a un molde de polipropileno con un espaciador de

silicona para obtener muestras de 0.4 mm de espesor; la polimerización se llevó a cabo durante 40 minutos bajo radiación UV en una lámpara de curado UVP ultravioleta (modelo CL-1000L, 230V).

- 5 Para ambos tipos de reacciones, tras el tiempo de reacción elegido, los hidrogeles se recuperaron de los viales o moldes y se les permitió hinchar en agua hasta el equilibrio. Posteriormente se lavaron exhaustivamente con agua para eliminar residuos y material no unido a la red, y se troquelaron en cilindros.

10

Contenido en agua y grado de hinchamiento en el equilibrio

- Los cilindros hinchados se pesaron y se pusieron a secar hasta pesada constante. El contenido en agua en el equilibrio (CAE) se definió como la
- 15 cantidad de agua en el estado de equilibrio por gramo de hidrogel seco (ecuación 1).

$$CAE = \frac{(P_h - P_s)}{P_s} [1]$$

donde P_h y P_s son los pesos en estado hinchado y seco respectivamente.

20

Ensayos mecánicos

- Muestras obtenidas mediante iniciación térmica: Se analizaron las propiedades mecánicas en un equipo Instron universal modelo 3366 en modo de
- 25 compresión empleando cilindros de 5mm de altura y 4.3mm de diámetro determinándose la máxima resistencia a la fractura (σ_{max}) y la compresión a rotura (ϵ_{ma}). El módulo elástico se calculó como la pendiente de la curva compresión-deformación en el rango lineal.

- 30 Las muestras de fotopolimerización se estudiaron por elongación. Muestras de 10mm de largo y 5 mm de ancho se elongaron a una velocidad constante

(5mm/min) hasta la fractura determinándose la resistencia a la tracción ($\sigma_{\max}$) y el alargamiento de rotura ($\epsilon_{\max}$). De la curva tensión-elongación en el rango lineal se determinó el modulo de Young (E).

- 5 El hinchamiento en agua de todas las muestra fue muy alto. La tabla 1 resume las propiedades de las muestras seleccionadas para el estudio de cultivo celular. La estabilidad mecánica de las muestras fue elevada, las muestras se pueden manejar fácilmente a pesar de hinchar en agua aproximadamente hasta un 1000% (10 g agua/ g polímero).

10

Tabla 1. Características de los hidrogeles utilizados en los estudios de cultivo celulares.

etiqueta	M/V relación molar	M/C1 relación molar	Hinchamiento CAE (g agua/g pol.)	Ensayos de compresión			Ensayos de elongación		
				E, MPa	$\epsilon_{\max}$ %	$\sigma_{\max}$, MPa	E, MPa	$\epsilon_{\max}$ %	$\sigma_{\max}$, KPa
Tipo 1 (T)	1/4	25	9.5	0.39	36	0.31	-	-	-
Tipo 2 (T)	1/6	25	10.2	0.38	57	0.66	-	-	-
Tipo 6 (T)	1/6	12.5	5.6	0.28	74	1.60	-	-	-
Tipo 3 (T)	1/6	8.3	4.05	0.50	63	1.98	-	-	-
Tipo 4 (F)	1/6	25	9.6	-	-	-	0.26	25	92
Tipo 5 (F)	1/6	12.5	5.2	-	-	-	0.41	52	135
Tipo 7 (F)	1/6	8.3	4.1	-	-	-	0.62	112	475

- 15 Todos los hidrogeles de la tabla 1 se prepararon utilizando una concentración inicial de M de 1 mol/L y 1% molar de C2 con respecto a V. Las letras F y T se refieren al modo de iniciación (F: fotoiniciación y T: térmica)

- 20 Se estudiaron como referencias las redes sencillas, redes sólo formadas por V o M y su entrecruzante homólogo; redes dobles sin utilizar el entrecruzante C2, así como una red de V con ambos entrecruzantes. Estos controles, en especial la red pura de M que estalló durante los ciclos de lavado, presentan peores

propiedades mecánicas que los hidrogeles de la presente invención y no se muestran en la tabla 1.

Cultivos celulares

5

En este trabajo se ha utilizado como modelo la línea celular mioblástica de ratón C2C12 que expresaba constitutivamente el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), insertado previamente en el genoma celular mediante infección con lentivirus. Las células se cultivaron en DMEM con alto contenido en glucosa, suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal más un 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y para su mantenimiento se realizaron los pases celulares al alcanzar el 80% de confluencia.

15

Procedimiento general para el análisis de las muestras in vitro

Las muestras de hidrogel fueron cortadas en forma de cilindros (16.26 mm de diámetro) que cubriesen el fondo del pocillo de una placa de 24 pocillos y fueron esterilizadas mediante exposición a luz UV durante 90 minutos. Cada hidrogel estéril se lavó 3 veces en PBS y se colocó en un pocillo de una placa de plástico de 24 pocillos sin pre-tratamiento para la adherencia celular y después, se lavaron 3 veces con medio de cultivo (DMEM) previo a la siembra de las células. Se sembraron 20000 células por muestra, utilizando en el experimento 12 réplicas para cada tipo de hidrogel. Más tarde, se añadió a cada pocillo 800 µl de medio completo y atemperado, y las muestras se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂. Las muestras se observaron tras 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, utilizando un microscopio Olympus Bx51 para tomar las imágenes con fluorescencia.

30

Para realizar el estudio del proceso de separación de la monocapa celular, los hidrogeles se retiraron de sus pocillos con unas pinzas, y se colocaron en un

nuevo pocillo de una P6 con plástico pre-tratado, dejando la monocapa en contacto con la superficie del pocillo de modo que los hidrogeles se comportan como sustrato para el trasplante, seguido de una incubación para permitir que las células se adhieran a la nueva superficie. Tras la incubación, los
5 hidrogeles se retiraron y descartaron, y las monocapas celulares se observaron y fotografiaron usando el microscopio de fluorescencia. Estos trasplantes se incubaron durante 48 horas más con objeto de observar el crecimiento celular. Finalmente, las monocapas celulares trasplantadas se tripsinizaron y sembraron para analizar si las células despegadas desde los hidrogeles
10 habían sido afectadas tras crecer sobre ellos durante una semana.

En otro experimento, se observó que un suave pipeteo podía separar la monocapa celular del hidrogel sin necesidad de adherirse a otro sustrato. La viabilidad celular no se veía comprometida si este pipeteo se continuaba hasta
15 disgregar la monocapa en células aisladas. Estas células se sembraron en una placa con plástico pre-tratado observándose que las células se adherían y crecían con su comportamiento habitual. Una vez más, se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia.

20 ***Ensayo de proliferación celular con Alamar Blue***

El ensayo de actividad metabólica con Alamar Blue se realizó según las instrucciones del fabricante (Biosource, Camarillo, CA, USA). Antes de cada medida se añadieron 80 µl de Alamar Blue en cada pocillo, y se incubó la
25 muestra durante 90 minutos. Tras el período de incubación, se midió por triplicado la intensidad de la fluorescencia ($\lambda=590$ nm) usando un lector de placas (Synergy HT, Biotek) restando los valores de sus respectivos blancos.

Resultados

30

La biocompatibilidad de los hidrogeles se estudio sembrando las células e incubándolas (10,000 C2C12-GMP células / cm²) sobre los geles descritos en

la Tabla 1. El crecimiento celular se siguió por microscopía durante los siguientes 7 días después del sembrado. Durante los primeros 2 días se observó un retardo en la adhesión y proliferación de las células en comparación con las células sembradas sobre placas control de plástico (TCP). Al tercer día

5 es evidente la proliferación celular en todas las muestras observándose el mayor crecimiento en las muestras tipo 3, 4 y 5. Al séptimo día de incubación se observa crecimiento en confluencia en las muestras tipo 3, 4 y 5 y crecimiento en subconfluencia (~60 %) en los hidrogeles tipo 1 y 2 (Figura 2 mostrando hidrogel tipo 4). En el séptimo día se llevó a cabo un ensayo de

10 AlamarBlue por triplicado en otro grupo de muestras para determinar la actividad metabólica. La mayor actividad metabólica se observó en los hidrogeles tipo 3, 4 y 5 siendo la mayor actividad observada en el hidrogel tipo 4. La menor actividad se detectó en los hidrogeles tipo 1 y 2 lo que indica un menor crecimiento celular en concordancia con la observación microscópica

15 cualitativa (Figura 3).

Después de reponer el medio de cultivo (séptimo día) se observó un comportamiento sorprendente cuando las células unidas a los hidrogeles se despegaron espontáneamente de la superficie de los mismos. En el caso de los

20 hidrogeles tipo 2 se desprendieron aglomerados o pequeñas monocapas de células; pero en el caso de los hidrogeles tipo 3,4 y 5 se obtuvieron monocapas de mayor tamaño de células en confluencia flotando en el medio de cultivo (Figura 4). Teniendo en cuenta la popularidad del desarrollo de plataformas para cultivo celular útiles en regeneración tisular era necesario comprobar la

25 reproducibilidad del resultado de recolección/extracción celular y por tanto el despegado de las células fue repetido utilizando nuevos hidrogeles lo que confirmó el potencial de los hidrogeles en regeneración de células y monocapas de células.

30 Además, se despegaron células de un nuevo grupo de hidrogeles y se disgregaron suavemente por pipeteo repetido. Las células separadas se resembraron en TCP y se incubaron durante la noche para determinar si las

células despegadas conservaban su viabilidad y se unían y crecían sobre los pocillos control de plástico de forma similar a las células despegadas por métodos tradicionales. En todos los casos, las células crecieron en TCP y mostraron una morfología típica para este tipo de línea celular, que es dependiente de la adhesión (Figura 5).

Aunque el rápido despegado de las células es un resultado deseable, también es ventajoso ser capaces de transplantar las monocapas celulares a un lugar de trasplante de elección. Con esto en mente, se sembraron células sobre otro grupo de hidrogeles y se incubaron tal y como se ha descrito anteriormente durante 7 días. Los hidrogeles portadores de las células fueron entonces volteados y transferidos con la zona superior, que contiene las células, hacia abajo sobre pocillos de plástico de diámetro superior al de los hidrogeles (diámetro de 3.46 cm) y las células se reincubaron de nuevo. De esta manera los hidrogeles que estaban actuando como sustrato se convierten en superestratos del trasplante. Después de la incubación los hidrogeles se retiraron y fue posible ver claramente una monocapa celular circular unida al pocillo de plástico cuyo tamaño corresponde con los hidrogeles retirados. En el caso de los hidrogeles 3 y 4 con menor confluencia que la observada en el hidrogel 3. Este resultado confirma el éxito del trasplante de la lámina celular, ver Figura 6. Estos discos se reincubaron durante la noche para determinar si las células eran capaces de seguir creciendo sobre el pocillo de plástico, Como se observa en la Figura 6, las células continuaron desarrollándose y se expandieron cuando se incubaron otras 24 o 48h. Las células se tripsinizaron y resembraron en placas de 6 pocillos. En todos los casos las células crecieron de manera normal confirmando que las células no sufren efectos negativos después de crecer sobre los hidrogeles durante 1 semana en todos los tipos de hidrogel.

REIVINDICACIONES

1.- Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada, caracterizado porque comprende:

- 5 a) unidades derivadas de vinilpirrolidona (V) y unidades derivadas de un monómero alquénico aniónico o anionizable (A), donde las relaciones de reactividad en copolimerización radical binaria de (V) y (A) tienen unos valores máximo y mínimo de 0.5 respectivamente; y
- 10 b) unidades derivadas de al menos un entrecruzante; siempre que el o los entrecruzantes sean:
- i) dos entrecruzantes E1 y E2, donde E1 presenta homología al menos parcial respecto a (A) y E2 presenta homología al menos parcial respecto a (V); o
- ii) un entrecruzante E3 que presenta homología respecto a (A) y (V).

15

2. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según la reivindicación 1, donde (A) se selecciona del grupo que consiste en monómero acrílico y monómero estirénico, comprendiendo en ambos casos al menos un grupo aniónico o anionizable.

20

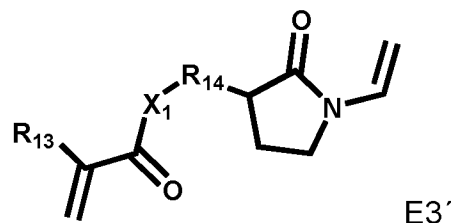
3. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el grupo aniónico o anionizable de (A) es sulfonato o un grupo sulfónico anionizable.

25 4. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según la reivindicación 3, donde (A) es una sal alcalina o amónica de metacrilato de C₁-C₁₀-alquilsulfonato.

5. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada
30 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende unidades derivadas de vinilpirrolidona (V), unidades derivadas de un monómero acrílico aniónico (A), unidades derivadas de un entrecruzante E1 con homología al

menos parcial respecto a (A) y unidades derivadas de un entrecruzante E2 con homología al menos parcial respecto a (V).

6. Hidrogel con estructura de redes poliméricas entrecruzadas interconectadas según la reivindicación 5, donde E1 es un oxi-, oxi-amino- o amino-derivado de un precursor con dos o más alcoholes y/o aminas primarias o secundarias, en los que al menos dos de dichos alcoholes o aminas han sido derivatizados a acrílicos para formar el entrecruzante E1.
7. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde E2 es un oxi-, oxi-amino-, carboxi- o amino-derivado de un precursor con dos o más alcoholes, uno o más alcoholes y una o más aminas primarias o secundarias, dos o más ácidos, o dos o más aminas primarias o secundarias; en los que al menos dos de dichos alcoholes, al menos un alcohol y una amina, al menos dos ácidos, o al menos dos aminas han sido derivatizados a vinílicos para formar el entrecruzante E2.
8. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde E3 corresponde a un compuesto de fórmula:



donde

- X₁ se selecciona del grupo que consiste en O y NH;
- R₁₄ se selecciona del grupo que consiste en H y CH₃; y
- R₁₃ es alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado.

9. Procedimiento de obtención del hidrogel tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho procedimiento comprende poner en contacto los monómeros (A) y (V) con los entrecruzantes E1 y E2, o el entrecruzante E3, en condiciones de polimerización radicalaria.

5

10. Procedimiento de obtención del hidrogel según la reivindicación 9, que comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de monómero alquénico aniónico o anionizable (A) y vinilpirrolidona (V) tal que la relación molar entre ellos es $0.001 \leq [A]/[V] \leq 2$.

10

11. Procedimiento de obtención del hidrogel según la reivindicación 10, que comprende añadir al medio de polimerización una cantidad inicial de entrecruzante E1 entre 0.1-100% molar respecto a la cantidad inicial de monómero (A); y una cantidad inicial de entrecruzante E2 entre 0.001-10% molar respecto a la cantidad inicial de vinilpirrolidona.

15

12. Hidrogel con estructura de red polimérica multicomponente entrecruzada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, obtenido por el procedimiento tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

20

13. Producto que comprende el hidrogel tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o en la reivindicación 12.

25

14. Uso del hidrogel tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 12, o del material tal como se describe en la reivindicación 13 para cultivo celular *in vitro*.

30

15. Uso del hidrogel tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 12, para fabricar un soporte para trasplante celular *in vivo*.

16. Uso del hidrogel tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 12, para fabricar un producto para actuar como sistema de barrera en el tratamiento de heridas.

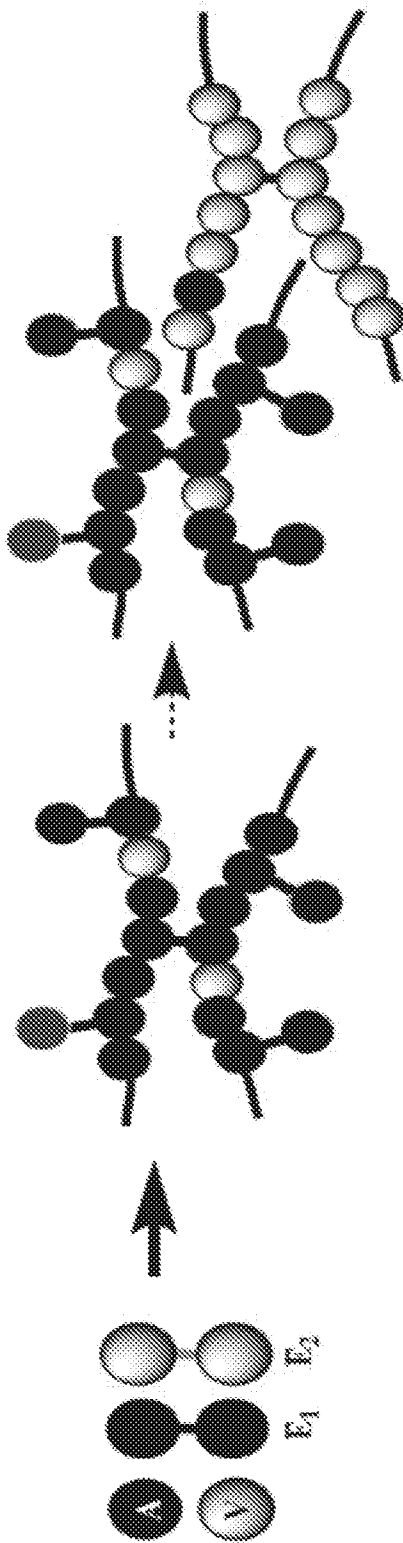


Fig. 1

2/6

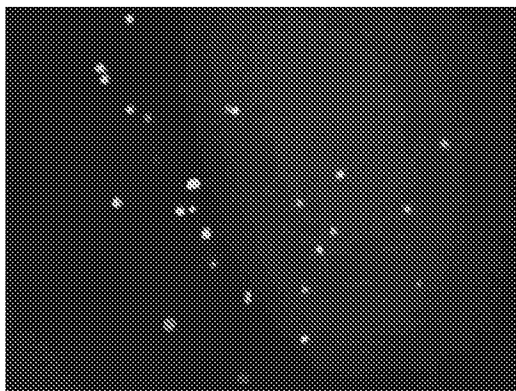


Fig. 2A

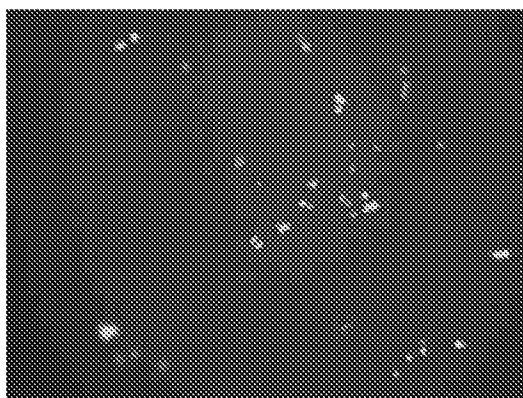


Fig. 2B

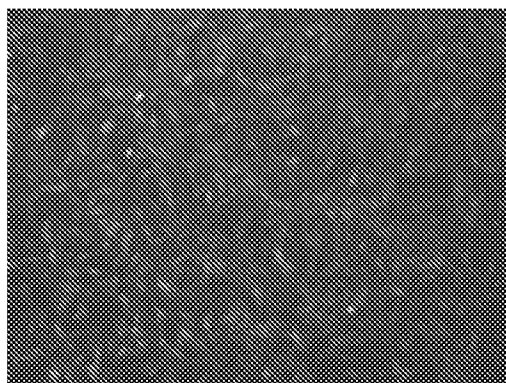


Fig 2C

3/6

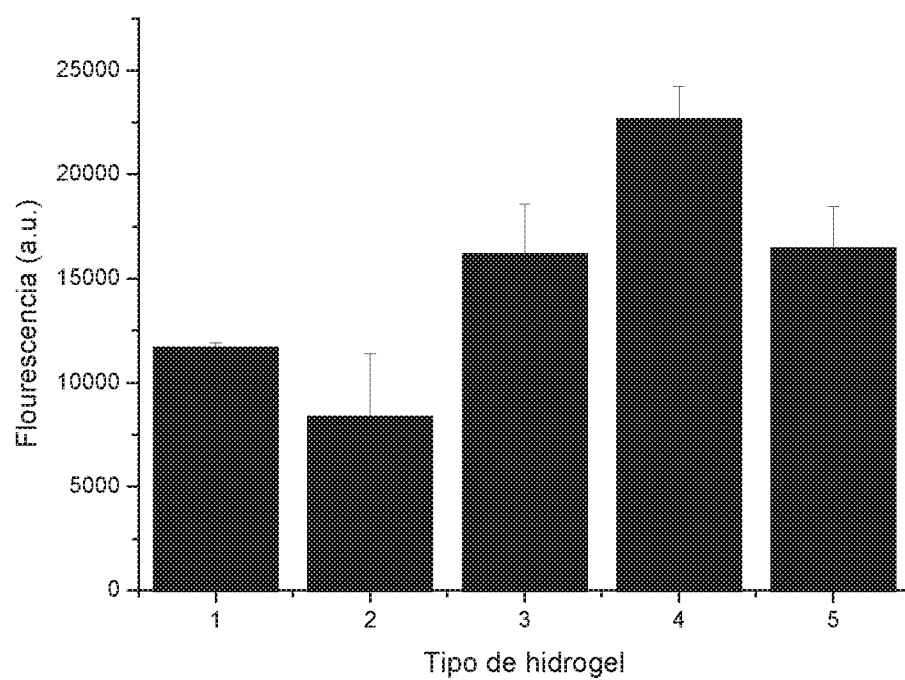


Fig. 3

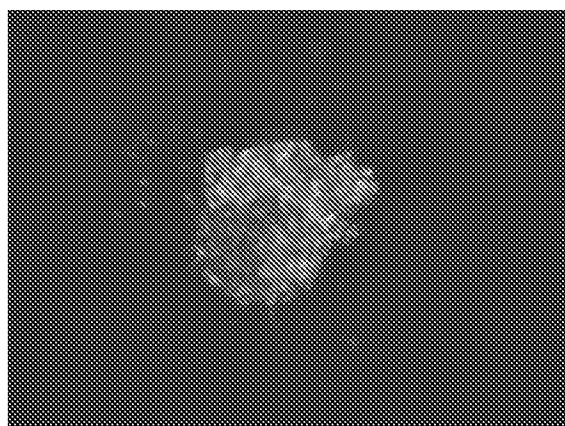


Fig. 4A



Fig. 4B

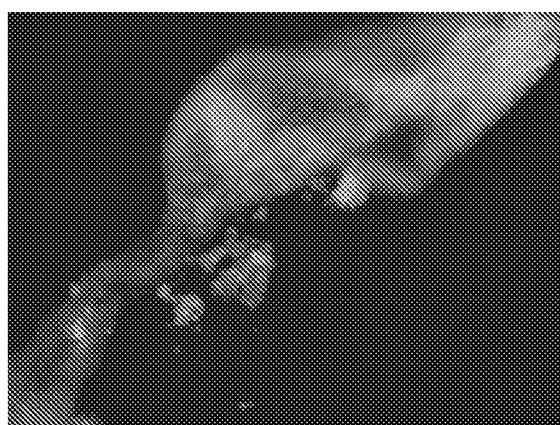


Fig. 4C

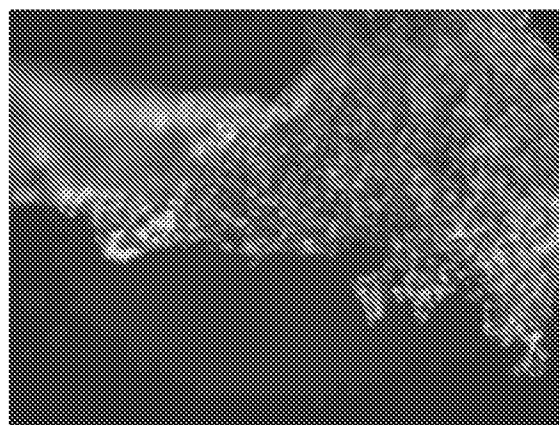


Fig. 4D

5/6

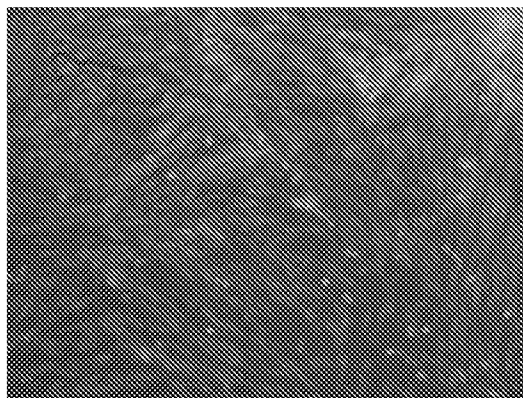


Fig. 5A

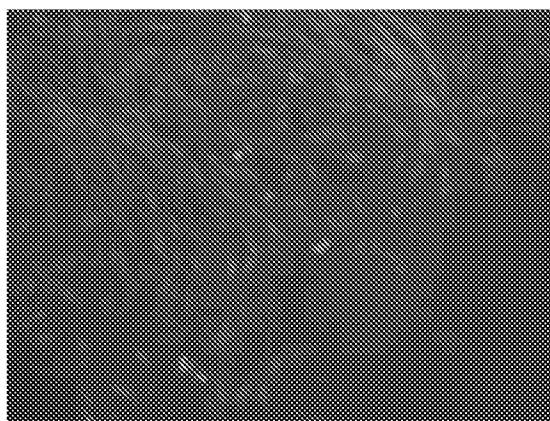


Fig. 5B

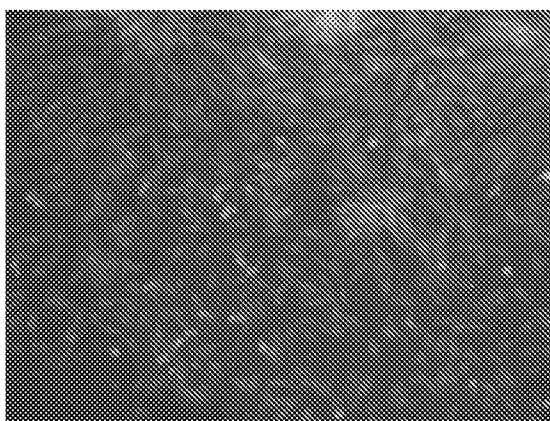


Fig. 5C

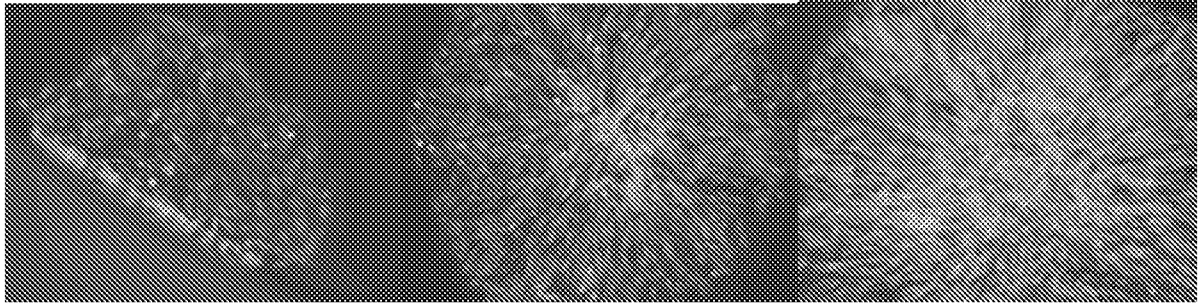


Fig. 6A

Fig. 6B

Fig. 6C

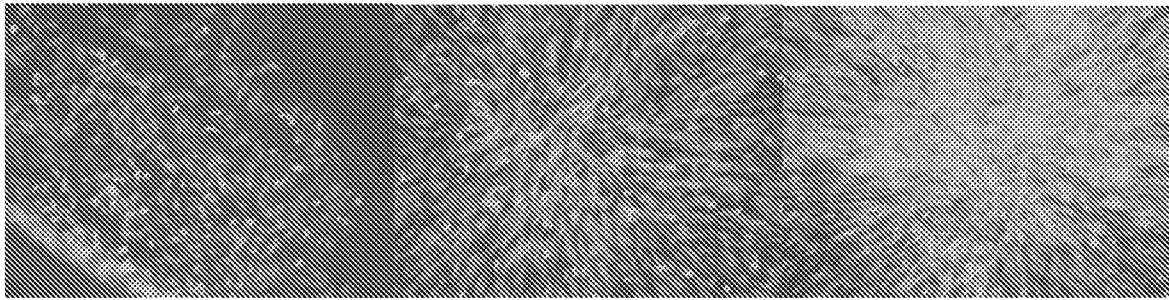


Fig. 6D

Fig. 6E

Fig. 6F

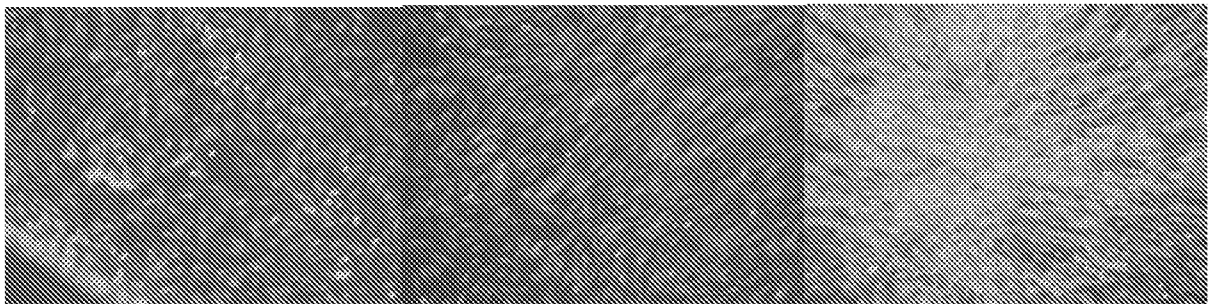


Fig. 6G

Fig. 6H

Fig. 6I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08L, C08J, A61K, A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, NLP, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	I. ARANAZ et al., "Pseudo-double network hydrogels with unique properties as supports for cell manipulation", Journal of Materials Chemistry B, 2014 (accessible on line 11-04-2014), vol. 2, pages 3839-3848	1-16
A	Q. TANG et al., "Preparation and properties of morphology controlled poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/poly(N-vinyl pyrrolidone) double networks for biomedical use", Current Applied Physics, 2010, vol. 10, pages 766-770	1-16
A	L. E. SMITH et al., "Examination of the effects of poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels in direct and indirect contact with cells", Biomaterials, 2006, vol. 27, pages 2806-2812	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16/07/2014Date of mailing of the international search report
(17/07/2014)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04Authorized officer
E. Davila Muro

Telephone No. 91 3495545

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070459

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D. DEMIRGÖZ et al., "Asymmetric bihomologous crosslinkers for biocomponent gels- The way to strongly increased elastic moduli", Journal of Applied Polymer Science, 2010, vol. 115, pages 896-900	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070459

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08L33/10 (2006.01)

C08L39/06 (2006.01)

C08J3/075 (2006.01)

C08L51/08 (2006.01)

A61K47/32 (2006.01)

A61L27/26 (2006.01)

A61L27/52 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070459

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08L, C08J, A61K, A61L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, NLP, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	I. ARANAZ et al., "Pseudo-double network hydrogels with unique properties as supports for cell manipulation", Journal of Materials Chemistry B, 2014 (accesible en línea 11-04-2014), vol. 2, páginas 3839-3848	1-16
A	Q. TANG et al., "Preparation and properties of morphology controlled poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/poly(N-vinyl pyrrolidone) double networks for biomedical use", Current Applied Physics, 2010, vol. 10, páginas 766-770	1-16
A	L. E. SMITH et al., "Examination of the effects of poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels in direct and indirect contact with cells", Biomaterials, 2006, vol. 27, páginas 2806-2812	1-16

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/07/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
17 de julio de 2014 (17/07/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Davila Muro
Nº de teléfono 91 3495545

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070459

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	D. DEMIRGÖZ et al., “Asymmetric bihomologous crosslinkers for biocomponent gels- The way to strongly increased elastic moduli”, Journal of Applied Polymer Science, 2010, vol. 115, páginas 896-900	1-16

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C08L33/10 (2006.01)

C08L39/06 (2006.01)

C08J3/075 (2006.01)

C08L51/08 (2006.01)

A61K47/32 (2006.01)

A61L27/26 (2006.01)

A61L27/52 (2006.01)