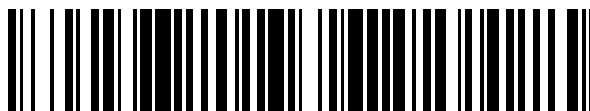


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 685**

51 Int. Cl.:

C08L 33/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2011** **PCT/GB2011/050329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011** **WO11101684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011** **E 11707214 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2542620**

54 Título: **Composiciones de microgel**

30 Prioridad:

19.02.2010 GB 201002862

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

23.11.2016

73 Titular/es:

GELEXIR HEALTHCARE LIMITED (100.0%)
C/o BioHub, Alderley Park
Nether Alderley, Cheshire SK10 4TG , GB

72 Inventor/es:

SAUNDERS, BRIAN;
MILANI, AMIR HOSSEIN;
LIU, RUIXUE y
FREEMONT, ANTHONY

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 590 685 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

Composiciones de microgel

5 Esta invención se refiere a composiciones de microgel y, en particular, a composiciones de gel formadas mediante la unión de una pluralidad de partículas de microgel individuales juntas. La presente invención también se refiere a procesos para la preparación de estas composiciones y a su uso para aplicaciones particulares, las aplicaciones especialmente médicas, tales como la reparación de tejido de soporte de carga dañado, degenerado o formado inapropiadamente (tal como, por ejemplo, discos intervertebrales).

Antecedentes

10 Partículas de microgel, que son partículas coloidales nanoscópicas o microscópicas de polímero reticulado, han sido investigadas por un número de diferentes aplicaciones potenciales. Los ejemplos particulares incluyen su uso como microreactores para la síntesis de plantilla de nanopartículas inorgánicas, como materiales ópticamente activos, incluyendo lentes y cristales fotónicos, y como sistemas de liberación de fármacos (Das et al. Annual Reviews of Materials Research, 2006, Vol.36: 117-142).

15 Las partículas de microgel se han utilizado también para la preparación de hidrogeles fotónicos, hidrogeles especialmente fotónicos capaces de manipular los fotones en el espectro visible e infrarrojo cercano (véase Cai et al. Macromolecules, 2008, Vol.41:9508-9512). Más específicamente, Cai et al., describen hidrogeles fotónicos derivados de partículas de microgel sensibles térmicamente, de vinilo funcionalizadas. Las partículas de microgel, que se forman a partir de polímeros de PEG, están reticuladas por cadenas de polímero de interconexión formadas por la polimerización de monómeros de etilenglicolacrilato (PEGA) y/o acrilamida. Tras la fotoiniciación, los monómeros de etilenglicolacrilato (PEGA) o acrilamida reaccionan con los grupos vinilo presentes en las partículas de microgel y polimerizan para formar poliinterconexión (PEGA) o cadenas de polímero de poli (acrilamida). El resultado es un hidrogel compuesto de partículas de microgel conectados entre sí por la interconexión de cadenas poliméricas de longitud variable.

20 Una aplicación particular de partículas de microgel biocompatibles es su utilidad potencial para la sustitución o la reparación de tejidos blandos que soportan carga lesionados, degenerados o formados inapropiadamente, tal como, por ejemplo, tales como, por ejemplo, discos intervertebrales y los tejidos encontrados en las articulaciones articulares (tales como el codo, rodilla, cadera, muñeca, hombro y tobillo). Estos tejidos blandos deben ser capaces de soportar cargas significativas y cambios en la presión. Por ejemplo, las presiones experimentadas dentro de los discos intervertebrales humanos pueden variar desde aproximadamente 0.5 MPa cuando está sentado a aproximadamente 2.3 MPa al levantar un peso de 20 kg. En consecuencia, la capacidad de los tejidos blandos, tales como discos intervertebrales, que soportan cargas variables biomecánicas es esencial para el funcionamiento normal del cuerpo.

25 El principio de tejido de soporte de carga del disco intervertebral es el núcleo pulposo en forma de disco, que forma el centro de un disco intervertebral. El núcleo pulposo consiste en condrocitos (células productoras de cartílago) dentro de una matriz de colágeno y proteoglicanos. El cartílago articular, que es el tejido que cubre los extremos óseos de las articulaciones articulares, tiene una composición similar a la encontrada en el núcleo pulposo. Los proteoglicanos tienen una alta densidad de carga negativa y son responsables de la alta presión de hinchazón del núcleo pulposo. El núcleo pulposo es un hidrogel iónico natural y contiene aproximadamente 75% de agua en los adultos. El contenido de proteoglicano disminuye gradualmente con la edad, debido a la degeneración natural, y esto puede resultar en la formación de tres canales de dimensiones conocidas como "hendiduras". La formación de hendiduras proporciona puntos débiles o huecos en la estructura del disco, lo que finalmente puede llegar a ser perjudicial para la forma general, la forma, las dimensiones y rendimiento del disco, en particular cuando se aplica una presión.

30 Cualquier lesión, degeneración o malformación en los tejidos de soporte de carga puede resultar en dolor significativo y falta de movilidad. Una proporción importante de todos los discos intervertebrales en la parte inferior de la columna vertebral muestra signos de degeneración por la edad de 50. Esto puede dar lugar a dolor de espalda crónico, que es una causa importante de morbilidad y ausencia del trabajo.

35 El tratamiento de los tejidos blandos de soporte de carga dañados, tales como discos intervertebrales o uniones articulares, generalmente se enfocan en el alivio sintomático del dolor. En los casos graves, puede ser necesaria la intervención quirúrgica para eliminar algunos de los tejidos dañados e insertar una sustitución protésica. La intervención quirúrgica es eficaz para aliviar el dolor, pero puede resultar en el daño de los tejidos adyacentes y alteraciones en las propiedades biomecánicas/de soporte de carga del tejido en cuestión. Además, la intervención quirúrgica puede requerir una estancia prolongada en el hospital y la morbilidad significativa para el paciente en cuestión.

40 Un enfoque de la ciencia de materiales para abordar el problema de la degeneración de los discos intervertebrales y otros tejidos de soporte de carga consiste en inyectar moléculas que polimerizan en el sitio de inyección. El depósito de polímero formado proporciona resistencia mecánica adicional al reforzar el tejido restante. Un ejemplo particular descrito en WO2000/062832 es la polimerización *in situ* de poli(etilenglicol)tetra-acrilato en el núcleo pulposo del disco intervertebral. Otro ejemplo consiste en la inyección de quitosano en el núcleo pulposo y permitiendo que se polimerice. El quitosano es un polisacárido de carga positiva que es soluble en agua a pH bajo. Se experimenta una transición de

solución a gel cuando se aumenta el pH. Por lo tanto, se ha contemplado que el quitosano se puede inyectar como una solución de bajo pH y después se deja formar un gel cuando se expone a un pH mayor *in vivo*. El gel que se forma *in vivo* no está cargado y forma una red de polímero que ocupa todo el volumen de la solución inyectada. Por lo tanto, se convierte en un macrogel a través de polimerización *in situ*.

5 El suministro de materiales inyectables que se pueden utilizar para tratar los tejidos de soporte de carga dañados o degenerados, tales como discos intervertebrales, es un reto importante. También debe apreciarse que un criterio clave para tales materiales es que sus propiedades mecánicas se replican a la del tejido de soporte de carga normal sano más cerca posible.

10 La WO2007/060424 describe el uso de partículas de microgel sensibles al pH para esta aplicación particular. El uso de partículas de microgel sensibles al pH biocompatibles ofrece muchas atracciones. En particular, las partículas de microgel se pueden inyectar en una configuración compacta (o "no hinchada") mediante el control del pH del medio de inyección. Sin embargo, una vez presente en el cuerpo, el pH por lo general se ajusta al pH fisiológico normal del tejido debido a las barreras naturales presentes en los fluidos fisiológicos. A valores de pH fisiológicos, el polímero que forma las partículas de microgel sensibles al pH sufren un cambio conformacional, que hace que las partículas de microgel se hidraten y se hinchen. A continuación, las micropartículas hinchadas, proporcionan una masa gelatinosa que llena cualquier región de tejido degenerado y proporciona soporte mecánico adicional para el tejido que se trate.

15 Sin embargo, a pesar de los lugares de interés de este enfoque, las propiedades mecánicas del gel no son óptimas y hay una tendencia a que las partículas de microgel disipen/migren fuera del lugar de inyección, por lo que todavía subsiste la necesidad de inyectables alternativas que son capaces de proporcionar más apoyo biomecánico mejorado para el tratamiento o la sustitución de los tejidos de soporte de carga dañados o degenerados.

20 La US5508325 (The Glidden Company) se refiere a una composición acuosa de recubrimiento protector para revestimientos de latas, basado en un aglutinante polimérico que comprende partículas de microgel epoxi reticuladas.

25 La WO2011009867 (Glaxo Group Limited) se refiere a una composición para el cuidado oral que comprende una dispersión de partículas de microgel sensibles o no sensibles, y al menos un portador o excipiente oralmente aceptable para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria.

Por lo tanto, es un objeto por tanto un objeto de la presente invención obviar o mitigar uno o más de los problemas de la técnica anterior, ya sea identificado en este documento o en otro lugar. En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado para la reparación de tejido de soporte de carga dañado y degenerado.

Breve resumen de la divulgación

30 La presente invención proporciona composiciones de microgel novedosas que tienen propiedades mecánicas generadas que les permiten ser utilizadas para la reparación y/o reemplazo de tejido blando dañado, tal como discos intervertebrales, así como para otras aplicaciones.

35 En sus términos más amplios, la presente invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una pluralidad de partículas de microgel, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas entre sí por cualquiera de

(i) enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y/o

40 (ii) por una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes y de este modo une las partículas entre sí, en donde la red de polímero de vinilo se forma por la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo.

45 Las composiciones de la presente invención poseen propiedades mecánicas ventajosas, en particular en términos de su capacidad para soportar cargas. Las propiedades mecánicas de estas composiciones pueden ser fácilmente y ventajosamente afinadas y controladas con el fin de optimizar las propiedades mecánicas de la composición de hidrogel resultante para aplicaciones de soporte de carga. Las propiedades mecánicas se pueden modificar mediante, por ejemplo, la modificación de las condiciones de preparación de la composición, variando las partículas de microgel originales, modificando las condiciones de reacción de reticulación, alterando el pH de la composición o la concentración de las partículas de microgel.

50 En particular, las propiedades mecánicas de las composiciones de la invención pueden replicar sustancialmente las del tejido de soporte de carga sano normal, tal como, por ejemplo, los discos intervertebrales, y por lo tanto permitir la provisión de materiales de composiciones de hidrogel que se pueden utilizar para el tratamiento de tejidos de soporte de carga dañados o degenerados. Por otra parte, las composiciones de la invención ventajosamente se pueden formar *in situ* en el sitio diana deseado. Esto permite que los materiales precursores (incluyendo, entre otras cosas, las partículas de microgel, monómeros de reticulación y/u otros reactivos necesarios) sean administrados en una forma conveniente

(por ejemplo, mediante la inyección de líquido) a un sitio diana (por ejemplo, *in vivo*) antes de que las composiciones de hidrogel y/o microgeles doblemente reticulados (DX) estén debidamente formados y moldeados *in situ* dentro del sitio diana deseado.

5 Las composiciones de la presente invención también proporcionan una forma física más consistente, que es particularmente ventajosa para aplicaciones *in vivo* donde la previsibilidad de la forma final es crucial. Tales composiciones también son estables y robustos, que tiene cepas críticas altas, y tienen una baja propensión a migrar o redispersar al servir una función de soporte de carga, especialmente *in vivo*. En particular, tales composiciones tienen una propensión reducida a redispersar en ambientes acuosos alcalinos o ácidos.

10 Las composiciones de la presente invención tienen la ventaja adicional de que pueden formarse a partir de sus precursores convenientemente administrables utilizando ya sea la temperatura de hinchazón activado por el pH de las partículas de microgel. Esto permite que los componentes precursores necesarios para formar las composiciones de la invención sean almacenados eficazmente durante largos períodos antes de la administración y formación de la composición. Esto es particularmente ventajoso para aplicaciones médicas en las que la forma administrable de la composición debe satisfacer regulaciones y requisitos para la fabricación, el transporte, y el almacenamiento de la forma administrable. Por otra parte, para aplicaciones *in vivo*, las propiedades de las composiciones se pueden modificar para permitir que un pH fisiológico proporcione la hinchazón activada por el pH de las partículas de microgel. Por ejemplo, hinchazón activada por el pH fisiológico de las partículas de microgel puede hacer que las partículas de microgel adyacentes para agrandar e interpenetrar con sus partículas de microgel precursoras vecinas y facilitar la reticulación de las partículas de microgel adyacentes para formar las composiciones de la invención. Esto es ventajoso porque las partículas mantienen una estructura 3-dimensional conectada (no porosa) con distribución de carga maximizadas dentro del gel.

Las ventajas de los microgeles DX sobre los microgeles reticulados por separado (SX) incluyen los valores del módulo elástico más altos, las cepas de mayor rendimiento, y la hinchazón en soluciones acuosas sin ningún tipo de redispersión.

25 Aunque los microgeles DX se asemejan a un hidrogel en que son macroscópicos, también son muy diferentes porque los microgeles DX se componen de partículas de microgel interunidas de tamaño de nanómetros (o, a veces micrómetro). Esto significa que las propiedades no mecánicas y la hinchazón se pueden modificar en la escala de tamaño de las partículas de microgel. Esto ofrece nuevas posibilidades para sintonizar las propiedades mecánicas, la construcción de híbridos y mezclas, que no existen para los hidrogeles macromoleculares convencionales. El término hidrogel macromolecular se refiere a hidrogeles formados por moléculas de unión covalente -hidrogeles convencionales.

Una ventaja particular de los métodos de preparación de microgel DX de la presente invención es que las partículas de microgel interpenetran antes de doble reticulación. Esto significa que hay una red eficiente, de tres dimensional, en lugar de la distribución de la tensión una vez que se forma el material. Como tal, los valores de módulo son más altos que los de los geles físicos SX precursores.

35 Así, en un aspecto particular, la presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas covalentemente entre sí mediante enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel. En este aspecto de la invención, las partículas de microgel de vinilo funcionalizadas son reticuladas directamente entre sí sin que intervenga ningún reticulador(es). Esto puede ser ventajoso porque la química de reticulación es simple y requiere menos reactivos. Las composiciones de hidrogel resultantes poseen también una forma física más consistente, que generalmente es más robusta con una menor propensión a la migración y/o re-dispersión cuando soporta cargas (por ejemplo, *in vivo*). Además, la administración de composiciones de la presente invención es particularmente conveniente (especialmente cuando se forma la composición *in vivo*). Estas composiciones también poseen propiedades mecánicas ventajosas, propiedades elásticas particularmente ventajosas. Estas composiciones también muestran excelente reología de gel con baja viscosidad, lo que es ideal para la reparación de tejidos blandos. Por otra parte, las propiedades mecánicas de las composiciones se pueden ajustar finamente y controlar fácilmente, alterando simplemente el grado de función de vinilo de las partículas de microgel, y también la concentración de las partículas de microgel utilizadas durante la preparación de la composición. Como tal, las composiciones se pueden adaptar para una variedad de aplicaciones específicas.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso de acuerdo con la reivindicación 8 para la preparación de una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel, en donde las partículas de microgel, en donde partículas de microgel adyacentes están unidas entre sí mediante enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel, comprendiendo el proceso:

55 (i) proporcionar, en un medio acuoso, una pluralidad de partículas de microgel que comprenden unidades estructurales funcionales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y

(ii) hacer que las partículas de microgel se hinchen de manera que las partículas de microgel adyacentes se ponen en contacto una con la otra y facilitar el acoplamiento de radicales libres de los grupos vinilo para unir de forma covalente partículas de microgel adyacentes entre sí.

5 La presente divulgación también describe una partícula de microgel que comprende una pluralidad de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre la superficie de la partícula de microgel.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso de preparación de una partícula de microgel que comprende una pluralidad de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre la superficie de la partícula de microgel, comprendiendo el proceso hacer reaccionar una partícula de microgel con un compuesto de la fórmula:

Z-L-B

10 en donde Z, L y B son como se definen en este documento.

En un aspecto particular adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel que están unidos por una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes, en donde la red de polímero de vinilo se forma mediante la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo. Las composiciones de este aspecto particular de la invención tienen la ventaja de que las composiciones con propiedades mecánicas altamente deseables, particularmente las apropiadas para la reparación de tejido blando, se pueden formar sin la necesidad de prefuncionalizar las partículas de microgel con unidades estructurales que contienen vinilo. Esto puede simplificar el proceso de formación de la composición para ciertas aplicaciones, y, potencialmente, simplifica la fabricación de la forma administrable de las composiciones, especialmente cuando se pretenden aplicaciones *in vivo*. Por otra parte, tales composiciones aún permiten la hinchazón desencadenada por temperatura y/o pH, las ventajas de las que se describen anteriormente, en particular con respecto a aplicaciones *in vivo*. Las propiedades de tales composiciones también se pueden controlar fácilmente y ajustar variando el peso molecular del monómero de reticulación.

En una realización, la composición está sustancialmente libre de cualquier reticulación directa entre las partículas de microgel (esto es, no hay enlace cruzado covalentes directo formado entre las cadenas de polímero que forman partículas de microgel adyacentes).

Alternativamente, las composiciones de este aspecto de la invención pueden comprender además enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de partículas de microgel adyacentes. Estos enlaces cruzados covalentes pueden ser, convenientemente, además de la red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes. Como tal, la composición puede comprender microgeles que están unidos por tanto la reticulación directa como una red de polímero interpenetrante separada.

Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender un grado de reticulación indirecta entre las partículas de microgel, por ejemplo, donde las partículas de microgel prefuncionalizadas con unidades estructurales de vinilo reticulables están reticuladas a través del monómero de reticulación (esto es, uno de los grupos vinilo del monómero de reticulación reacciona con un grupo vinilo en una partícula de microgel mientras que otro de los grupos vinilo del monómero de reticulación reacciona con un grupo vinilo en otra partícula de microgel). El uso de un monómero de reticulación que comprende dos o más grupos vinilo, por ejemplo, un monómero de reticulación bi-vinilo, es ventajoso sobre el uso de los monómeros de reticulación que comprenden un solo grupo vinilo porque la longitud de la cadena de cualquier enlace cruzado indirecto generalmente se regula mejor, por lo tanto, las propiedades de la composición se controlan más fácilmente y sintonizado fino a través de la selección del monómero de reticulación apropiado. Cuando, como en el caso Cai et al. (Macromolecules, 2008, Vol.41: 9508-9512), un monómero de reticulación comprende un solo grupo vinilo, se forman enlaces cruzados entre microgeles con diferentes longitudes de cadena (después de la polimerización propagada de los monómeros de reticulación por sí mismos), que realiza el control de las propiedades de la composición resultante.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel que están unidas entre sí por una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes y de este modo une las partículas entre sí, en donde se forma la red del polímero de vinilo mediante la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo, comprendiendo el proceso:

50 (i) proporcionar, en un medio acuoso, una pluralidad de partículas de microgel; y

(ii) hacer que las partículas de microgel se hinchen en presencia de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo de tal manera que las partículas de microgel adyacentes se ponen en contacto una con la otra y facilitar la polimerización del monómero de reticulación para formar una red de polímero reticulado que interpenetra las partículas y une las partículas de microgel adyacentes entre sí.

En un aspecto particular adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas entre sí por una combinación de:

(i) enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y

- 5 (ii) por una red de polímero reticulado que interpenetra las partículas de microgel adyacentes y de este modo une las partículas entre sí, en donde la red de polímero de vinilo se forma por la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo.

La composición de la invención es convenientemente obtenible por cualquiera de los procesos definidos en este documento.

- 10 Se describe con más detalle en este documento una composición de precursor para la formación de una composición de la invención como se define en este documento, la composición de precursor que comprende una pluralidad de partículas de microgel entre sí con uno o más reaccionantes o reactivos de reticulación adicionales (por ejemplo, monómeros reticulantes, iniciadores de la polimerización de vinilo). De manera apropiada, las partículas de microgel están en una configuración no hinchada en la composición de precursor, lo que les permite ser convenientemente
15 almacenadas y administradas al sitio diana para la formación *in situ* de la composición de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición como se define en este documento para su uso en el tratamiento de una condición caracterizada por tejido blando dañado o degenerado.

- 20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición como se define en este documento para su uso en el tratamiento de una condición caracterizada por tejido blando dañado o degenerado, en donde dicha composición se forma *in situ* dentro del cuerpo.

Además, se describe en este documento un método de tratamiento de un sujeto que sufre de una condición caracterizada por tejido blando dañado o degenerado, el método comprende la administración de una composición de precursor como se define en este documento, que reacciona para formar una composición tal como se define en este documento *in situ* dentro del cuerpo.

- 25 Se describe además en este documento una composición de precursor tal como se define en este documento para su uso en el tratamiento de una condición caracterizada por tejido blando dañado o degenerado, en donde dicha composición forma una composición de la invención como se define en este documento *in situ* dentro del cuerpo.

Los anteriores y otros aspectos se describen en la invención con más detalle en este documento.

Breve descripción de los dibujos

- 30 Las realizaciones particulares de la invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un esquema que muestra un primer método para preparar una composición de partículas de microgel reticuladas de la presente invención;

- 35 La figura 2 es un esquema que muestra un segundo método para preparar una composición de partículas de microgel reticuladas de la presente invención;

La figura 3 es un esquema que muestra un tercer método para preparar una composición de partículas de microgel reticuladas de la presente invención; y

Las figuras 4 a 18 se describen en los ejemplos adjuntos.

Descripción detallada

- 40 Composiciones de microgel

La presente invención proporciona composiciones de microgel que poseen propiedades mecánicas especialmente ventajosas que las hacen apropiadas para una serie de aplicaciones, incluyendo la reparación del tejido blando dañado o degenerado.

- 45 Las composiciones de la invención comprenden partículas de microgel que están bien unidas entre sí por enlaces cruzados covalentes formados por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas en la superficie de las partículas de microgel; y/o por una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes

y de este modo une las partículas entre sí, en donde la red de polímero se forma por la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo.

También se describen las composiciones de precursor para la formación de una composición de la invención, donde la composición precursora que comprende una pluralidad de partículas de microgel junto con uno o más reactivos o reactivos de reticulación adicionales (por ejemplo, de monómeros de reticulación, iniciadores de polimerización de vinilo, etc.). De manera apropiada, las partículas de microgel están en una configuración no hinchada en la composición de precursor, lo que les permite ser convenientemente almacenadas y administradas al sitio diana para la formación *in situ* de la composición de la invención.

Una composición de la invención es convenientemente obtenible por una cualquiera de los procesos definidos en este documento.

Como se discute en más detalle a continuación, los enfoques para unir las partículas de microgel juntos se basan en la química de radicales libres para inducir el acoplamiento de grupos vinilo (si se trata de la polimerización de radicales libres de los monómeros de reticulación que comprenden dos o más grupos vinilo o las unidades estructurales que contienen vinilo injertadas en la superficie de las partículas de microgel, o una combinación de los mismos).

Partículas de microgel

Las composiciones de la presente invención son composiciones de hidrogel macrogel que se forman mediante la unión junto con una pluralidad de partículas de microgel.

Por el término "partícula de microgel", se quiere decir una partícula de hidrogel que tiene un tamaño dentro del intervalo de 1 nm a 100 μ m y que comprende un polímero reticulado formado por la polimerización de una pluralidad de comonómeros reticulados.

La partícula de microgel en sí, se puede considerar que es una macromolécula (esto es, el polímero reticulado) que comprende una masa molar entre aproximadamente 10^6 y 10^{10} Da. (Por ejemplo, entre 10^6 y 10^9 Da). Sin embargo, los comonómeros individuales que se utilizaron durante la preparación de las partículas de microgel pueden comprender una masa molar entre aproximadamente 5Da y 5000 Da, más preferiblemente, entre aproximadamente 10 Da y 1000 Da, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 50 Da y 500 Da, y más preferiblemente, entre aproximadamente 75 Da y 400 Da. En una realización más preferida, los comonómeros utilizados en la reacción de polimerización comprenden una masa molar entre aproximadamente 100 Da y 300 Da.

La partícula de microgel es convenientemente una partícula de copolímero reticulado que es sensible al pH y/o a la temperatura. Por "sensible a pH y/o a temperatura" se quiere decir que el polímero que forma las partículas de microgel puede someterse a un cambio conformacional dependiente del pH y/o de la temperatura, que tiene un efecto consiguiente en la hidratación de la partícula. Esto significa que variando el pH y/o la temperatura, las partículas de microgel pueden tener transición entre una configuración colapsada, en la cual la partícula está en una configuración compacta, a una configuración hinchada, en la que la partícula es en forma de un gel altamente hidratado (o microgel).

Por el término "configuración colapsada", nos referimos a la partícula se reduce sustancialmente en tamaño y tiene un diámetro medio menor que en la configuración hinchada. En este estado, el polímero presente en las partículas de microgel adopta una configuración que no favorece la entrada de agua en la partícula. El límite de la configuración colapsada es cuando la partícula contiene prácticamente nada de agua. Por lo tanto, la partícula de microgel comprende preferiblemente menos de aproximadamente 70% (peso/peso) de agua, más preferiblemente, menos de aproximadamente 50% (peso/peso) de agua, preferiblemente, menos de aproximadamente 30% (peso/peso) de agua, e incluso más preferiblemente, menos de aproximadamente 20% (peso/peso) de agua, y más preferiblemente, menos de aproximadamente 10% (peso/peso) de agua en la configuración colapsada. En una realización particular, las partículas comprenden una proporción menor de agua (menos de aproximadamente 40% peso/peso) en la configuración colapsada. Se apreciará que este contenido de agua es una referencia al agua presente dentro de la partícula.

Se apreciará que el diámetro de las partículas de microgel dependerá de la hidratación (contenido de agua) de la misma que a su vez depende de la configuración del polímero. El diámetro de la partícula de microgel en la configuración colapsada es por lo general menos de aproximadamente 100 μ m, más por lo general, menos de aproximadamente 50 μ m, e incluso más por lo general, menos de aproximadamente 20 μ m. Sin embargo, en una realización preferida, se prefiere que el diámetro de la partícula de microgel en la configuración colapsada sea inferior a aproximadamente 10 μ m, más preferiblemente, menos de aproximadamente 5 μ m, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 1 μ m. La mayoría de partículas preferidas son en la escala de nanómetros, esto es, el diámetro medio de la partícula de microgel en la configuración colapsada está preferiblemente entre aproximadamente 1 nm y 1000 nm, más preferiblemente, entre aproximadamente 10 nm y 750 nm, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 20- 500 nm, y más preferiblemente, entre aproximadamente 50 y 100 nm de diámetro.

Por el término "configuración hinchada", queremos decir que la partícula de microgel es sustancialmente hidratada y ampliada, y por lo tanto tiene un diámetro medio mayor que el de la partícula cuando está en la configuración colapsada.

Se apreciará que esta inflamación es causada por un flujo de agua en la partícula. En la configuración hinchada, la partícula de microgel comprende preferiblemente al menos aproximadamente 70% (peso/peso) de agua, más preferiblemente, al menos aproximadamente 85% (peso/peso) en agua, preferiblemente, al menos aproximadamente 90% (peso/peso) de agua, incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 95% (peso/peso) de agua, y más preferiblemente, al menos aproximadamente 99% (peso/peso) de agua. Se apreciará que la cantidad de agua en la partícula dependerá de la temperatura y/o pH, así como las propiedades del polímero que constituyen la partícula de microgel (por ejemplo, densidad de carga). De manera apropiada, el diámetro medio de la partícula de microgel está adaptado para aumentar en al menos 20%, más convenientemente, por al menos 50%, más convenientemente por lo menos 100%, incluso más convenientemente, por lo menos 200%, ya que la transición de una configuración colapsada a una hinchada en respuesta a un cambio en el pH y/o temperatura.

En una realización, el diámetro de las partículas de microgel en la configuración hinchada es de aproximadamente 5 nm a 100 μ m, de forma apropiada de aproximadamente 5 nm a 10 μ m, y preferiblemente de 50 nm a 1 μ m.

Para dispersiones concentradas de partículas de microgel (por ejemplo, concentraciones superiores a 2 % en peso), La transición de una configuración colapsada a una configuración hinchada puede ser referida como una etapa de macrogelación dependiente del pH o la temperatura. El cambio conformacional del polímero causa solvente en el medio que rodea a la entrada en la partícula y hacer que se hinche. Así, en la configuración colapsada que las partículas se dispersan en un medio sustancialmente fluido, que tiene una baja viscosidad y puede fluir. Por lo tanto, en esta configuración, las partículas de microgel se pueden transportar fácilmente a la ubicación deseada, por ejemplo, mediante la inyección de las partículas a la ubicación deseada en el cuerpo. Sin embargo, en la configuración hinchada, las partículas de microgel forman una masa gelificada que tiene una viscosidad más alta y un gel físico de mayor viscosidad.

Para la aplicación particular, por lo que las composiciones de la invención se usan para el tratamiento de tejido de soporte de carga dañado o degenerado, el polímero que constituye la partícula de microgel se puede seleccionar de modo que la transición a una configuración hinchada a pH fisiológico o temperatura. Esto significa que el pH o la temperatura del medio de inyección pueden ser manipulados de modo que las partículas de microgel están en su configuración compacta en el punto de administración, lo que les permite administrar fácilmente a la ubicación deseada por inyección. El cambio posterior en la temperatura y/o pH en el cuerpo, entonces hará que las partículas de microgel se hinchen de manera que entran en contacto con partículas de microgel adyacentes. A continuación, las partículas de microgel hinchadas se pueden unir juntas por la reacción entre los grupos vinilo proporcionados en o cerca de la superficie de las partículas de microgel hinchadas adyacentes y/o por la formación de una red de polímero reticulado dentro de la matriz de microgel hinchada. El resultado es una composición de macrogel cohesiva que tiene propiedades mecánicas ventajosas.

Con el fin de que las partículas de microgel se hinchen, tienen que dispersarse en un medio acuoso apropiado. Se prefieren agua, solución reguladora o fluidos fisiológicos.

La pluralidad de partículas de microgel utilizadas para formar las composiciones de la presente invención pueden todos poseen la misma composición polimérica, esto es, los mismos comonomeros se utilizan para formar los polímeros que componen las partículas de microgel. Sin embargo, en ciertas realizaciones de la invención, la pluralidad de partículas de microgel puede comprender dos o más tipos diferentes de partículas de microgel formadas a partir de polímeros que se componen de diferentes componentes comonoméricos o con diferentes proporciones de los mismos componentes comonoméricos.

Una dispersión de microgel es diferente a un hidrogel, ya que tiene la capacidad de fluir y existir en el estado fluido. Un hidrogel no puede hacer eso porque es un macroscópico (por ejemplo, material de tamaño de milímetros o centímetros). La dispersión de microgel se compone de partículas de microgel dispersas dentro de una solución (acuosa). Debido a que hay espacio entre las partículas que pueden fluir y es un fluido. Sin embargo, el uso de las partículas de microgel sensibles al pH de la presente invención, el pH se utiliza para desencadenar un aumento en el tamaño de la partícula de microgel para que ocupen todo el volumen del fluido. Esto provoca la formación de un gel físico (reticulado por separado). En este estado las periferias de las partículas de microgel se interpenetran.

El nuevo método para la formación de microgel DX toma ventaja de esta mediante acoplamiento covalente de las periferias de microgeles funcionalizados de vinilo interpenetrados. Esto da un segundo nivel de reticulación (doble reticulado) que une las partículas de microgel entre sí.

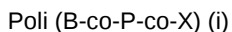
Partículas de microgel sensibles al pH

En una realización particular, las partículas de microgel son sensibles al pH. Cualquier partícula de microgel sensible al pH apropiada puede ser utilizada para formar las composiciones de la presente invención.

En una realización particular, el polímero sensible al pH es un polímero definido en WO2007/060424, de la cual los contenidos completos se incorporan en este documento por referencia. En particular, los polímeros apropiados para la formación de partículas de microgel sensibles al pH se definen en la página 12/línea 21 a la página 22/línea 17, y página

26/línea 20 a la página 28/línea 22, de WO2007/060424. Las partículas de microgel se pueden hacer por cualquier método apropiado conocido en la técnica. Los iniciadores apropiados para su uso en la formación de tales partículas de microgel sensibles al pH se definen en la página 22/línea 19 a la página 24/línea 3 de WO2007/060424. Los surfactantes apropiados que también se pueden utilizar se definen en la página 24/línea 5 hasta la página 26/línea 11.

- 5 Para las composiciones de la presente invención, se prefiere que la partícula de microgel comprenda un comonomero hidrófobo. Por lo tanto, se prefiere que la partícula de microgel comprenda una partícula de polímero copolimerizado, que puede definirse por la siguiente fórmula I:



en donde:

- 10 P es un comonomero sensible al pH;

X es un comonomero de reticulación funcional; y

B es un comonomero hidrófobo.

Estos polímeros de microgel particulares se describen en la página 19/línea 21 hasta la página 22/línea 8 de WO2007/060424.

- 15 En una realización preferida, la partícula de microgel comprende acrilato de etilo (EA esto es, que es el comonomero hidrófobo, B), ácido metacrílico (MAA esto es, que es el comonomero sensible al pH, P), y 1,4-butanodiol diacrilato (esto es BDDA, que es el comonomero de reticulación funcional, X). De acuerdo con lo anterior, una partícula de microgel preferido comprende poli (EA/MAA/BDDA).

- 20 El poli(EA/MAA/BDDA) utilizado para formar la partícula de microgel puede comprender un % de masa máximo de EA (monómero hidrófobo) de aproximadamente 95%, un % de masa mínimo de MAA (monómero sensible al pH) de aproximadamente 5%, y un % de masa mínimo de BDDA (monómero de reticulación) de aproximadamente 0.1%. De manera apropiada el % de masa de BDDA está dentro del intervalo de 0.1 a 2%.

- 25 En una realización particular, las partículas de microgel poli (EA/MAA/BDDA) comprenden 65.9% de EA, aproximadamente 33.1% de MAA y aproximadamente 1.0% de BDDA basado en la masa total de monómeros. Esto puede ser definido como una relación de masa de EA/MAA/BDDA como 65.9/33.1/1.0, o como una relación molar de EA/MAA/BDDA es 130.4/76.0/1.0.

- 30 En otra realización preferida, la partícula de microgel comprende metacrilato de metilo (esto es, MMA, que es el comonomero hidrófobo, B), ácido metacrílico (esto es, MAA, que es el comonomero sensible al pH, P) y etilenglicol dimetacrilato (esto es, EGDMA, que es el comonomero de reticulación funcional, X). De acuerdo con lo anterior otra partícula de microgel preferida comprende poli(MMA/MAA/EGDMA).

El poli (MMA/MAA/EGDMA) utilizado para formar la partícula de microgel puede comprender una % de masa máxima de MMA (monómero hidrófobo) de aproximadamente 95%, un % de masa mínima de MAA (monómero sensible al pH) de aproximadamente 5%, y una % de masa mínima de EGDMA de aproximadamente 0.1% (monómero de reticulación). De manera apropiada, el % en masa de EGDMA está dentro del intervalo de 0.1 a 2%.

- 35 En una realización particular, el poli (MMA/MAA/EGDMA) de las partículas de microgel comprende aproximadamente 66.8% de MMA, aproximadamente 32.8% de MAA y aproximadamente 0.4% de EGDMA basado en la masa total de monómeros. Esto puede ser definido como una relación de masa de MMA/MAA/EGDMA de 167/82/1.0, o como una relación molar de MMA/MAA/EGDMA es de 320/185/1.0.

- 40 En una realización particular, la composición o (o composición de precursor utilizada para formar dicha composición) como se define en este documento comprende partículas de microgel que se hinchan o colapsan como consecuencia de un cambio en el pH del ambiente circundante. En una realización particular, la composición (o composición de precursor utilizada para formar dicha composición) tiene un estado de almacenamiento y/o estado de administración que tiene un entorno de pH que es diferente del entorno de pH del sitio diana (por ejemplo, pH fisiológico). En el estado de almacenamiento o administración, las partículas de microgel existen convenientemente en un estado sustancialmente no hinchado. El hueco entre el entorno de pH del almacenamiento y/o estado de la administración y ambiente de pH del sitio diana es convenientemente suficiente para hacer que las partículas de microgel se hinchen de manera que su diámetro hidrodinámico (d_h) aumenta. De manera apropiada, el pH en el sitio diana provoca que el diámetro hidrodinámico (d_h) de las partículas de microgel aumentan en relación con el almacenamiento o el estado administración por al menos 10%, más convenientemente por lo menos 25%, incluso más convenientemente por lo menos 50%, y más convenientemente por lo menos 100%. El sitio diana puede ser convenientemente *in vivo*, que tiene un ambiente de pH fisiológico.
- 50

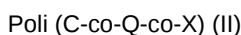
Las partículas de microgel sensibles al pH apropiadas se pueden obtener comercialmente o preparar utilizando metodología bien conocida en la técnica.

Partículas de microgel sensibles a la temperatura

5 Las partículas de microgel de la presente invención también pueden ser sensibles a la temperatura. Cualquier partícula de microgel sensible a la temperatura apropiada puede ser utilizada para formar las composiciones de la presente invención.

10 El término "sensible a la temperatura" se utiliza en este documento para referirse a polímeros que se someten a un cambio dependiente de la temperatura en la hidratación. La temperatura a la que un cambio sustancial en la hidratación polimérica se produce se conoce como la temperatura de solución crítica (CST). La temperatura de solución crítica inferior (LCST) es la temperatura crítica inferior a la que el copolímero se vuelve altamente miscible con agua. De acuerdo con lo anterior, por encima de la LCST el copolímero es altamente deshidratado y por debajo de la LCST el copolímero es altamente hidratado. Los polímeros apropiados de la presente invención tienen una LCST en el intervalo de 20°C a 40°C. La LCST deseable será dictada en última instancia por la aplicación pretendida de la composición de microgel. Por ejemplo, para aplicación *in vivo*, será deseable tener una LCST por encima de 37°C. Para otras 15 aplicaciones, por ejemplo, la condición de una película de microgel sensible a la temperatura para aplicaciones de cultivo celular, puede ser necesaria una LCST de, por ejemplo 30 a 34°C. Un ejemplo de un polímero que tiene una LCST inferior de aproximadamente 32°C es Poli (N-isopropilacrilamida). El término "sensible a la temperatura" también se utiliza en este documento para referirse a monómeros que, cuando se polimerizan forman polímeros, sensibles a la temperatura que se someten a un cambio dependiente de la temperatura en la hidratación como se discutió 20 anteriormente.

En una realización particular de la invención, el polímero sensible a la temperatura utilizada para formar las partículas de microgel es un copolímero de la siguiente fórmula II:



en donde:

25 C es un monómero sensible a la temperatura;

Q es un monómero que contiene un grupo hidroxilo o un comonómero P sensible al pH tal como se define anteriormente en este documento; y

X es un comonómero de reticulación tal como se define en WO2007/060424.

30 Cualquier monómero sensible a la temperatura (componente C) apropiado se puede utilizar. Los ejemplos apropiados del monómero C sensible a la temperatura incluyen N-isopropilacrilamida y vinilcaprolactona. De manera apropiada, C constituye 40 a 98 % mol., del polímero sensible a la temperatura.

Un ejemplo apropiado de Q es hidroxí etil metacrilato, alcohol de vinilo, etilenglicol metacrilato, o poli(etilenglicol) metacrilato. De manera apropiada, C constituye 1-55 % mol del polímero sensible a la temperatura.

Como el anterior, X constituye convenientemente de 0.01 a 2 % mol del polímero sensible a la temperatura.

35 Los polímeros utilizados para preparar las partículas de microgel de la presente invención pueden comprender además un monómero que comprende una cadena lateral que contiene vinilo (en lugar de, o además de, el monómero de reticulación X). La cadena lateral que contiene vinilo provee grupos vinilo funcionales, al menos una proporción de las cuales estarán en o cerca de la superficie de la partícula de microgel y por lo tanto proporcionan un medio por el que las partículas de microgel pueden reaccionar y unirse entre sí. Un ejemplo apropiado de dicho monómero sería metacrilato de alilo (AM). Un ejemplo apropiado de un polímero que comprende metacrilato de alilo es poli (EA/MAA/AM) como se 40 define en Dalmont et al. (Langmuir, 2008, 24, 2834-2840).

Injerto de unidades estructurales que contienen vinilo

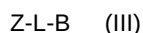
45 En una realización particular, la presente invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas covalentemente entre sí por grupos de reticulación formados por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las partículas de microgel. Como tal, la composición precursora puede comprender convenientemente partículas de microgel con unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre la misma.

Se prevé que las unidades estructurales que contienen vinilo serán injertadas predominantemente en la superficie de la partícula de microgel, o la próxima a la misma.

El injerto de unidades estructurales que contienen vinilo en las partículas de microgel preformadas proporciona una pluralidad de unidades estructurales que contienen vinilo que posteriormente se pueden hacer reaccionar para formar el enlace cruzado covalente entre partículas de microgel adyacentes.

5 Cualquier unidad estructural que contiene vinilo apropiado que puede ser injertada en la partícula de microgel se puede utilizar para este propósito. De manera apropiada, la unidad estructural que contiene vinilo es soluble en agua.

En una realización, la unidad estructural que contiene vinilo se proporciona por reacción de una partícula de microgel con un compuesto soluble en agua de la fórmula (III):



en donde:

10 Z es un grupo reactivo;

L es un enlace o un grupo de unión entre Z y B; y

B es un grupo que comprende un grupo funcional vinilo.

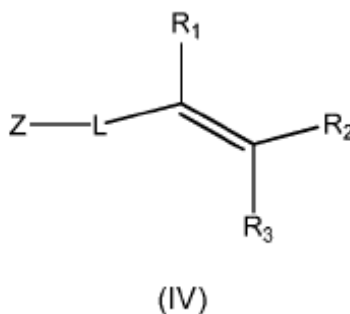
15 Z puede ser cualquier grupo reactivo apropiado. El propósito del grupo Z es reaccionar con un grupo funcional presente en la partícula de microgel y por lo tanto injertar la parte de -L-B del compuesto de fórmula III en la superficie de la partícula para proporcionar la fracción que contiene vinilo. Por lo tanto, la selección de un grupo Z funcional apropiado será dictada por la naturaleza de la partícula de microgel en cuestión. Un químico experto sería fácilmente capaz de seleccionar grupos apropiados. Por ejemplo, si la partícula de microgel comprende unos grupos de ácido carboxílico, a continuación, Z puede ser cualquier grupo que reaccionará para formar un éster con el grupo de ácido carboxílico, tal como, por ejemplo, un halógeno, hidroxilo, amino o un grupo epóxido. Del mismo modo, si la partícula de microgel comprende un grupo amino, a continuación, Z puede ser un grupo que reacciona con la amina para formar un enlace amida (por ejemplo, Z puede ser un grupo -C(O)M, en donde M es un grupo saliente, por ejemplo, un halógeno tal como cloro), o un grupo que reacciona para formar un enlace de sulfonamida (por ejemplo, Z es un grupo tal como -S(O)₂Cl).

25 Alternativamente, si la partícula de microgel comprende un grupo (o grupos) de ácido carboxílico, Z puede ser convenientemente un grupo amino, tales como amino etilmetacrilato (o sal del mismo), y el acoplamiento puede conducir convenientemente en una amida de ácido. En tales casos, el compuesto III convenientemente puede acoplarse con el(los) grupo(s) de ácido carboxílico después de la activación previa del(los) grupo(s) de ácido carboxílico (por ejemplo, a través de la formación de un acil-cloruro) o el uso de un agente de acoplamiento (por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), carbonildiimidazol (CDI)). Z puede ser convenientemente alquilamino (o una sal del mismo), por ejemplo, clorhidrato de etilamina.

30 En una realización particular, Z es un grupo epóxido.

35 L puede ser cualquier enlace o grupo de unión apropiado, tal como, por ejemplo, una cadena de alquileo funcionalizada que comprende opcionalmente uno o más grupos funcionales seleccionados de -O-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NR^a-, -NR^a-C(O)-, o -C(O)-NR^a-, en donde R^a es H o alquilo (C1-2) o L puede ser -(OCH₂CH₂)_n-, donde n es 1 a 50 (inclusive). La cadena de alquileo puede ser un grupo corto (1-3 átomos de carbono) que comprende uno o más de estos grupos funcionales definidos anteriormente.

B puede ser cualquier grupo que contiene vinilo apropiado. En una realización particular, B es un grupo -CR₁ = CR₂R₃, esto es, la fracción que contiene vinilo es un compuesto de fórmula estructural IV mostrada a continuación:



en donde Z y L son como se definen anteriormente; y R₁, R₂ y R₃ se seleccionan de H o alquilo (C1-3).

40 R₁, R₂ y R₃ se seleccionan convenientemente de H, metilo o etilo, especialmente H o metilo.

En una realización de la invención, el compuesto de fórmula III o IV se selecciona de metacrilato de glicidilo, acrilato de glicidilo o de otros glicidilacrilatos funcionalizados. Tales compuestos se pueden acoplar a los grupos de ácido carboxílico, amina o hidroxilo en la superficie de las partículas de microgel.

En una realización particular, el compuesto de fórmula III o IV es metacrilato de glicidilo.

- 5 En una realización alternativa, el compuesto de fórmula III o IV es alilamina, que puede ser unido covalentemente a grupos de ácido carboxílico en la superficie de las partículas de microgel utilizando química de carbodiimida soluble en agua.

- 10 En una realización alternativa, el compuesto de fórmula III o IV es clorhidrato de metacrilato de aminoetilo (AEMHCl). Tales compuestos pueden convenientemente estar acoplados a un(os) grupo(s) de ácido carboxílico en las partículas de microgel por medio de una reacción de acoplamiento que implica EDC.

Un experto en la técnica será capaz de seleccionar las condiciones experimentales apropiadas para injertar la fracción que contiene vinilo en la partícula de microgel.

De manera apropiada, la reacción se llevará a cabo en el solvente acuoso a un pH entre 2 y 7, y preferiblemente a un pH entre 2 y 4.

- 15 De manera apropiada, la concentración de las partículas de microgel en el solvente acuoso es entre 0.05 y 20% en peso.

De manera apropiada, la concentración del grupo que contiene vinilo (por ejemplo, metacrilato de glicidilo, acrilato de glicidilo u otros glicidilacrilatos funcionalizados) está comprendida entre 10^{-3} y 10 Mol dm^{-3} , y preferiblemente entre 0.1 y 5 Mol dm^{-3} .

- 20 Una temperatura apropiada para la reacción de injerto es entre 0 y 100°C , y preferiblemente entre 40 y 70°C . La reacción puede proceder entre 0.5 y 48 horas, y preferiblemente entre 4 y 12 horas.

De manera apropiada, la unidad estructural que contiene vinilo debe corresponder a una concentración entre 0.1 y 60% mol con respecto a todos los comonomeros presentes en el gel. Preferiblemente, la concentración de la fracción que contiene vinilo debe estar entre 10 y 30% mol con respecto a todos los comonomeros presentes en el gel.

- 25 Reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado

Las unidades estructurales que contienen vinilo injertadas en la superficie de las partículas de microgel pueden someterse a una reacción de acoplamiento de los radicales libres directamente con las unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de partículas de microgel adyacentes para formar un enlace covalente directo entre ellas.

- 30 Esta reacción particular se muestra esquemáticamente en la figura 2. La primera etapa de la reacción consiste en proporcionar partículas de microgel que tienen unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre a sus superficies. La siguiente etapa consiste en llevar las superficies de las partículas adyacentes en contacto una con la otra. Esto se puede lograr haciendo que las partículas de microgel que responden a hincharse mediante la variación de la temperatura o el pH (como se describe anteriormente en este documento). La hinchazón de las partículas de microgel, como se hidratan hace que las superficies de las partículas adyacentes estén en contacto entre sí e incluso se superponen para formar regiones interpenetrantes de polímero gelificado. Este dispone las unidades estructurales que contienen vinilo injertado de superficie de micropartículas adyacentes en estrecha proximidad entre sí para facilitar el acoplamiento de los radicales libres de las unidades estructurales de vinilo, como se discute más adelante.

- 40 La reacción entre las unidades estructurales que contienen vinilo injertadas en la superficie de partículas de microgel adyacentes se consigue mediante la química de radicales libres utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Una característica clave de la presente invención es que la reacción debe tener lugar en el medio acuoso, por lo que los reactivos solubles en agua convenientemente deben ser utilizados. Para aplicaciones *in vivo* también se prefiere que ninguno de los reactivos utilizados posea poca o ninguna toxicidad para el sujeto.

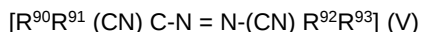
- 45 De manera apropiada, la reacción se realiza en presencia de un iniciador de radical libre (en lo sucesivo, denominado como un iniciador), que es soluble en agua. De manera apropiada, el iniciador es sensible a la temperatura o la radiación ultravioleta.

Los iniciadores solubles en agua apropiados incluyen:

Iniciadores aniónicos:

• iniciadores de la fórmula general $[M]S_2O_8^{2-}$, en donde M es un catión tal como K^+ , Na^+ o NH_4^+ , o un catión divalente. Persulfato de amonio, $(NH_4^+)_2S_2O_8^{2-}$, es un ejemplo específico.

• un iniciador azo aniónico orgánico de fórmula V:



5 en donde:

R^{90} y R^{92} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo (C1-10) lineal o ramificado; o un grupo -NH- alquilo (C1-10) o-N [alquilo (C1-10)]₂; y

10 R^{91} y R^{93} pueden ser $CR^{94}COOH$ (en donde R^{94} puede ser $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ o cadena de alquilenos (C1-20) lineal, o ramificada) o fenilo que está opcionalmente sustituido (por ejemplo, por uno a tres grupos sustituyentes seleccionados de halo, alquilo (C1-6), amido, amino, hidroxilo, nitro, y alcoxi (C1-6)).

Un iniciador particularmente apropiado perteneciente a este grupo es ácido azobiscianopentanoico (también conocido como 4,4'-azobis (ácido 4-cianoalélico)).

Iniciadores catiónicos:

• un iniciador de amina catiónica de fórmula estructural VI:



en donde R^{80} , R^{81} , R^{83} y R^{84} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo (C1-10) lineal o ramificado; un grupo -NH- alquilo (C1-10) o-N [alquilo (C1-10)]₂; y en donde R^{82} y R^{85} pueden ser $C(=NR^{86})NH_2$, en donde R^{86} se puede seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo (C1-10) lineal o ramificado.

20 Por ejemplo, un ejemplo específico es propanimidamida, 2,2'-azobis [2-metil,dihidrocloruro]. Este iniciador también se conoce como V50.

Iniciadores de peróxido:

• un iniciador de peróxido se define por la fórmula estructural VII:



25 en donde R^{70} o R^{71} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo (C1-10) lineal o ramificado; un grupo -NH- alquilo (C1-10) o-N [alquilo (C1-10)]₂; o fenilo que está opcionalmente sustituido (por ejemplo, por uno a tres grupos sustituyentes seleccionados de halo, alquilo (C1-6), amido, amino, hidroxilo, nitro, y alcoxi (C1-6)).

Los fotoiniciadores ultravioletas solubles en agua apropiados son de la fórmula VIII:



donde R^{52} es $HO-(CH_2)_2-$ y R^{53} es $-C(O)C(OH)(CH_3)_2$ y ph representa un anillo de fenilo.

Un iniciador particular de acuerdo con esta fórmula se conoce como Irgacure 2959.

35 La reacción de acoplamiento de los radicales libres también puede llevarse a cabo en presencia de un acelerador soluble en agua apropiado. Ejemplos apropiados de tales aceleradores incluyen TEMED (1,2-bis(dimetilamino)etano, N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina) y ácido ascórbico (también conocido como ácido DL-ascórbico).

Un químico experto será capaz de seleccionar las condiciones experimentales apropiadas con el fin de llevar a cabo las reacciones de acoplamiento de vinilo.

40 La hinchazón de las partículas de microgel puede ser iniciado por la variación de la temperatura y/o pH. La temperatura y/o pH requerido dependerá de los componentes poliméricos de las partículas de microgel. Por lo general, todas las partículas de microgel sensibles a la temperatura se hinchan dentro de un intervalo de temperatura de 0 a 100°C, y convenientemente en el intervalo de 20 a 80°C. Para aplicaciones *in vivo*, donde se puede requerir la reticulación *in situ* de las partículas de microgel, se prefiere que las partículas de microgel se hinchan a la temperatura corporal y/o el pH del tejido diana.

La reacción de acoplamiento del vinilo puede proceder a cualquier temperatura apropiada. Se pueden utilizar temperaturas que van de 0 a 100°C, y convenientemente de 20 a 80°C. Una vez más, para aplicaciones *in vivo* donde se puede requerir la reticulación *in situ* de las partículas de microgel, se prefiere que la reacción de reticulación se lleve a cabo a la temperatura normal del cuerpo.

- 5 La cantidad de las partículas de microgel requerida para la reacción de acoplamiento de vinilo es convenientemente 1 a 60% en peso, y preferiblemente de 10 al 20% en peso, del medio de reacción.

La concentración de iniciadores debe estar en el intervalo de 0.01 a 10% en peso con respecto al agua. La concentración preferida es de 0.1 a 2% en peso con respecto al agua.

- 10 Cualquier intervalo de pH apropiado puede ser utilizado para la reacción de acoplamiento de vinilo. El intervalo de pH debe incluir el pK_a para el polímero de microgel si es una partícula de microgel sensible al pH. Una vez más, para aplicaciones *in vivo* donde se puede requerir la reticulación *in situ* de las partículas de microgel, se prefiere que la reacción de acoplamiento de vinilo proceda a pH fisiológico. El intervalo de pH utilizado durante la unión de las partículas de microgel para las partículas de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) es de 6.0 a 9.0, y es preferiblemente de 7.0 a 8.0.

- 15 La relación de hinchazón ($q = V/V_{coll}$) define el grado de hinchazón de las partículas de microgel. V es el volumen de partículas de microgel medido en una configuración parcialmente hinchado o totalmente hinchado. V_{coll} es el volumen de la configuración colapsada, no hinchada de las partículas de microgel. El valor de q durante la reacción de acoplamiento de vinilo debe ser 1.1 - 500. Preferiblemente, el valor de q debe ser 3 - 100.

- 20 Si se utiliza la fotoiniciación ultravioleta, entonces la intensidad de la irradiación UV requerida es, por ejemplo, la mitad de un minuto a 2 horas de exposición bajo una lámpara de UV proporcionando una intensidad de luz en el intervalo de 0.1 a 100 mW/cm². En una realización particular, la exposición es de 3 minutos.

Reticulación de las partículas de microgel mediante la formación de una red de polímero interpenetrante

- 25 Un enfoque alternativo para unir las partículas de microgel entre sí se muestra esquemáticamente en la figura 1. La primera etapa de la reacción implica proporcionar las partículas de microgel (sin ninguna de las unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las partículas). La siguiente etapa consiste en llevar las superficies de las partículas adyacentes en contacto una con la otra en presencia de un monómero de reticulación que comprende dos o más grupos vinilo. Esto se puede lograr haciendo que las partículas de microgel sensibles se hinchen (por variación de la temperatura o el pH como se ha descrito anteriormente) en presencia del monómero de reticulación. La hidratación y la hinchazón de las partículas de microgel hace que las superficies de las partículas adyacentes se pongan en contacto entre sí y se superponen para formar regiones que se interpenetran del polímero gelificado. La polimerización iniciada libre de radicales del monómero de reticulación que contiene vinilo entonces se puede iniciar. El resultado es la formación de una red de polímero interpenetrante reticulado dentro de las partículas de microgel hinchadas. Esta red une las partículas de microgel entre sí para formar una estructura de gel cohesiva.

- 35 Por "red de polímero interpenetrante" se entiende que la red de polímero se forma dentro de las partículas de microgel hinchadas y se extiende desde una partícula de microgel a otra. La red de polímero se forma *in situ* y entre las partículas hinchadas por la polimerización de los monómeros solubles en agua que se difunden en las partículas de microgel hinchadas como hidrato.

- 40 Una ventaja de este método es que la adición del monómero de reticulación soluble en agua proporciona una herramienta útil para el ajuste de las propiedades mecánicas del precursor. Por ejemplo, un agente de reticulación de masa molar baja (por ejemplo, EGDMA) puede ser absorbido en los microgeles de interpenetrados, y por lo tanto los une juntos. La dispersión de microgel precursor en ese caso es un gel físico.

- 45 Un agente de reticulación de masa molar más alta (por ejemplo, PEGDMA550) puede ser excluido de la partícula de microgel interior y, como tal, un mecanismo de deshinchamiento osmótico puede ser responsable de parte de la hinchazón de las partículas de microgel. En ese caso la dispersión precursora es un fluido (incluso cuando el pH ha aumentado). La reticulación puede resultar en la formación de una matriz de hidrogel que encapsula las partículas de microgel. Esta red puede, en cierta medida interpenetrar las periferias de las partículas de microgel.

Se puede observar que la masa molar del polímero soluble en agua adicionado juega un papel importante en las propiedades físicas del precursor dispersión de microgel y también las propiedades mecánicas de los microgeles DX finales.

- 50 La reacción de polimerización de vinilo se puede llevar a cabo utilizando el iniciador soluble en agua como se describe anteriormente.

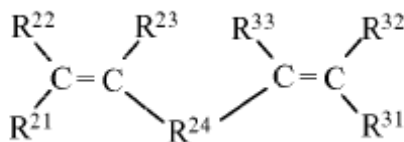
Un acelerador soluble en agua como se describe en este documento también puede estar presente.

Las condiciones de reacción apropiadas para la reacción de polimerización serán bien conocidas para los expertos en el arte y también se hace referencia a las condiciones generales descritas anteriormente para las reacciones de acoplamiento de vinilo.

- 5 Cualquier monómero de reticulación soluble en agua apropiado puede ser utilizado para formar la red de polímero interpenetrante que une las partículas de microgel entre sí. Para aplicaciones *in vivo*, es necesario que los monómeros (y la red de polímero resultante interpenetrantes formada) son biocompatibles. Para ser soluble en agua un agente de reticulación puede tener convenientemente algo de solubilidad en agua, por ejemplo, que van desde 10^{-6} a 100% en peso con respecto a la fase de agua. En realizaciones particulares, el agente reticulante tiene una solubilidad en agua de al menos 0.1% en peso, convenientemente al menos 1% en peso, o convenientemente al menos 10% en peso.
- 10 De manera apropiada, el monómero de reticulación comprenderá dos o más grupos vinilo para permitir que una red de polímero interpenetrante altamente reticulado se forme.

En una realización, la masa molar del monómero de reticulación es convenientemente 220 a 750 g/mol, convenientemente 350 a 600 g/mol, o más convenientemente de 500 a 600 g/mol.

De manera apropiada, el monómero de vinilo de reticulación tiene la siguiente fórmula: -



15

en donde:

(a) R^{21} , R^{22} , R^{23} , R^{31} , R^{32} y R^{33} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo lineal o ramificado; o un grupo N-alquilo de hasta 10 unidades de C; y

en donde (b) R^{24} se puede seleccionar independientemente de un grupo que consiste en: -

- 20 (i) $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{34}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, en donde R^{34} puede comprender $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ o un grupo alquilo lineal o ramificado, tal como una cadena de metileno, que puede tener hasta 20 cadenas de C de longitud; o $-\text{C}_6\text{H}_4-$; o $\text{C}_6\text{H}_3\text{R}^{35}$, en donde R^{35} comprende sustituyentes tales alquilo, por ejemplo, CH_3 ; un grupo halógeno; o un grupo amida; u otros grupos fenilo di- o trisustituidos que contiene más de uno de estos sustituyentes;
- (ii) $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{36}-\text{C}(=\text{O})-$, en donde R^{36} puede ser $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ en donde n puede ser de 1 a 30;
- 25 (iii) $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{37}\text{R}^{38}\text{R}^{37}-$, en donde R^{37} puede comprender enlaces éster degradables, por ejemplo, lactona, $[(\text{CH}_2)_5\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_m-$, lactida, $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_m-$, glicólido, $[\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_m-$, en donde m puede ser de 1 a 50, y en donde R^{38} puede ser $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, en donde n puede ser de 1 a 30;
- (iv) $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{39}-$, en donde R^{39} puede comprender enlaces éster degradables, por ejemplo, lactona, $[(\text{CH}_2)_5\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_m$, lactida, $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_m$, glicólido, $[\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_m$, en donde m es entre 1 a 100;
- 30 (v) alilacrilatos, por ejemplo $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{40}-$, en donde R^{40} puede ser $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ o una cadena de metileno lineal, o ramificada hasta 20 cadenas de C de longitud, o $-\text{C}_6\text{H}_4-$, $\text{C}_6\text{H}_3\text{R}^{41}$, en donde R^{41} puede comprender sustituyentes, tal como alquilo, CH_3 , un halógeno o un grupo amida u otros grupos fenilo di- o tri-sustituidos que contienen más de uno de estos sustituyentes;
- 35 (vi) vinilbencenos, por ejemplo, C_6H_4 o $\text{C}_6\text{H}_3\text{R}^{42}$, en donde R^{42} comprende sustituyentes, tales como alquilo; CH_3 ; a halógeno o un grupo amida (véase (iii) anteriormente); u otros grupos fenilo sustituidos que contienen más de uno de estos sustituyentes;
- (vii) acrilamidas, por ejemplo $\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^{43}-\text{R}^{44}-\text{NR}^{45}\text{C}(=\text{O})-$, en donde R^{43} y R^{44} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo lineal o ramificado; un grupo dialquilo; un grupo N-alquilo, de hasta 10 unidades de C; y en donde R^{44} puede comprender $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ o una cadena de metileno lineal, o ramificada hasta 20 cadenas de C de longitud; o $-\text{C}_6\text{H}_4-$, $\text{C}_6\text{H}_3\text{R}^{41}$ en donde R^{41} comprende sustituyentes, tales como alquilo; CH_3 ; un halógeno o un grupo amida u otros grupos fenilo di- o tri-sustituidos que contiene más de uno de estos sustituyentes;
- 40 (viii) monómeros de reticulación trifuncionales, en donde R^{24} comprende cualquiera de los grupos enumerados en (b), así como $\text{R}^{21}\text{R}^{22}\text{C}=\text{CR}^{23}$, donde R^{21} , R^{22} y R^{23} se describen en (a);

(ix) monómeros de reticulación tetrafuncionales, en donde R^{24} comprende cualquiera de los grupos enumerados en (b), así como $R^{21}R^{22}C=CR^{23}$ y $R^{31}R^{32}C=CR^{33}$, en donde R^{21} , R^{22} , R^{23} , R^{31} , R^{32} y R^{33} se describen en (a); y

(x) en donde R^{24} puede contener cualquier combinación de los grupos enumerados en (b).

- 5 Sin embargo, se prefiere que el monómero comprende un monómero de reticulación funcional (preferiblemente, una funcionalidad di- o superior) adicional tal como, por ejemplo, un acrilato funcional sustituido. Por lo tanto, el monómero puede comprender metacrilato de alilo o divinilbenceno. Por lo tanto, el monómero puede comprender diacrilato de butanodiol. Sin embargo, preferiblemente, el monómero comprende dimetacrilato de etilenglicol.

El comonómero reticulante funcional puede tener otros grupos entre los grupos vinilo terminales, por ejemplo, poli (etilenglicol) dimetacrilato (PEGDMA).

- 10 El monómero de reticulación de vinilo preferido desde el punto de vista de la reparación del disco intervertebral es PEGDMA con una masa molar en el intervalo de 200 a 1000 g/mol. Preferiblemente, la masa molar debe estar entre 220 y 750 g/mol, más preferiblemente de 300 y 600 g/mol. El monómero de reticulación de vinilo más preferido es EGDMA.

Reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado combinado con la formación de una red polimérica interpenetrante

- 15 La figura 3 muestra una realización alternativa adicional de la presente invención que es una combinación de los enfoques que se muestran en las figuras 1 y 2.

Por lo tanto, las composiciones formadas por este enfoque comprenden una pluralidad de partículas de microgel unidas juntas por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel y por una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes (y de ese modo une además las partículas entre sí), en donde la red de polímero se forma por la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo.

- 20 En una realización particular, las partículas de microgel se forman a partir de poli (MMA/MAA/EGDMA) y metacrilato de glicidilo se injerta en la superficie para proporcionar los grupos vinilo funcionales. Estas partículas de microgel "funcionalizadas" son entonces sometidas a una reacción de acoplamiento de vinilo tal como se define en este documento en presencia de un monómero de reticulación, tal como PEGDMA que tiene una masa molar en el intervalo de 300 a 600 g/mol.

- 25 Este método combina los beneficios de reticulación directamente de las partículas de microgel de vinilo injertado y la reticulación de las partículas de microgel mediante la formación de una red polimérica interpenetrante. La red de interpenetración puede ser considerada como un refuerzo de la microgel reticulada doblemente directamente, sino que también proporciona un medio adicional para ajustar las propiedades mecánicas de la dispersión precursora y propiedades de microgel DX utilizando la masa molar del agente de reticulación soluble en agua.

Propiedades de las composiciones de partículas de microgel unidas de la invención

- 30 Las composiciones de microgel de la presente invención pertenecen a la clase de materiales conocidos como hidrogeles. Se diferencian de los hidrogeles convencionales porque están compuestos de partículas de microgel ligados o unidos.

El módulo elástico (G') de las composiciones de la invención dependerá del método utilizado para su preparación. Los valores de G' , tal como se mide por reología dinámica, serán por lo general mayores de 10 Pa (sin ningún límite superior). Los valores para el módulo de pérdida (G'') serán menores que el módulo de elasticidad para cada composición de la invención debido a su clasificación como hidrogeles.

- 40 Las características de hinchazón de las composiciones de la invención pueden volver a ser definidos por la relación de hinchazón (como se define anteriormente). El valor de q será por lo general entre 1.2 y 500. Para la aplicación específica de la reparación del disco intervertebral, se prefiere que la relación de hinchazón sea entre 3 y 200.

- 45 Las composiciones de la invención, al igual que las partículas de microgel componentes, serán sensibles a la temperatura y/o al pH. Las composiciones sensibles a la temperatura serán en la configuración hinchada a temperaturas por debajo de la LCST y en la configuración colapsada a temperaturas por encima de la LCST. El valor de q para tales composiciones estará por lo general entre 1.2 y 200. Los módulos elásticos tendrán los mismos valores mínimos especificados anteriormente.

- 50 Para las composiciones sensibles al pH de la invención que comprende partículas de microgel compuestas de monómeros ácidos, las partículas estarán en una configuración hinchada en valores de pH mayores que el pK_a de los monómeros ácidos, y en la configuración colapsada a valores de pH menores que el valor de pK_a de los monómeros

ácidos. Los valores de pK_a pueden estar en el intervalo de 1 a 13. El intervalo preferido para la aplicación de disco intervertebral es de 5.0 a 8.0.

Para las composiciones sensibles al pH de la invención que comprende partículas de microgel compuestos de comonomeros básicos, las partículas estarán en la configuración hinchada a valores de pH menores que el pK_a del ácido conjugado de los monómeros básicos y en la configuración colapsada en valores de pH superiores a este valor de pK_a . Los valores de pK_a pueden estar en el intervalo de 1 a 13.

Las composiciones de microgel de la presente invención tienen convenientemente significativos valores críticos de tensión (γ^*). El valor crítico de deformación es el valor de la tensión, medido por un reómetro, a la que el módulo elástico (G') alcanza primero un valor de 95% del que se mide cuando $\gamma = 1.0\%$. El intervalo preferido para γ^* para las composiciones de la invención es de 2 a 500%, más preferido es de 5 a 300%, e incluso más preferido es de 5 a 200%.

Aplicaciones

Las composiciones (incluyendo composiciones de precursor) de la presente invención se pueden utilizar para una variedad de diferentes aplicaciones, incluidas las aplicaciones en la administración de fármacos, fotónica, catálisis, almacenamiento de información, o se pueden utilizar como materiales absorbentes.

Se prevé que las composiciones (o composiciones de precursor) de la presente invención serán particularmente apropiadas para aplicaciones médicas. Se prevé particularmente que las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para reparar tejido blando dañado o degenerado en un sujeto.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición (o composición de precursor) tal como se define en este documento para su uso en el tratamiento de tejido dañado o degenerado, especialmente tejidos de soporte de carga dañados o degenerados.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de tratamiento de tejido dañado o degenerado, especialmente tejidos de soporte de carga dañados o degenerados, en un sujeto en necesidad de tal tratamiento, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición (o la composición de precursor) como se define en este documento.

De manera apropiada, una composición de la invención se forma *in situ* dentro del cuerpo (por ejemplo, de una composición de precursor). Por lo tanto, las partículas de microgel se administran junto con cualesquiera otros materiales necesarios para unir las partículas de microgel entre sí (por ejemplo, los reactivos necesarios para las reacciones de acoplamiento de vinilo) y de este modo formar una composición de la presente invención *in situ* en el cuerpo. Por "junto con" queremos decir que uno o más de los reactivos son ya sea coadministrados con las partículas de microgel, administradas antes de que las partículas de microgel o administrados después de las partículas de microgel.

Por lo tanto, en una realización, las partículas de microgel que tienen unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre sus superficies se administran junto con un iniciador soluble en agua y, opcionalmente, un acelerador de soluble en agua.

En otra realización, las partículas de microgel (sin unidades estructurales que contienen vinilo injertadas en la superficie) se administran junto con el monómero de reticulación (que forma una red de polímero interpenetrante después de la polimerización) y un iniciador soluble en agua y, opcionalmente, un acelerador soluble en agua.

En una realización adicional, las partículas de microgel que tienen unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre sus superficies se administran junto con un monómero de reticulación de vinilo (que forma una red de polímero interpenetrante) y un iniciador soluble en agua y, opcionalmente, un acelerador de soluble en agua.

Los componentes adicionales, tales como un vehículo apropiado, agentes reguladores, ácidos, bases, u otros excipientes farmacéuticamente aceptables también se pueden administrar junto con las partículas de microgel y cualesquiera otros reactivos.

En una realización, las partículas de microgel se administran en la configuración colapsada o sustancialmente plegada, que hace la composición de partículas más fluidas y por lo tanto más fáciles de administrar, por ejemplo, por inyección. Cuando las partículas de microgel en la configuración colapsada llegan al sitio previsto, las partículas se hinchan preferiblemente como consecuencia de un cambio en el pH y/o temperatura, y la reacción de acoplamiento de vinilo luego pueden ser iniciados para formar una composición de la presente invención en la que las partículas de microgel están unidas entre sí.

En una realización particular, las partículas de microgel son sensibles al pH y están adaptados para estar en una configuración hinchada o sustancialmente hinchada en el pH fisiológico del tejido diana. A continuación, el pH de la composición administrada se puede manipular de manera que las partículas están en una configuración colapsada en el

momento de la administración, pero a continuación, se hincha dentro del tejido diana. La velocidad de hinchazón se puede aumentar mediante la administración de una solución de ácido, base o solución reguladora fisiológicamente aceptable, ya sea con o después de la administración de las partículas de microgel.

5 Por ejemplo, si las partículas de microgel se administran a un IVD en un sujeto, se sabe que el pH medio del IVD es de aproximadamente 7.5. Las partículas de microgel que se encuentran en una configuración hinchada o sustancialmente hinchada a un pH entre 6.5 y 8, más preferiblemente entre 6.6 y 7.5, serían particularmente apropiadas para la administración a un IVD. El pH de la composición de partículas de microgel administradas al sujeto podría entonces ser manipulado de modo que las partículas de microgel se encuentran en la configuración colapsada o colapsada sustancialmente en el punto de administración. En una realización, las partículas de microgel se mantienen a un pH de menos de 6.6, de manera que después de la administración en el IVD, las partículas se hincharán y causarán la gelificación de la composición. En dicha realización, las partículas pueden ser mantenidas en la configuración colapsada a un pH entre aproximadamente 5.0 a 6.6, más preferiblemente entre aproximadamente 5.5 a 6.6, y aún más preferiblemente entre aproximadamente 6.0 a 6.6 antes de la administración. A estos valores de pH, el diámetro de las partículas de microgel es convenientemente entre aproximadamente 50-200 nm, y más preferiblemente, aproximadamente 80 a 150 nm (como se mide por Microscopía Electrónica de Barrido). De acuerdo con lo anterior, el aumento de pH de menos de 6.6 a aproximadamente 7.5 *in vivo* hace que el agua entre en las partículas de tal manera que se hinchen. Cuando se administra a un IVD dañado o degenerado, la hinchazón y la reticulación *in situ* de las partículas de microgel proporciona una composición de la invención que proporciona soporte de carga adicional al IVD.

20 En una realización alternativa, las partículas de microgel se administran en una configuración hinchada o sustancialmente hinchada. De manera apropiada, las partículas de microgel se producen a hincharse justo antes de la administración. Una ventaja de este enfoque es que las partículas de microgel llegan al tejido diana en forma hinchada que es apropiado para la rápida reticulación para formar una composición de la invención. Por ejemplo, las partículas de microgel sensibles al pH se pueden administrar en una configuración hinchada o sustancialmente hinchada a un pH de, por ejemplo, 7.5 a 7.8.

25 En una realización particular, las partículas de microgel se administran en la configuración colapsada o sustancialmente colapsada, y se dejaron hinchar *in situ*. Se añaden los reactivos de reticulación (el iniciador y, opcionalmente un acelerador y un monómero de reticulación (si una red de polímero interpenetrante se va a formar)) una vez que las partículas de microgel son suficientemente hinchadas para que la reticulación ocurra.

30 En una realización preferida, las partículas de microgel se administran en la configuración hinchada o sustancialmente hinchada y los reactivos de reticulación (el iniciador y, opcionalmente un acelerador y un monómero de reticulación (si una red de polímero interpenetrante se va a formar)) son coadministrados o administrados inmediatamente después de la administración de las partículas de microgel.

35 Se puede preferir ponerse en contacto con la composición que comprende la partícula de microgel con un ácido, base (por ejemplo, NaOH o KOH) o solución reguladora fisiológicamente aceptables para facilitar un cambio en el pH y acelerando de este modo la gelificación *in vivo*. Se apreciará que un ácido, base o solución reguladora fisiológicamente aceptable se pueden administrar al tejido diana, ya sea antes o después de la composición que comprende la partícula de microgel se ha administrado. Alternativamente, un procedimiento de coadministración se puede utilizar donde tanto la composición que comprende las partículas de microgel, como una solución reguladora fisiológicamente aceptable se administran sustancialmente al mismo tiempo. Esto se puede conseguir por ejemplo a través de una aguja de la jeringa especialmente construida.

40 De manera apropiada, la reacción de reticulación con vinilo se produce rápidamente después de la administración (antes de que el iniciador y opcionalmente el acelerador se difunda lejos del sitio de administración). Por tanto, se prefiere que el iniciador y, opcionalmente, acelerador son ya sea coadministrados con las partículas de microgel o administradas inmediatamente después de las partículas de microgel. Cualquier monómero de reticulación que reacciona para formar una red de polímero interpenetrante para unir las partículas entre sí puede ser coadministrado con las partículas de microgel o administrarse antes de o después de la administración de las partículas de microgel.

45 Como resultado de la formación *in situ* de la composición de la invención dentro de un sujeto, es preferiblemente, un aumento de la altura del disco y también módulo de Young del IVD como las formas de composición y la resistencia mecánica se restaura eficazmente. Ventajosamente, esto proporciona un método mínimamente invasivo que puede llenar el interior de cualquiera hendidura de forma irregular en el IVD. Es probable que tenga un tiempo de recuperación muy reducido, Por lo tanto, este método mínimamente invasivo no implica ninguna intervención de cirugía mayor, lo que significa por lo tanto que el sujeto está siendo tratado.

Otra ventaja del método es que no requiere la eliminación de cualquier tejido sano. Esto es en contraste directo con las tecnologías de reemplazo de núcleo que implican microdissectomía y extracción de tejido del núcleo pulposo.

55 En otra realización, la composición administrada para formar la composición de la invención puede comprender al menos una celda de núcleo pulposo y/o al menos una célula madre y/o al menos una célula de mamífero.

- Los ejemplos de células de mamífero apropiadas, que se pueden añadir a la composición incluyen los condrocitos (por ejemplo, autólogo o autógeno). Ejemplos de células madre apropiadas, que pueden añadirse a la composición incluyen mesenquimales, hematopoyéticas etc., incluyendo células madre embrionarias y clonadas. Además, la composición administrada puede comprender además colágeno y/o proteoglicanos. Se espera que la adición de células de núcleo pulposo de la composición aumentara la velocidad de recuperación del sujeto. Por lo tanto, una ventaja adicional del método de acuerdo con la invención es que permite la mezcla de células vivas (por ejemplo, células NP o células madre) con la composición que comprende la dispersión de partículas de microgel con el fin de facilitar el recrecimiento de tejido NP. Así, el método de acuerdo con la invención es susceptible de la combinación de soporte mecánico con un sistema de reparación biológica.
- Los ejemplos de tejidos blandos apropiados que se pueden tratar incluyen piel, músculo, ligamento o tejido adiposo. Tal tejido blando dañado o degenerado puede comprender una herida, la cual puede ser aguda o crónica. Sin embargo, se prefiere que el tejido blando que se está tratando comprende tejido de soporte de carga dañado o degenerado tal como, por ejemplo, discos intervertebrales y los tejidos encontrados en las articulaciones articulares (tales como el codo, rodilla, cadera, muñeca, hombro y tobillo). Además, las composiciones de la invención se pueden usar para tratar articulaciones que soportan baja carga, como, por ejemplo, las articulaciones presentes en un dedo o un pulgar.
- Es más preferido que las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar discos intervertebrales o vertebrales (DIV) dañados o degenerados. Preferiblemente, el método del segundo aspecto comprende administrar la composición directamente en el IVD, y preferiblemente en el núcleo pulposo (NP) de los mismos. Por lo tanto, ventajosamente, no hay cirugía se requiere utilizando este enfoque. Más preferiblemente, la composición se puede administrar directamente en las hendiduras dentro de la NP, que se forman cuando el contenido de proteoglicanos en el IVD disminuye con la edad. Además, se prefiere que los componentes necesarios para formar la composición de la invención se administren por inyección en el tejido diana.
- Condiciones de la enfermedad, que se pueden tratar con el medicamento del primer aspecto o el método de acuerdo con el segundo aspecto incluyen artritis, degeneración del disco intervertebral, dolor de espalda, dolor lumbar bajo, ciática, cervical, espondilosis, dolor de cuello, cifosis, escoliosis, enfermedad degenerativa de las articulaciones, osteoartritis, espondilolisis, espondilolistesis, prolapso del disco intervertebral, cirugía de la columna fallada, y la inestabilidad de la columna. La condición de la enfermedad puede ser crónica o aguda, por ejemplo, dolor de espalda crónico o agudo.
- En una realización particular, la composición de la invención se utiliza para el tratamiento de condiciones osteoartíticas en las articulaciones como una alternativa a la sustitución del cartílago. En tales realizaciones, la composición de la invención está formada por *in situ* dentro de la articulación mediante la inyección de los componentes necesarios para formar la composición de la invención en la cápsula de la articulación de una articulación osteoartítica. A continuación, la composición de la invención proporcionaría un medio de mantener los extremos del hueso aparte.
- La presión de hinchazón de los geles de la presente invención se puede ajustar utilizando el pH y/o la temperatura con el fin de aumentar el módulo de Young eficaz de los tejidos blandos de carga de microgel. Además, los inventores creen que debería ser posible ajustar el pKa de estos microgeles variando la composición química de las partículas, lo que permitirá el ajuste fino de las propiedades de soporte de carga de estos materiales en el pH del tejido de soporte de carga dañado.
- Se apreciará que la composición de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en una monoterapia (esto es, uso de la composición de acuerdo con la invención solos para prevenir y/o tratar enfermedades caracterizadas por el tejido blando dañado o degenerado, y preferiblemente, tejidos de soporte de carga). Alternativamente, la partícula de microgel de acuerdo con la invención puede ser utilizada como un complemento, o en combinación con otras terapias conocidas.
- Las composiciones que comprenden la partícula de microgel de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un número de maneras. Preferiblemente, la composición se puede administrar mediante inyección.
- La terapia se puede administrar como una sola administración (por ejemplo, una sola inyección). Alternativamente, la composición utilizada puede requerir la administración repetida a intervalos predeterminados.
- La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de microgel junto con reactivos para formar la composición de la invención *in situ* en el cuerpo. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad de una partícula de microgel de acuerdo con la invención que, cuando se administra a un sujeto forma una composición de la invención que previene y/o trata una enfermedad caracterizada por tejido blando dañado o degenerado.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit de partes que comprende partículas de microgel como se define en este documento (opcionalmente en presencia de un medio de vehículo/dispersión apropiado) y uno o más reactivos de reticulación como se define en este documento. Los reactivos apropiados comprenden un iniciador como se define anteriormente, y pueden comprender además un acelerador y/o un monómero de reticulación como se ha

definido anteriormente. De manera apropiada, el kit comprende además instrucciones que explican cómo administrar el contenido de la formación de gel *in situ*.

- 5 En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprenden" y "contienen" y variaciones de ellos significan "incluyendo, pero no limitado a", y no se pretende que (y no lo hacen) excluyen otras unidades estructurales, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, donde se utiliza el artículo indefinido, la memoria descriptiva se debe entender que contempla la pluralidad, así como la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

EJEMPLOS

- 10 La invención se describirá ahora con más detalle en relación a los siguientes ejemplos ilustrativos.

Mediciones físicas

A menos que se indique lo contrario, se utilizó la siguiente metodología para obtener mediciones físicas.

- 15 Las mediciones de titulación se llevaron a cabo utilizando una unidad de valoración de Mettler en presencia de un electrolito de soporte (NaCl 0.1 M). Las mediciones de espectroscopia de correlación de fotones se realizaron utilizando dispersiones que contienen $\phi_p = 3 \times 10^{-4}$ de microgel. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un aparato de dispersión de luz BI-9000 de Brookhaven (Brookhaven Instrument Cooperation), equipado con una 20 mW HeNe y el detector se fijó en ángulo de dispersión 90° . La extensión de la hinchazón de la partícula se caracteriza en términos de la relación de hinchazón estimada, Q . Esto se da por la siguiente ecuación.

$$Q = \left(\frac{d}{d_{coll}} \right)^3 \quad (1)$$

- 20 Para la ecuación (1) d y d_{coll} son los diámetros de las mediciones utilizando espectroscopia de correlación de fotones (PCS) a un pH dado y el tamaño de partícula colapsada, respectivamente. En este trabajo los valores de d_{coll} fueron los obtenidos a pH = 4 a menos que se indique lo contrario. Las mediciones SEM se obtuvieron utilizando un instrumento de FEGSEM Philips. Las muestras se secaron a temperatura ambiente o mediante liofilización. Al menos 100 partículas fueron contadas para las estimaciones del tamaño de partícula. Las mediciones de reología dinámica se realizaron utilizando un reómetro con control de temperatura AR G2 instrumento TA con una cámara ambiental. Se utilizó una geometría de placa de diámetro de 20 mm con una trampa de solvente. La brecha fue de 1000 nm.

- 25 Los experimentos de hinchazón para los microgeles DX (reticulados) de la presente invención se llevaron a cabo mediante la colocación de muestras en solución reguladora y a continuación, permitiendo que la muestra se equilibre con agitación suave durante un período de 8 días. La solución reguladora se cambió con regularidad. Periódicamente, se extrajo la muestra, le dio unas palmaditas con una toalla de papel seca, se pesó y luego regresó inmediatamente a la solución reguladora. Las soluciones reguladoras utilizadas fueron fosfato o ftalato de base, tenía una fuerza iónica de aproximadamente 0.1 M, y se prepararon como se describe en otro lugar (J. Brandrup, E. H. Immergut, E. A. Grulke, A. Abe, and D. R. Bloch (1999) CRC Polymer Handbook, 4 ed., John Wiley & Sons). La relación de hinchazón de volumen para los microgeles de DX (QDX) se determinó gravimétricamente y se calcula utilizando:

$$Q_{DX} = \rho_p \left(\frac{Q_{DX(m)}}{\rho_s} + \frac{1}{\rho_p} \right) - \frac{\rho_p}{\rho_s} \quad (2)$$

- 35 Para la ecuación (2) $Q_{DX(m)}$ es la relación de la masa de gel hinchado a la masa seca. ρ_s y ρ_p son las densidades del solvente y polímero, respectivamente. Estos se tomaron como 1.2 y 1.0 gcm⁻³.

Método 1 - Preparación de partículas de microgel de poli (MMA/MAA/EGDMA) (utilizadas para formar las composiciones de la invención)

- 40 El poli (MMA/MAA/EGDMA) se preparó utilizando polimerización en emulsión. Un baño de agua se calentó a 80°C. 1.8 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) se disolvió en 517.5 g de agua desionizada (DI). Después, la solución se filtró en un matraz de cuatro cuellos y se purgó con nitrógeno durante 30 minutos. La mezcla de monómeros se preparó con la siguiente composición: MMA (189.76 g), MAA (94.87 g) y EGDMA (2.882 g). Esto incluye 15% de exceso con el fin de dar cuenta de la pérdida durante la etapa de alimentación. Después de la disolución de SDS, se adicionaron 31.5 g de

mezcla de monómeros (semilla), mientras se agita, al recipiente seguido inmediatamente por la adición de respectivamente solución de K_2PO_4 (0.2264 g en 2.93 g de agua DI) y solución de persulfato de amonio (APS) (0.2 g en 3.39 g de agua DI). La mezcla se dejó en agitación durante otros 30 minutos y la temperatura se elevó a 88°C. La mezcla de monómeros restantes se adicionó durante 90 min a una velocidad de aproximadamente 2.5 ml/min. Después de que la alimentación se completó, una solución de APS se adicionó (0.0874g en 3 g de agua DI). La dispersión se dejó agitar al menos durante 2 horas hasta que no pudieron detectarse monómeros y después se enfriaron con agua y mezcla de hielo mientras se agitaba. El producto enfriado (una dispersión lechosa) se filtró. Este microgel contenía una concentración nominal de 66% en peso de MMA, 33% en peso de MAA y 1% en peso de EGDMA.

Método 1A - Preparación de poli (MMA/MAA/EGDMA) partículas de microgel (utilizado para formar composiciones de la invención)

El poli (MMA/MAA/EGDMA) también se preparó utilizando el siguiente método. 1.8 g de SDS en 517.5 g de agua DI se adicionaron a un matraz de fondo redondo de cuatro bocas, equipado con un agitador mecánico y condensador de reflujo. El contenido se purgó con nitrógeno durante 30 minutos a 80°C. Para formar la semilla, se adicionaron al recipiente 31.5 g de una solución de MMA (66% en peso), MAA (33% en peso) y EGD (1% en peso) seguido inmediatamente por la adición de, respectivamente, K_2HPO_4 (3.15 g de solución al 7 % en peso) y persulfato de amonio (APS, 3.5 g de solución al 5 % en peso). La semilla se dejó en agitación durante otros 30 minutos y la temperatura se elevó a 85°C. Los 218.5 g restantes de la mezcla de monómero (con las mismas proporciones que anteriormente) se adicionó uniformemente a lo largo de 90 minutos con una velocidad de aproximadamente 2.43 g/min. Después de la adición se adicionó otra porción de APS (3.1 g de una solución de 3% en peso) y la reacción se continuó durante otras 2 horas. El producto se enfrió en agua fría con agitación. Después de la filtración, los microgeles se dializaron en agua DI durante 14 días (el agua DI se cambió dos veces al día).

Método 2 - Preparación de partículas de microgel poli (EA/MAA/BDDA) (utilizadas para formar composiciones de la invención)

El microgel poli (EA/MAA/BDDA) se preparó utilizando el método de polimerización en emulsión de alimentación de semilla (alimentación privada de). Se preparó una mezcla de monómeros que contiene EA (Aldrich, 99%, 143.5 g), MAA (Aldrich, 99%, 72.0 g) y BDDA (Aldrich, 98%, 2.2 g) y 12.5% de la mezcla se adiciona a un pre-purgado, se agitó, la solución de dodecilsulfato de sodio (BDH, 1.75 g en 500 g de agua), que se había calentado a 80°C. Los monómeros se hicieron pasar por una columna de alúmina antes de su uso para eliminar el inhibidor. Se adicionaron inmediatamente K_2HPO_4 (3 g de solución de 7% en agua) y 2.95 g de una solución de persulfato de amonio al 5% en agua mientras se mantiene una atmósfera de nitrógeno. Después de la aparición de una ligera turbidez azul, se adicionó la mezcla de monómeros restantes a una velocidad continua durante un período de 90 min. Se adicionó persulfato de amonio adicional (3.3 g de solución al 5% en agua) y la temperatura se mantuvo a 80°C, durante otras 2 h. El microgel se dializó extensamente frente a agua de calidad Milli-Q.

Método 2A - Preparación de partículas de microgel poli (EA/MAA/BDDA) (utilizadas para formar composiciones de la invención)

El microgel poli (MMA/MAA/BDDA) también se preparó utilizando un método similar al Método 1A. Sin embargo, MMA y EGD fueron reemplazados por EA y BDD, respectivamente, al mismo % mol.

Método 3 - Funcionalización GMA de microgel poli(MMA/MAA/EGDMA) (utilizado para formar composiciones de la invención)

Antes de la funcionalización de metacrilato de glicidilo (GMA, purum, $\geq 97.0\%$ (GC)), microgel poli(MMA/MAA/EGDMA) [Método 1] se purificó extensivamente por diálisis con el cambio de agua desionizada dos veces al día durante al menos dos semanas. Las dispersiones de microgel purificadas se mezclaron con GMA. Esto se hizo a una concentración de 5 veces de GMA a la concentración de carboxilato presente en el microgel. Las mezclas se diluyeron con agua DI a la concentración de microgel 14.87% en peso, y el valor de pH se ajustó a 3.5 mediante la adición de solución acuosa de HCl. El sistema se hizo reaccionar a 50°C en un baño de agua de agitación durante 8 h. La mezcla de reacción se lavó con acetato de etilo 4 veces para eliminar la mayor parte de GMA sin reaccionar, y se dializó adicionalmente 3 días para eliminar cualquier GMA sin reaccionar por completo.

Método 3A - Funcionalización GMA de microgel poli(MMA/MAA/EGDMA) y poli(EA/MAA/BDDA) (utilizado para formar composiciones de la invención)

GM-M-EGD y GM-E-BDD se refieren a los microgeles M-EGD y E-BDD GM funcionalizados, respectivamente. El método utilizado para la funcionalización de M-EGD se describe brevemente en lo siguiente. El pH de una dispersión M-EGD con una fracción de volumen de polímero (ϕ_p) de 0.15 que contiene 1.73 M de GM se ajustó a 3.5, y después se calentó a 50°C con agitación mecánica durante 8 h. La dispersión se lavó cuatro veces con acetato de etilo y se dializó extensamente para obtener el GM-M-EGD purificado. Un procedimiento similar se utilizó para preparar partículas de GM-E-BDD. Sin embargo, en ese caso, el pH fue 5.1 durante la funcionalización y las partículas se lavaron con

cloroformo antes de la diálisis. Un pH de 5.1 también se utilizó para la preparación de un microgel GM-M-EGD funcionalizado más altamente, que se abrevia en este documento como GM(H)-M-EGD.

Método 3B - funcionalización AEMHCL de microgel poli(MMA/MAA/EGDMA) y poli(EA/MAA/BDDA) (utilizado para formar composiciones de la invención)

5 Una preparación típica se describe como sigue para la preparación de funcionalizado AEM M-EGD con una relación [AEM]/[MAA] de 0.40, esto es, AEM40-M-EGD. La relación de concentración de MAA:EDC:NHS:AEM fue de 1:0.5:0.4:0.4. EDC y NHS son N- (3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato y N-hidroxisuccinimida, respectivamente. Se colocaron 10.25 g de 29% en peso de M-EGD en un matraz de 100 ml de fondo redondo con un agitador magnético y se diluye por 30 ml de solución reguladora de pH = 6.6 (0.1 M). A continuación, se disolvieron 0.53 g de NHS en 5 ml de solución reguladora, se disolvieron 0.88 g de EDC en 5.25 ml de HCl 1 M. Se adicionaron entonces la solución que contiene NHS y EDC a la dispersión de microgel y se dejó agitar durante 20 min. A continuación, se disolvieron 0.76 g de clorhidrato de metacrilato de aminoetilo (AEMHCl) en 5 ml de solución reguladora y se adicionaron. El pH final se ajustó a 6.5 por la adición adicional de amortiguación. La reacción se dejó proceder durante 1 día a RT. El producto se purificó por centrifugación repetida y redispersión en agua de calidad Milli-Q. El estado parcialmente agregado de los microgeles facilitó la centrifugación utilizando una centrífuga de alta velocidad convencional.

Microgeles funcionalizados de AEM-E-BDD se prepararon sustancialmente de la misma manera, excepto que el pH se ajustó a aproximadamente 7.0.

20 Método 4 -. Cálculo del % en moles de GMA injertado en partículas de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) en el Método 3

Estos datos se obtuvieron mediante la valoración de los grupos ácido carboxílico libres sobre las partículas de microgel y cálculo del % mol de esos grupos reaccionados. La comparación con la composición del microgel (Microgel 2B) permitió el cálculo del % mol de GMA incorporado. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación (ver Método 6).

25 Método 4A -. Cálculo del % en moles de GMA injertado en las partículas de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) y poli (EA/MAA/BDDA) en el Método 3A

Como en el Método 4 anteriormente, estos datos se obtuvieron mediante titulación potenciométrica. El % en moles de GMA se determinó a partir de la diferencia en el % mol de MAA mol en el microgel antes y después de la funcionalización. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla A.

30 Tabla A

Código	% Mol. de MAA ^a	% Mol. De GMA ^a
M-EGD	35.9	-
E-BDD	37.2	-
GM-M-EGD	34.1	1.8
GM(H)-M-EGD	35.9	5.8
GM-E-BDD	26.5	7.8
^a Determinado a partir de los datos de titulación potenciométrica. El % mol de GMA se determinó a partir de la diferencia en el % mol de MAN en el microgel antes y después de funcionalización.		

Método 4B -. Cálculo del % en moles de AEMHCl injertado en las partículas de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) y poli (EA/MAA/BDDA) en Método 3B

35 De acuerdo con el método 4, estos datos se obtuvieron mediante titulación potenciométrica. El % mol de AEMHCL se determinó a partir de la diferencia en el % mol de MAA en el microgel antes y después de la funcionalización. Los resultados se muestran a continuación, en la Tabla B.

Tabla B

Código	[AEM]/ [MAA] ^a	% Mol. de MAA (exp) ^b	% Mol. AEM (exp) ^c
M-EGD	-	42.5	-
AEM5-M-EGD ^g	0.05	38.7	3.0
AEM10-M-EGD	0.10	38.5	4.1
AEM20-M-EGD ^g	0.20	34.3	7.4
AEM30-M-EGD	0.30	31.1	11.4
AEM40-M-EGD	0.40	35.1	7.4
AEM50-M-EGD	0.50	31.5	11.0
E-BDD	-	37.2	-
AEM20-E-BDD	0.20		
^a Relación de concentración de AEMHCl y MAA utilizada para preparar los microgeles funcionalizados. ^b % Mol. de MAA encontrado en los microgeles por titulación. ^c Contenidos de AEM determinados a partir de los datos de titulación del pH para los microgeles utilizando la diferencia entre los contenidos de MAA en el microgel original y el respectivo microgel funcionalizado de AEM.			

Se utilizó la titulación potenciométrica para determinar el contenido de MAA y de los valores efectivos de pK_a para todos los microgeles estudiados. Véase la Tabla B anterior. Estos datos también permitieron el cálculo de la % mol de AEM dentro de los microgeles funcionalizados.

- 5 La figura 5B-1 muestra la variación de Mol. De AEM dentro de los microgeles AEM-M-EGD con [AEM]/[MAA]. La línea discontinua representa los valores teóricos para una eficiencia del 100% de funcionalización.

Se puede observar de la Fig. 5B-1 que muy buena concordancia entre la teoría y la experimentación se observó hasta que [AEM]/[MAA] superó 0.30. En niveles más altos [AEM]/[MAA] se produjo una incorporación mucho más baja de la esperada y los valores se hicieron más variables. De modo interesante, el % mol. máximo de AEM incorporado no excedió el valor determinado al final de la región lineal (11.4 % mol).

- 10 Se obtuvieron los datos de FTIR para los microgeles funcionalizados (Fig. 5B-2).

La figura 5B-2 muestra los espectros FTIR seleccionados para microgeles AEM-M-EGD. La leyenda muestra las relaciones [AEM]/[MAA] utilizadas. Los espectros se registraron en películas secas y bandas seleccionadas están etiquetadas.

- 15 Muestran evidencia de incorporación de grupo vinilo de una banda a 1020 cm^{-1} , que está presente para los microgeles funcionalizados de AEM, pero ausentes en el espectro de M-EGD. Las bandas¹⁷ de amida I (1647 cm^{-1}) y amida II (1560 cm^{-1}) también fueron evidentes en funcionalización. Los espectros apoyan nuestra interpretación de que se produjo con éxito la funcionalización de vinilo.

- 20 Los valores de pK_a para los microgeles se calcularon en cada punto de neutralización de los datos de la valoración utilizando:

$$pK_a = \text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$$

donde α es el grado de neutralización. Se han establecido que a medida que aumenta el contenido de MAA en partículas de látex disminuye el pK_a . Esto se ha atribuido (Pinprayoon, O.; Groves, R.; Saunders, B. R. *J. Coll. Interf. Sci.* 2008, 321, 315) a una disminución de las interacciones hidrofóbicas que se oponen a las partículas de hinchazón como resultado de la ionización.

25

- La figura 5B-3 muestra la variación de pK_a con la neutralización de microgeles AEM-M-EGD. Las leyendas dan las relaciones $[AEM]/[MAA]$ utilizadas para su preparación. Los datos muestran un aumento pronunciado en los valores de pK_a para $\alpha < 20\%$ con el aumento de $[AEM]/[MAA]$. Esta es una fuerte indicación de que la funcionalización procede del exterior hacia el interior del microgel. Los grupos de AEM son relativamente hidrófobos en comparación con MAA y esto conduce a un aumento de la pK_a local. Estos datos proporcionan evidencia de una funcionalización AEM localmente alta en la periferia de microgel. Esto es consistente con las partículas que son parcialmente hinchadas en las etapas iniciales del proceso de funcionalización. Es probable que las periferias de las partículas se cierran a medida que avanza la funcionalización debido a un aumento de la hidrofobicidad y la pérdida de carga en esa región. Esto sería cortar el suministro de AEM a las regiones interiores de los microgeles.
- Método 5 - Mediciones del tamaño de partícula dependientes del pH para microgeles de los métodos 1 y 2
- Las mediciones se realizaron con espectroscopía de correlación de fotones utilizando una concentración de partículas en el intervalo de 0.001 a 0.1 % en peso de soluciones reguladoras patrón, se utilizaron para estos experimentos. Estas mediciones se realizaron con un aparato de dispersión de luz Brookhaven BI-9000 equipado con un láser de 20 mW HeNe. El detector se fijó en un ángulo de 90° de dispersión.
- Los resultados se muestran en la figura 4 [Microgel 1 (rombos abiertos), 2A (triángulos abiertos), 2B (cuadrados abiertos), 2BG (cuadrados cerrados)].
- Método 5A - Mediciones del tamaño de partícula dependientes del pH para microgeles a partir de los Métodos 1A, 2A y 3A
- Las mediciones se realizaron con espectroscopía de correlación de fotones utilizando dispersiones que contienen $\phi_p = 3 \times 10^{-4}$ microgel. Las soluciones reguladoras patrón se utilizaron para estos experimentos. Estas mediciones se realizaron con un aparato de dispersión de luz Brookhaven BI-9000 equipado con un láser de 20 mW HeNe. El detector se fijó en un ángulo de 90° de dispersión.
- La figura 4A muestra la dependencia del pH del diámetro hidrodinámico (d_h) y valores de Q para los microgeles: a) y b) [M-EGD (rombos sólidos), GM-M-ECD (cuadrados abiertos)]; c) y d) [E-BDD (rombos sólidos), GM-E-BDD (cuadrados abiertos)], donde GM-prefijo se refiere a un microgel GMA funcionalizado.
- Los datos seleccionados se muestran también en la Tabla 1. Los datos muestran hinchazón activado por el pH a un pH de aproximadamente 6.4. La hinchazón completa se había producido por el pH de aproximadamente 7.4. Este último corresponde al pK_a del microgel. Se debe observar que no hay perfecta concordancia entre los valores de pK_a y los datos de hinchazón de partícula (Fig. 4A). El pK_a para los geles polielectrolitos es fuertemente afectado por una serie de factores, que incluye polímero y concentración de electrolito¹⁸. Por lo tanto, las diferencias entre los valores de pK_a y el intervalo de pH de fuerte hinchazón (Fig. 4A) se puede atribuir a las diferencias en la concentración de electrolito y la concentración de polímero dentro de las partículas de microgel para cada técnica.
- De modo interesante, se puede ver en la figura 4A que los microgeles GM-M-EGD se hinchan mucho más que las partículas de M-EGD. Esto se sospecha que es debido al procedimiento de lavado de acetato de etilo, que se utilizó para eliminar GMA residual de los microgeles. Para probar esta idea microgel no funcionalizado se lavó con acetato de etilo. El tamaño de partícula de M-EGD aumentó de a 285 nm a pH = 8 después de lavado de acetato de etilo (cf. 232 nm en la Tabla 1). Esta es una nueva observación de microgeles basados en MMA sensibles al pH e indica fuertemente que la asociación hidrófoba reversible restringe la hinchazón de estos microgeles. El proceso de lavado debe eliminar reticulaciones físicas, es de suponer que participan grupos de MMA. La presencia de enlaces cruzados hidrofóbicos podría ser ayudado por la baja movilidad de las cadenas de PMMA debido a su alto T_g . El acetato de etilo puede actuar como un plastificante para las partículas de M-EGD. En contraste la hinchazón dependiente del pH para los microgeles EBDD y GM-E-BDD fueron casi idénticos (Fig. 4A (b) y 4A (d)). Esto es probablemente porque los microgeles E-BDD están compuestos por cadenas de polímero con un T_g inferior y se ven menos afectadas por enlaces cruzados físicos hidrófobos. Esto es apoyado por los valores Q más altos obtenidos para los microgeles E-BDD (Fig. 4A).
- La figura 4A-2 incluye datos adicionales que muestran la variación de (a) diámetro hidrodinámico y (b) relación de hinchazón con pH para los distintos microgeles, incluyendo el microgel GM(H) -M-EGD altamente funcionalizado.
- Método 5B - Dependencia del pH y otras dependencias de mediciones del tamaño de partícula para microgeles a partir de Métodos 1A, 2A y 3B
- Las mediciones se realizaron con espectroscopía de correlación de fotones utilizando dispersiones que contienen $\phi_p = 3 \times 10^{-4}$ de microgel. Soluciones reguladoras de patrón se utilizaron para estos experimentos. Estas mediciones se realizaron con un aparato de dispersión de luz Brookhaven BI-9000 equipado con un láser de 20 mW HeNe. El detector se fijó en un ángulo de 90° de dispersión.

La figura 4B-1 muestra la variación de (a) diámetro hidrodinámico, (b) relación de hinchazón y (c) ϕ_p^* con pH para los microgeles M-EGD (rombos sólidos) y E-BDD (triángulos abiertos). Los datos se midieron utilizando soluciones reguladoras 0.1 M.

Las partículas de microgel se hinchan cuando el pH se aproxima a sus respectivos valores de pK_a . Utilizando la ecuación (1) los valores máximos de Q para M-EGD y E-BDD son 4 y 40, respectivamente. El microgel E-BDD se hincha muy fuertemente. La relativamente baja hinchazón de los microgeles M-EGD es porque tienen una contribución reticulación reversible, lo que restringe la hinchazón (Liu, R.; Milani, A. H.; Freemont, T. J.; Saunders, B. R. *Manuscript submitted to Soft Matter* 2011). La hinchazón se puede aumentar en gran medida de los microgeles M-EGD utilizando el lavado de acetato de etilo.

La fracción de volumen de polímero en donde las partículas de microgel vecinas se solapan, ϕ_p^* , ya que da una indicación de cuándo la reticulación interpartículas puede ser eficaz. Además, estará relacionada con el punto en el que se produce la gelificación física. En un trabajo reciente (Lally, S.; Cellesi, F.; Freemont, T.; Saunders, B. R. *Coll. Polym. Sci.* 2011, *In Press*), se encontró que ϕ_p^* podría ser estimada para dispersiones de microgel E-BDD como el valor de ϕ_p que es igual a la fracción de volumen de polímero interno dentro de las partículas (hinchadas) de microgel (ϕ_{MG}). El enfoque para los microgeles se basa en la definición de las concentraciones de solapamiento de micelas de polímero poliméricas (van Ruymbeke, E.; Pamvouxoglou, A.; Vlassopoulos, D.; Petekidis, G.; Mountrichas, G.; Pispas, S. *Soft Matter* 2010, 6, 881). Se supone que la distribución del segmento radial dentro de cada partícula es constante y hace caso omiso de los huecos intersticiales entre las partículas, esto es, asume una eficiencia de empaquetamiento de 100%. Para partículas de microgel de esfera duras una eficiencia de empaquetamiento de menos de 100% se espera³. Sin embargo, la eficiencia de embalaje precisa dependerá de la composición microgel y no es capaz de ser pre-determinada. La siguiente ecuación se utilizó para estimar ϕ_p^* .

$$\phi_p^* = \frac{1}{Q} \quad (3)$$

Los datos de ϕ_p^* se muestran en la figura 4B-1 (c). Estos datos se pueden utilizar para inferir superposición y también elasticidad al gel. Se espera que la superposición y la elasticidad serán más altas para los geles físicos E-BDD si se utiliza un valor de ϕ_p de 0.10 y el pH es mayor que 6.5.

La figura 4B-2 muestra la variación de (a) diámetro hidrodinámico con pH, (b) diámetro con relación $[AEM]/[MAA]$ y (c) Q nominal con $[AEM]/[MAA]$ para los microgeles AEM-M-EGD. El punto de datos en (b) para $[AEM]/[MAA] = 0.30$ y etiquetado como pH = 8 se midió a pH = 7.4. Los datos en (a) son para microgeles AEMHCL-M-EGD formados utilizando una relación de concentración de $[AEM]/[MAA]$ de 0.5 (triángulos abiertos), 0.1 (rombos sólidos), 0 (rombos abiertos)], donde un AEMHCL- prefijo se refiere a un microgel AEMHCL funcionalizado.

PCS se utilizó para medir el tamaño de las partículas colapsadas (pH = 4) después de la funcionalización. Los datos se muestran en la figura 4B-2 (a) y (b) datos de relación de hinchazón se muestra en la figura 4B-2(c), donde el término Q_{nom} se ha utilizado para Q.

Los datos muestran un aumento lineal de diámetro con relación $[AEM]/[MAA]$ para todos los microgeles M-EGD estudiados a pH = 4 y 8. Esto se atribuye a la agregación. Los valores Q nominales a pH = 8 se calcularon utilizando la ecuación (1), y se muestran en la figura 4B-1 (c). Estos valores, que están sujetos a una considerable dispersión, se basan en la suposición de que los agregados están formados de forma irreversible durante la etapa de funcionalización de vinilo y no se descomponen cuando se aumenta el pH. El hecho de que Q_{nom} no cambia significativamente con $[AEM]/[MAA]$ indica que la hinchazón de las partículas individuales no se ha visto afectada en gran medida por la funcionalización AEM. Es decir que han mantenido su sensibilidad al pH, incluso en el estado agregado. Véase también la figura 4B-1 (a). Esto es razonable teniendo en cuenta que la magnitud máxima de funcionalización afecta aproximadamente 1/3 de los grupos MAA presentes en el microgel principal (Tabla 1).

En contraste con un método de vinilo-funcionalización anteriormente (Ejemplo 3A) que implica GMA (metacrilato de glicidilo) el método utilizado en este documento involucró una alta concentración de electrolito. Esto es debido a la utilización de AEMHCl. El pH utilizado en este método fue de aprox 6.6, lo que requiere la adición de solución reguladora y NaOH. Este pH se utiliza para asegurar que las partículas de microgel se hincharon al menos parcialmente durante la funcionalización. AEMHCl es un electrolito y fuerzas iónicas tan altos estaban presentes.

La figura 4B-3 muestra una variación de (a) diámetro hidrodinámico y (b) relación de hinchazón (Q) con la concentración de NaCl en solución a pH = 6.6 para la dispersión de microgel M-EGD.

El efecto de la adición de NaCl en el tamaño de las partículas del microgel se investigó a pH = 6.6 (Figura 4B-3). A este pH, las partículas fueron ligeramente hinchadas ($Q=1.5$). Un ligero aumento en el tamaño se produjo (a aproximadamente 170 nm, La figura 3S) a una concentración de NaCl de 0.10 M que indica una ligera agregación.

Estos datos muestran que se produjo funcionalización en condiciones en las que las partículas eran (inicialmente) ligeramente hinchadas y que produjeron agregación (parcial) limitada. La extensión de la agregación dependerá en la medida de la hinchazón de la partícula (y por lo tanto el pH). A modo de comparación, el uso de funcionalización [AEM]/[MAA] = 0.40 implica la adición de reactivos y solución reguladora que dieron una contribución de fuerza iónica de 0.28 M. Una contribución adicional de las partículas de microgel (grupos MAA) por sí mismos habría aumentado la fuerza iónica. Por lo tanto, no es sorprendente que la agregación parcial se produjo durante el proceso de funcionalización. Los datos de la figura 4B-2 muestran que se hizo progresivamente más pronunciada a medida que aumenta [AEM]/[MAA]. Es importante tener en cuenta que el agregado de tamaño de la figura 4B-2 está a menos de 1 μm . Esto significa que estas dispersiones todavía serían capaces de ser inyectadas a través de estrechas agujas de jeringa de calibre. Esto es importante para futuras aplicaciones potenciales que implican técnicas mínimamente invasivas (por ejemplo, inyección).

Método 6 - Caracterización de las partículas de microgel preparadas en los Métodos 1, 1A, 2, 2A, 2B, 3, 3A, y 3B (utilizadas para formar composiciones de la invención)

Los datos de caracterización se presentan, a continuación, en la Tabla 1:

Tabla 1

No.	Método	Composición ^a	$d_{h(4)}/\text{nm}^b$	$d_{h(10)}/\text{nm}^b$	q^c	pK_a
1	2	poli(EA ₆₆ /MAA ₃₃ /BDDA _{1.0})	75	309	70	6.70
2A	1	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0}) ^d	104	205	7.7	
2B	1	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})	130	208	4.1	6.35
2BG	3	poli(MMA ₆₆ /MAA ₂₃ /EGDMA _{1.0})-GMA _{0.018}	131	323 ^g	15 ^h	7.1
3e	1	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /PEGDMA550 _{1.0})	150			
3G ^e	3	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /PEGDMA550 _{1.0})-GMA ^f				
M-EGD	1A	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})	139	232 ^g	4.7 ^h	7.4
E-BDD	2A	poli(EA ₆₆ /MAA ₃₃ /BDDA _{1.0})	75	247 ^g	35 ^h	6.5
GM-M-EGD	3A	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-GMA _{0.018}	131	323 ^g	15 ^h	7.1
GM(H)-M-EGD	1A	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-GMA _{0.058}	133	315	13	6.0
GM-E-BDD	3A	poli(EA ₆₆ /MAA ₃₃ /BDDA _{1.0})-GMA _{0.078}	77	243 ^g	32 ^h	6.1
M-EGD	1A	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})	134	212 ^g		7.2
AEM5-M-EGD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM _{0.030}	-	-		6.5
AEM10-M-EGD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM _{0.041}	257	306 ^g		6.6
AEM20-M-EGD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM _{0.074}	-	-		6.7
AEM30-M-EGD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM _{0.114}	653	914 ^g		6.8
AEM40-M-EGD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM _{0.074}	655	742 ^g		6.7
AEM50-M-EGD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM _{0.11}	576	851 ^g		6.9

AEM20-E-BDD	3B	poli(MMA ₆₆ /MAA ₃₃ /EGDMA _{1.0})-AEM				
μ-BDD	2	poli(EA ₆₆ /MAA ₃₃ /BDDA _{1.0})	108	310'	24 ^J	6.7

^a Los números de los subíndices son las composiciones aproximadas nominales (% en peso) en base a las condiciones de preparación. En el caso de GMA o AEM el número se basa en datos de valoración y se refiere a la composición como un todo (véase Ejemplo 10).

^b Diámetro hidrodinámico medido a pH = 4 o 10.

^c Relación de hinchazón volumétrica calculada utilizando valores $d_{h(10)}$ y $d_{h(4)}$ de acuerdo con: $q = (d_{h(10)}/d_{h(4)})^3$.

^d Este microgel se preparó utilizando alta cizalla.

^e 3 y 3G se hicieron utilizando los métodos 1 y 3, respectivamente, la diferencia es que PEGDMA550 se utilizó en lugar de EGDMA. La concentración % en peso fue la misma.

^f La composición de 3G debe ser similar a la del Microgel 2BG, pero no se ha establecido en la actualidad.

^g En estos casos, el diámetro hidrodinámico se midió a pH 8, no 10.

^h En estos casos, relaciones de hinchazón volumétrica se calculan utilizando valores $d_{h(8)}$ y $d_{h(4)}$ de acuerdo con: $q = (d_{h(8)}/d_{h(4)})^3$.

ⁱ En estos casos, el diámetro hidrodinámico se midió a pH 7, no 10.

^j En estos casos, relaciones de hinchazón volumétrico se calcula utilizando valores $d_{h(7)}$ y $d_{h(4)}$ de acuerdo con: $q = (d_{h(7)}/d_{h(4)})^3$. El grado de funcionalización por GMA para GM-M-EGD (del método 3A) fue modesto (1.8 % mol en general, o 5% de los grupos MAA). Como se muestra a continuación esto era suficiente para formar geles DX. En el caso de la GM-E-BDD (de método 3A) la funcionalización fue mucho más alta (7.8 % mol en general, o 21% de los grupos MAA). Para preparar dispersiones de microgel GM-E-BDD coloidalmente estables fue necesario utilizar un pH más alto para la funcionalización para evitar la agregación durante el proceso. El contenido de GMA relativamente alto para los microgeles GM-E-BDD no disminuyó el grado de hinchazón a juzgar por los valores de Q a pH = 8 (Tabla 1).

Ejemplo 1 - Reticulación de las partículas de microgel por formación de una red de polímero interpenetrante (para formar composiciones de la invención)

Se utilizaron dos métodos:

Método A: En este método se adiciona en primer lugar el microgel. Por lo general, el sistema se preparó utilizando 10% en peso de Microgel (métodos 1 o 2) y 10% en peso de dispersión de PEGDMA550 stock. En ese caso, una mezcla de 0.2 ml de solución de persulfato de amonio (10% en peso en agua), se adicionaron 0.5 ml de NaOH acuoso 2 M a una mezcla de 2.5 ml de microgel (16% en peso), 0.36 ml de PEGDMA550 y 0.44 ml de agua DI con agitación. El gel débil final como mezcla se mantuvo en un baño de agua y se dejó reaccionar a la temperatura deseada.

Método B: Se adiciona en primer lugar el reticulante. En este caso 2.5 ml de microgel (16% en peso) se adicionaron a una mezcla previamente preparada de 0.2 ml de solución de persulfato de amonio (10% en peso en agua), 0.5 ml de NaOH acuoso 2 M, 0.36 ml de PEGDMA550 y 0.44 ml de agua DI por agitación. Antes se adicionó el microgel, la mezcla de todos los otros materiales se dejó mezclar durante medio minuto. El líquido final como mezcla se mantuvo en un baño de agua.

Caracterización

(i) Efecto de concentración de Microgel 1 en módulo elástico dependiente de la tensión (G') y $\tan\delta$ ($= G''/G'$) [Tener en cuenta que G'' es el módulo de pérdida].

El microgel reticulado se preparó utilizando el Ejemplo 1, Método A. Las dispersiones contenían 10% en peso de PEGDMA (la masa molar fue 550 g/mol).

Las mediciones de reología dinámica se realizaron utilizando un instrumento TA reómetro con control de temperatura AR G2 con una cámara ambiental. Los resultados se muestran en la figura 6.

(ii) Variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con tensión para microgeles reticulados preparados utilizando Microgel 2A y PEGDMA550.

Las concentraciones de Microgel y PEGDMA utilizados fueron 10% en peso de cada uno. En este caso se llevó a cabo el método de reticulación *in situ* dentro de la geometría del reómetro antes de la medición. El instrumento se describió anteriormente. La preparación se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1, Método B. Los resultados se muestran en la figura 7.

(iii) Efecto de concentración de Microgel 1 en módulo elástico dependiente de la tensión (G') y $\tan\delta$ ($= G''/G'$) [Tener en cuenta que G'' es el módulo de pérdida]

Las partículas de microgel reticuladas 1 se prepararon utilizando el Ejemplo 1, Método B. Las dispersiones contenían 10% en peso PEGDMA550 (masa molar fue de 550 g/mol). El instrumento fue el mismo que el descrito anteriormente en (i) anterior. Los resultados se muestran en la figura 8.

Ejemplo 2 - La reticulación de las partículas de microgel por la formación de una red de polímero interpenetrante y estudio de las redes precursoras de microgel/reticulantes (para formar las composiciones de la invención)

Para un compuesto de hidrogel total que contiene una fracción de volumen total de polímero (ϕ_{Tot}) de 0.20, con una fracción de volumen de microgel con respecto al polímero total (Φ_{μ}) de 0.5, una mezcla de 0.02% en peso de persulfato de amonio se combinó con una cantidad apropiada de hidróxido de sodio (Aldrich, 98%) para dar un pH de la solución final de 7.4. A esto se adicionó el monómero de reticulación (X), con el mismo por ciento en moles como poli(etilenglicol)dimetacrilato (PEGD550). PEGD (promedio M_n 550, Aldrich) y luego se disolvió en esta solución, a la que 10% en peso de microgel (Microgel μ -BDD - obtiene a partir de Método 2 anterior) se adicionó gota a gota mientras que la mezcla utilizando un mezclador de vórtice. A continuación, se calentó la dispersión a 50°C durante 16 horas.

En este estudio utilizamos concentraciones molares constantes de comonómero de reticulación adicionado. Es decir, para EGD y los diferentes monómeros de reticulación PEGD se adiciona un % mol (x_x) de monómero de reticulación constante, cuando se comparan los datos. El valor de x_x es el % mol de X presente con respecto a todos los monómeros presentes en el material compuesto μ -BDD/H-X. Por lo tanto, el % en moles de monómeros presentes en el microgel es 100 - x_x . La consecuencia de esto es que hay diferentes fracciones de volumen de monómero de reticulación presente.

Los microgeles son identificados como μ -BDD donde μ indica microgel y BDD identifica el monómero de reticulación se utiliza (esto es, poli (EA/MAA/BDDA) como se obtiene a partir del Método 2). Cuando X se polimeriza para formar una fase de la red de hidrogel de este se identifica como H-X. Los sistemas (dispersiones o geles) contienen ya sea μ -BDD y X: (esto es, μ -BDD/X) o μ -BDD y H-X: (μ -BDD/H-X). La fracción del volumen de polímero de microgel en el μ -BDD/X o mezcla μ -BDD/H-X con respecto al polímero y monómero o hidrogel presente es $\Phi_{\mu-BDD}$. La fracción de volumen de monómero de reticulación presente es ϕ_x . En los compuestos microgel/hidrogel la fracción de volumen del polímero de hidrogel (formado por X) es ϕ_{H-X} . En tanto las dispersiones μ -BDD/X o geles compuestos de μ -BDD/H-X de la fracción total de volumen de polímero y monómero de reticulación es ϕ_{Tot} . Se aplican las siguientes ecuaciones.

Para las dispersiones μ -BDD/X:

$$\phi_{Tot} = \phi_{\mu-BDD} + \phi_x \quad (4)$$

Para los geles compuestos de μ -BDD/H-X:

$$\phi_{Tot} = \phi_{\mu-BDD} + \phi_{H-X} \quad (5)$$

La fracción de volumen de microgel con respecto a microgel y monómero (o de hidrogel) es Φ_{μ} .

$$\Phi_{\mu} = \frac{\phi_{\mu-BDD}}{\phi_{Tot}} \quad (6)$$

La primera parte del estudio investigó las propiedades de las mezclas μ -BDD/X. Estas mezclas se utilizaron para preparar los hidrogeles. Era importante investigar cualquier cambio en las propiedades de microgel causado por la adición de los monómeros. Con el fin de proporcionar un buen control de las mezclas se calentaron durante el mismo período de tiempo que se utiliza para la formación de hidrogel; Sin embargo, no se agregó APS.

Las mezclas de μ -BDD/X se prepararon inicialmente utilizando un intervalo de valores de $\Phi_{\mu-BDD}$. Se encontró que el comportamiento de las mezclas fue dependiente del peso molecular de X. Si se utilizó EGD continuación, las

dispersiones se mantuvieron geles físicos sobre los valores de $\Phi_{\mu-BDD}$ de 0.05-0.15. Sin embargo, si se utiliza PEG550 entonces los geles físicos cambian a fluidos (al juzgar por inversión del tubo) cuando $\Phi_{\mu-BDD}$ fue inferior a 0.125. Las imágenes seleccionadas se muestran en la figura 9C. Basándose en un estudio anterior que investigó microgeles relacionados en presencia de homopolímeros PEG lineales⁹, este comportamiento se atribuye a deshinchamiento osmótico de los microgeles causado por la exclusión del PEGD550 de peso molecular más alto. El EGD de peso molecular más bajo fue capaz de migrar hacia el interior de las partículas de microgel y no causó colapso de las partículas. También es posible ver la evidencia de esto visualmente a través de cambios de turbidez (véase la figura 9C). La figura 9C muestra imágenes de dispersiones concentradas seleccionados. Se muestran los valores de $\Phi_{\mu-BDD}$ y X_x . El pH fue de 7.4. La turbidez aparece independiente de $\Phi_{\mu-BDD}$ para las dispersiones $\mu-BDD/EGD$. Sin embargo, se disminuye notablemente para las dispersiones $\mu-BDD/PEGD$ con el aumento de $\Phi_{\mu-BDD}$. A altos valores de $\Phi_{\mu-BDD}$ no hay suficiente PEGD550 excluido para deshinchar las partículas.

Se probó el efecto del peso molecular de PEGD utilizando mediciones de reología dinámica con el fin de investigar la evidencia de un valor de corte.

La figura 6C muestra una variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con la tensión para dispersiones $\mu-BDD/X$. El peso molecular de X se muestra en la leyenda. (c) Muestra los valores de G' y $\tan\delta$ medidos a 1% de tensión. (d) Muestra la variación de la tensión de rendimiento con el peso molecular de X . En todos los casos $\Phi_{\mu-BDD} = 0.1$ y $pH = 7.4$. El valor para x_x utilizado fue 15 % mol

Las figuras 6C (a) - (c) muestran claramente que G' cae y $\tan\delta$ incrementa con el peso molecular de X . En nuestra experiencia un G' de aproximadamente 100 Pa se requiere para un gel para sobrevivir la inversión de tubo. En consecuencia, los datos reológicos son consistentes con las imágenes de los tubos mostrados anteriormente. Se deduce de estos datos que el peso molecular de PEGD crítico para completar la exclusión del microgel es entre 550 y 750 g/mol. Esto corresponde a 9-13 unidades de EO. Bajo estas condiciones las partículas de microgel se colapsaron suficientemente que los geles físicos no son lo suficientemente fuertes como para soportar su propio peso cuando se someten a la inversión de tubo (Figura 9C).

La tensión de rendimiento (γ^*) se define en este documento como la tensión a la que G' cae al 95% de su valor en 1% de tensión (Choungnet, A.; Audibert, A.; Moan, M. *Rheol. Acta* 2007, 46, 793). Esto marca la transición a la avería de la red. Se puede ver en la figura 6C (d) que existe una variación considerable con el peso molecular de X para estos valores. En general, los geles físicos son materiales frágiles y γ^* no parece estar relacionada con G' .

Caracterización

(i) la relación de volumen de hinchazón (Q) para microgeles reticulados formados de acuerdo con el Ejemplo 2 medidos después de 7 días en función de la fracción de volumen de $\mu-BDD$.

El comportamiento de hinchazón se investigó para los compuestos de hidrogel $\mu-BDD/H-PEGD550$ a $pH = 7.4$ después de 7 días.

La figura 8C-1 muestra la relación de hinchazón $\mu-BDD/H-PEGD550$ y la fracción sol como una función de Φ_{μ} . Los insertos muestran geles $\mu-BDD/H-PEGD550$ seleccionados. Los compuestos se prepararon utilizando $\phi_{Tot} = 0.2$. Tener en cuenta que $\Phi_{\mu-BDD} = \Phi_{\mu} \times \phi_{Tot}$. Los datos y las imágenes fueron $pH 7.4$. Q para el microgel $\mu-BDD$ (Tabla 1) se muestra para comparación. Las imágenes y los datos fueron obtenidos después de 7 días.

Los geles se prepararon utilizando $\phi_{Tot} = 0.2$ y un intervalo de valores de Φ_{μ} . Los valores de Q y SF fueron constantes hasta que Φ_{μ} superó 0.25. A mayores valores de Φ_{μ} Q aumenta mientras que SF disminuyó. Esto se atribuye a una disminución en la matriz de PEGD550 que tenía un SF sustancial (de aproximadamente 0.5) y un peso molecular medio más bajo entre reticulaciones. Las partículas de microgel tenían un valor de Q más alto que el poli (PEGD), ya que sólo contenían aproximadamente 0.5% mol de BDD. Esto se puede ver mediante la comparación de los puntos de datos en $\phi_{Tot} = 0$ y 1.0, respectivamente, para el poli (PEGD550) y partículas de microgel $\mu-BDD$.

El cambio brusco en el comportamiento en $\Phi_{\mu} = 0.25$ es interesante. Puede ser que este es donde una red de partículas de microgel percolada dentro de la matriz $H-PEGD550$ primero se forma. Tales como la red se esperaría que reduzca la eficacia global de la fase reticulada $H-PEGD550$ para restringir las partículas de microgel. En valores Φ_{μ} mayores que o iguales a aproximadamente 0.63 del gel redispersado. Este valor de Φ_{μ} está muy cerca de la fracción de volumen de embalaje para un sistema de empaquetado hexagonal cerca de esferas monodispersas (0.64). También se encuentra en la región de fracciones de volumen donde se espera un vaso atrapado (Debord, S. B.; Lyon, L. A. *J. Phys. Chem. B*. 2003, 107, 2927). Sería razonable esperar que la fase $H-PEGD550$ de encapsulación se fragmenta (no continua) en estas condiciones. El punto en el cual $\mu-BDD/H-PEGD550$ re-dispersa ($\Phi_M \geq 0.63$) corresponde con el punto en el que las mezclas de $\mu-BDD/PEGD550$ originales forman geles físicos (Figura 9C). Esto demuestra que la redispersión se debe a la incapacidad de PEGD550 para formar una membrana continua por toda la dispersión.

(ii) Volumen relación de hinchazón (Q) para microgeles reticulados formados de acuerdo con el Ejemplo 2 medido después de 7 días como una función del peso molecular de X (reticulante)

El efecto de peso molecular de X en la hinchazón también fue investigado (Véase La figura 8C-2).

La figura 8C-2 muestra el efecto de MW en la relación de hinchazón y la fracción sol de compuestos de hidrogel μ -BDD/H-X. Los materiales compuestos se prepararon utilizando $\Phi_{\mu\text{-BDD}} = 0.10$ y $X_X = 15\%$ mol. Los geles se equilibraron luego a pH = 7.4 para 7 días antes de la medición.

Parece ser que Q aumenta y SF disminuye con MW del monómero de reticulación. Se espera que el aumento de Q de un aumento en el peso molecular promedio entre reticulaciones. No está claro por qué el SF disminuye con MW para estos sistemas en esta etapa, aunque se puede esperar que las complicaciones se hagan más importantes que la masa molar de X aumenta.

(iii) relación de volumen de hinchazón (Q) para microgeles reticulados formados de acuerdo con el Ejemplo 2 medida después de 7 días como una función de pH

Los geles μ -BDD/ H-PEGD550 y μ -BDD/ H-EGD se les permitió alcanzar el equilibrio de hinchazón. Los valores de Q respectivos se muestran en la figura 8C-3.

La figura 8C-3 muestra una variación de Q para materiales compuestos de hidrogel con el pH. Los compuestos se prepararon a pH 7.4, $\Phi_{\mu\text{-BDD}} = 0.10$ y $X_X = 15\%$ mol, colocado en solución reguladora 0.1 M y se dejó equilibrar durante 7 días. También se muestran los datos para el μ -BDD obtenidos a partir de PCS.

En general, existe un acuerdo entre los valores de Q para los geles y las partículas de microgel μ -BDD. Sin embargo, existe una dispersión considerable de los datos de gel que impide un análisis más detallado.

(iv) Efecto de la concentración Microgel μ -BDD en el Ejemplo 2 en módulo elástico (G') dependiente de la tensión y $\tan\delta$ ($= G''/G'$) [Tener en cuenta que G' es el módulo de pérdida]

Los hidrogeles compuestos (μ -BDD/H-X) se prepararon mediante la adición de iniciador (APS) a las dispersiones concentradas descritas anteriormente en el Ejemplo 1C. El resultado de la reticulación era geles que eran más resistentes a redispersión (más adelante). También hubo un aumento en el módulo. El aumento fue más pronunciado para el sistema μ -BDD/H-PEGD550.

La figura 7C muestra el efecto de la variación de $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ para compuestos de hidrogel μ -BDD/ H-EGD y μ -BDD/H-PEGD550. Los datos seleccionados para las respectivas dispersiones μ -BDD/EGD también se muestran para la comparación. También se muestran los valores para x_X . Todos los sistemas se midieron a pH 7.4. Estos datos ilustran la brecha en valores G' que se convierten cada vez más pronunciada en la región $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ de aproximadamente 0.10 a 0.17. Esto indica un intervalo óptimo para deshinchazón osmótica de las partículas μ -BDD en presencia de PEGD550 antes de la reticulación.

(v) Efecto del peso molecular del monómero de reticulación (X) sobre las propiedades mecánicas de los geles compuestos del Ejemplo 2

El efecto del peso molecular del monómero de reticulación sobre las propiedades mecánicas de los geles compuestos preparados utilizando $\Phi_{\mu\text{-BDD}} = 0.1$ y $X_X = 15\%$ mol se investigó con más detalle. Los resultados de estos datos se muestran en los estudios de amplitud de tensión realizados.

La figura 8C-4 muestra los datos para geles compuestos de μ -BDD/H-x: Efecto del peso molecular de X en (a) G', (b) $\tan\delta$ y (c) γ^* . Se obtuvieron los datos mediante $\Phi_{\mu\text{-BDD}} = 0.10$ y $X_X = 15\%$ en moles. Los datos para (a) y (b) se midieron utilizando 1% de tensión y 1 Hz. Tener en cuenta que el punto en el MW de 0 corresponde a $\Phi_{\mu\text{-BDD}} = 0.20$. Estos datos muestran evidencia de un cambio claro en G' y γ^* con MW de X. Se puede observar que el MW de 330 g/mol marca un cambio en la velocidad de disminución de G' con MW y también un valor máximo de γ^* (de 19%). Esto es una indicación de una masa molar relativamente grande entre los puntos de reticulación en la periferia de las partículas. Los datos también muestran (Figura 8C-4 (b)) que hay un aumento brusco de $\tan\delta$ a valores de MW altos. Esto es una indicación de aumento de la disipación debido a una red débil que rodea las partículas deshinchado.

La comparación de los datos que se muestran en las Figs. 6C (véase el Ejemplo 1C) y 8C-4 muestra que el mayor incremento de G' después de la formación de compuesto se produce cuando X es excluido a partir de microgel interior; en ese caso el fluido (mezcla) cambia a un gel sólido. No existe una gran diferencia para los valores G' para los monómeros de reticulación de bajo peso molecular.

(vi) Efecto de $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ en G', $\tan\delta$ y γ^* de los productos del Ejemplo 2

El efecto de $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ en G' , $\tan\delta$ y γ^* fueron investigados y que los datos aparecen en la figura 8C-5.

La figura 8C-5 muestra el efecto de $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ en (a) G' , (b) $\tan\delta$ y (c) γ^* para compuestos de hidrogel $\mu\text{-BDD}/\text{H-EGD}$ y $\mu\text{-BDD}/\text{H-PEGD550}$. El valor para x_x era 15% mol en cada caso.

- 5 Se puede ver que un $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ mínimo de aproximadamente 0.05 se requiere para los sistemas $\mu\text{-BDD}/\text{H-PEGD550}$ con el fin de formar un gel con elasticidad y $\tan\delta < 1.0$ significativa. En el caso de $\mu\text{-BDD}/\text{H-EGD}$ el mínimo es mucho más baja (menos de 0.025). Las relaciones exponenciales (Figura 8C-5 (a)) implican capacidad de ajuste a través del control de $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ es interesante que para ambos sistemas parece que hay un $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$ a la que los valores G' y $\tan\delta$ se vuelven idénticos y esto es 0.125. Las propiedades reológicas de los compuestos son idénticos lo que implica que no hay diferencia entre la distribución de la carga dentro de cada tipo de red en que el valor de $\Phi_{\mu\text{-BDD}}$.
- 10 Los datos anteriores demuestran la capacidad de ajuste considerable para los compuestos. Los mayores cambios durante la reticulación covalente se producen durante los geles $\mu\text{-BDD}/\text{H-PEGD550}$. Cuando $\Phi_{\mu\text{-BDD}} = 0.1$, cambian de un fluido a un gel. Esto indica un buen potencial para una dispersión inyectable.

(vii) Efecto del pH sobre módulo elástico dependiente de la tensión (G') y $\tan\delta (= G''/G')$ [Tener en cuenta que G'' es el módulo de pérdida] para el Ejemplo 2

- 15 También se investigaron las propiedades reológicas de los geles hinchados de equilibrio.

La figura 8C-6 muestra la variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con pH para hidrogeles compuestos $\mu\text{-BDD}/X$. Estos fueron los mismos geles utilizados para los experimentos de hinchazón que se muestran en la figura 8C-3.

- 20 Se puede observar que en el intervalo de pH fisiológico de los geles compuestos tienen valores G' bajos. Ellos también fueron bastante frágiles con los valores γ^* menores del 5%. Ambos efectos se pueden atribuir a las cadenas altamente hinchadas. Los valores Q se encuentran en el entorno de 30 a 40 de la figura 8C-3 en estos intervalos de pH (de 7 a 7.4). Esto corresponde a un valor ϕ_p de sólo el 0.02 hasta 0.03. Por lo tanto, en el estado totalmente hinchado estos compuestos son geles débiles. Sin embargo, los datos de la figura 8C-5 muestran que se pueden lograr geles mucho más elásticos mediante la limitación de la inflamación a un intervalo en donde los valores ϕ_p son más grandes.

Conclusiones

- 25 El tipo de compuesto de hidrogel que se obtiene depende del MW del monómero de reticulación adicionado. Si el MW es menor que el límite de exclusión (ca. 550 g/mol), entonces penetra los microgeles hinchados y refuerza los geles físicos para producir microgeles roscados de la red. Si el MW es mayor que este valor se excluye el monómero y se reticula alrededor de las partículas de microgel, encapsulación de los mismos, para formar un hidrogel reforzado con microgel. En el último caso, el monómero de reticulación excluido causó deshinchamiento y esto resultó en un fluido en lugar de un gel físico. El fluido de $\mu\text{-BDD}/X$ cambió a un gel durante la reticulación. Este es un resultado ventajoso desde el punto de vista de aplicación potencial porque los últimos sistemas son inyectables antes de la gelificación. El trabajo también ha demostrado que las propiedades mecánicas de los compuestos de hidrogel se pueden sintonizar por la composición utilizada para su preparación. Los valores del módulo obtenidos en este trabajo (1000–30,000 Pa) coinciden con los de un intervalo de tejidos blandos del cuerpo. Además, la capacidad de ajustar los valores de módulo sugiere que las propiedades mecánicas de estos compuestos de hidrogel serán apropiadas para aplicación en la reparación del disco intervertebral.
- 30
- 35

Ejemplo 3 - La reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado (para formar composiciones de la invención)

- 40 Se adicionaron 2.5 ml de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA)-GMA (16% en peso) a una mezcla de 0.2 ml de solución de persulfato de amonio (10% en peso en agua), 0.5 ml de NaOH acuoso 2 M y 0.8 ml de agua DI por agitación. El pH final se mantuvo entre 7.5 y 8.5. La dispersión se calentó a la temperatura deseada. En el caso de preparaciones realizadas a 37°C, se adicionó TEMED a concentraciones entre (2 y 50 mM).

- 45 La figura 9 muestra una imagen fotográfica de: (a) una dispersión de microgel 2B (a pH = 7.3); (b) un microgel 2BG reticulado; y (c) un microgel 2BG reticulado que se ha hinchado en agua de pH neutro. Para cada gel mostrado en la figura 9, la concentración inicial de microgel correspondió a 7% en peso. Los geles se prepararon utilizando el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 2 a una temperatura de 50°C, y en ausencia de TEMED adicionado.

- 50 La figura 10 muestra las imágenes de micrografía por barrido electrónico de: (a) un microgel 2BG reticulado y (b) una dispersión de microgel no reticulado (Microgel 2B), ambas a la misma concentración de partículas (10% en peso). La imagen SEM se obtuvo utilizando un instrumento Philips FEGSEM. La muestra (a) se preparó utilizando el método descrito en el Ejemplo 2 anterior y la muestra (b) se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Método 1. En el caso de la muestra (a) no se adicionó TEMED y la reacción se realizó a 50°C.

Caracterización

(i) Relación de volumen de hinchazón (q_{gel}) para geles reticulados de Microgel 2BG medida después de 7 días como una función del pH.

También se muestran los datos medidos en una solución salina estandarizada con fosfato (PBS). El valor para q_{gel} se midió utilizando la relación del volumen de gel a un pH dado para el volumen del gel libre de agua (en seco). Esto se hizo gravimétricamente después de secar el exceso de agua del gel hinchado utilizando papel de seda.

El microgel reticulado doble se preparó utilizando calentamiento a 50°C como se describe para el Ejemplo 2. Sin embargo, en este caso no se adicionó TEMED.

Los resultados se muestran en la figura 11.

(ii) Efecto de la concentración de partículas de microgel 2BG utilizado durante la reticulación en (a) G' y (b) $\tan\delta$ como una función de la tensión.

El microgel reticulado doble se preparó utilizando calentamiento a 50°C utilizando el Ejemplo 2 en ausencia de TEMED adicionado. Los valores de γ^* se determinaron como se ha descrito anteriormente. La instrumentación de la reología también fue descrita anteriormente.

Los resultados se muestran en la figura 13. La fracción de volumen de polímero utilizada durante la preparación se muestra en la leyenda. [Multiplicar por un factor de 100 para convertir a % en peso] La variación de G' , γ^* y $\tan\delta$ con la fracción de volumen de polímero se muestran en (c) y (d). El pH de estos datos fue 7.8. En estas mediciones, y las otras dadas en los ejemplos, se utilizó la frecuencia de oscilación 6.3 rad/s a menos que se indique lo contrario.

(iii) Variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con la tensión para microgeles reticulados preparados.

Los datos se obtuvieron utilizando Microgel 2BG (rombos abiertos) y 3G (rombos cerrados). La doble reticulación se realizó a 37°C utilizando persulfato de amonio (22 mM) y 10% en peso de la microgel durante 17 h utilizando el Ejemplo 2 en ausencia de TEMED adicionado. El valor de γ^* para 3G doblemente reticulado está en la vecindad de 500%. Para estos experimentos el hidrogel se preparó *in situ* en el reómetro justo antes de que se produzcan las mediciones utilizando el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la figura 14.

(iv) Variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con la tensión para microgeles doblemente reticulados preparados a partir de Microgel 2BG y TEMED (7.98 mM).

La reticulación se realizó a 37°C. Se muestra el tiempo de reacción. Los valores estimados para g^* es de 195% para el sistema después de 120 minutos de reacción. El sistema se preparó utilizando 10% en peso de Microgel 2BG.

Esta se midió después reticulación *in situ* dentro del reómetro utilizando el procedimiento del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la figura 15.

Ejemplo 4 - La reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado (para formar composiciones de la invención)

En general, se preparó la composición de partículas de microgel doblemente reticulado (microgel DX) utilizando $\phi_p = 0.10$, pH = 7.8, 22 mM de APS y una temperatura de reacción de 50°C. Se adicionó el microgel GM-funcionalizado (por ejemplo, Microgel GM-MEGD del Método 3A) a la solución de NaOH/APS con la mezcla vigorosamente durante aproximadamente 5 minutos para formar un gel físico a temperatura ambiente. Después de mezclar completamente la dispersión gelificada físicamente se calentó a 50°C, durante 8 h, y se dejó reaccionar para producir DX GM-M-EGD.

Para las mediciones realizadas utilizando reología de la reticulación se llevó a cabo *in situ* dentro del reómetro durante al menos 1 h antes de comenzar las mediciones. Para las muestras más grandes preparadas para mediciones de hinchazón el tiempo de reacción fue de 8 h.

La figura 9A muestra una imagen fotográfica SEM de: (a) Microgel M-EGD (del Método 1A); (b) microgel GM-MEGD (del Método 3A). Las partículas son esféricas, aunque las polidispersidades son significativas. La Tabla 2 muestra que los tamaños de partículas promedio en número para estos dos microgeles fueron aproximadamente 130 nm y no afectadas significativamente por la funcionalización. La comparación de los diámetros medidos por SEM y también PCS (a pH = 4) muestra que son similares. Esto indica que no había agregación insignificante de las partículas en la dispersión.

Tabla 2

Código	% Mol. de MAA ^a	% Mol. GMA ^a	$d_{n(sem)}$ / nm (CV) ^b	$d_{h(4)}$ ^c / nm	$d_{h(8)}$ ^c /nm	$Q_{(8)}$ ^d	pK_a ^e
M-EGD	35.9	-	131 (14)	139	232	4.7	7.4

GM-M-EGD	34.1	1.8	133 (20)	131	323	15	7.1
GM(H)-M-EGD	35.9	5.8		133	315	13	6.0

^a Determinado a partir de los datos de titulación potenciométrica. El % mol de GMA se determinó a partir de la diferencia en el% molde MAA en el microgel antes y después de la funcionalización.

^b Diámetros promedio en número determinados a partir de imágenes SEM. El número entre paréntesis es el coeficiente de variación.

^c Diámetro hidrodinámico a valores de pH de 4 y 8.

^d Relación calculada utilizando valores $d_{h(8)}$ y $d_{(4)}$ de microgel original de acuerdo con la ecuación (1) - véase el texto.

^e Valores de pK_a aparentes. Estos son los valores de pH que corresponden a 50% de neutralización.

La figura 10A muestra las imágenes de micrografía por barrido electrónico de las muestras liofilizadas de: (a) DX GM-M-EGD y (b) M-EGD (esto es, la muestra se preparó utilizando $\phi_p = 0.10$ y $pH = 7.8$). Las inserciones para (a) y (b) muestran unas imágenes de un microgel independiente DX GM-M-EGD y una dispersión M-EGD gelificado físicamente, respectivamente. Se obtiene una imagen SEM utilizando un instrumento Philips FEGSEM. La muestra (a) se preparó utilizando el método descrito en el Ejemplo 2A anterior y la muestra (b) se preparó utilizando el procedimiento descrito en el método 1A. La liofilización tiene una tendencia a producir huecos de tamaño micrométrico como consecuencia de la formación de hielo durante la inmersión de la muestra en nitrógeno líquido. Sin embargo, se encontró que características en la escala de las partículas individuales fueron menos comunes con los geles de DX (Figura 10A (a)) en comparación con el gel SX M-EGD original (Figura 10A (b)), lo que puede indicar un mayor grado de interpenetración entre partículas. Las partículas de GM-M-EGD tuvieron una mayor tendencia a hincharse de las partículas de M-EGD (véase más adelante).

Caracterización

(i) Relación de volumen de hinchazón (Q) para geles reticulados de Microgel DX GM-M-EGD como se prepara en el Ejemplo 4 después de 8 días en función del pH.

Este microgel doble reticulado fue DX GM-M-EGD como se preparó en el Ejemplo 2A.

Las mediciones físicas se llevaron a cabo como se describe anteriormente.

En el siguiente estudio se estudiaron las propiedades mecánicas de los microgeles DX que se les permitió alcanzar el equilibrio de hinchazón. Utilizamos las condiciones justo por debajo del valor ϕ_p crítico de 0.10 porque esto fue una prueba más rigurosa de si microgeles DX de hecho podrían sobrevivir la hinchazón sin desintegración. Además, el gel SX tenía valores G' suficientemente bajos que eran fluidos cuando fueron cizallados por inversión del tubo. Esto significa que estas mezclas serían inyectables a través de una jeringa de calibre estrecho. Eso sería ventajoso para la reparación de tejidos blandos si se utilizó reticulación a temperatura baja.

Los microgeles DX hinchados fuertemente en solución reguladora o agua. El microgel DX GM-M-EGD se hinchó tan fuertemente en el agua que se fragmentó macroscópicamente después de varios días. Esto demuestra que la reticulación entre partículas no era lo suficientemente fuerte como para soportar la presión de hinchazón dentro de las partículas. Si el microgel DX se colocó en soluciones solución reguladora (fuerza iónica de aproximadamente 0.1 M) dieron geles sólidos que no se fragmentan. La fuerza iónica alta reduce el grado de hinchazón y muestra la importancia de la repulsión electrostática en la hinchazón de estos microgeles DX.

Los valores Q_{DX} para los microgeles DX se midió como una función del tiempo (Figura 12A).

La figura 12A. Muestra (a) relaciones de hinchazón como una función del tiempo para DX GM-M-EGD preparados utilizando $\phi_p = 0.08$. Las líneas son guías para los ojos. (b) Variación de relaciones de hinchazón medido después de 8 días con pH para los microgeles DX GM-M-EGD (cuadrados sólidos), DX GM-EGD (PBS) (cuadrados abiertos) y SX GM-M-EGD (rombos abiertos - esto es producto de método 3A, microgel originales). El pH inicial fue de 7.8. Las ecuaciones utilizadas para estos datos fueron (1) y (2).

La hinchazón fue lenta debido a la naturaleza compactada cerca de estos geles doblemente reticulados. Tenemos la hipótesis de que una estrecha disposición por paquetes de partículas era un requisito para la preparación de geles de soporte de carga. Los microgeles DX de Cho et al.⁸ se formaron mediante un procedimiento diferente (interacciones atractivas) y mucho más rápido había hinchazón cinética debido a su morfología más abierta. Los datos mostrados en la figura 12A revela una diferencia significativa entre los valores Q_{DX} y los valores de Q para los microgeles SX GM-M-

EGD. La causa del aumento de la hinchazón de los microgeles DX GM-M-EGD se debe aumentar la hinchazón entre las partículas, esto es, una densidad de reticulación entre partículas inferior. Esto sugeriría un M_c superior en la periferia de las partículas (que une las partículas) que en el interior de las partículas. Esto parecería razonable teniendo en cuenta (a) la funcionalización GMA bajo (1.8% mol) para el microgel DX GM-M-EGD y (b) la fragmentación que se produjo para este sistema cuando se hincha por el agua.

La figura 12A.1 muestra relaciones de hinchazón para (a) microgeles DX GM-M-EGD y DX GM (H)-M-EGD, así como (b) microgel DX GM-E-BDD como una función del tiempo medido a diferentes valores de pH. Las líneas son guías para los ojos. Los microgeles DX se hincharon en soluciones de solución reguladora cuando el pH era mayor que o igual a 7.4 y dio geles robustos que no fragmentan. Los microgeles DX necesarios al menos 1 día para llegar a la hinchazón completa. Este es el soporte para una morfología que llena el espacio que está libre de microporosidad significativa y es consistente con las imágenes de SEM (Figuras 10A). Esta hinchazón más lenta es diferente a la hinchazón rápida (minutos) observada para microgeles DX preparados por una agregación en puente. Se sugiere que la morfología libre de poros (en la escala micrométrica) de estos microgeles DX contribuye a sus altos valores de G' .

Como un estudio final, se probaron los comportamientos reológicos de los geles de equilibrio DX hinchados (Figura 12A-1). Se seleccionaron microgeles DX preparados en valores ϕ_p bastante bajos con el fin de obtener altas relaciones de hinchazón. Los datos de amplitud de tensión aparecen en la figura 12A-2. Los geles utilizados para esta figura fueron los de la figura 12A.

La figura 12A-1 muestra (a) Variación de G' y $\tan\delta$ con pH para microgeles DX GM-M-EGD. Los triángulos y rombos son G' y $\tan\delta$, respectivamente. Los símbolos cerrados muestran puntos de datos obtenidos utilizando PBS. (b) Variación de γ^* con el pH de los microgeles DX. La doble reticulación se realizó utilizando $\phi_p = 0.08$ (pH = 7.8) y las muestras se hincharon en los valores de pH que se muestran durante 8 días antes de la medición.

La figura 12A-2 muestra la variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con la tensión para microgeles DX GM-M-EGD después de la hinchazón a diferentes valores de pH (o en solución salina estandarizada con fosfato, PBS) durante 8 días. La frecuencia utilizada fue de 1 Hz. Las relaciones de hinchazón de estos microgeles DX se muestran en la figura 12A-1.

De modo interesante, los valores G' alcanzaron ca. 10^6 Pa al pH más bajo (3.8). Este proceso de mejora de G' comenzó una vez que el pH se disminuyó a menos de o igual a 5.8. Una disminución en el valor de M_c se produce cuando el pH disminuye. El enlace de hidrógeno entre los grupos RCOOH cercanos también puede contribuir a la disminución de M_c . A pH = 3.8 el microgel DX era frágil y valor γ^* disminuyó a aproximadamente 2% (Figura 10 (b)). A pH = 7.4 estos microgeles DX contienen aproximadamente 98% de agua en el equilibrio de hinchazón y tienen un módulo de aproximadamente 10^3 Pa con γ^* de 8.4%. Estos valores pueden ser apropiados para la aplicación potencial como dispersiones inyectables para la reparación de tejidos blandos. La capacidad de ajuste de estas propiedades debe ser alcanzable a través del valor ϕ_p utilizado durante la formación del microgel DX y también a través de la selección de monómeros.

(ii) Variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con la tensión para microgeles reticulados preparados.

La siguiente ecuación, que se origina a partir de la teoría de la elasticidad del caucho, se puede utilizar para describir el módulo de una red^{20,21}.

$$G \cong \frac{\rho RT}{M_c} \quad (7)$$

Para la ecuación (7) G es el módulo de cizallamiento, ρ es la densidad del polímero, R y T tienen sus significados usuales y M_c es el peso molecular promedio en número entre reticulaciones. Este último es el peso molecular de las cadenas elásticamente eficaces. El valor para G' debe aumentar con la disminución de M_c . Esto tendrá dos contribuciones de microgeles DX; reticulaciones intra-partículas e inter-partículas.

La reología dinámica se utilizó para investigar las propiedades mecánicas de los geles DX. Los datos de amplitud de tensión se muestran en la figura 14A-1. Estos datos consisten en los dos geles físicos SX originales (M-EGD o E-BDD y GM-M-EGD o GME- BDD) y los respectivos microgeles DX (DX GM-M-EGD o DX GM-E-BDD). La figura 14A-1 muestra una comparación de las mediciones de amplitud de tensión para microgeles DX y SX basados en M-EGD ((a) y (b)) y E-BDD ((c) y (d)). Los datos se obtuvieron en la misma fracción de volumen de partícula (0.10) y pH (7.8). La frecuencia utilizada fue de 1 Hz. Las flechas en (c) y (d) muestran el cambio brusco en los valores que se produjeron de G' y $\tan\delta$.

Se puede observar que se ha producido un ligero aumento en G' tanto de geles físicos funcionalizados GM en comparación con los microgeles originales respectivos. Esto se atribuye a la mayor hidrofobicidad de microgeles funcionalizados de GM. Es importante destacar que hay un aumento importante en G' bajo doble reticulación. Por otra

parte, las tendencias para los valores G' (Figura (14A-1 (a) y (c)) para disminuir y los valores $\tan\delta$ (Figura 14A-1 (b) y (d)) para aumentar a alta tensión son muy disminuidos como consecuencia de la doble reticulación. Ambos de estos comportamientos son evidencia indirecta de reticulación inter-partículas.

Se puede observar en la figura 14A-1 (d) que los valores $\tan\delta$ son excepcionalmente bajos para microgel DX GM-E-BDD con un promedio de $\tan\delta$ ca. 0.01. Esto significa que la pérdida de energía de disipación era menos de 1% de la energía almacenada en esta red microgel DX. Las propiedades mecánicas del microgel DX GM-E-BDD fue casi completamente elástico. De modo interesante, este microgel DX no muestra avería de la red inducida por tensión hasta que la tensión alcanza 50% (Figura 14A-1 (c)). Todos los microgeles estudiados en este documento en general, satisfacen un criterio clave para ser considerados como geles^{22,23}, esto es, $\tan\delta < 1.0$. Sin embargo, para el microgel DX GM-E-BDD $\tan\delta$ también es independiente de la frecuencia, que es un segundo criterio que muchos geles no satisfacen.

La figura 14A-1.1 muestra amplitud de tensión ((a) y (b)) y barrido de frecuencia ((c) y (d)) para DX GM (H) -M-EGD, DX GM-E-BDD y microgeles DX GM-M-EGD, donde los microgeles DX se prepararon a $\phi_p = 0.10$ y $pH = 7.8$.

Se esperaba que M_c fuera inversamente proporcional al grado de funcionalización. Por lo tanto, se esperaba que G' aumente con funcionalización de acuerdo con la ecuación (7). Esto se investigó mediante microgeles DX GM-M-EGD y DX GM (H) -M-EGD. Estos últimos tenían una mayor funcionalización GM (5.8% mol cf. 1.8% mol). La amplitud de la tensión y los datos de reología de barrido de frecuencia para los microgeles DX GM(H) -M-EGD y GM-M-EGD se muestran en la figura 14A-1.1. La comparación de los datos que se muestran en las figuras 14A-1.1 (a) y (b), es evidente que los valores de G' para DX GM (H) -M-EGD son mucho más altos que los de GM DX-M-EGD. En una tensión del 1% del valor de G' para DX GM (H) -M-EGD fue 18,800 Pa, y es seis veces el valor de DX GM-M-EGD. Este es un módulo alto para un gel que sólo ocupa 10% vol. del volumen total. Además, el valor de $\tan\delta$ disminuyó a 0.045. La dependencia de la frecuencia de G' y también $\tan\delta$ se redujo en gran medida (Figura 14A-1.1 (c) y (d)). El microgel DX GM (H) -M-EGD es menos dúctil ya que $\tan\delta$ aumenta más a una tensión inferior (Figura 14A-1.1 (b)). El valor de γ^* es de 8.0%. Todos estos cambios son indicativos de un valor M_c más pequeño como consecuencia de un mayor grado de funcionalización de GM para DX GM (H) -M-EGD. Los cambios de G' y γ^* para este sistema se ajustan generalmente lo que se espera de un hidrogel convencional y que atribuyen estos cambios en el aumento de la reticulación entre partículas. Estos datos muestran que el módulo y ductilidad para los microgeles DX GM-M-EGD son ajustables utilizando la medida de funcionalización GM.

(iii) Variación de (a) G' y $\tan\delta$, así como (b) γ^* con fracción de volumen de partículas de microgel de microgeles doblemente reticulados del Ejemplo 4

También se investigó el efecto de la fracción de volumen de GM-M-EGD utilizado durante la doble reticulación.

La figura 16A muestra (a) Efecto de la fracción de volumen de GM-M-EGD utilizada durante doble reticulación en G' y $\tan\delta$. (b) La variación de γ^* con la fracción de volumen de polímero. El pH utilizado para obtener estos datos fue 7.8. Una tensión y frecuencia de 1% y 1 Hz se utilizó para obtener los datos mostrados en (a).

Los datos muestran un aumento de G' con ϕ_p . Por otra parte, $\tan\delta$ aumenta con ϕ_p lo que sugiere un aumento de la disipación con concentraciones altas de microgel. La figura 16A (a) muestra un incremento de G' cuando ϕ_p alcanza 0.10. La figura 16A (b) muestra que esa γ^* aumenta fuertemente cuando ϕ_p alcanza 0.10. Estos datos sugieren un valor ϕ_p crítico de aproximadamente 0.10, donde la reticulación entre partículas se hace cada vez más pronunciada. Presumiblemente, los valores más altos ϕ_p resultan en interpenetración más extensa en la periferia de las partículas. Estos datos muestran que el G' del microgel DX puede ser fácilmente ajustado simplemente mediante el uso de la concentración de partículas de microgel.

(iv) Variación de (a) G' y $\tan\delta$, así como (b) γ^* con pH utilizado durante la reticulación en el Ejemplo 4.

Se investigó el efecto de pH utilizado durante doble reticulación. Se utilizó una concentración de partículas de $\phi_p = 0.10$ para estos experimentos. Consideremos en primer lugar los datos de los experimentos amplitud de tensión (Figura 14A-2).

La figura 14A-2 muestra los datos de amplitud de tensión para microgeles DX GM-M-EGD preparados y medidos en diferentes valores de pH (que se muestran en la leyenda). El valor para ϕ_p fue de 0.10. Los datos representados se obtuvieron utilizando 1 Hz.

Se puede observar que G' no cambia significativamente con la tensión (γ) en el intervalo de tensión de 0.1 a 10% para los valores de pH entre 7.3 y 8.3. Este, sin embargo, comienza a disminuir a valores de tensión más altos. Estos datos muestran que el aumento del pH durante la preparación (hasta 8.3), aumenta tanto G' como también la tensión requerida para interrumpir la red. Más allá de un pH de 8.3 a continuación, ambos parámetros disminuyen. Cuando el pH fue mayor que o igual a 9.6, $\tan\delta$ es mayor que 1.0 y el material sigue siendo fluido.

La figura 14A-3 muestra los datos tomados de los espectros mecánicos (promedio de la tensión y frecuencia de barrido). Observar para (c) que sólo se muestran los datos de los geles ($\tan\delta < 1.0$). Los datos utilizados son de 1% de tensión y 1 Hz. Las líneas verticales que se muestran en (a) y (b) son el valor de pK_a para GM-M-EGD. La curva en (c) es una guía para el ojo.

- 5 Se puede observar en la figura 14A-3 que los valores de G' aumentaron en aproximadamente factores de 2 y 7, respectivamente, para los microgeles DX GM-M-EGD y GM-E-BDD. Esto implica que M_c disminuyó en un factor de 2 para el DX GM-M-EGD. Para la serie DX GM-E-BDD M_c debe haber disminuido por un factor de aproximadamente 7. Estos cambios de datos son generalmente consistentes con la ecuación (3), ya que el primero debe tener un M_c mucho más bajo debido al % mol de GMA mucho mayor incorporado (Tabla 1).
- 10 La tensión rendimiento (γ^*) se define en este documento como la tensión a la que G' disminuye al 95% de su valor en 1% de tensión²⁴. Esto aumenta de aproximadamente 8% para los geles SX (Figura 14A-3 (c)) hasta más del 30% para el gel DX GM-M-EGD y 55% para el gel DX GM-E-BDD. El aumento de este valor es una indicación de las cadenas relativamente flexibles que unen los microgeles juntos. Esto podría ser debido a las cadenas extendidas de las partículas en la periferia que han interpenetrado y reticulado con cadenas de partículas vecinas.
- 15 Los geles físicos deben formar primero en orden para una red de microgel unido covalentemente para formar posteriormente. Se puede ver en la figura 14A-3 que los microgeles DX con los valores de G' más altos y valores de $\tan\delta$ más bajos se producen a valores de pH entre 7.3 y 8.3. De hecho, en este intervalo de pH (que incluye el pH fisiológico) tanto G' como γ^* aumentan con pH utilizado para preparar los microgeles DX. A valores de pH más altos γ^* aumenta (La fig 14A-3 (c).); sin embargo, G' disminuye y $\tan\delta$ aumentó por encima de 1.0 lo que indica que un fluido está presente. Esto es sugerente de un aumento de la masa molar entre puntos de reticulación en la periferia de las partículas. A valores de pH altos esto se convierte en insuficiente para permitir la formación de gel.

El valor de γ^* será sensible a los valores M_c dentro y entre las partículas de microgel. El aumento de γ^* con pH para los microgeles DX GM-M-EGD (Figura 14A-3 (c)) sugiere que cadenas eficaces elásticamente ya están presentes en la periferia de las partículas a pH alto. A pH = 9.6, el gel se aproxima el estado fluido ($\tan\delta$ cercano a 1.0). El valor de G' fue bajo (96 Pa). Sin embargo, ese sistema tenía el valor más alto de γ^* 64%. Por otra parte, que la muestra fue completamente transparente (sin turbidez). A valores de pH más altos de las dispersiones no formaron geles físicos o unidos covalentemente. Es probable que el electrolito provocara colapso de partículas a pH alto (debido a la detección) redujo la extensión de la inter-penetración de la partícula hasta el punto que no se produjo la gelificación física.

- 25

Conclusiones

- 30 En este trabajo, ha sido demostrado un nuevo método general para preparar microgeles DX. Este método utiliza sólo microgeles funcionalizadas y se ha utilizado para preparar dos nuevas familias de microgeles DX sensibles a pH; DX-GM MEGD y DX GM-E-BDD. Estos microgeles DX no se vuelven a dispersar en soluciones reguladoras 0.1 M en el intervalo de pH 3.8 y 9.2 o PBS (0.15 M). Las propiedades mecánicas de los geles DX como hechos son fuertemente dependientes de pH y también se utiliza para la preparación ϕ_p . Esto ofrece una oportunidad considerable para la sintonización de estas propiedades para aplicaciones específicas, por ejemplo, para la reparación de los tejidos blandos y/o soportar carga. Este estudio ha demostrado que la tensión de módulo y rendimiento se puede controlar mediante las condiciones de preparación.
- 35

Las propiedades mecánicas de los microgeles DX parecen estar determinado fuertemente por las del microgel original y también el grado de funcionalización. Los datos revelan que de alto módulo de los geles físicos dará lugar a valores de varios módulos para la respectiva microgel DX. Sin embargo, el grado de aumento del módulo en dobles de reticulación aumenta con el % mol de GMA incorporado. La ductilidad de los microgeles, como se juzga por γ^* , depende de la reticulación inter-partículas y aumenta considerablemente cuando un ϕ_p mayor que o igual a 0.10 se utiliza durante la preparación DX. El estudio ha demostrado que las dispersiones inyectables que pueden formar microgeles DX se puede lograr utilizando $\phi_p = 0.08$. Si se requieren alto G' y rendimiento de tensión, se deben utilizar valores de ϕ_p más altos.

- 45 El microgel DX GM-E-BDD utilizado en este estudio para demostrar la generalidad se demostró que era notable en términos de sus propiedades elásticas. Se encontró que comportarse como un gel reológicamente casi perfecto ($\tan\delta$ cercano a cero e invariante con frecuencia y alto γ^*) y componente viscoso excepcionalmente bajo. Esto podría ser un gel nuevo importante para la reparación de tejidos blandos.

Ejemplo 5 - La reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado (para formar composiciones de la invención)

- 50 Dos tipos de microgeles que contienen MAA fueron preparados en este trabajo; M-EGD y E-BDD. La mayor parte del trabajo fue realizado en la serie M-EGD porque este sistema tiene mayor potencial aplicación en la reparación de tejidos blandos. M-EGD contiene comonomeros que han sido investigados para su aplicación en el cemento óseo (Hiratani, H.; Alvarez- Lorenzo, C. Biomaterials 2004, 25, 1105.) y lentes de contacto (Zhang, X. S.; Revell, P. A.; Evans, S. L.; Tuke, M. A.; Gregson, P. J. J. Biomed. Mater. Res. 1999, 46, 279). El monómero fundamental (MMA) es un componente

importante del cemento óseo. Los microgeles E-BDD se utilizaron para demostrar la generalidad de nuestro nuevo enfoque.

Los microgeles DX se prepararon utilizando una fracción de volumen de polímero de $\phi_p = 0.10$, pH = 7.8 y en presencia de 22 mM de APS a menos que se indique lo contrario. Se adicionó el microgel funcionalizado-AEM (Microgel AEM10-M-EGD obtenido de Método 3B) a una solución de NaOH/APS y luego se mezcla vigorosamente durante unos tres minutos. Después de mezclar completamente la dispersión gelificada físicamente se calentó a 50°C durante 8 horas para producir DX AEM-M-EGD.

En el caso de microgeles investigados utilizando reología, la reacción DX se realizó durante al menos 1 hora en el reómetro antes de que el sistema se enfrió a temperatura ambiente y los experimentos de reología realizados.

La figura 9B muestra una imagen fotográfica SEM de: (a) Microgel M-EGD (del Método 1A); (b) microgel E-BDD (del Método 2A). Imágenes de SEM representativas para los microgeles se muestran en la figura 1. Las partículas esféricas son evidentes.

La figura 10B muestra las imágenes de micrografía por barrido electrónico de las muestras secadas con aire (a temperatura ambiente) de: (a) DX AEM-M-EGD y (b) DX AEM-M-EGD (soplado encima de la imagen de la figura 10B (a)). La muestra se preparó utilizando ϕ_p ($[AEM]/[MAA]$) = 0.10 y pH = 7.8. La imagen SEM se obtuvo utilizando un instrumento Philips FEGSEM.

Estas muestras se secaron al aire (a RT) antes de SEM. Muestran evidencia de grietas de tamaño micrométricas y nanométricas. De modo interesante, algunas partículas de microgel se pueden ver en la superficie obtenida utilizando una gran ampliación. La similitud del tamaño de las partículas de microgel M-EGD originales con las características rodeadas de grietas en la figura 10B (b) conduce a la sugerencia de que las grietas se forman en las interfaces entre los agregados vecinos. Si se confirma, esto indicaría que la periferia entre los agregados es el punto más débil de la matriz microgel DX.

Caracterización

(i) Variación de (a) G' y (b) $\tan\delta$ con la tensión para microgeles reticulados preparados de acuerdo con el ejemplo 5.

Los microgeles DX se prepararon a partir microgeles gelificados físicamente. Por lo tanto, el comportamiento reológico de las dispersiones de microgel reticuladas por separado se estudió en los mismos valores de pH y ϕ_p utilizados para doble reticulación.

La figura 14B-1 muestra barridos de amplitud de tensión ((a) y (b)) y barridos de frecuencia ((c) y (d)) para dispersiones concentradas de microgel SX AEM-M-EGD. Las leyendas dan las relaciones $[AEM]/[MAA]$ utilizadas para la preparación de los microgeles AEM funcionalizados. También se muestran los datos para microgel E-BDD. Las mediciones se hicieron utilizando 1 Hz (amplitud de tensión) o 1% de tensión (barrido de frecuencia) utilizando $\phi_p = 0.1$ y pH = 8.4.

En la figura 14B-1 se puede ver que hay una gran diferencia entre el comportamiento reológico dinámico para los microgeles M-EGD y E-BDD concentrados. El primero es un gel débil; mientras que, el último tiene una elasticidad y una tensión de rendimiento mucho mayor. Tras el trabajo relacionado (Choungnet, A.; Audibert, A.; Moan, M. Rheol. Acta 2007, 46, 793), la tensión de rendimiento (γ^*) se define en este documento como la tensión a la que G' se ha reducido a un 95% de su valor en 1% de tensión. La variación de G' y γ^* se muestran en la figura 14B-2.

La figura 14B-2 muestra la variación de la tensión de rendimiento de (a) G' y (b) con una relación $[AEM]/[MAA]$ para dispersiones concentradas de microgel reticuladas por separado. Los datos se obtuvieron utilizando $\phi_p = 0.1$ y pH = 8.4. Los puntos de datos para E-BDD se obtuvieron utilizando pH = 7.8. Se obtuvieron los datos para (a) al 1% de tensión y 1 Hz.

Basándose en la ecuación (3) se sugiere que el principal aumento de G' para E-BDD en comparación con M-EGD (factor de 50) se debe a la mayor superposición e inter-penetración del microgel. Esto probablemente también explica el mayor valor para γ^* (factor 2.5 veces mayor).

También se puede ver en la figura 14B-2 que el G' aumenta sustancialmente con relación $[AEM]/[MAA]$ utilizada para la preparación. El aumento máximo es también un factor de aproximadamente 50. Sin embargo, en este caso γ^* no ha aumentado, pero es aproximadamente el mismo. Esto sugiere que no hay una mejora en la superposición para el gel en su conjunto. Los datos PCS (Figura 2) indican que no se produjo inflamación adicional como resultado de funcionalización como se esperaba, ya que hay menos grupos MAA presentes en el microgel funcionalizado. Por lo tanto, se puede concluir que los aumentos en G' observados para estos geles físicos de funcionalización es debido a un aumento de la tendencia de los agregados de la partícula para formar contactos físicos a través de la asociación hidrófoba. De hecho, se observó que las dispersiones de microgel funcionalizado tenían una tendencia a la separación de fases si se deja durante largos periodos de tiempo (mes) los que indica que se ha producido la agregación. Estos

datos a continuación, muestran que el aumento de la hidrofobicidad de las partículas de microgel se agrega un componente hidrófobo a los contactos de partícula-partícula que se producen durante la doble reticulación. Este componente domina el comportamiento del gel para los microgeles M-EGD AEM funcionalizados. Se puede sugerir que estas dispersiones concentradas constan de hinchado, los agregados con una periferia hidrófobo que es rica en grupos de AEM.

Mediciones de reología dinámica se hicieron utilizando los microgeles DX como se han obtenido a partir del Ejemplo 2.

La figura 14B-3 muestra barridos de amplitud de tensión ((a) y (b)) y barridos de frecuencia ((c) y (d)) para microgeles DX AEM-MEGD. Las leyendas dan las relaciones $[AEM]/[MAA]$ utilizadas para la preparación. Las mediciones se hicieron utilizando 1 Hz (amplitud de tensión) o 1% de tensión (barrido de frecuencia) utilizando $\phi_p = 0.1$ y $pH = 8.4$. Los datos para un microgel funcionalizado GM (DX GM-M-EGD) doblemente reticulado también se muestran para comparación.

Los datos mostrados en la figura 14B-3 revelan que los microgeles DX tenían valores G' consistentemente más altos que los microgeles SX (Compárese con la figura 14B-1). Tanto los sistemas de microgel SX y DX tendían a sufrir una disminución importante en el aumento de G' y en $\tan\delta$ cuando la tensión superó aproximadamente el 10%. Los datos también permiten la comparación entre los dos métodos de funcionalización. El valor de G' máximo alcanzado por los microgeles DX AEM-M-EGD ($[AEM]/[MAA] = 0.5$) es de aproximadamente un factor de 4,5 que consigue utilizando el método de GMA-funcionalización. Estos datos sugieren que el método de funcionalización AEM proporciona microgeles DX con mayor elasticidad que los obtenidos utilizando funcionalización GM¹.

Los datos de G'' y $\tan\delta$ dependiente de la frecuencia se muestran en la figura 9 (c) y (d). Los gradientes son muy bajos (especialmente para $\tan\delta$ frente a la frecuencia) que indica el comportamiento similar a un gel como se identifica por los criterios de Winter and Chambon²⁰⁻²¹. El intervalo de valores son los mismos que para los geles físicos que contienen partículas funcionalizadas AEM (Figura 5 (c) y (d)) y confirma que los microgeles DX preservan los componentes de disipación bajos de sus propiedades reológicas.

(ii) Variación de (a) G' y $\tan\delta$ así como (b) γ^* con condiciones de preparación de microgeles doblemente reticulados del Ejemplo 5

La figura 14B-4 muestra el efecto de las condiciones de preparación en las propiedades mecánicas de microgeles DX. Los valores G' y $\tan\delta$ para microgeles DX y SX como una función de relación $[AEM]/[MAA]$ utilizado para preparar los microgeles funcionalizados se muestran en (a) y (b). Los valores G' y γ^* se representan como una función de % mol de AEM presente dentro de los microgeles funcionalizados en (c) y (d). Los valores para el microgel DX GM-M-EGD se muestran como las líneas horizontales. Los datos se midieron a 1% de tensión. Se obtuvieron los datos mediante $\phi_p = 0.10$ y $pH = 8.4$.

Los datos de G' y $\tan\delta$ dependientes de la frecuencia se muestran en la figura 9 (c) y (d). Los gradientes son muy bajos (especialmente para $\tan\delta$ frente a la frecuencia) que indica el comportamiento similar a un gel como se identifican por los criterios de Winter and Chambon (Winter, H. H. Polim. Eng. Sci. 1987, 27, 1698; y Winter, H. H.; Chambon, F. J. Rheol. 1986, 30, 367). El intervalo de valores son los mismos que para los geles físicos que contienen partículas funcionalizadas AEM (Figura 14B-1 (c) y (d)) y confirma que los microgeles DX preservan los componentes de disipación bajos de sus propiedades reológicas.

Los datos tomados de la figura 14B-3 a una frecuencia y tensión de 1 Hz y 1%, respectivamente, se muestran en la figura 14B-4. El contraste entre microgeles DX y SX es muy claro en mayores grados de funcionalización. La comparación de estos datos para los microgeles DX y SX respectivos (Figura 14B-4 (a) y (c)) muestra claramente que la reticulación proporciona un aumento de G' además a la contribución hidrófoba discutida anteriormente. El aumento de los valores de G' se puede atribuir a reticulación covalente adicional de los grupos de AEM. Por otra parte, G' para microgeles DX parece ser proporcional a la cantidad de AEM incorporado cuando el % mol AEM (exp) supera 3%. Los valores G' para los microgeles DX de hasta 10^4 Pa son valores respetables, dado que ϕ_p sólo 0.10. El uso de los valores más altos ϕ_p sin duda permitirá valores G' mucho más altos que se logran¹.

Un punto interesante se refiere a la capacidad de estos microgeles DX para soportar la tensión. Los valores de γ^* se muestran en la figura 14B-4 (d). Estos valores se encuentran entre 2.5 y 4.5% y no son significativamente diferentes a los de los respectivos microgeles SX AEM-M-EGD. El valor de γ^* para el microgel DX GM-M-EGD fue del 6.0%. Este fue un factor de 2 más alto que los valores de γ^* para el microgel original (M-EGD) y también significativamente mayores que los de los microgeles DX AEM-M-EGD. Aunque el método de funcionalización AEM ha dado lugar a un aumento importante en G' para los microgeles DX M-EGD, estos geles son inherentemente más frágiles. Presumiblemente, esto se debe a que la masa molar de las cadenas elásticamente eficaces en la periferia es baja. Esto podría indicar reducida inter-penetración de las periferias de los agregados en los geles físicos.

Conclusiones

En este estudio se investigó un nuevo método, que implica el acoplamiento EDC, para la preparación de microgeles funcionalizadas de vinilo con el fin de aumentar el módulo de microgeles DX. Los datos de la valoración indican que la funcionalización procede del exterior de los microgeles hacia el interior. La agregación parcial efectuada durante el proceso de funcionalización. Esto parece desempeñar un papel en la limitación del grado máximo de funcionalización que se puede lograr a aproximadamente 12% mol en total, esto es, aproximadamente 1/tercero de los grupos RCOOH. Los geles físicos (microgeles SX) formados en dispersiones concentradas que tuvieron una contribución hidrófoba para su elasticidad. La doble reticulación de las dispersiones parcialmente agregadas dio geles con alta elasticidad y esto es consistente con un grado relativamente alto de funcionalización. El módulo de los microgeles DX parece ser ajustable utilizando el % mol de AEM incorporado. Los resultados apoyan la sugerencia de que el acoplamiento EDC aumentaría la funcionalización y el módulo elástico. Las propiedades mecánicas de estos microgeles DX pueden ser controladas por su composición. En el trabajo anterior (Liu, R.; Milani, A. H.; Freemont, T. J.; Saunders, B. R. Manuscript submitted to Soft Matter 2011) el máximo G' alcanzado fue de 2,800 Pa. Una mejora de módulo elástico por aproximadamente un factor de 4.5 en comparación con el método anterior se encontró para el microgel DX AEM50-M-EGD. Sin embargo, estos microgeles DX son más frágiles, con una tensión de rendimiento que disminuye en aproximadamente un factor de 2. Esto es más probable debido a la superposición reducida entre los agregados debido a las periferias de partículas de microgel más hidrófobas. El trabajo futuro incluirá el lavado de los microgeles M-EGD con acetato de etilo antes de la funcionalización con el fin de aumentar la hinchazón y la superposición durante la doble reticulación. Se espera que la técnica aplique también a los microgeles AEM-E-BDD y esto es actualmente objeto de estudio. Un resultado exitoso muestra que la técnica es ampliamente aplicable a microgeles que contienen RCOOH.

Ejemplo 6 - La reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado por irradiación UV (para formar composiciones de la invención)

Se adicionaron 2.5 ml de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) -GMA (16% en peso) a una mezcla de 0.2 ml de Irgacure 2959 (10 % en peso en etanol), 0.5 ml de NaOH acuoso 2 M y 0.8 ml de agua DI por agitación. El pH final se mantuvo entre 7.5 y 8.5. La dispersión se expone a la luz UV durante 2.5 horas.

Caracterización

(i) Variación de (a) G' y $\tan\delta$, así como (b) γ^* con fracción de volumen de partículas de microgel para microgel 2BG doblemente reticulado.

Los resultados se muestran en la figura 16. Para convertir a % en peso se multiplican por ϕ_p 100. La doble reticulación se realizó en el uso de la irradiación UV utilizando Microgel 2BG utilizando el método descrito en el Ejemplo 6.

Ejemplo 7 - La reticulación de las partículas de microgel de vinilo injertado mediante la formación de una red de polímero interpenetrante (para formar composiciones de la invención)

Se utilizaron tres métodos:

Método A: En primer lugar, se adiciona el microgel. Por lo general, el sistema contenía 10% en peso de Microgel y 10% en peso de PEGDMA550, se adicionó una mezcla de 0.2 ml de solución de persulfato de amonio (10% en peso en agua), 0.5 ml de NaOH acuoso 2 M a una mezcla de 2.5 ml de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) -GMA (16% en peso), 0.36 ml de PEGDMA550 y 0.44 ml de agua DI por agitación. El gel débil final como mezcla se mantuvo en un baño de agua y se dejó reaccionar a la temperatura deseada.

Método B: En primer lugar, se adiciona el reticulante. En este caso, se adicionan 2.5 ml de poli (MMA/MAA/EGDMA) microgel -GMA (16% en peso) a una mezcla pre-preparada de 0.2 ml de solución de persulfato de amonio (10% en peso en agua), 0.5 ml de NaOH acuosa 2 M, 0.36 ml de PEGDMA550 y 0.34 ml de agua DI por agitación. Antes de que el microgel se adicione la mezcla de todos los otros materiales se mezclaron durante medio minuto. El líquido final como mezcla se mantuvo en un baño de agua y se dejó reaccionar a la temperatura deseada.

Cuando se requiera, se adicionó acelerador, TEMED, a la mezcla de persulfato de amonio y una solución de NaOH antes de microgel o se adicionó PEGDMA dentro del Método 6A y Método 6B. La adición de TEMED disminuyó el tiempo de reticulación y activar una temperatura de 37°C que es utilizado.

Método C: irradiación UV

En el caso de iniciación de luz UV, se adicionaron 2.5 ml de microgel poli (MMA/MAA/EGDMA) -GMA (16% en peso) a una mezcla de 0.2 ml de una solución de Irgacure 2959 (10% en peso en etanol), 0.5 ml de NaOH acuoso 2 M, 0.36 ml de PEGDMA550 y 0.44 ml de agua DI por agitación. Antes de que el microgel se adicionara la mezcla de todos los otros materiales se mezclaron durante medio minuto. El gel débil final como mezcla se coloca bajo luz UV durante 3 horas

Caracterización

Una composición de microgel reticulado de la invención formado por el método del Ejemplo 7, Método B (y en presencia de TEMED) se muestra en la figura 17. El material se preparó utilizando 10% en peso de PEGDMA550 y 10% en peso de microgel 2BG. El gel se preparó a 37°C. La barra de escala es en centímetros.

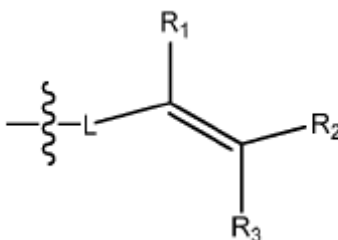
5 Variación de (a) G' y $\tan\delta$, así como (b) γ^* con % en peso de PEGDMA550 utilizada para preparar microgeles doblemente reticulados.

La concentración total de microgel 2BG y PEGDMA550 fue de 20% en peso. Cabe señalar que el único sistema PEGDMA550 no se formó un gel de relleno de espacio; mientras que, los otros sistemas hicieron. Los microgeles doblemente reticulados se prepararon utilizando reticulación UV, utilizando el proceso descrito en el Ejemplo 4, Método C. Los resultados se muestran en la figura 18.

10

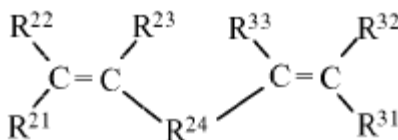
Reivindicaciones

1. Una composición que comprende una pluralidad de partículas de microgel, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas entre sí por cualquiera de
 - (i) un enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y/o
 - (ii) una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes y de este modo une las partículas entre sí, en donde la red de polímero se forma por la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo.
 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las partículas de microgel son sensibles al pH; y/o en donde las partículas de microgel comprenden un polímero seleccionado de poli(EA/MAA/EGDMA), poli(MMA/MAA/EGDMA), poli(EA/MAA/BDDA) o poli(MMA/MAA/BDDA).
 3. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas covalentemente entre sí, por enlaces cruzados covalentes formados por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel.
 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la unidad estructural que contiene vinilo es un grupo de la fórmula -L-B, en donde L es un enlace o grupo de unión; y B es un grupo que comprende un grupo funcional de vinilo;
- O
- en donde la unidad estructural de vinilo tiene la fórmula:



- en donde L es un enlace o un grupo de unión y R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan de H o alquilo (C_{1-3}).

5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas entre sí por una red de polímero reticulado que interpenetra las partículas de microgel adyacentes y de este modo une las partículas entre sí, en donde la red de polímero se forma mediante la polimerización de una soluble en agua de monómeros de reticulación que comprende dos o más grupos vinilo.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el monómero de reticulación tiene la siguiente fórmula:



en donde:

- (a) R^{21} , R^{22} , R^{23} , R^{31} , R^{32} y R^{33} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo lineal o ramificado; o un grupo N-alquilo de hasta 10 unidades de C; y
- en donde (b) R^{24} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en :-
- (i) $-C(=O)-O-R^{34}-O-C(=O)-$, en donde R^{34} puede comprender $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ o un grupo alquilo lineal o ramificado, tal como una cadena de metileno, que puede tener hasta 20 cadenas de C de longitud; o $-C_6H_4-$; o $C_6H_3R^{35}$, en donde R^{35} comprende sustituyentes tales alquilo, por ejemplo, CH_3 ; un grupo halógeno; o un grupo amida; u otros grupos di- o tri-fenilo sustituidos que contienen más de uno de estos sustituyentes;

- (ii) $-C(=O)-O-R^{36}-C(=O)-$, en donde R^{36} puede ser $-(CH_2CH_2O)_n-$ en donde n puede ser de 1 a 30;
- (iii) $-C(=O)-O-R^{37}R^{38}R^{37}-$, en donde R^{37} puede comprender enlaces éster degradables, por ejemplo, lactona, $-[(CH_2)_5C(=O)-O]_m-$, lactida, $-[CH(CH_3)C(=O)-O]_m-$, glicólido, $-[CH_2C(=O)-O]_m-$, en donde m puede ser de 1 a 50, y en donde R^{38} puede ser $-(CH_2CH_2O)_n-$, en donde n puede ser de 1 a 30;
- 5 (iv) $-C(=O)-O-R^{39}-$, en donde R^{39} puede comprender enlaces éster degradables, por ejemplo, lactona, $[(CH_2)_5C(=O)-O]_m-$, lactida, $[CH(CH_3)C(=O)-O]_m-$, glicólido, $[CH_2C(=O)-O]_m-$, en donde m es entre 1 a 100;
- (v) alilacrilatos, por ejemplo $-C(=O)-O-R^{40}-$, en donde R^{40} puede ser $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ o una cadena de metileno lineal, o ramificada hasta 20 cadenas de C de longitud, $o-C_6H_4-$, $C_6H_3R^{41}$, en donde R^{41} puede comprender sustituyentes, tales como alquilo, CH_3 , un halógeno o un grupo amida u otros grupos fenilo di- o tri-sustituidos que contiene más de uno de estos sustituyentes;
- 10 (vi) vinilbencenos, por ejemplo, C_6H_4 o $C_6H_3R^{42}$ en donde R^{42} comprende sustituyentes, tales como alquilo; CH_3 ; un halógeno o un grupo amida (véase (iii) arriba); u otros grupos fenilo sustituidos que contienen más de uno de estos sustituyentes;
- (vii) acrilamidas, por ejemplo $C(=O)-NR^{43}-R^{44}-NR^{45}C(-O)-$, en donde R^{43} y R^{44} se pueden seleccionar independientemente de un grupo que consiste en H; CH_3 ; un grupo alquilo lineal o ramificado; a grupo dialquilo; un grupo N-alquilo, de hasta 10 unidades de C; y en donde R^{44} puede comprender $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ o una cadena de metileno lineal, o ramificada de hasta 20 cadenas de C de longitud; o $-C_6H_4-$, $C_6H_3R^{41}$ en donde R^{41} comprende sustituyentes, tales como alquilo; CH_3 ; un halógeno o un grupo amida u otros grupos fenilo di- o tri-sustituidos que contiene más de uno de estos sustituyentes;
- 15 (viii) monómeros de reticulación trifuncional, en donde R^{24} comprende cualquiera de los grupos enumerados en (b), así como $R^{21}R^{22}C=CR^{23}$, donde R^{21} , R^{22} y R^{23} se describen en (a);
- (ix) monómeros de reticulación tetrafuncional, en donde R^{24} comprende cualquiera de los grupos enumerados en (b), así como $R^{21}R^{22}C=CR^{23}$ y $R^{31}R^{32}C=CR^{33}$, en donde R^{21} , R^{22} , R^{23} , R^{31} , R^{32} y R^{33} se describen en (a); y
- (x) en donde R^{24} puede contener cualquier combinación de los grupos enumerados en (b).
- 25 7. La composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las partículas de microgel adyacentes están unidas entre sí por ambos:
- (i) un enlace cruzado covalente formado por la reacción de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y
- 30 (ii) una red de polímero reticulado que interpenetra partículas de microgel adyacentes y de este modo une las partículas entre sí, en donde la red de polímero se forma por la polimerización de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo.
8. Un proceso para la preparación de una composición de acuerdo con la reivindicación 3, comprendiendo el proceso:
- (i) proporcionar, en un medio acuoso, una pluralidad de partículas de microgel que comprenden unidades estructurales funcionales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y
- 35 (ii) hacer que las partículas de microgel se hinchen de manera que las partículas de microgel adyacentes se ponen en contacto una con la otra y facilitan el acoplamiento de radicales libres de los grupos vinilo de unir de forma covalente partículas de microgel adyacentes entre sí.
9. Un proceso para la preparación de una composición de acuerdo con la reivindicación 5, comprendiendo el proceso:
- (i) proporcionar, en un medio acuoso, una pluralidad de partículas de microgel; y
- 40 (ii) hacer que las partículas de microgel se hinchen en presencia de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo tales que las partículas de microgel adyacentes se ponen en contacto una con la otra y facilitar la polimerización del monómero de reticulación para formar una red de polímero reticulado que interpenetra las partículas y une las partículas de microgel adyacentes.
10. Un proceso para la preparación de una composición de acuerdo con la reivindicación 7, comprendiendo el proceso:
- 45 (i) proporcionar, en un medio acuoso, una pluralidad de partículas de microgel que comprenden unidades estructurales funcionales que contienen vinilo injertadas sobre las superficies de las partículas de microgel; y

(ii) hacer que las partículas de microgel se hinchen en presencia de un monómero de reticulación soluble en agua que comprende dos o más grupos vinilo tales que las partículas de microgel adyacentes se ponen en contacto una con la otra; y

(iii) facilitando ambos:

- 5 (a) el acoplamiento de radicales libres de los grupos vinilo que unen de forma covalente partículas de microgel adyacentes entre sí; y
- (b) la polimerización del monómero de reticulación para formar una red de polímero reticulado que interpenetra las partículas y une partículas de microgel adyacentes entre sí.
- 10 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde facilitar la etapa (iii) comprende facilitar ambos (a) y (b) de forma simultánea.
12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o la reivindicación 11, en donde las partículas de microgel son causadas al hincharse por un cambio en el pH.
- 15 13. Un proceso de preparación de una partícula de microgel que comprende una pluralidad de unidades estructurales que contienen vinilo injertadas sobre la superficie de la partícula de microgel, el proceso que comprende hacer reaccionar una partícula de microgel con un compuesto de la fórmula:

Z-L-B

en donde L y B son como se definen en la reivindicación 4, y Z es un grupo reactivo adaptado para reaccionar con los grupos de función de la partícula de microgel.

- 20 14. Una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento del tejido blando dañado o degenerado.

Figura 1

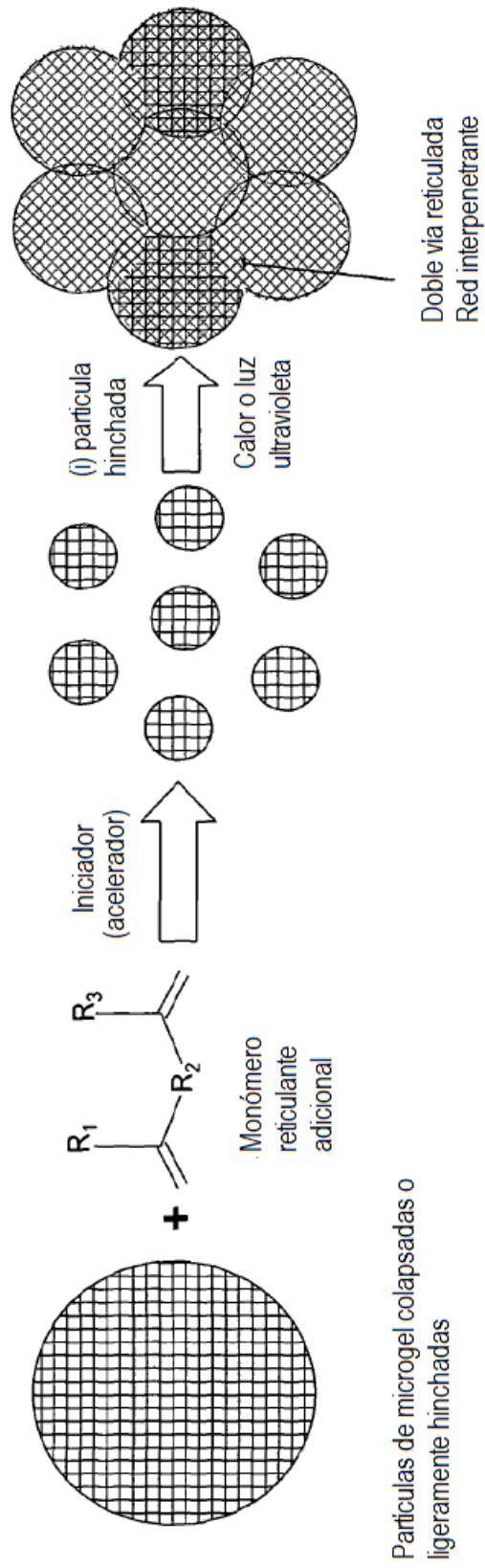


Figura 2

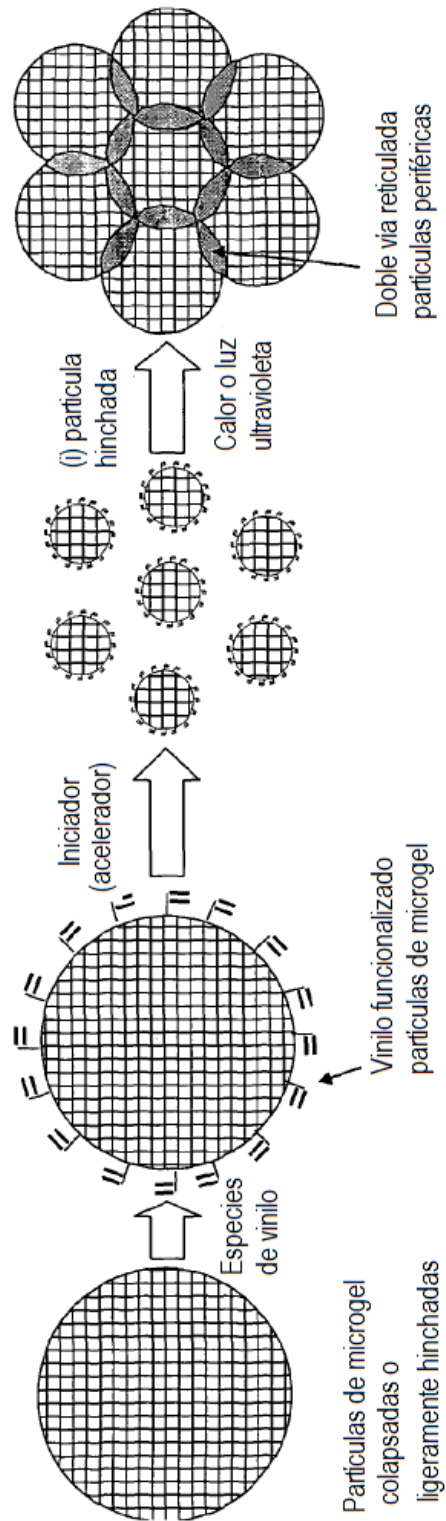
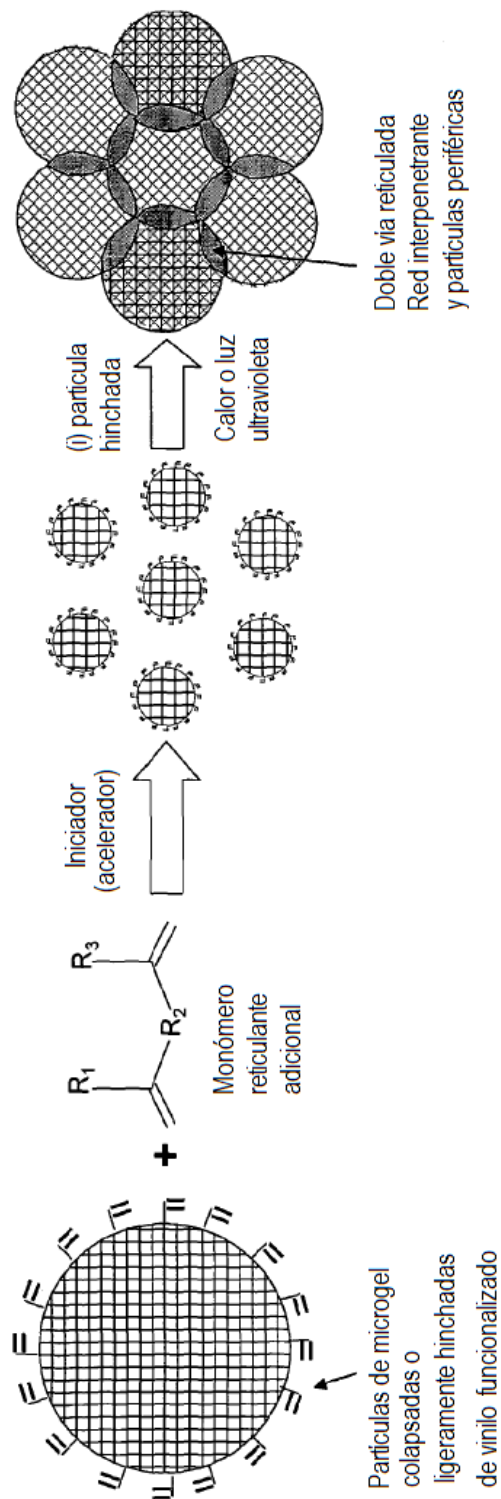


Figura 3



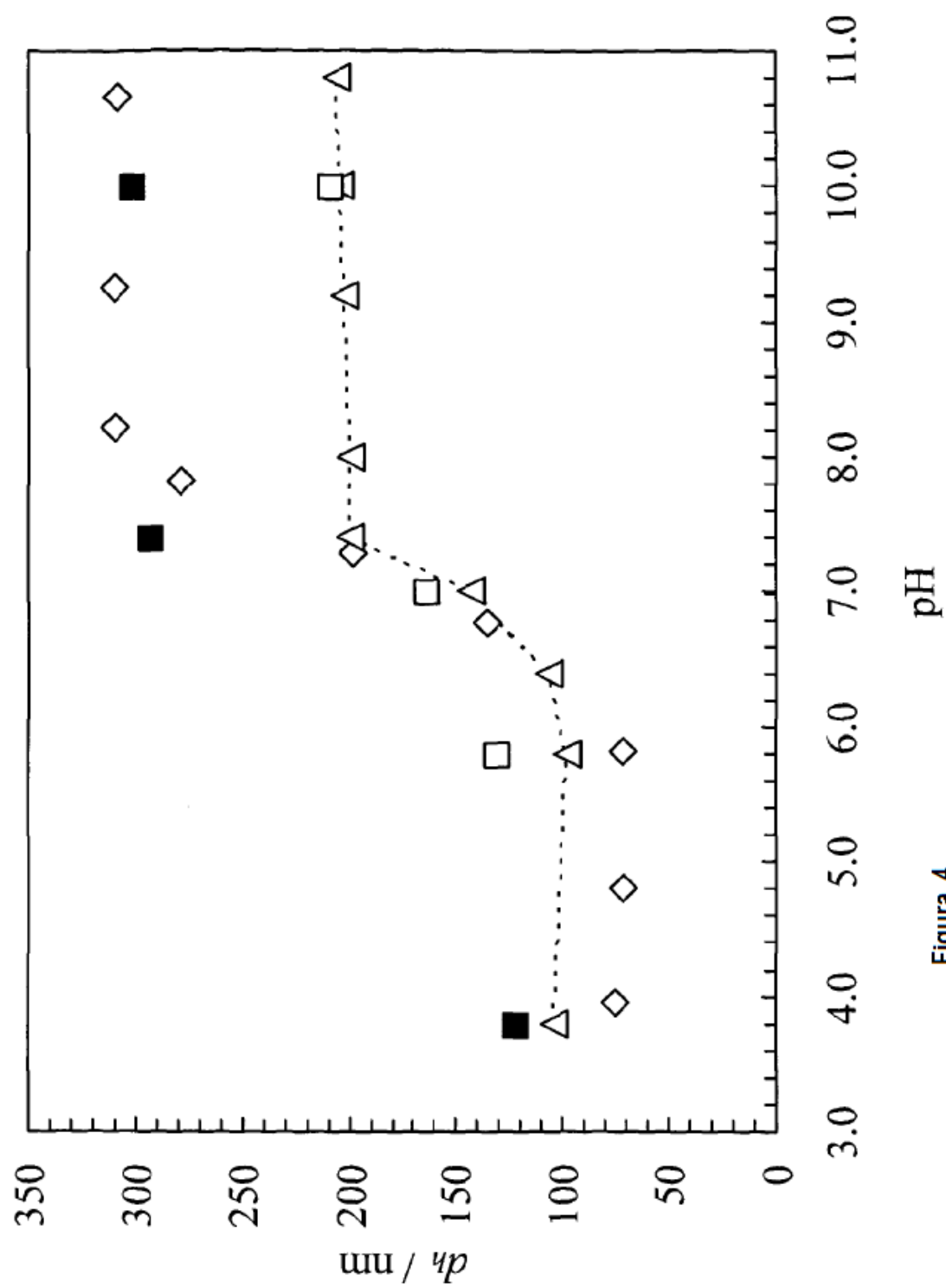


Figura 4

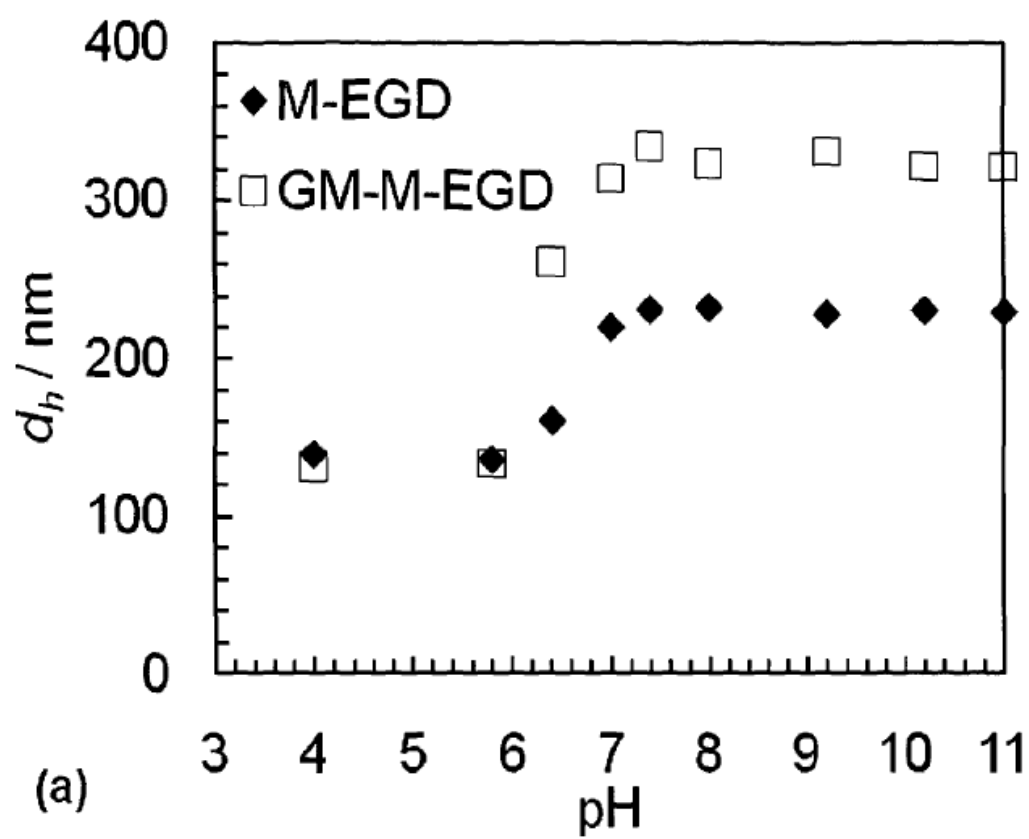


Figura 4A(a)

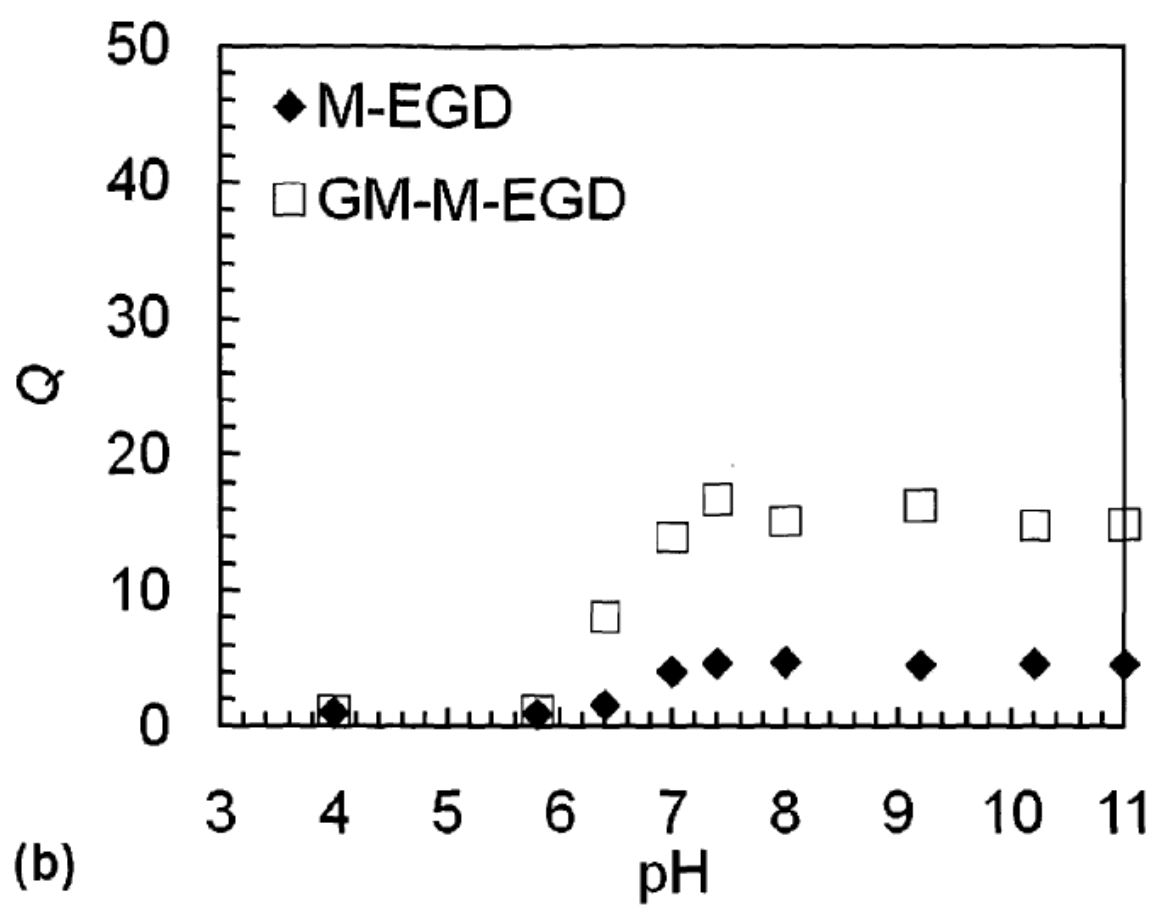


Figura 4A(b)

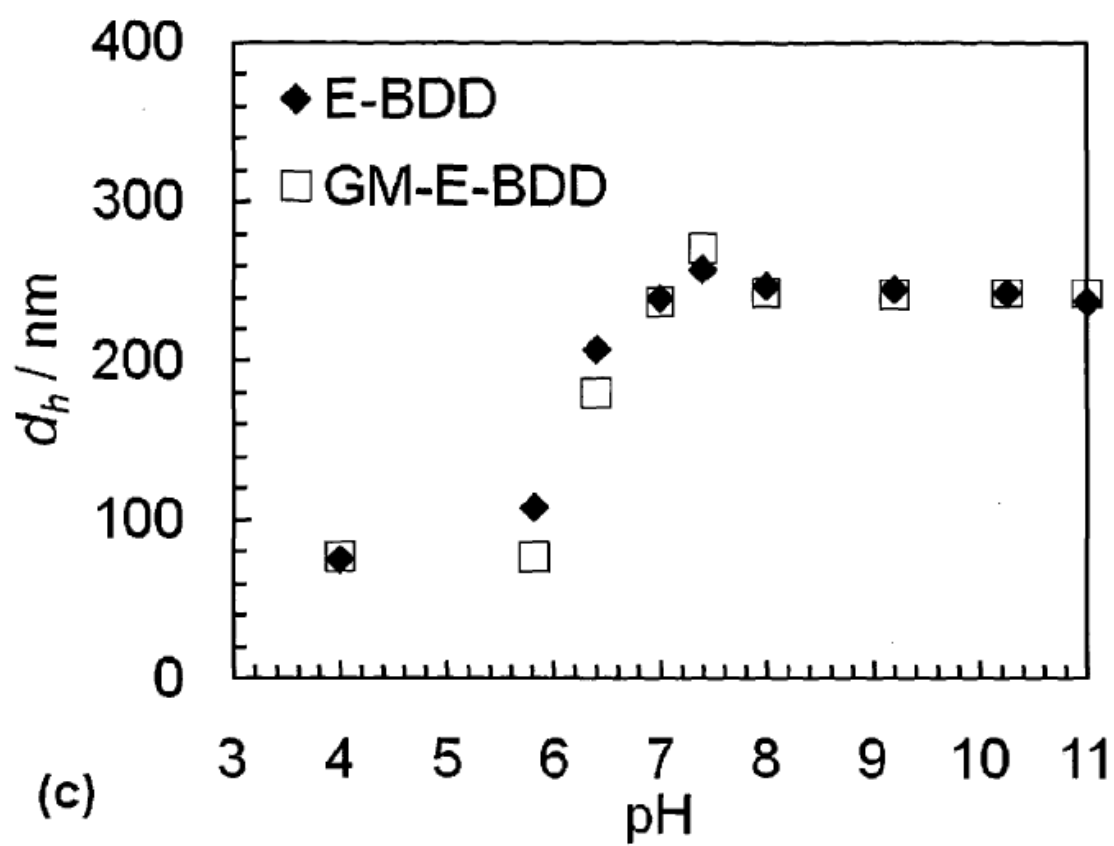


Figura 4A (c)

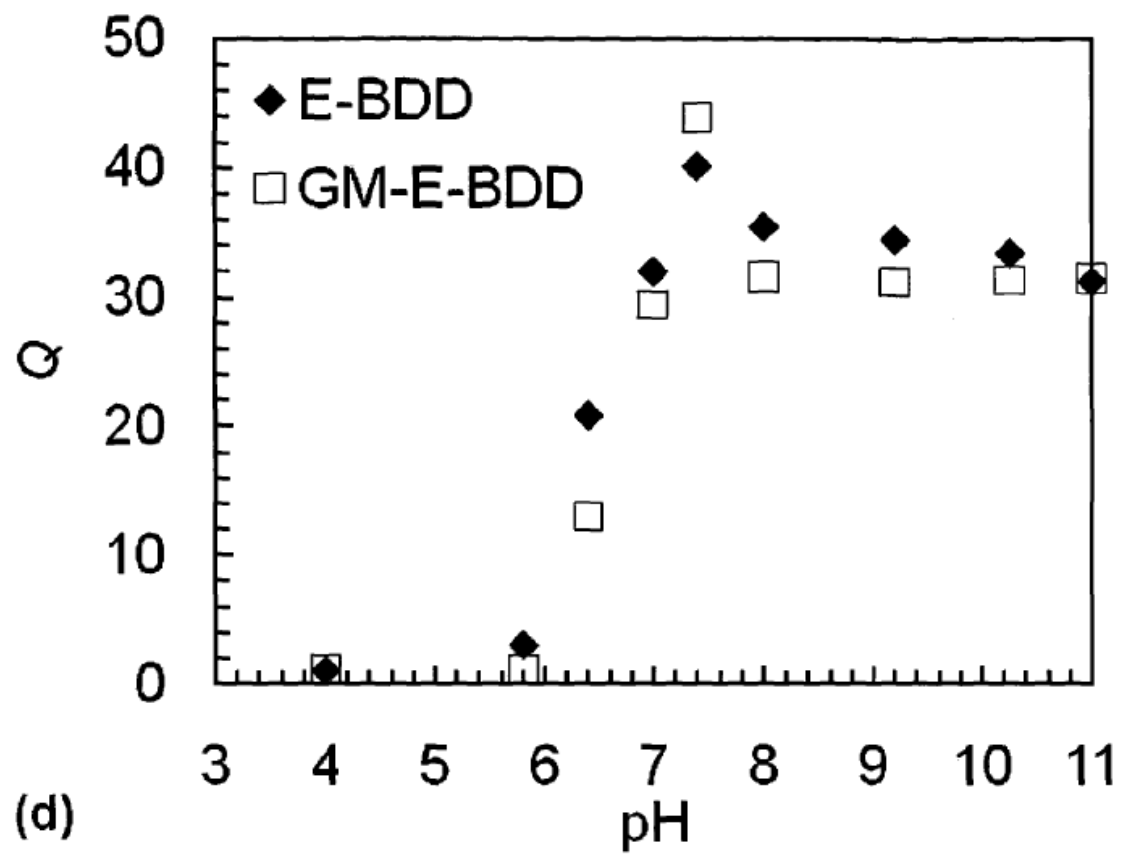


Figura 4A (d)

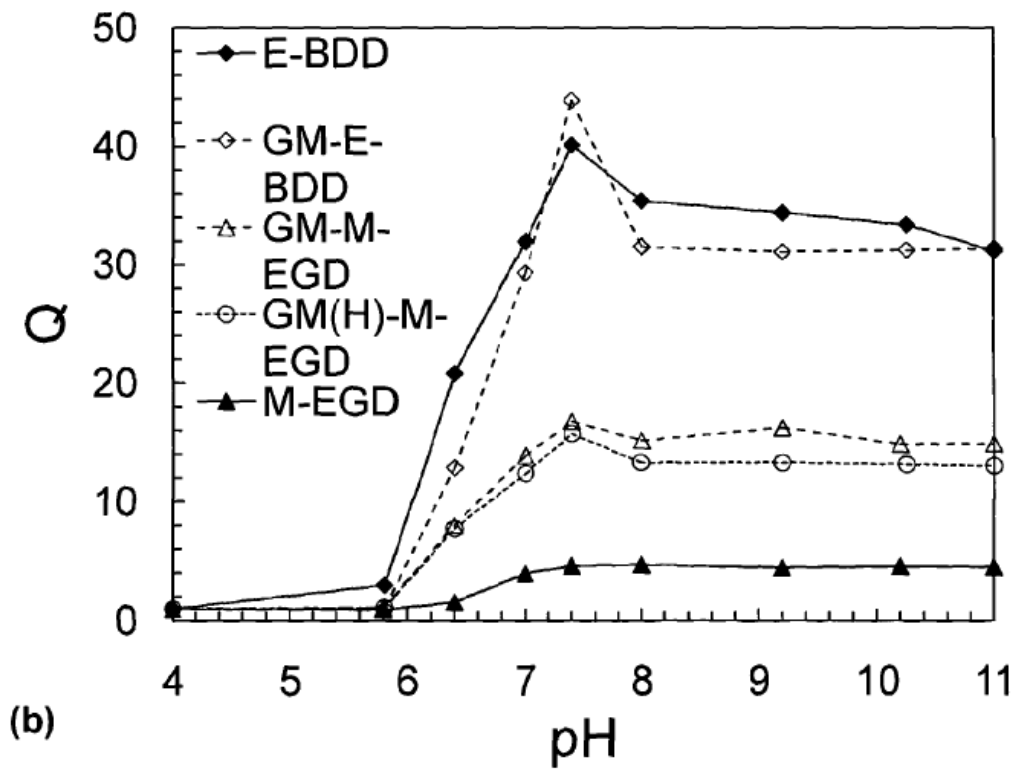
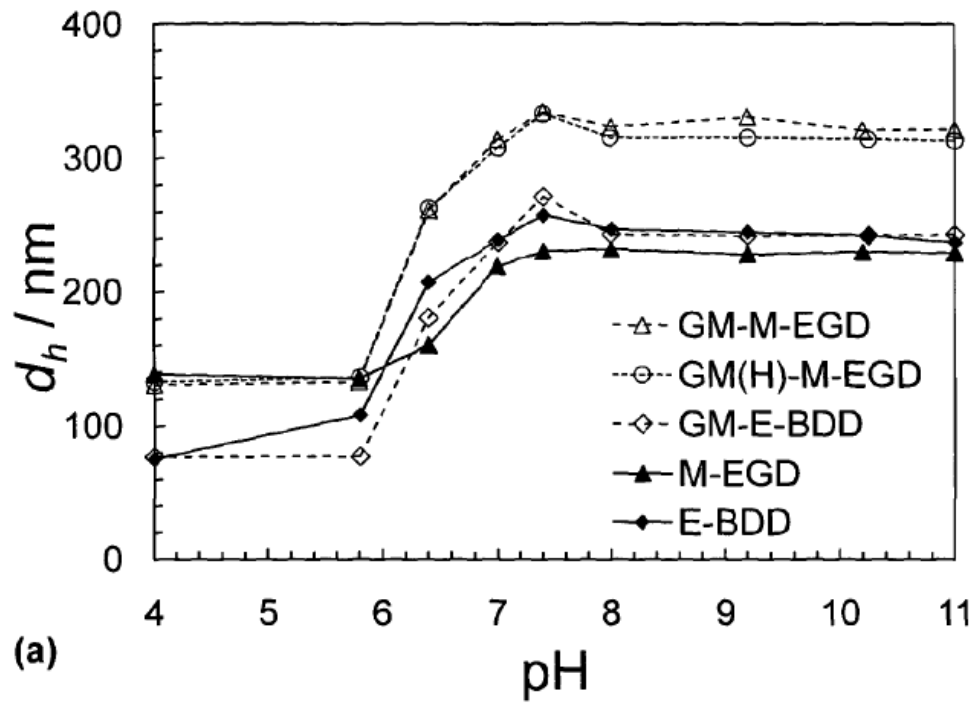


Figura 4A-2

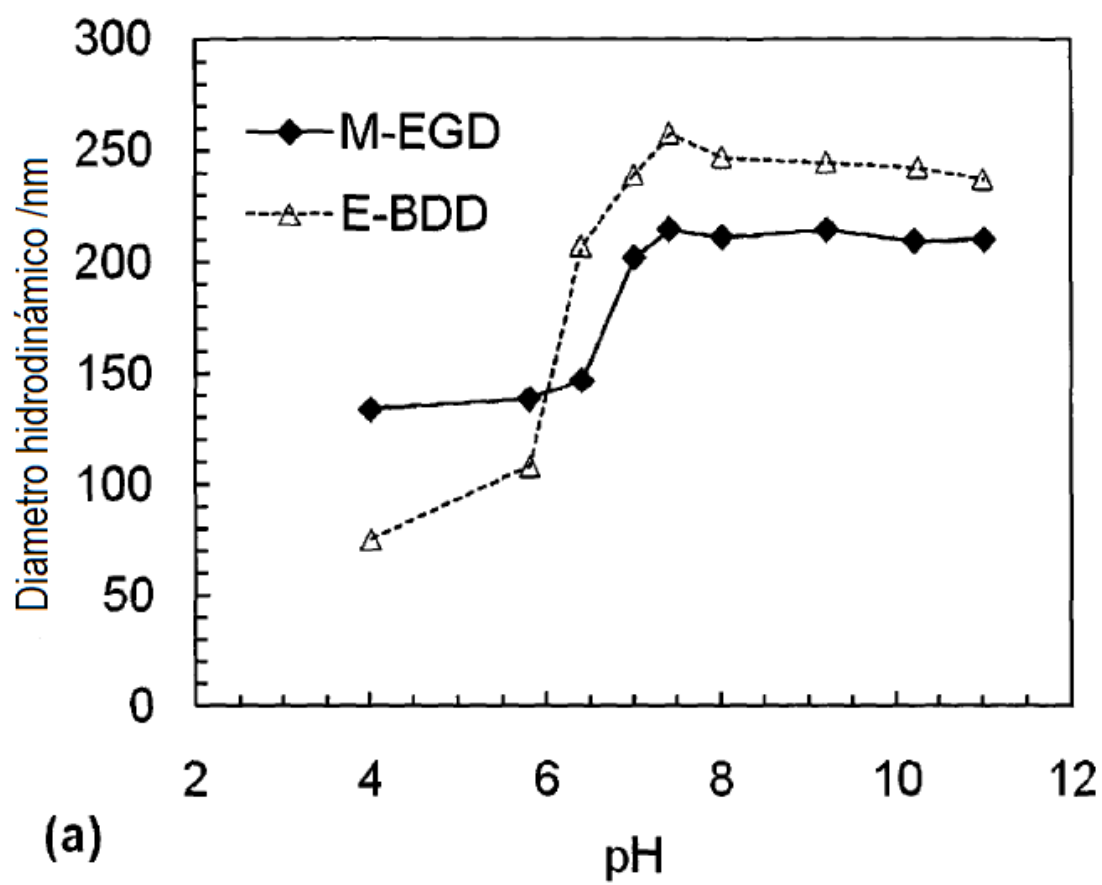


Figura 4B-1(a)

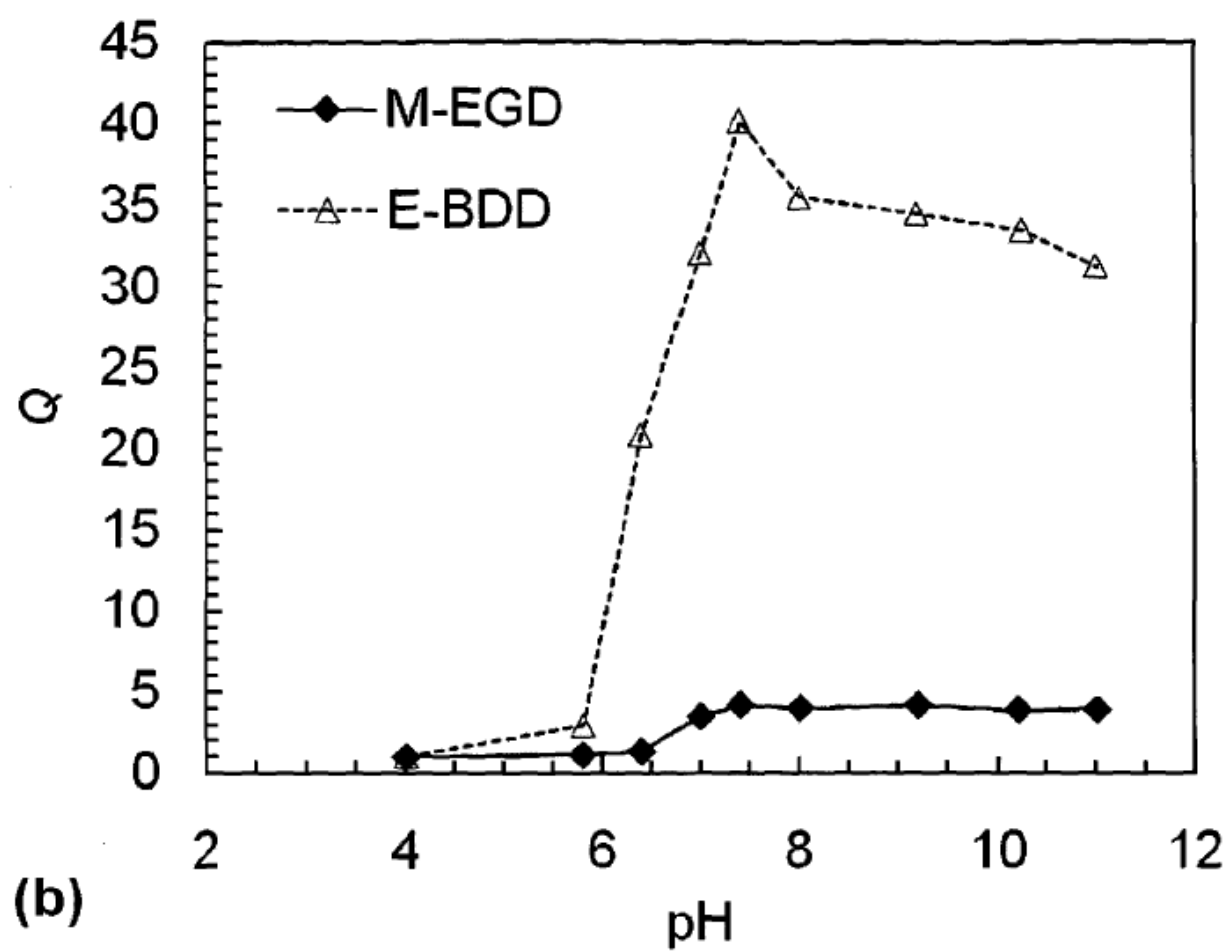
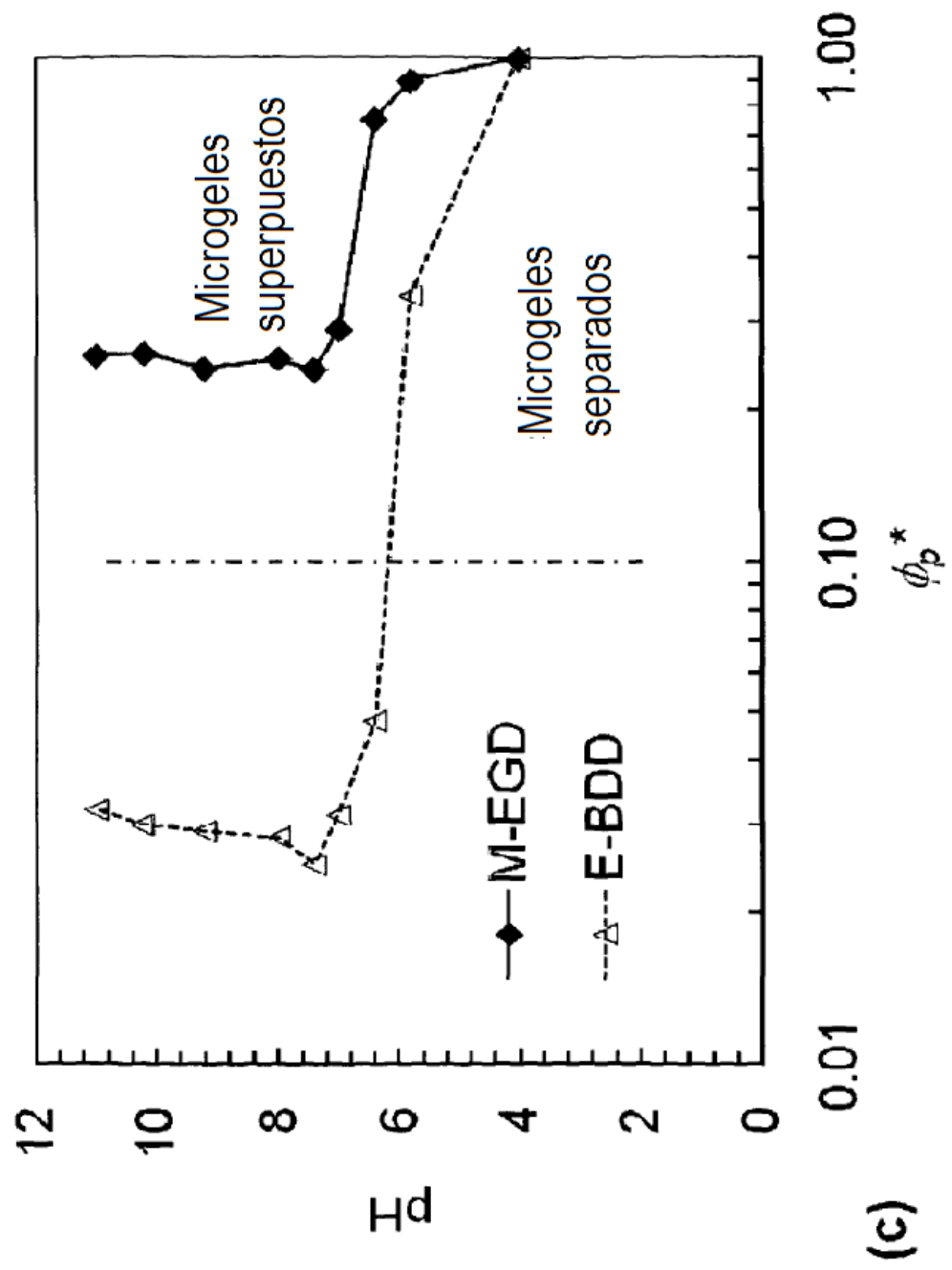


Figura 4B-1(b)

figura 4B-1(c)



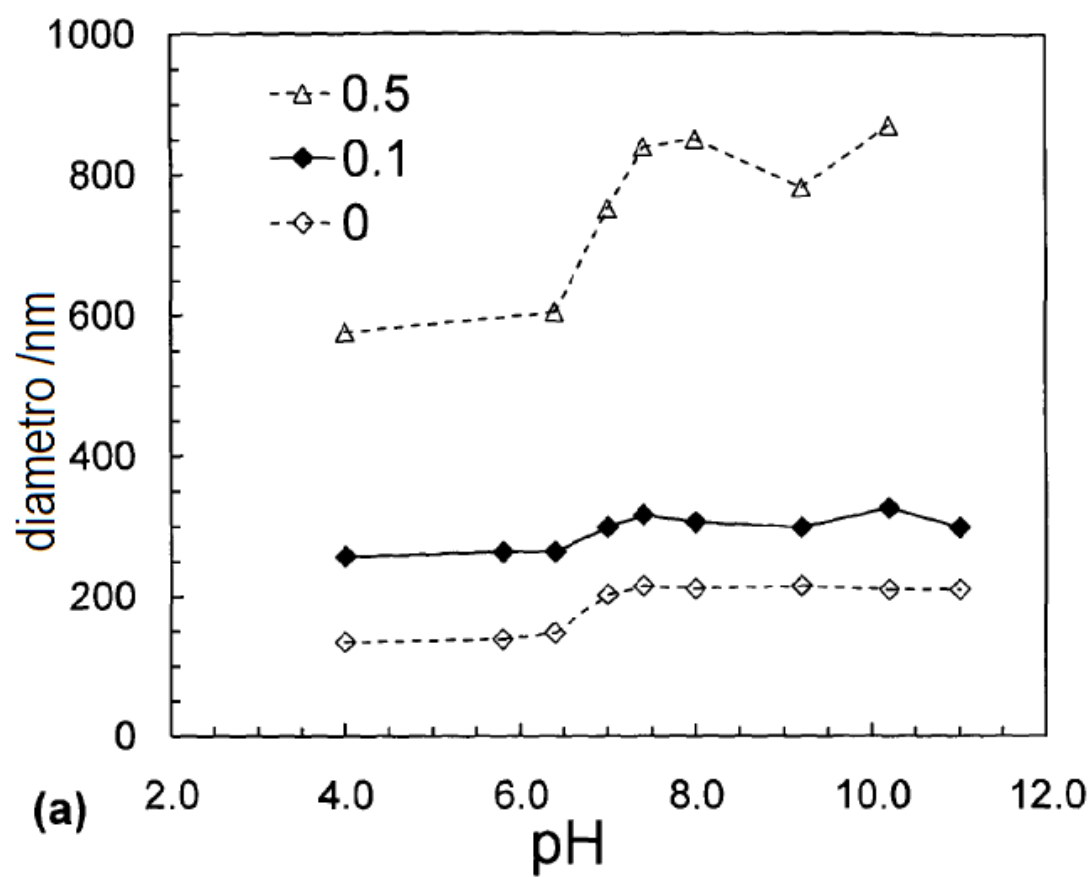


Figura 4B-2(a)

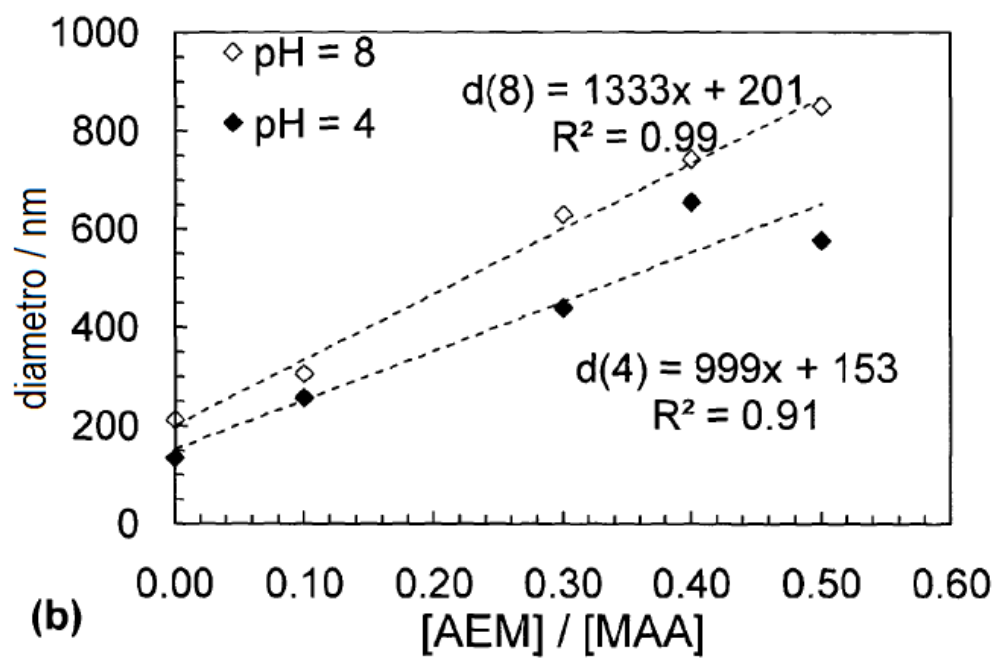


Figura 4B-2 (b)

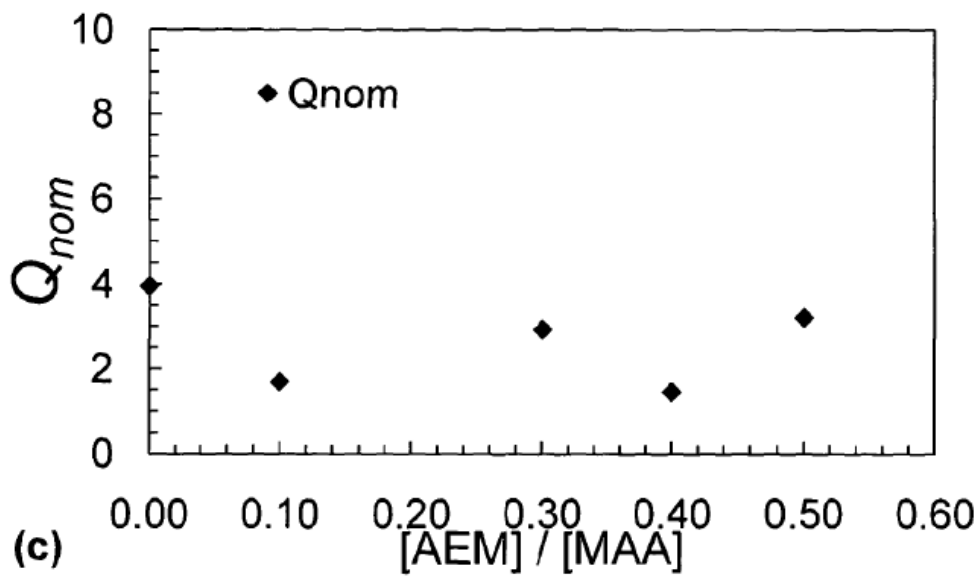


Figura 4B-2 (c)

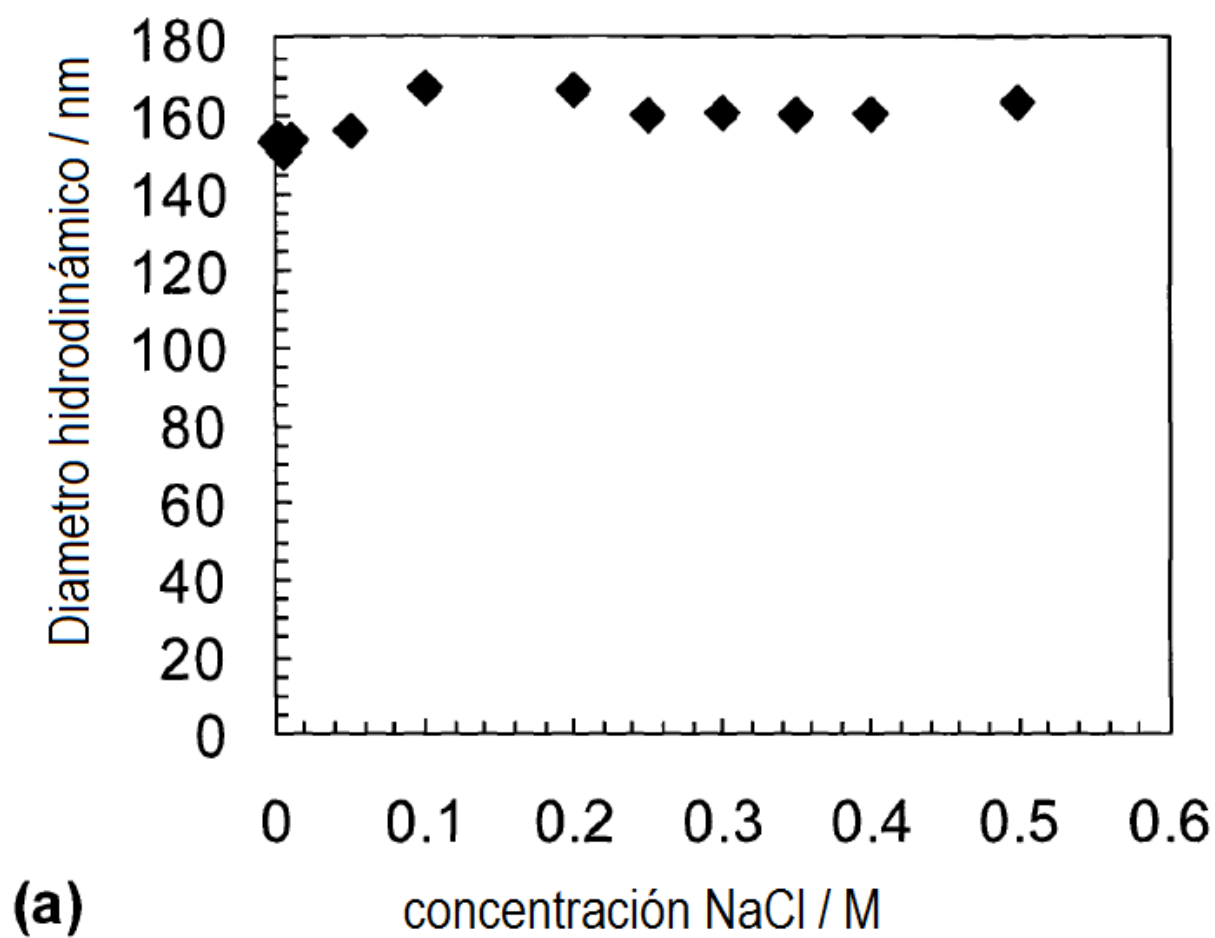


Figura 4B-3

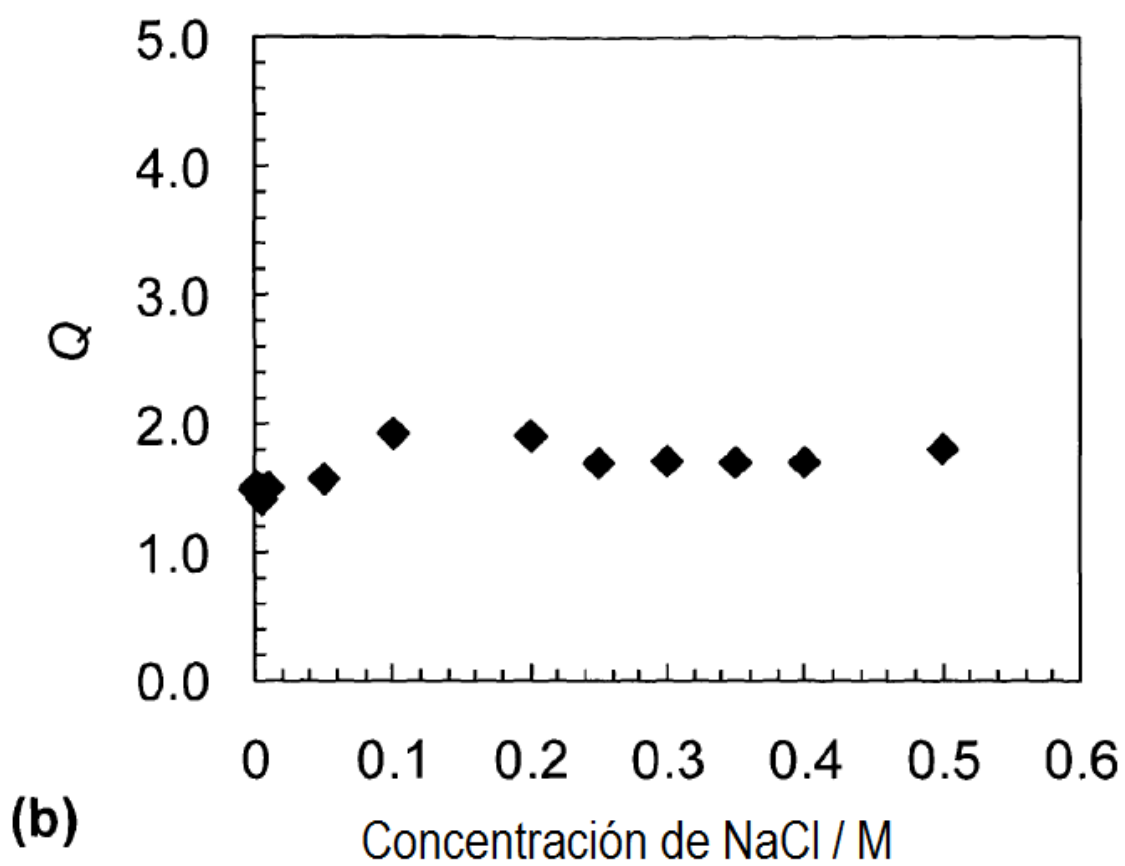


Figura 4B-3

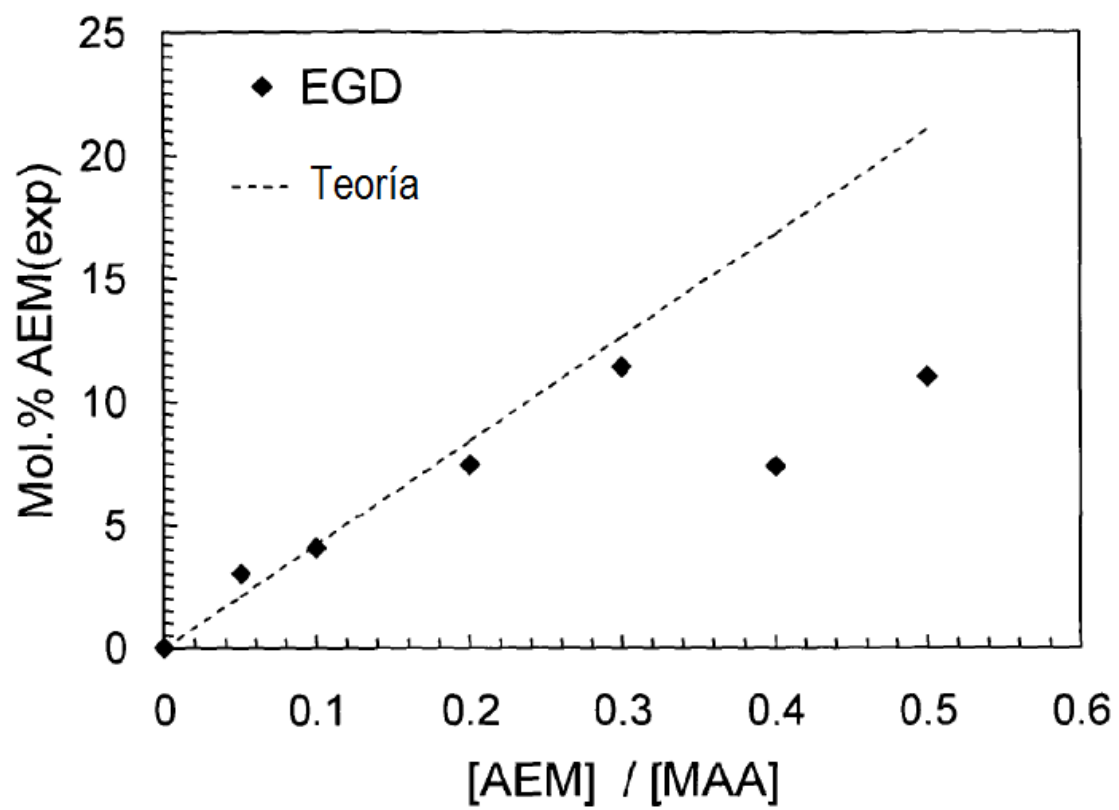


Figura 5B-1

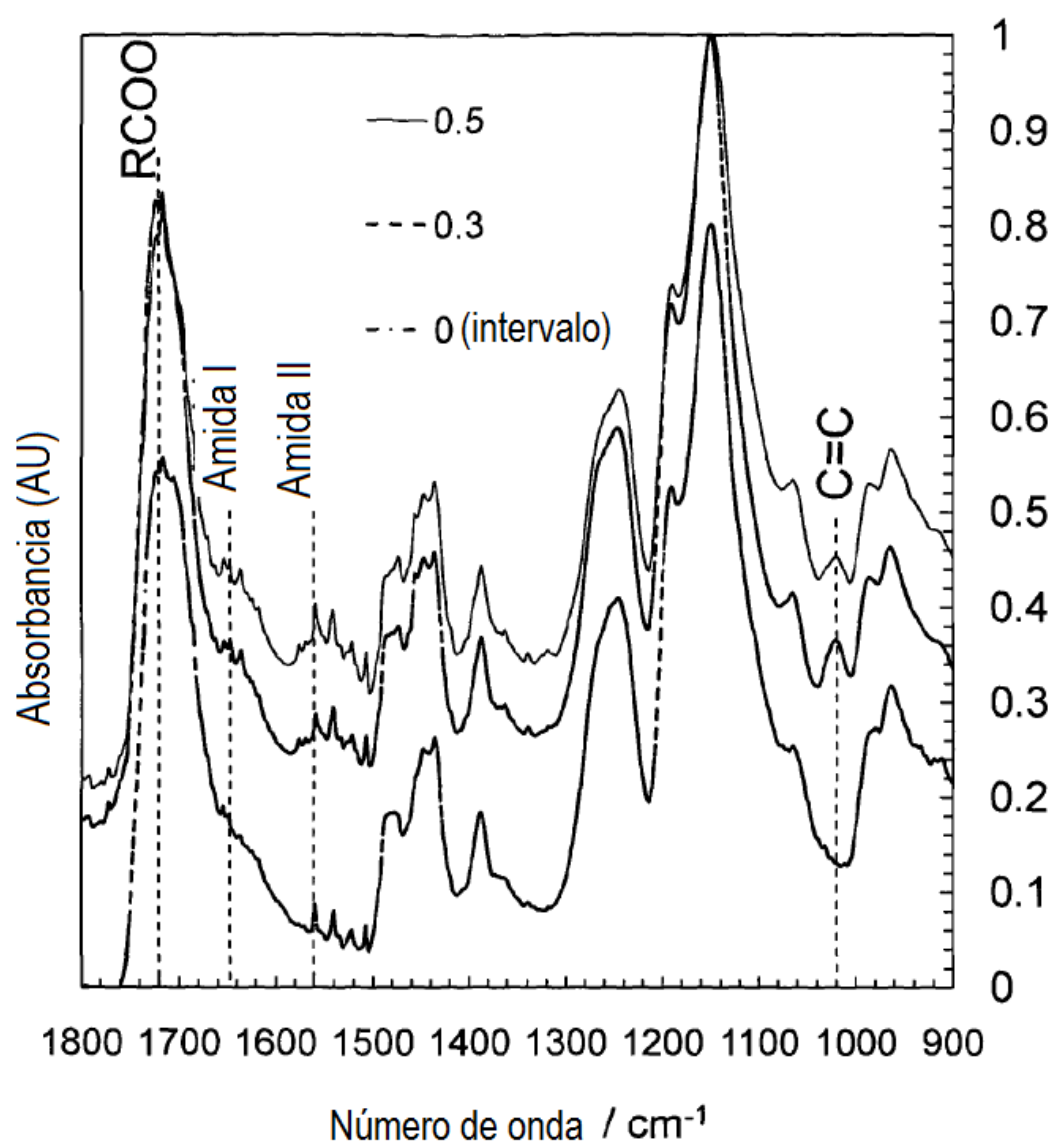


figura 5B-2

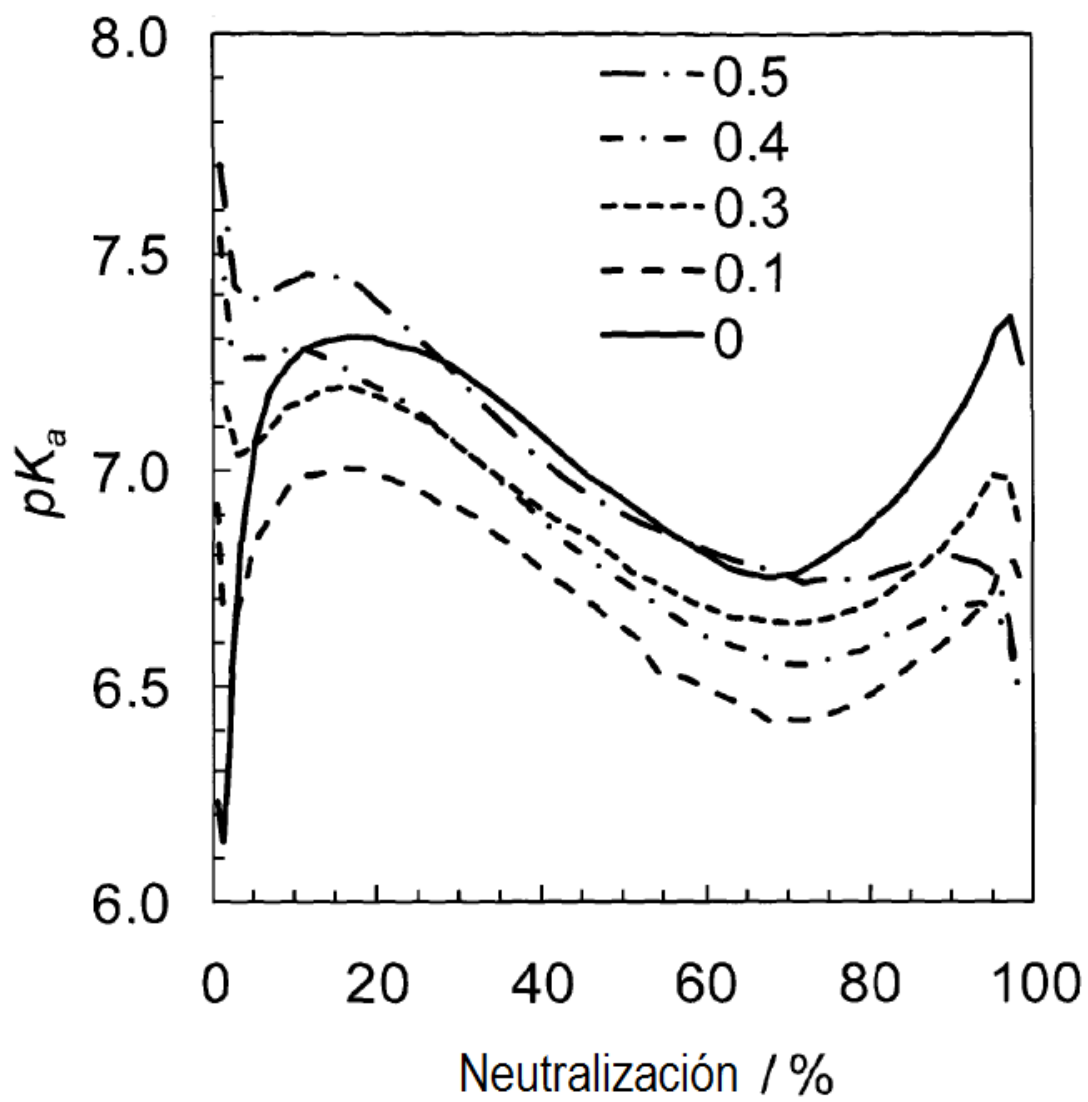


Figura 5B-3

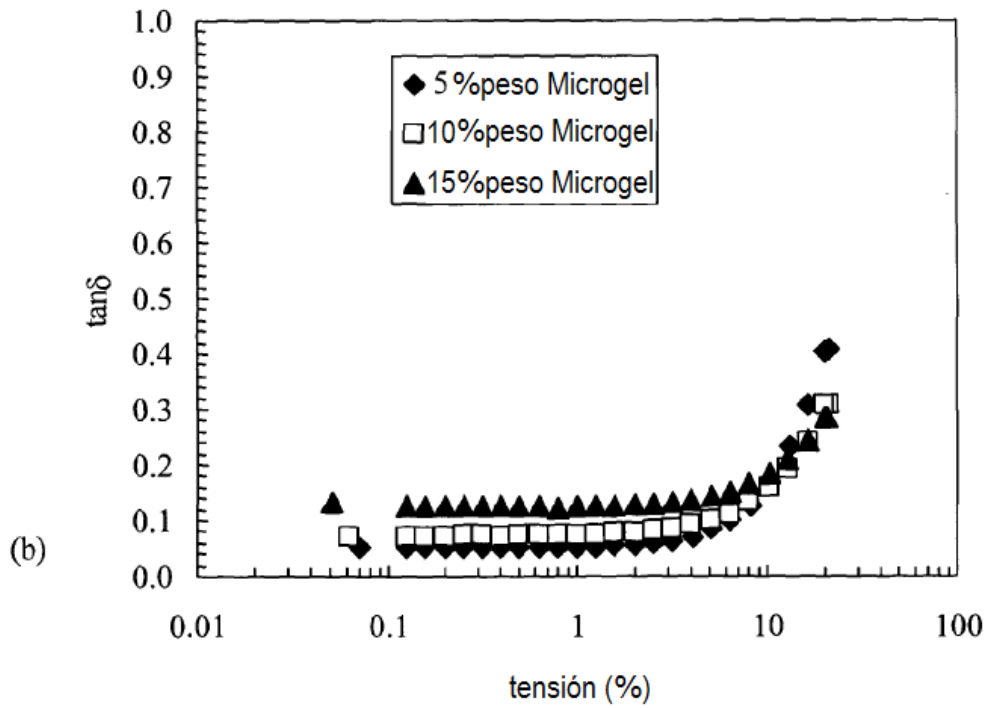
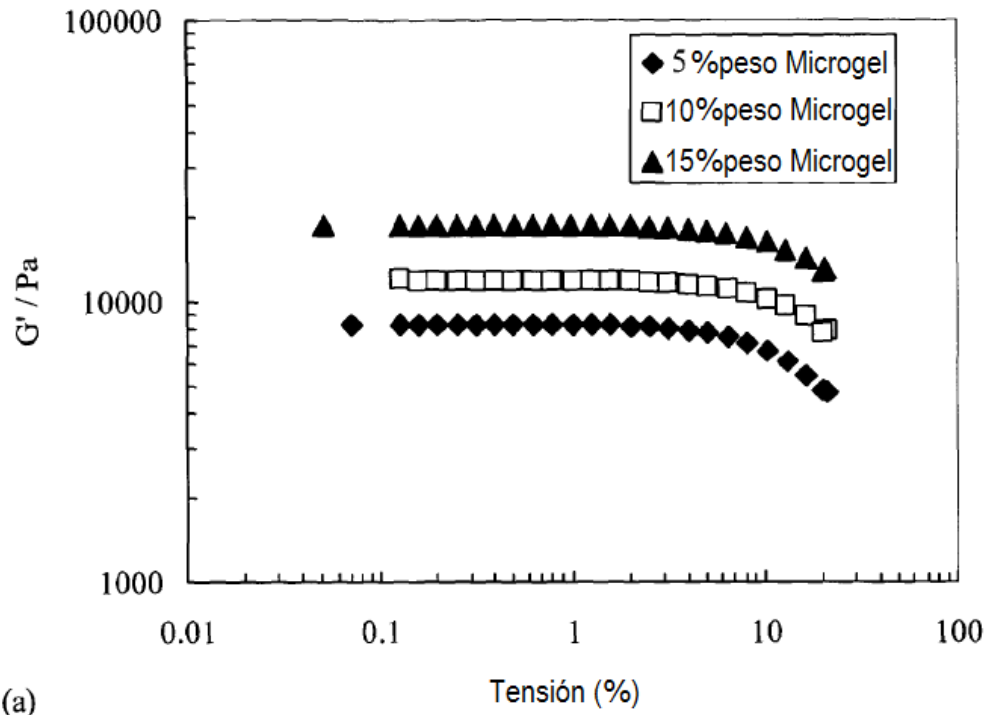


Figura 6

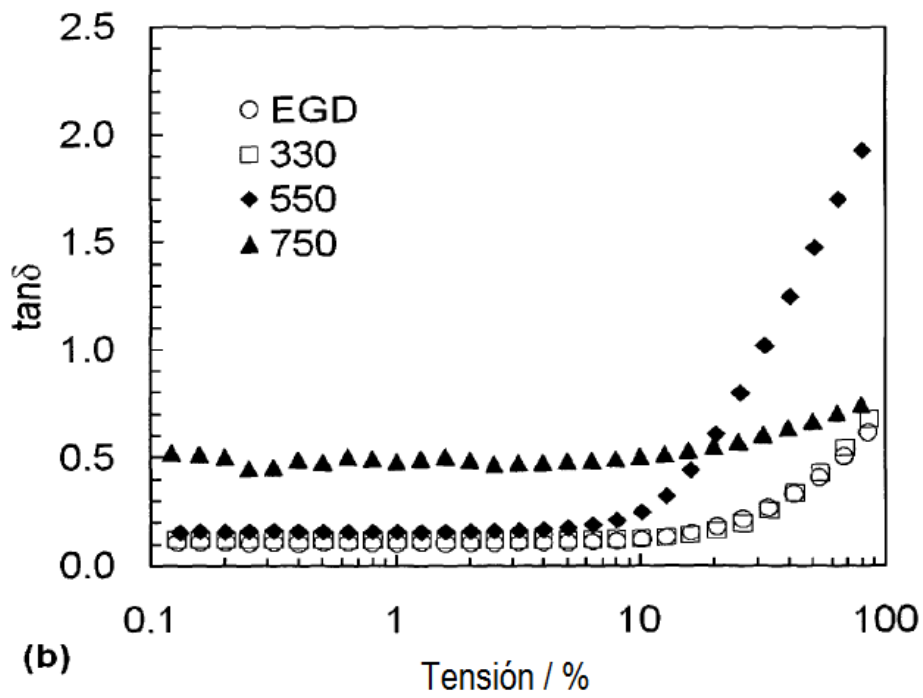
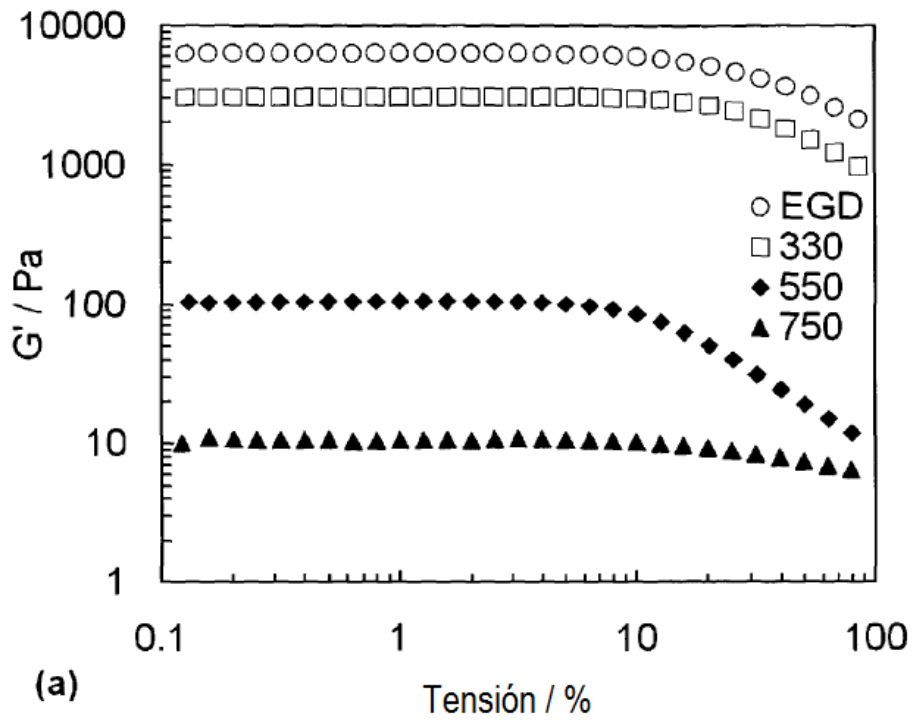


Figura 6C (a) y (b)

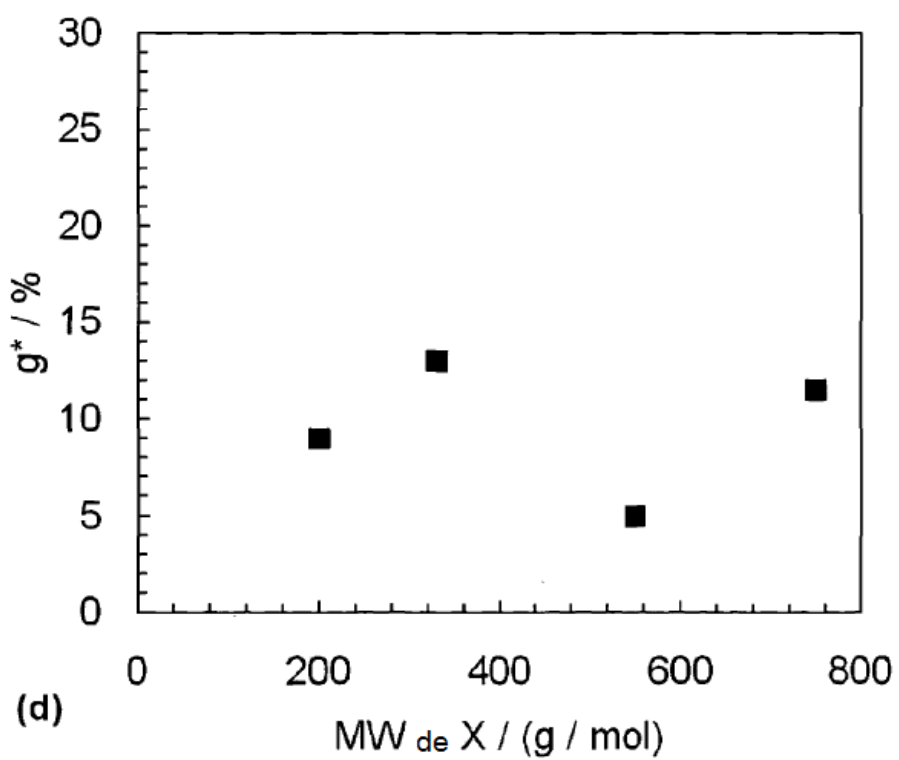
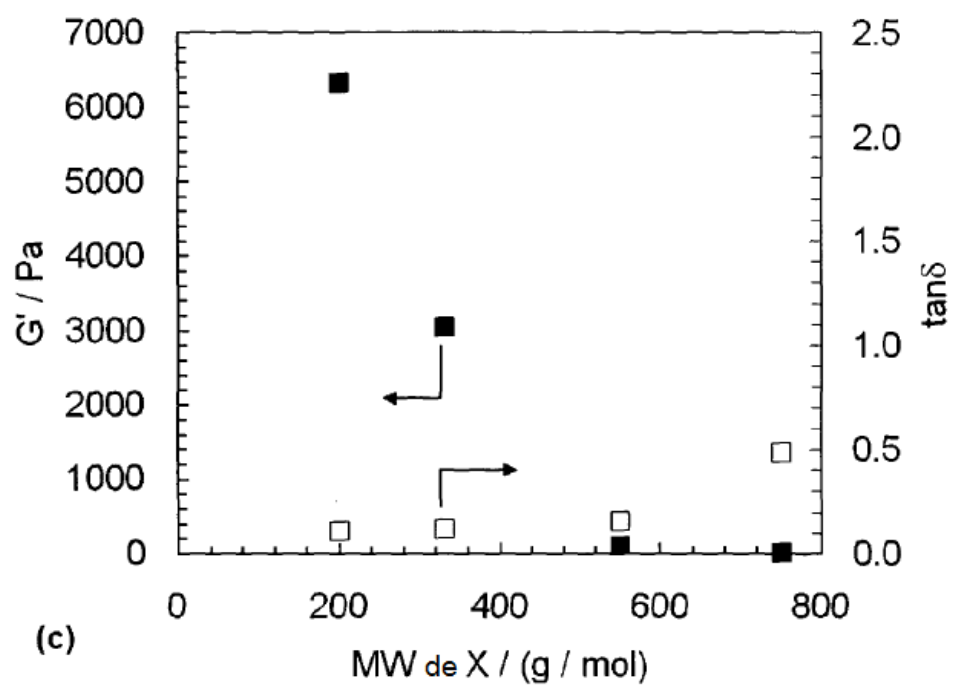


Figura 6C (c) y (d)

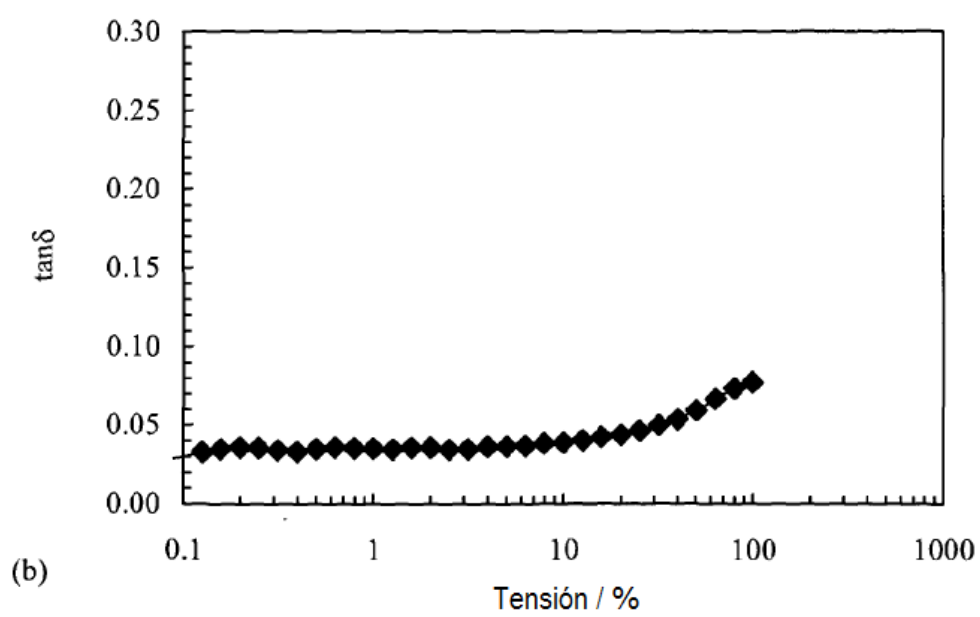
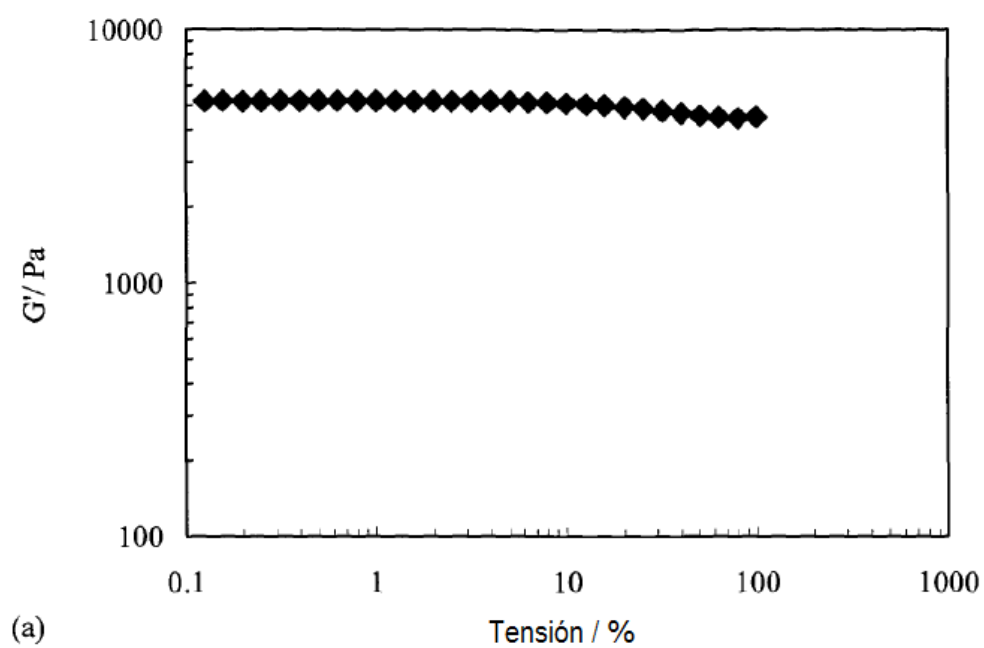


Figura 7

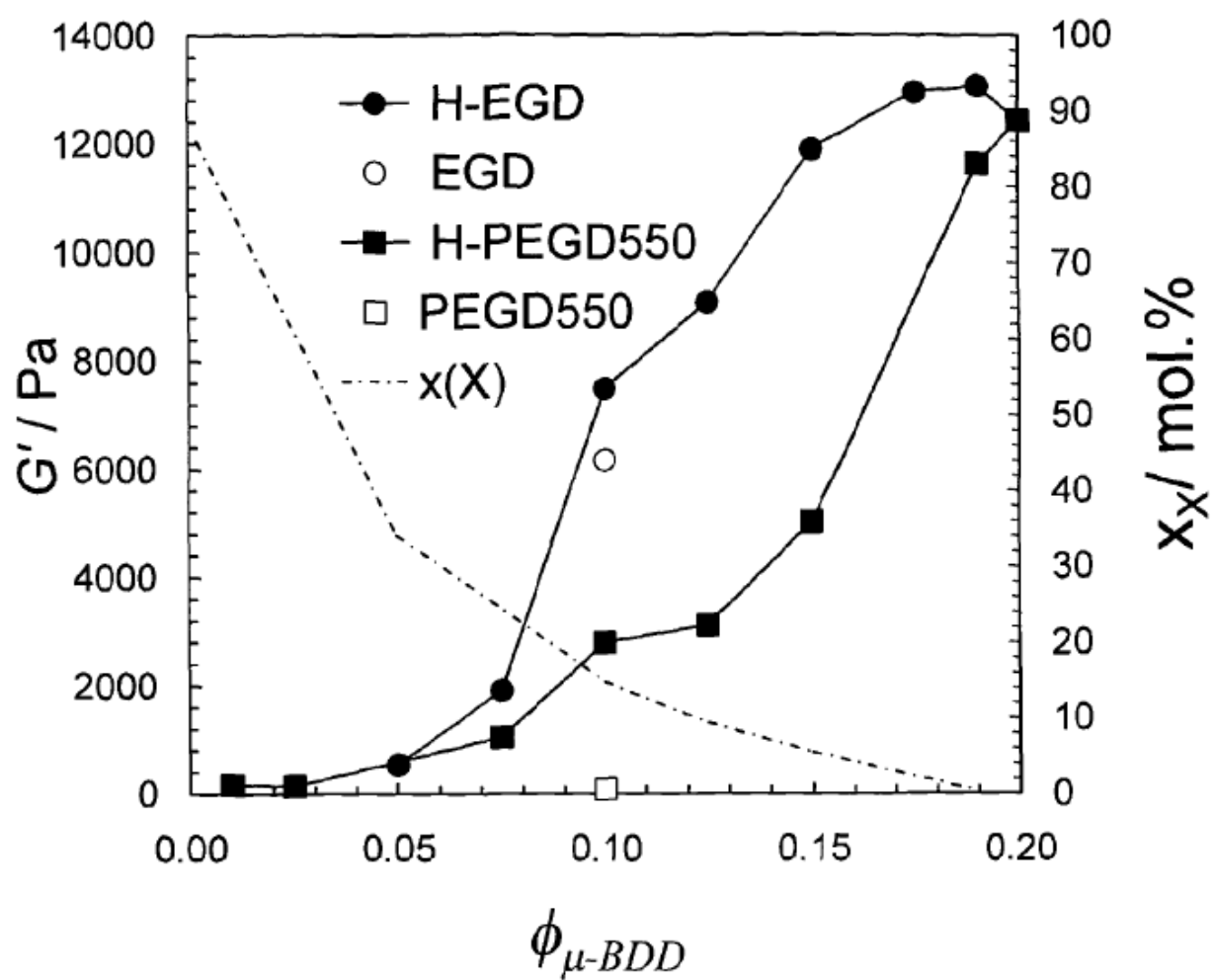
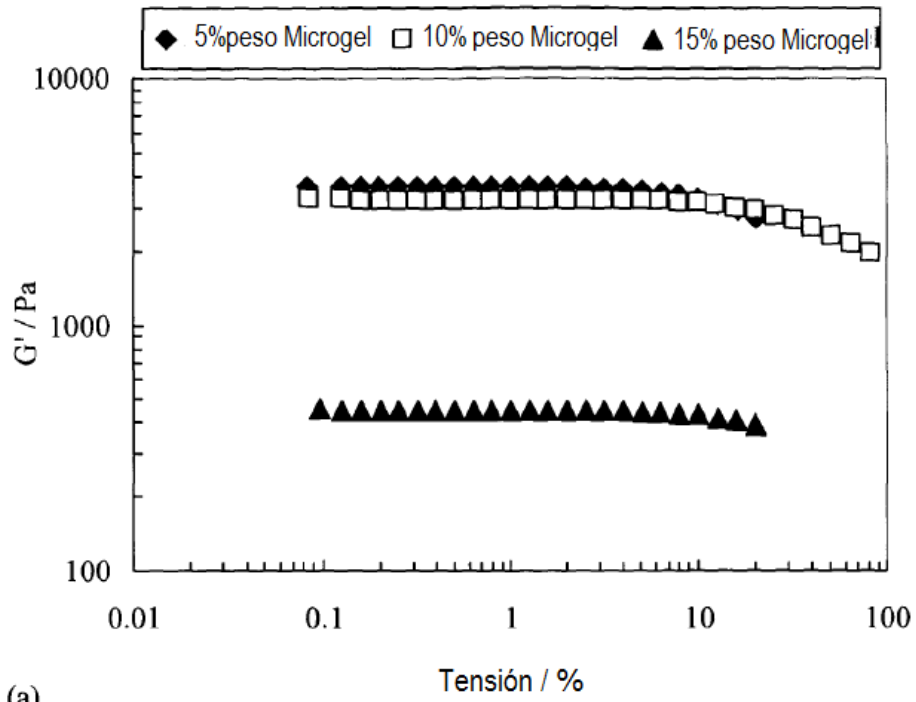
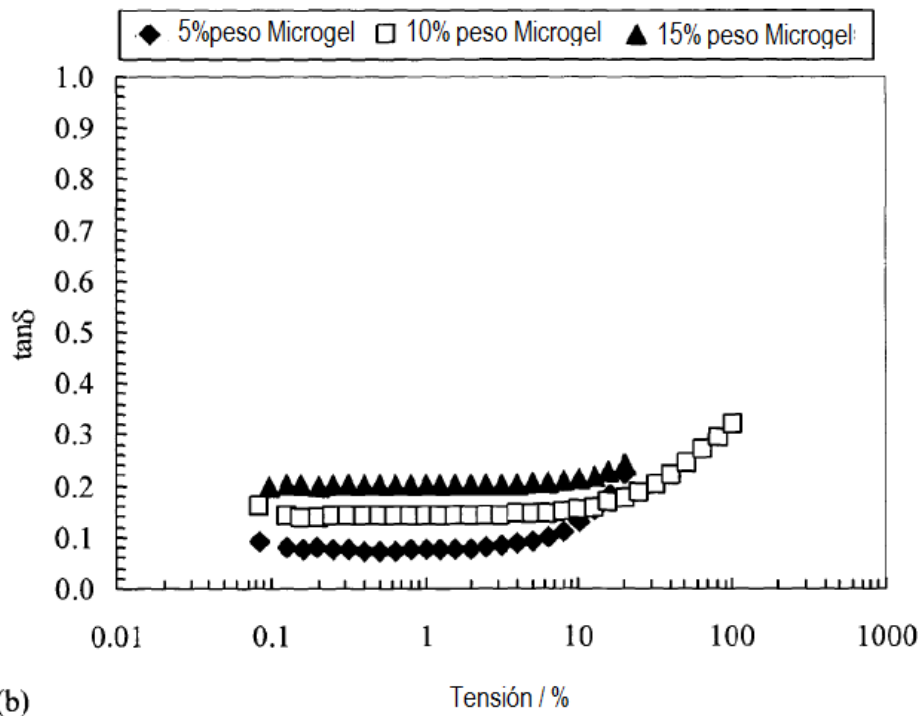


Figura 7C



(a)



(b)

Figura 8

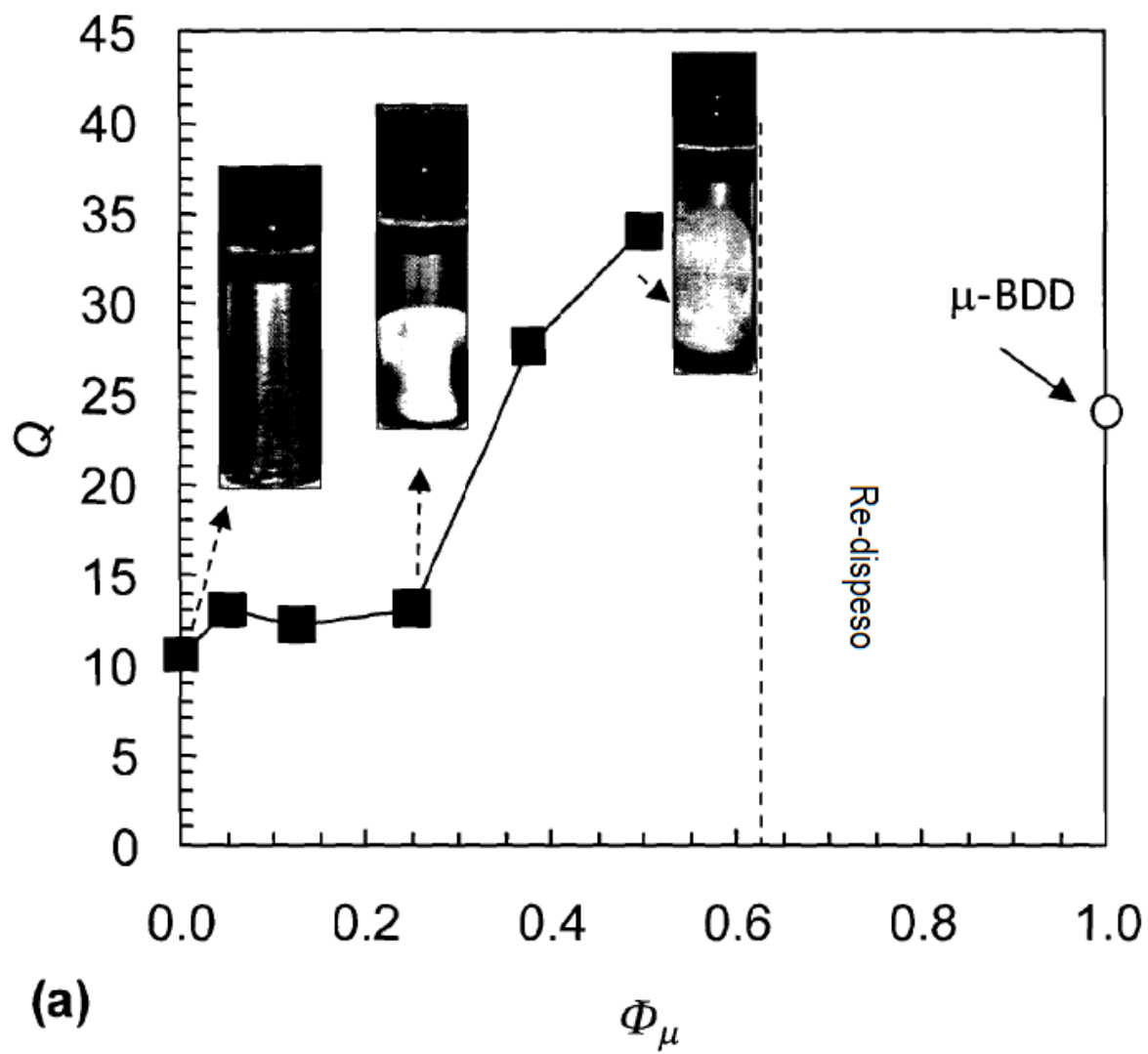


Figura 8C-1

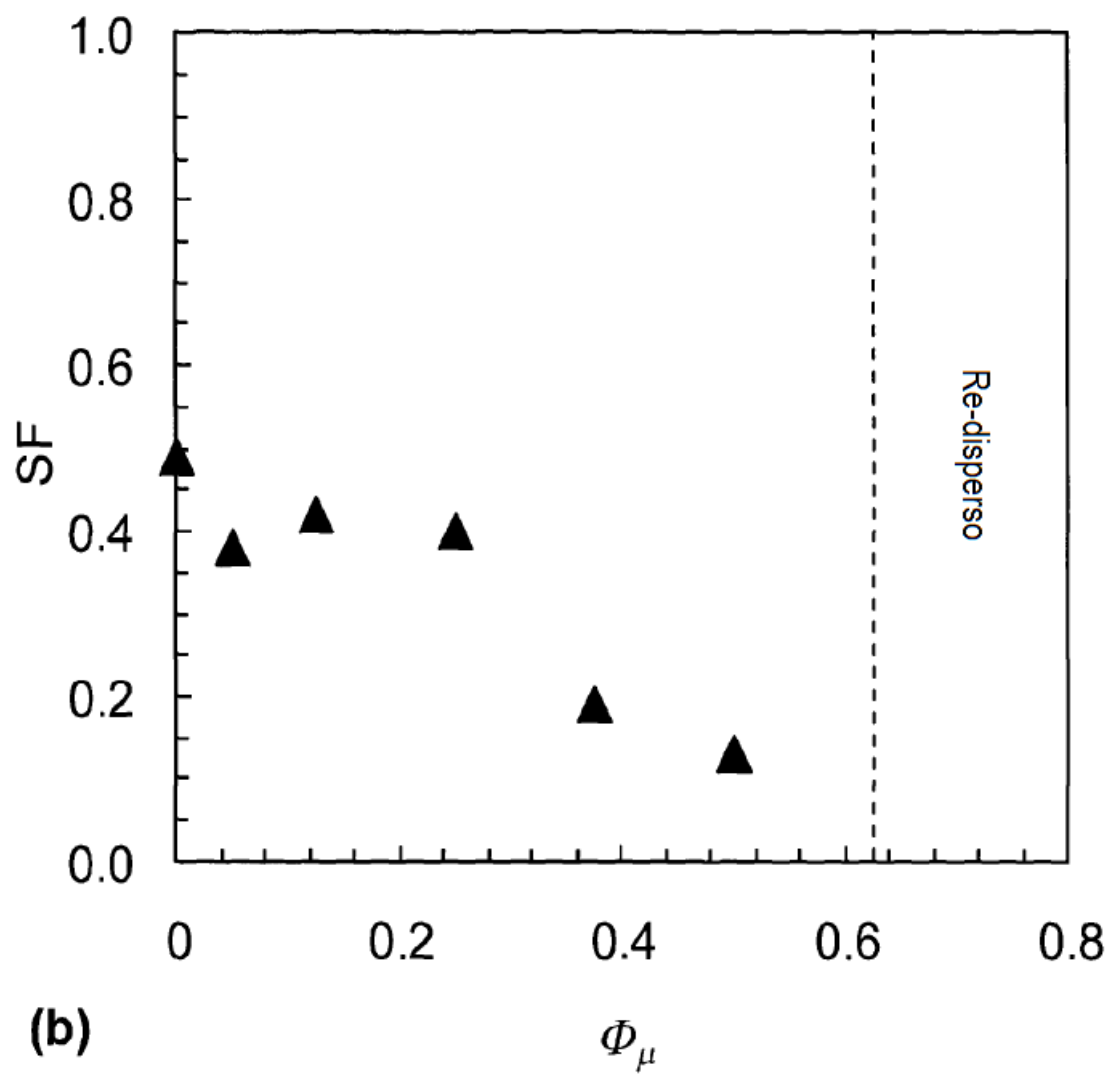


Figura 8C-1

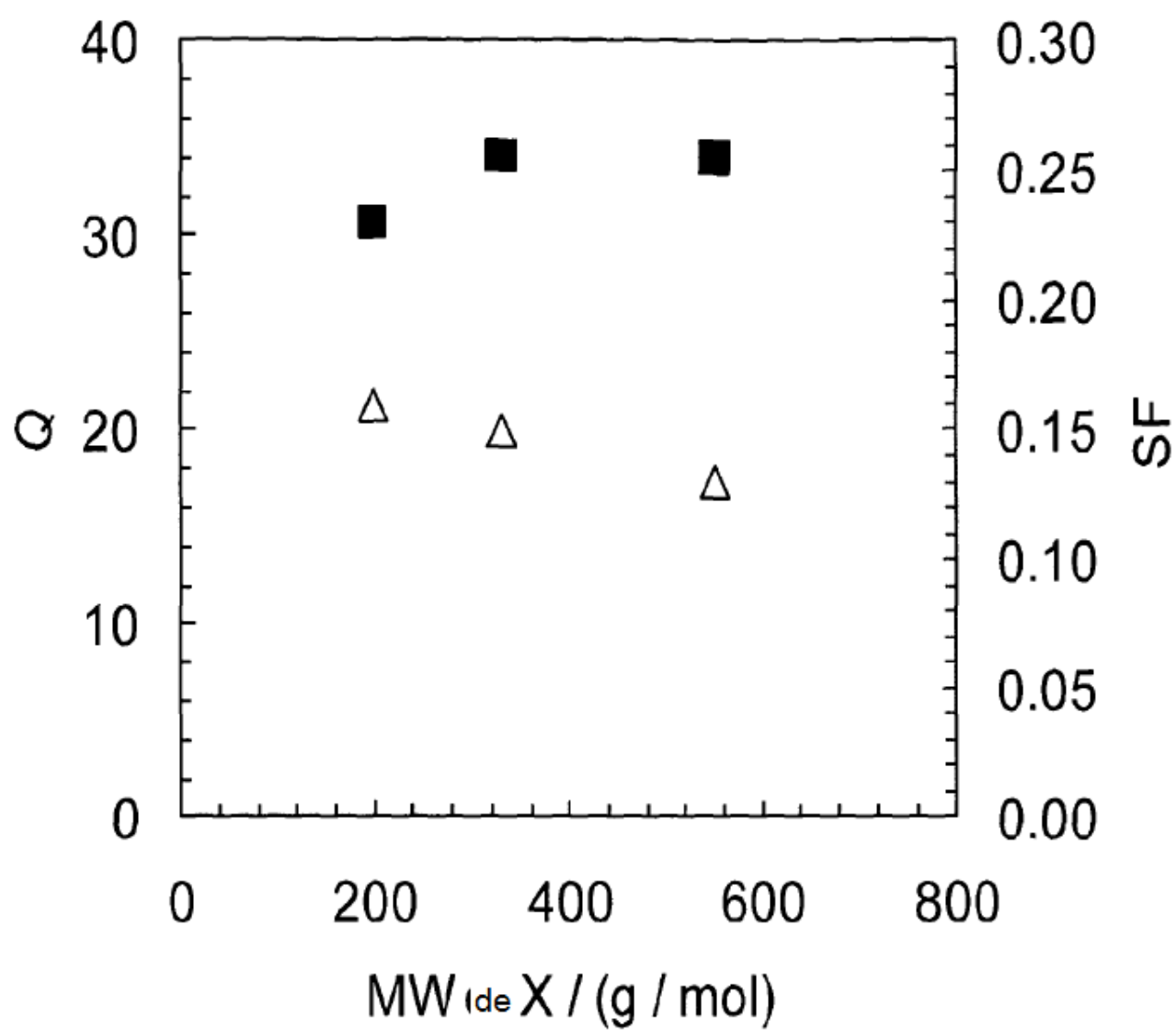


Figura 8C-2

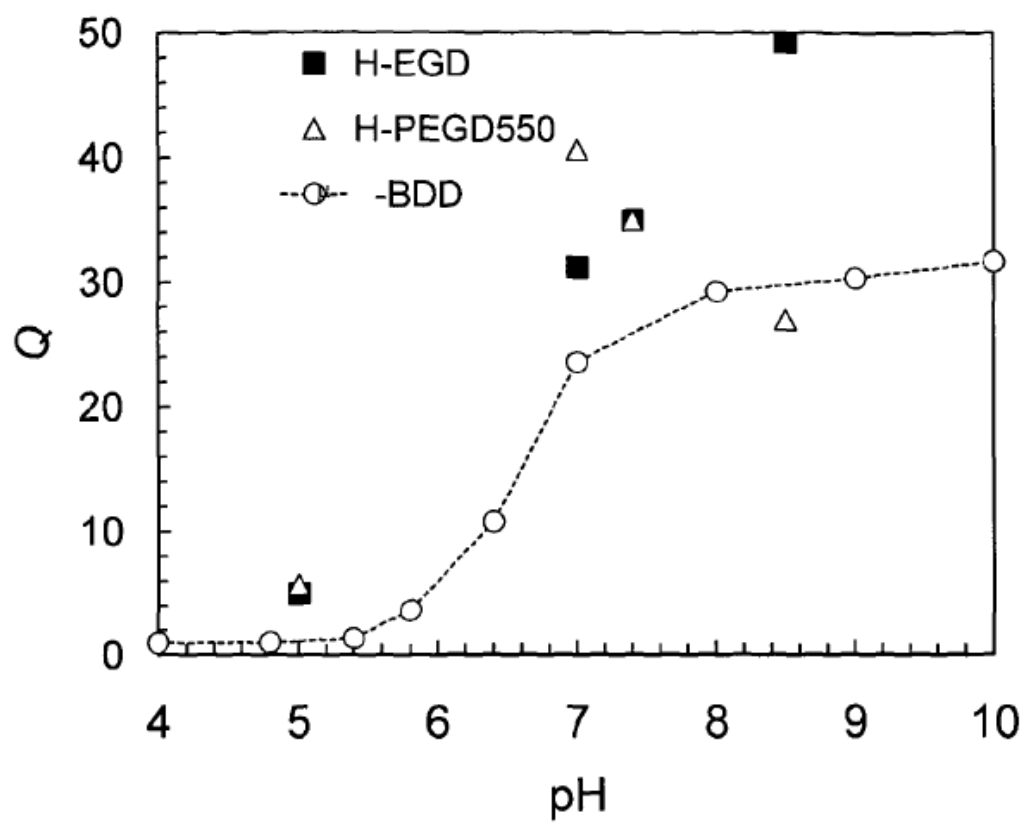


Figura 8C-3

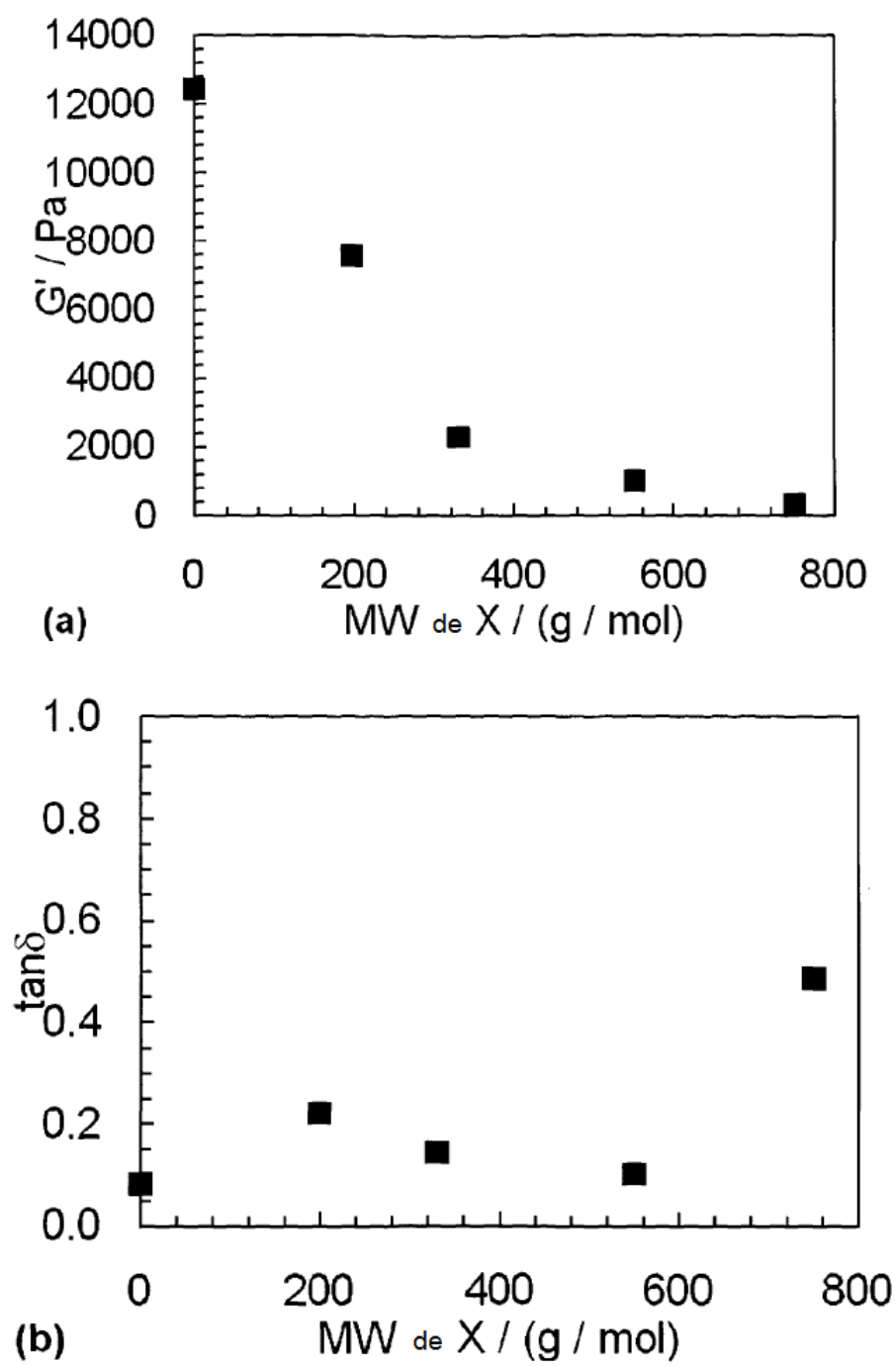


Figura 8C-4

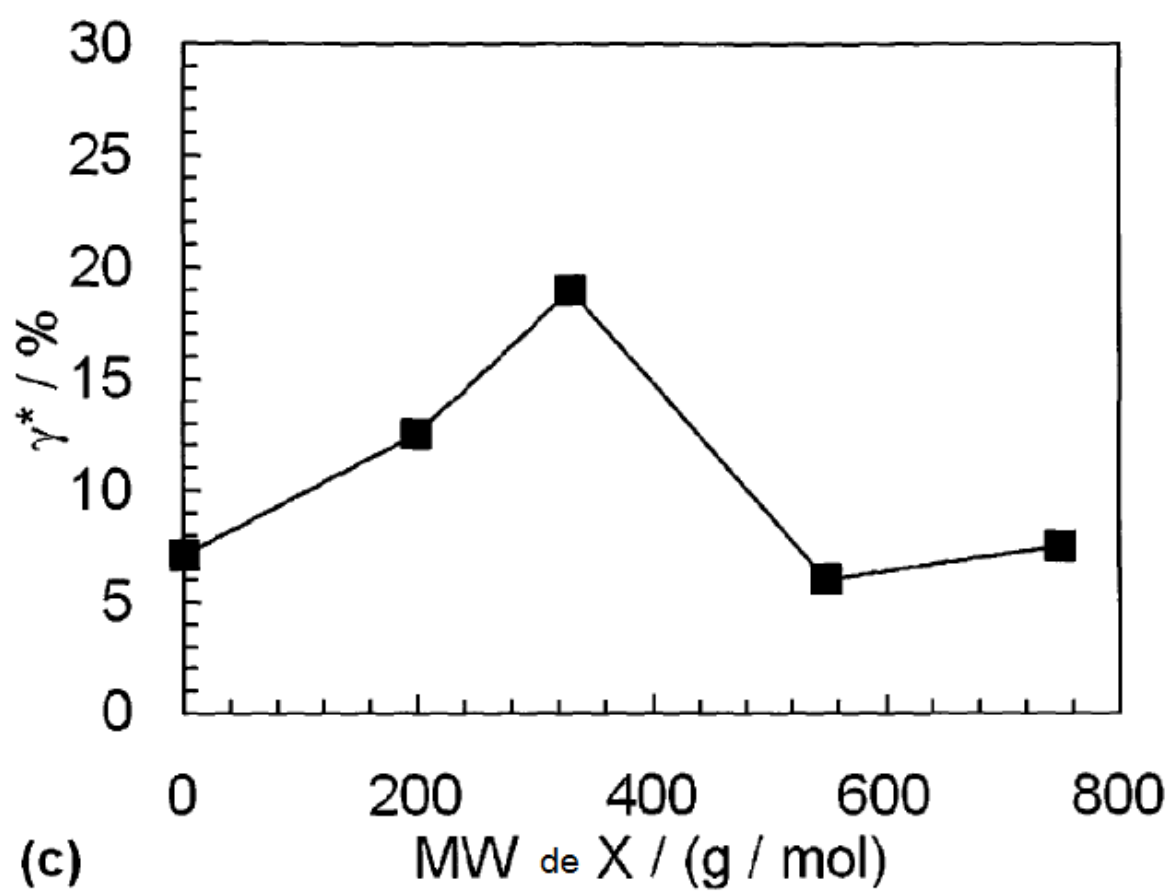
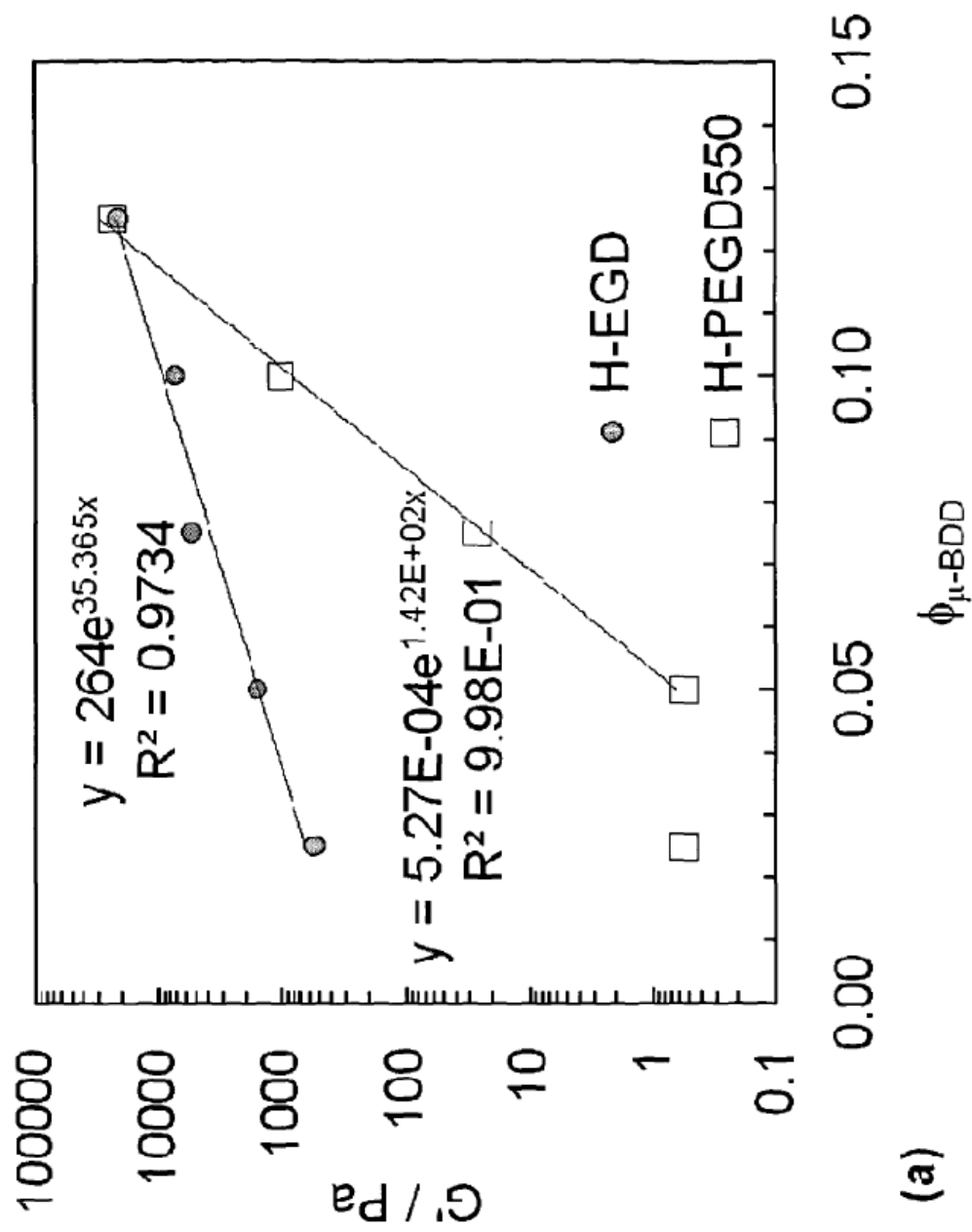


Figura 8C-4

Figura 8C-5



(a)

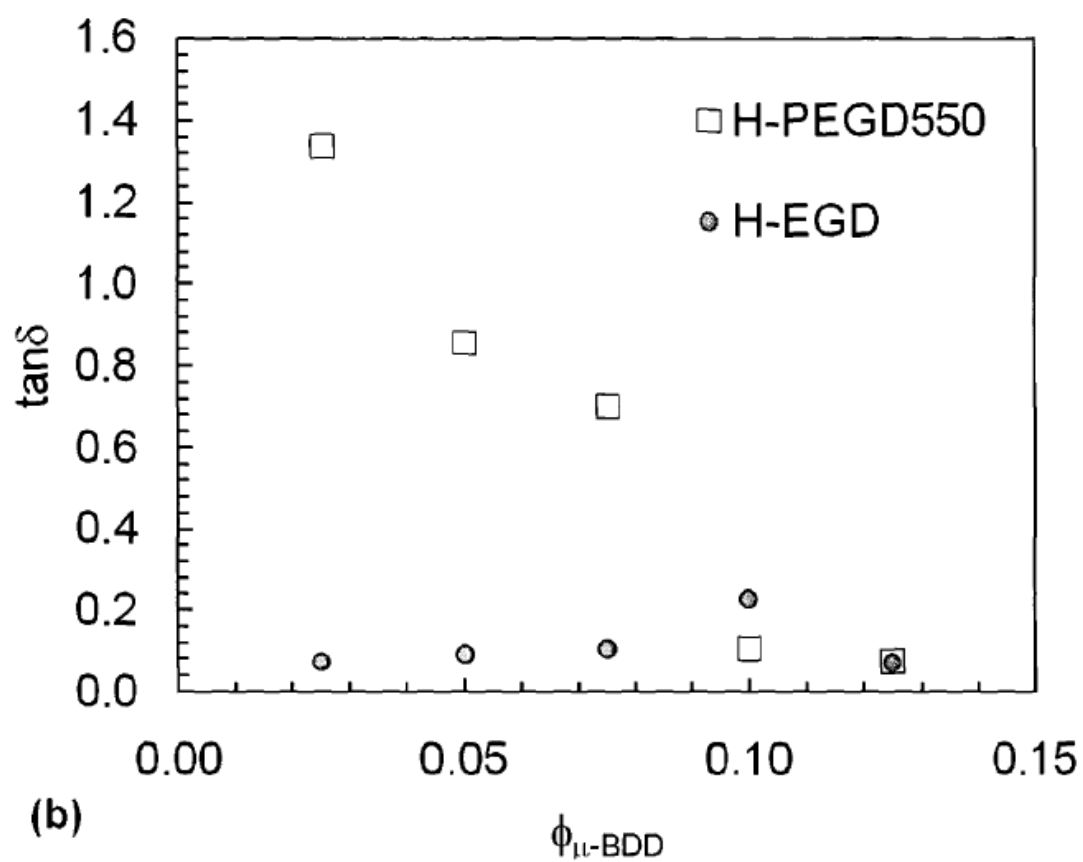


Figura 8C-5

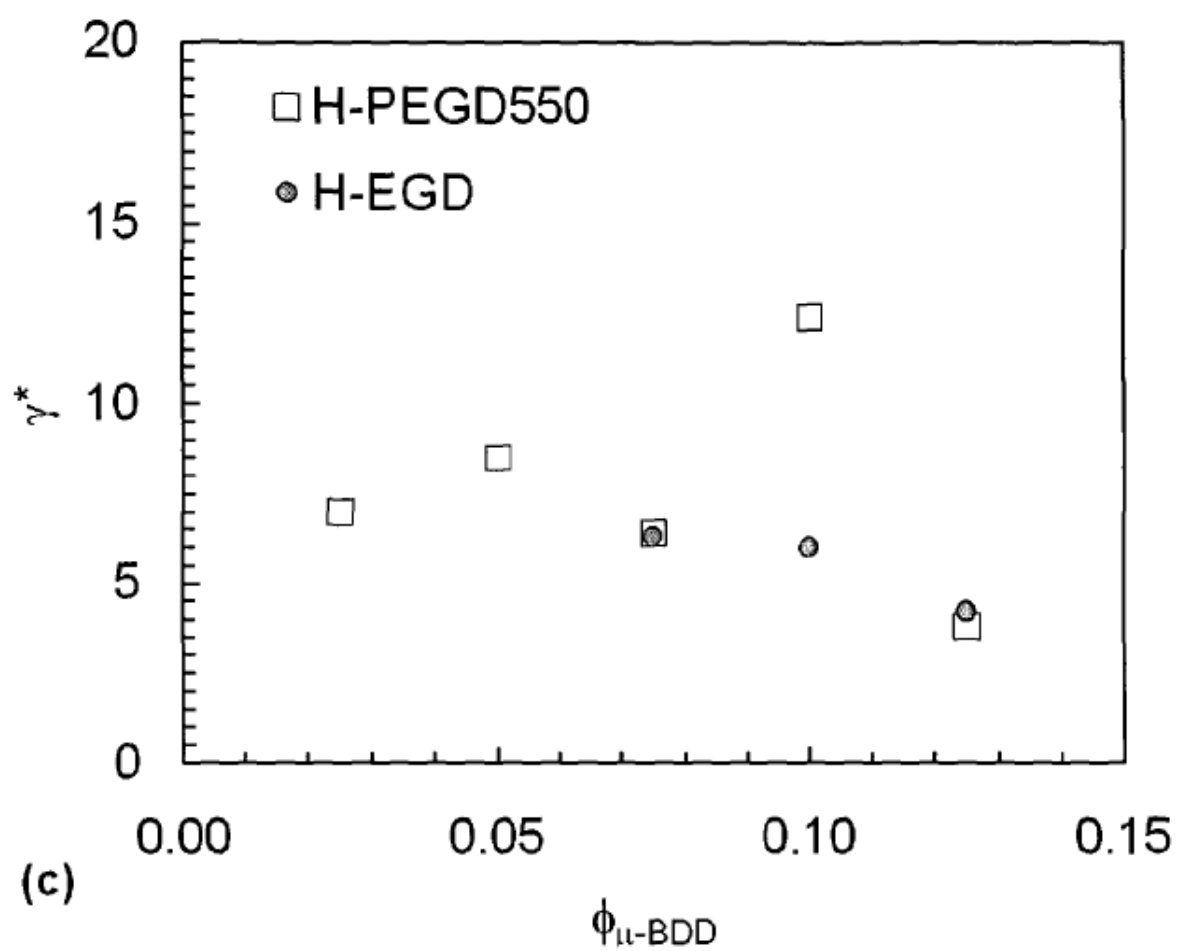


Figura 8C-5

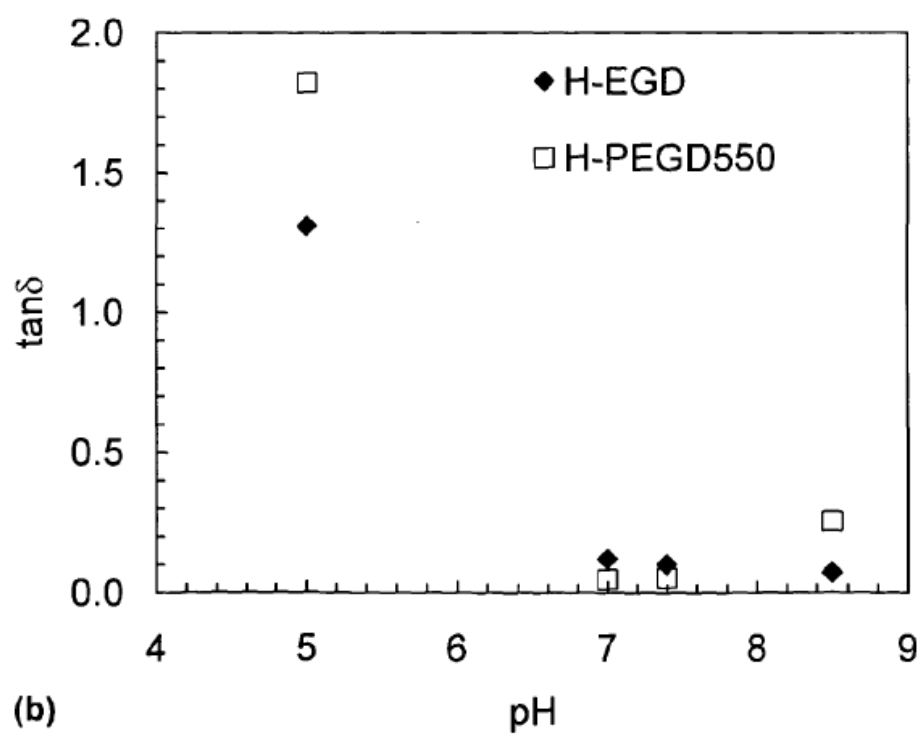
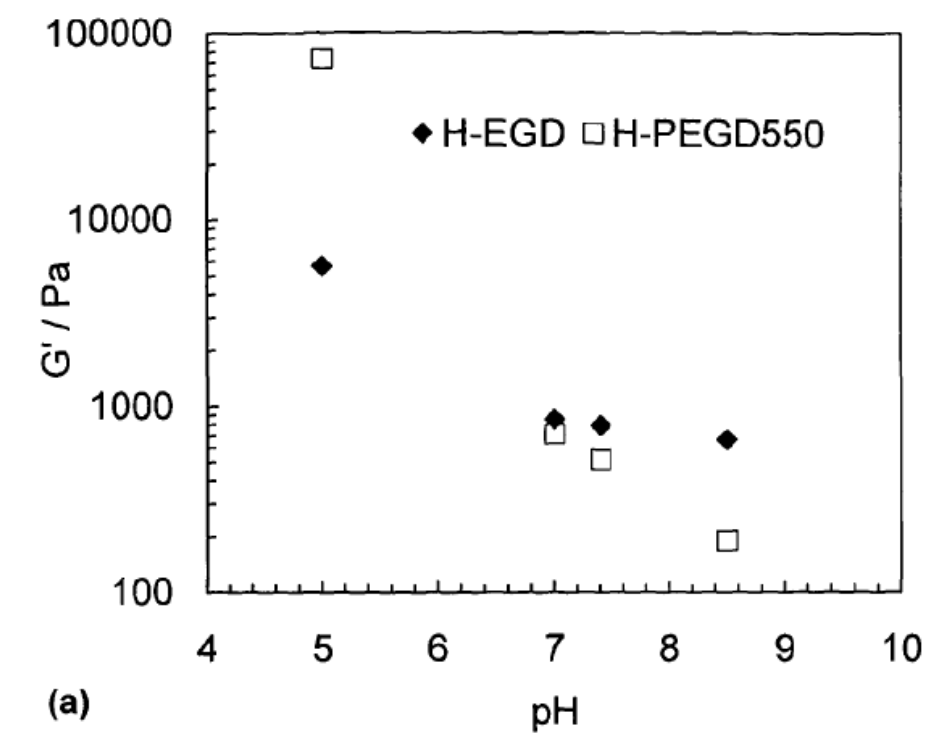


Figura 8C-6

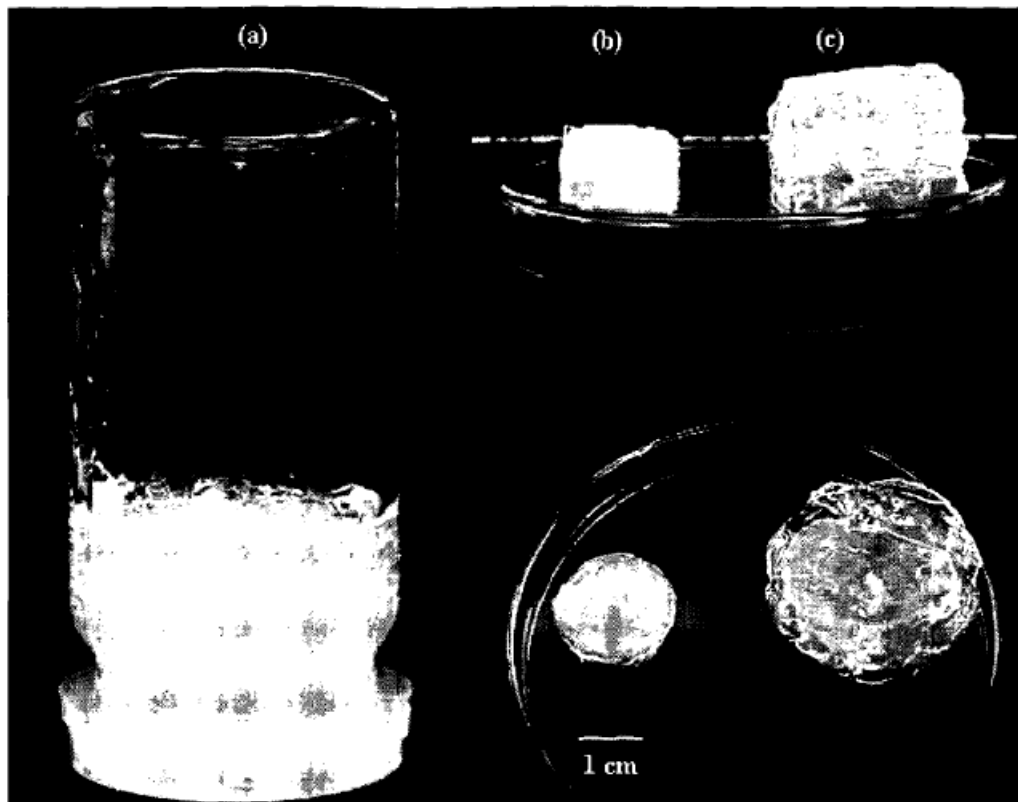


Figura 9

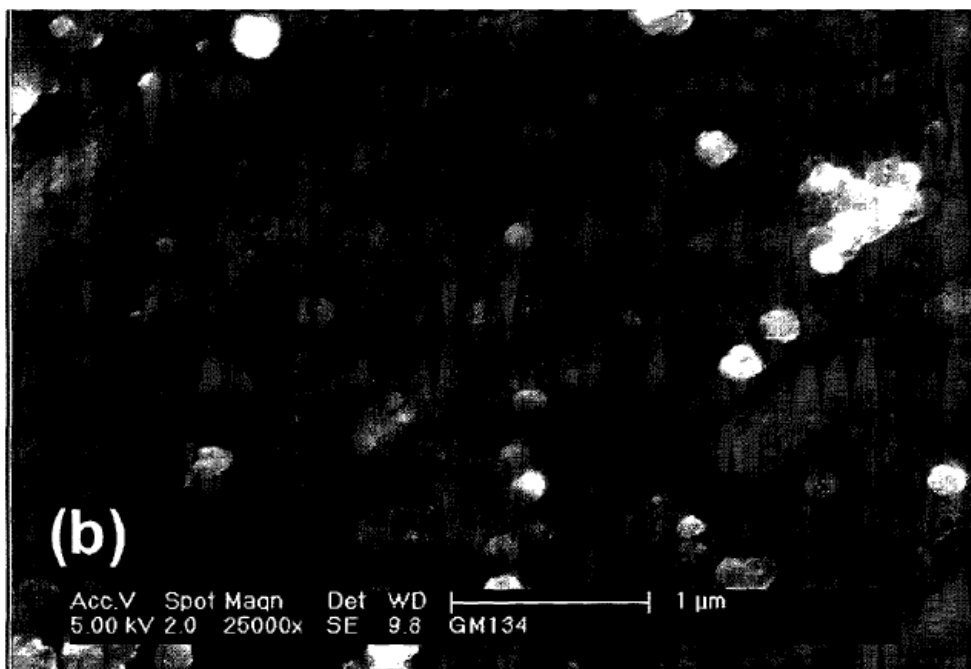
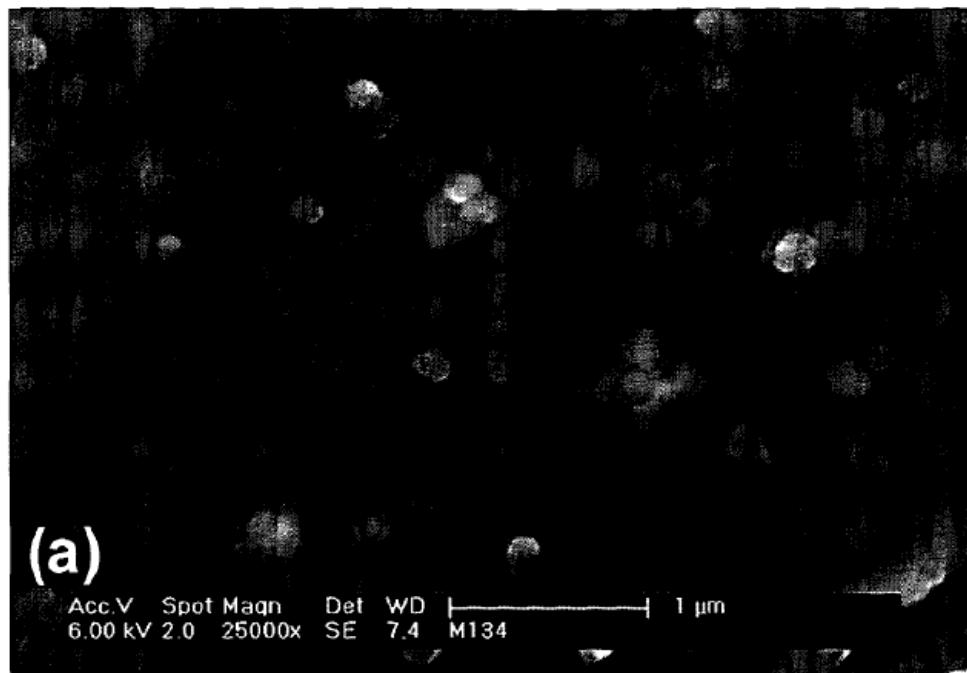


Figura 9A

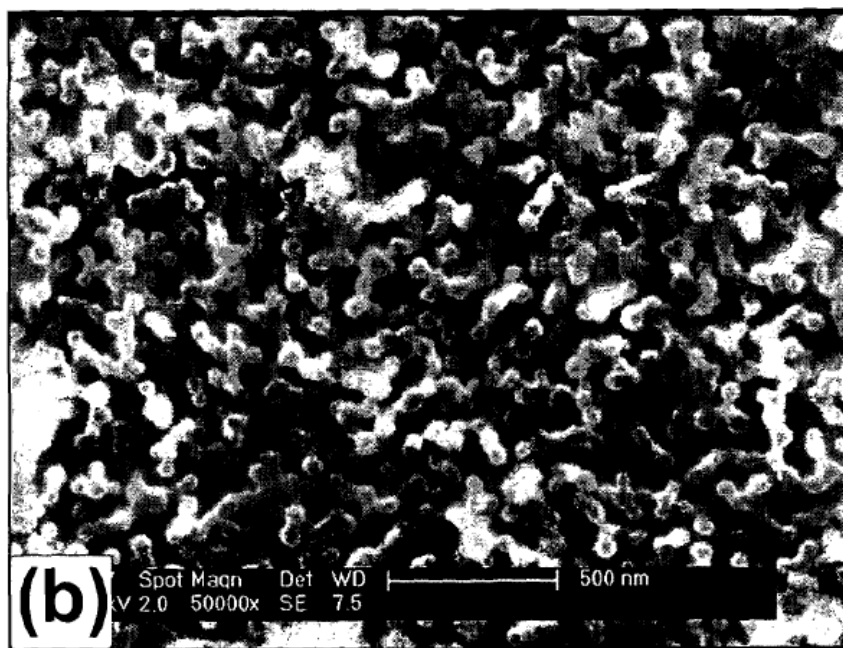
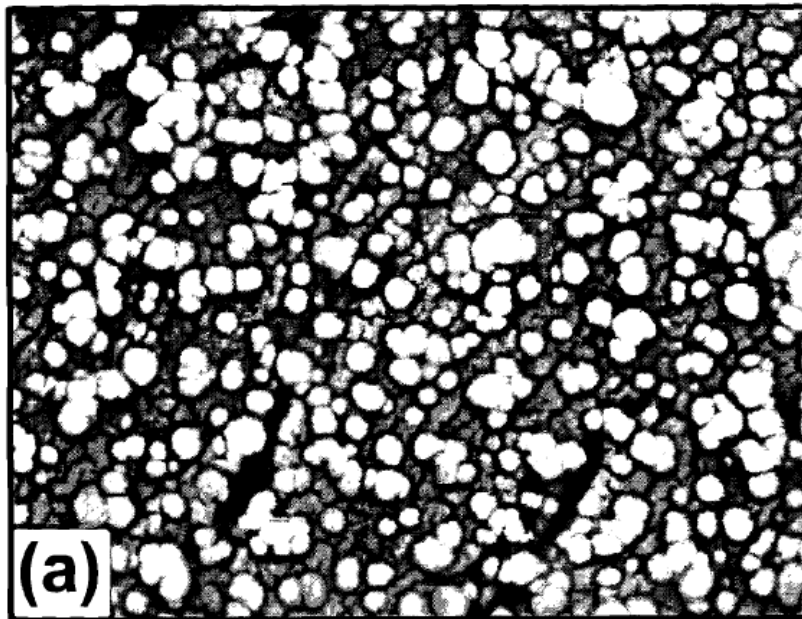


Figura 9B

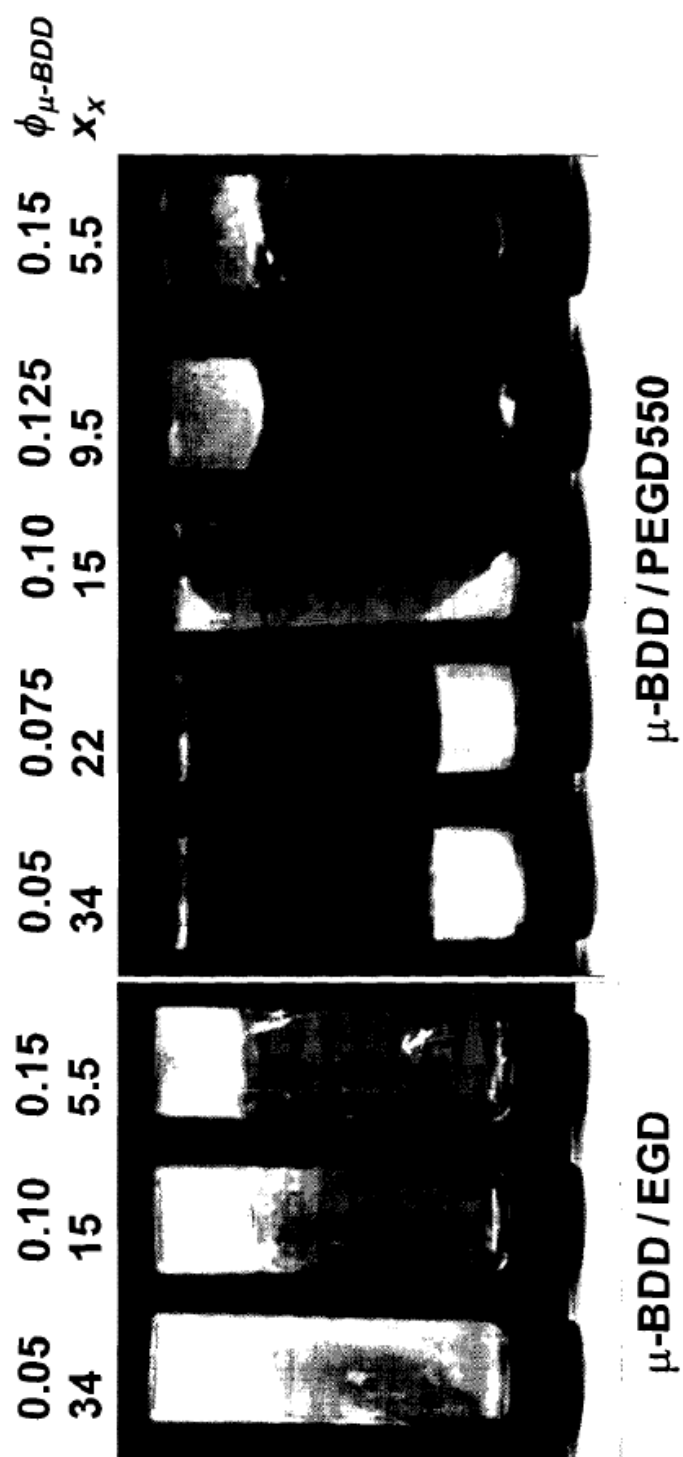


Figura 9C

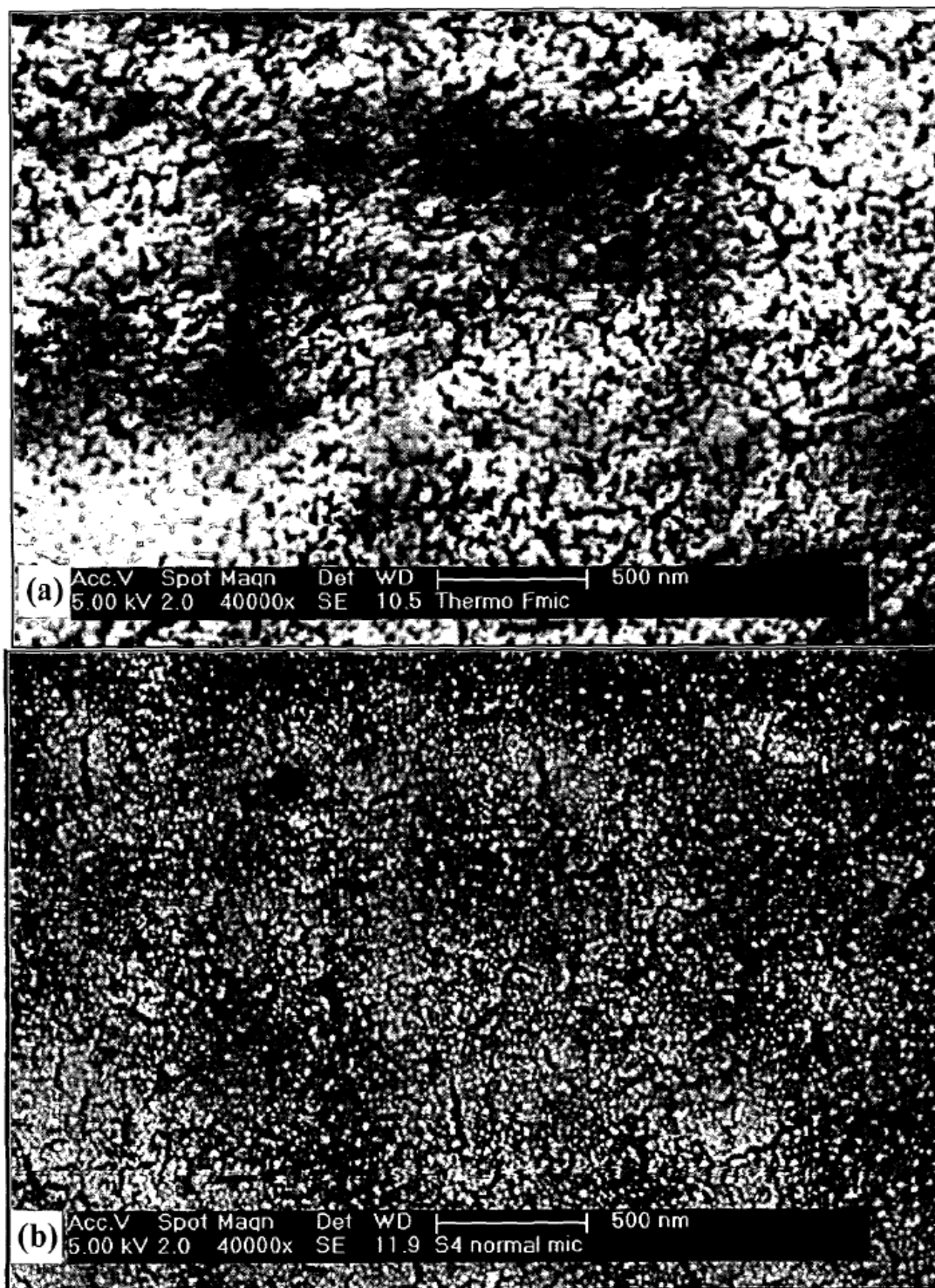


Figura 10

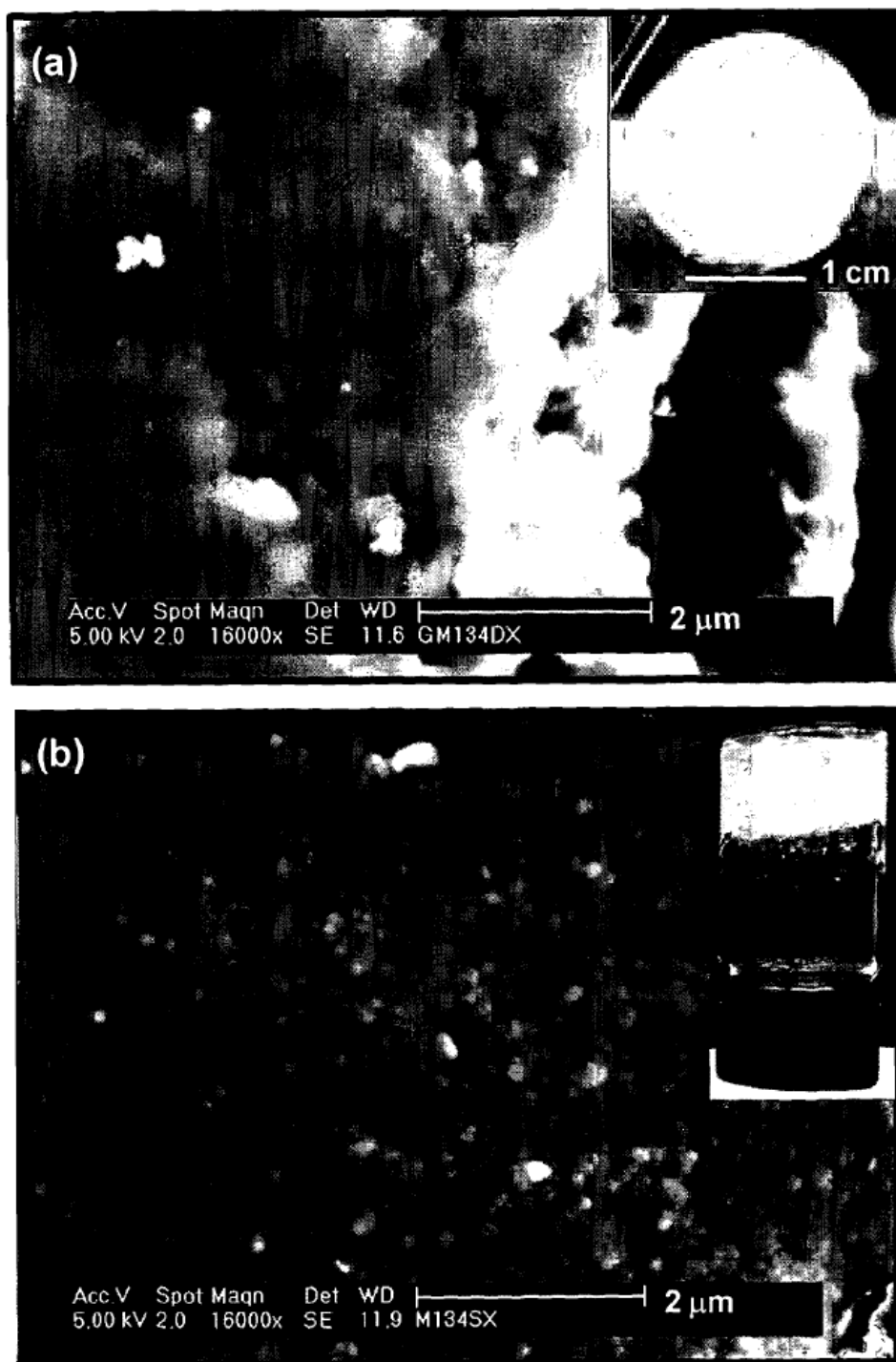


Figura 10A

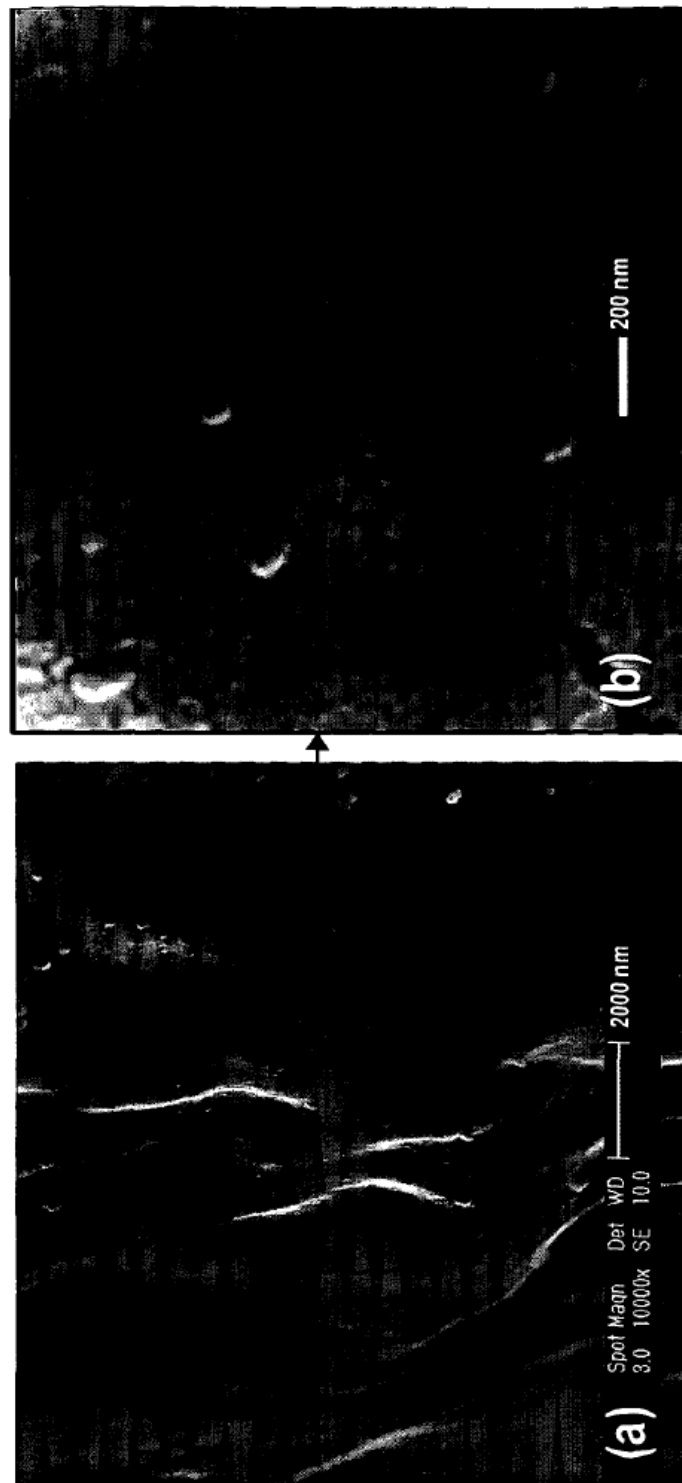
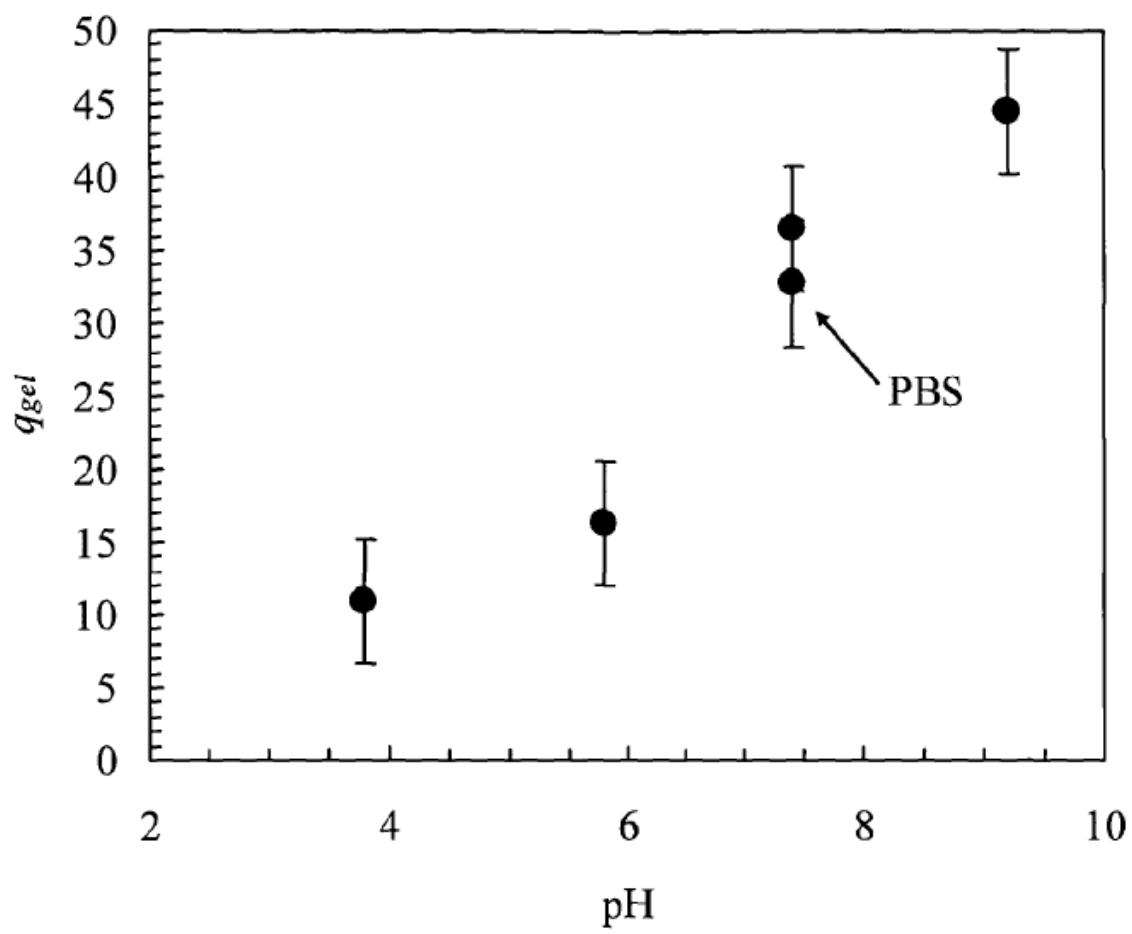


Figura 10B

**Figura 11**

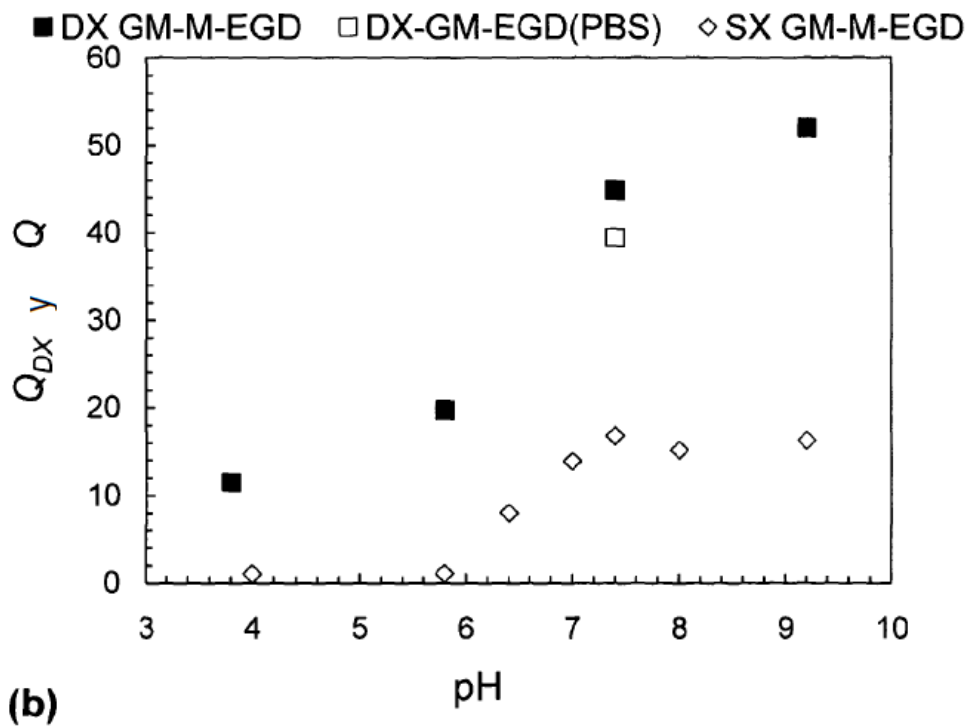
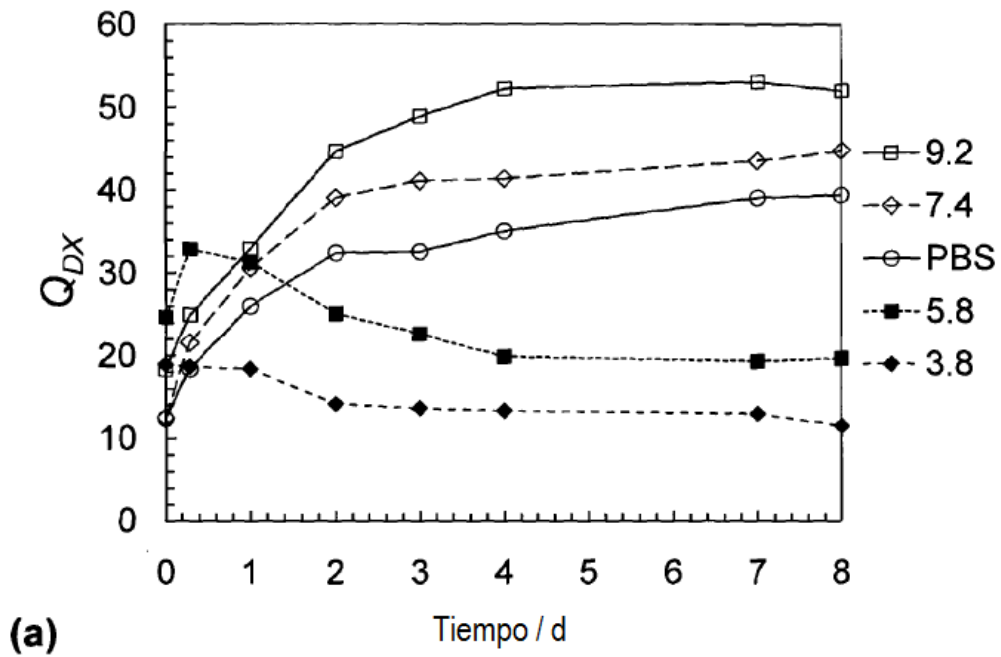


Figura 12A

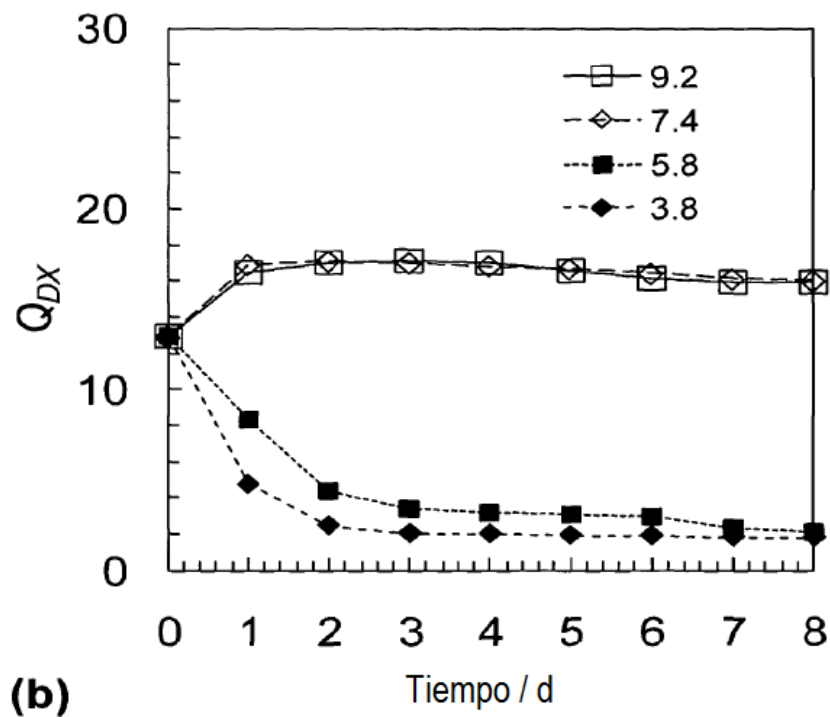
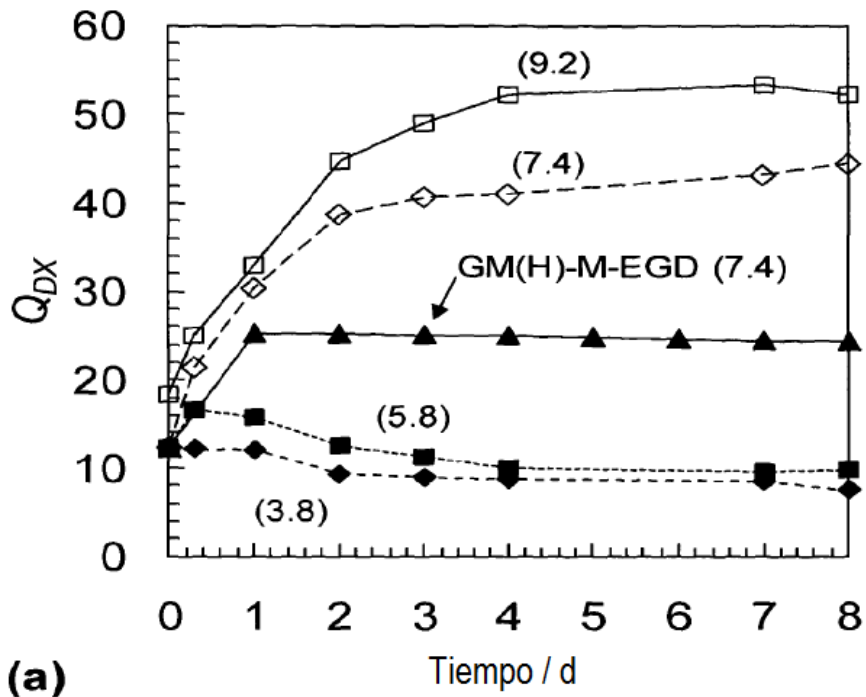


Figura 12A.1

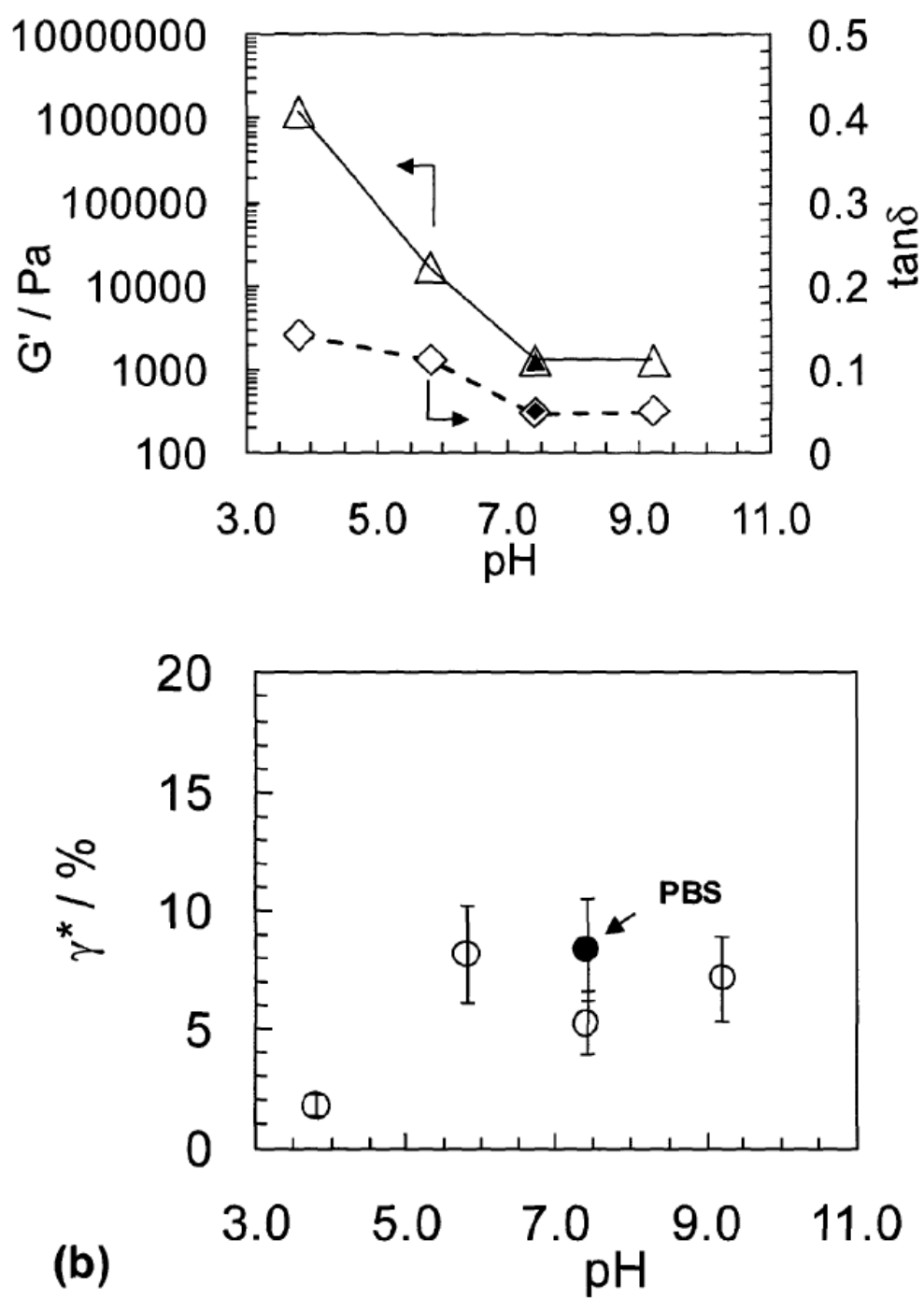


Figura 12A-1

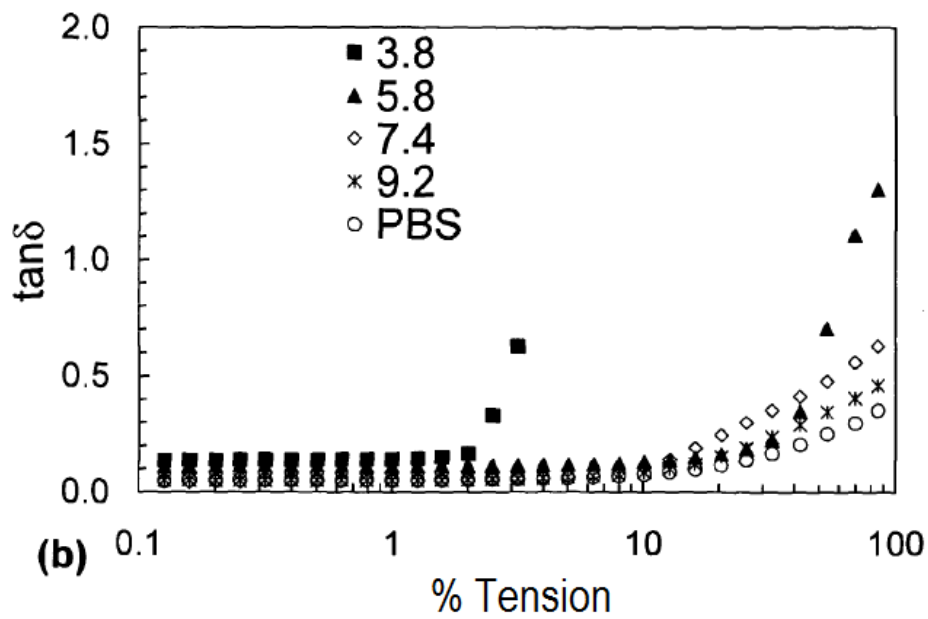
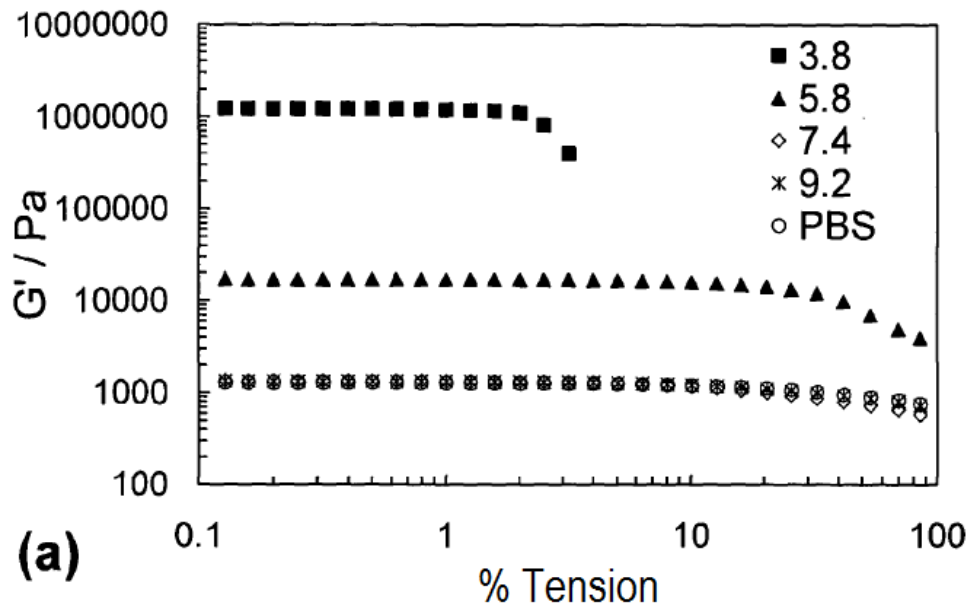


Figura 12A-2

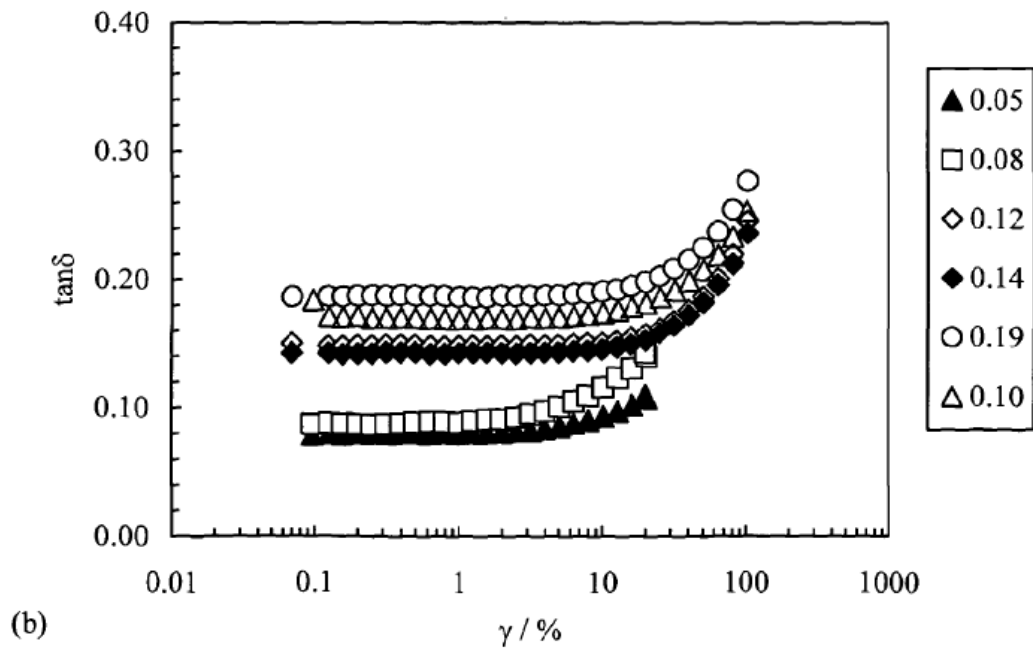
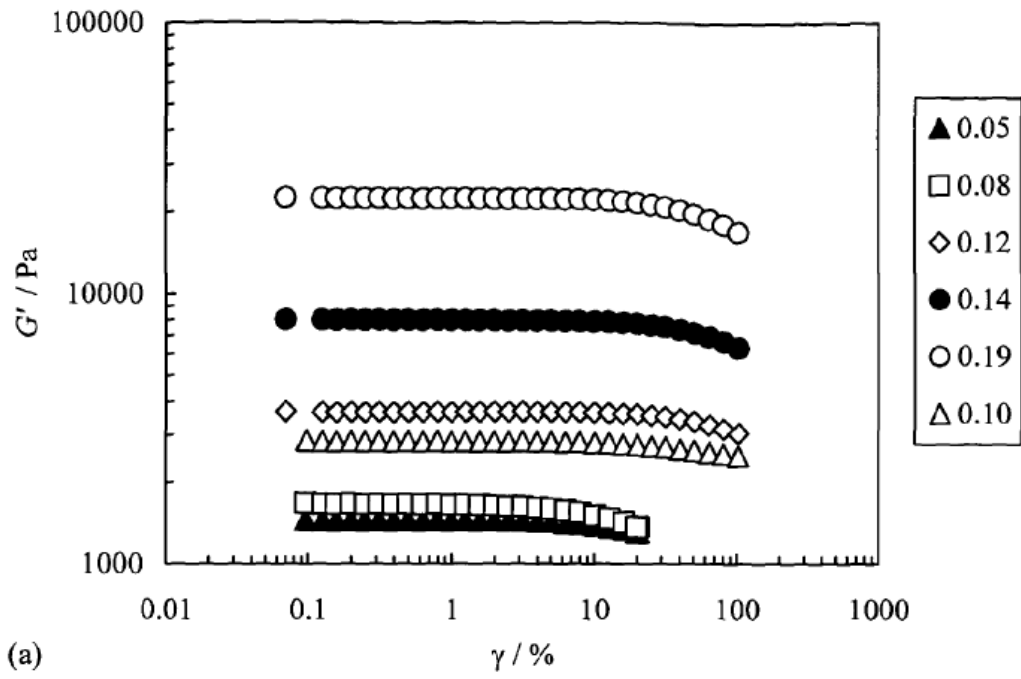


Figura 13

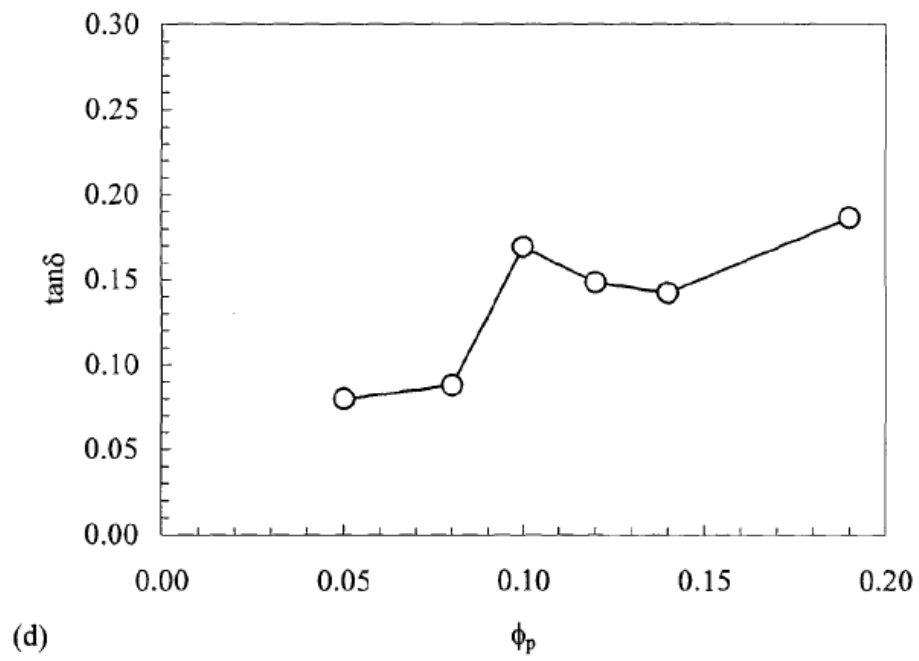
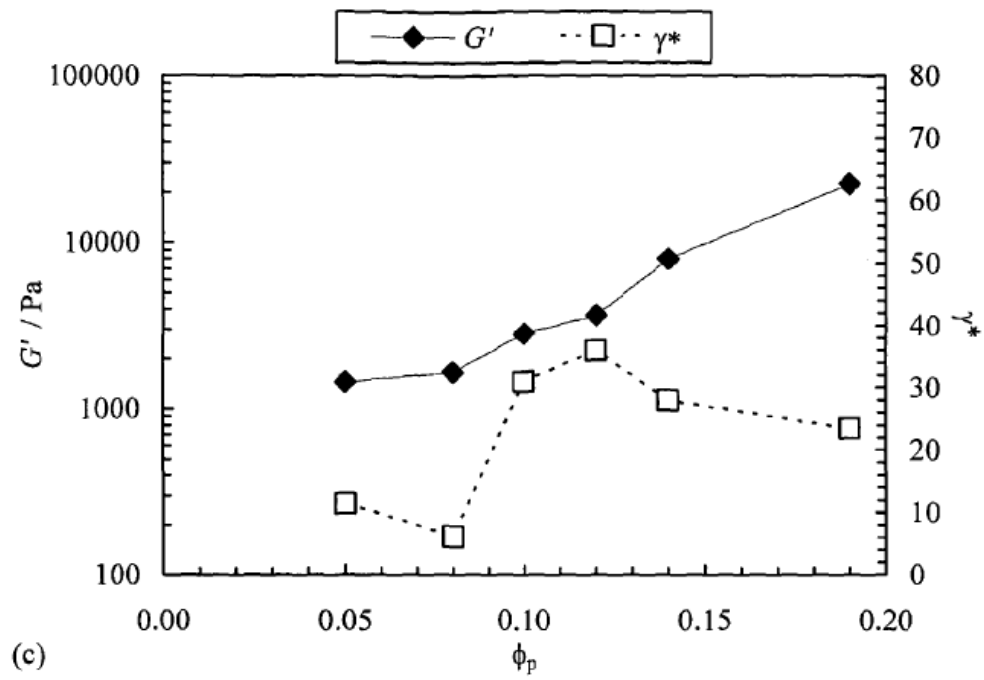


Figura 13

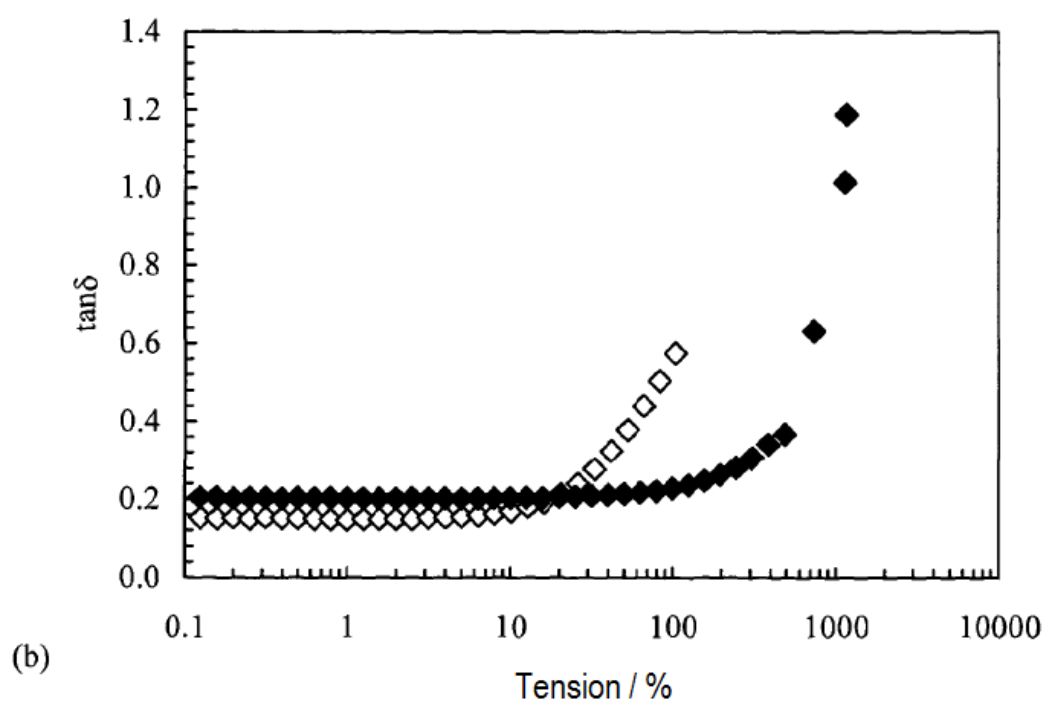
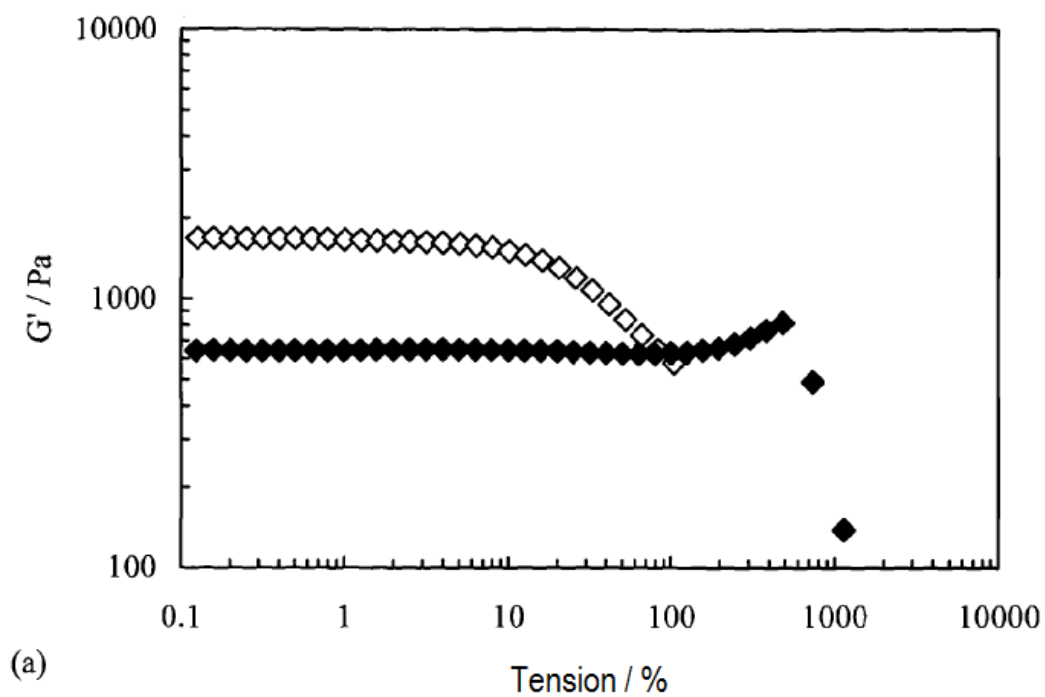


Figura 14

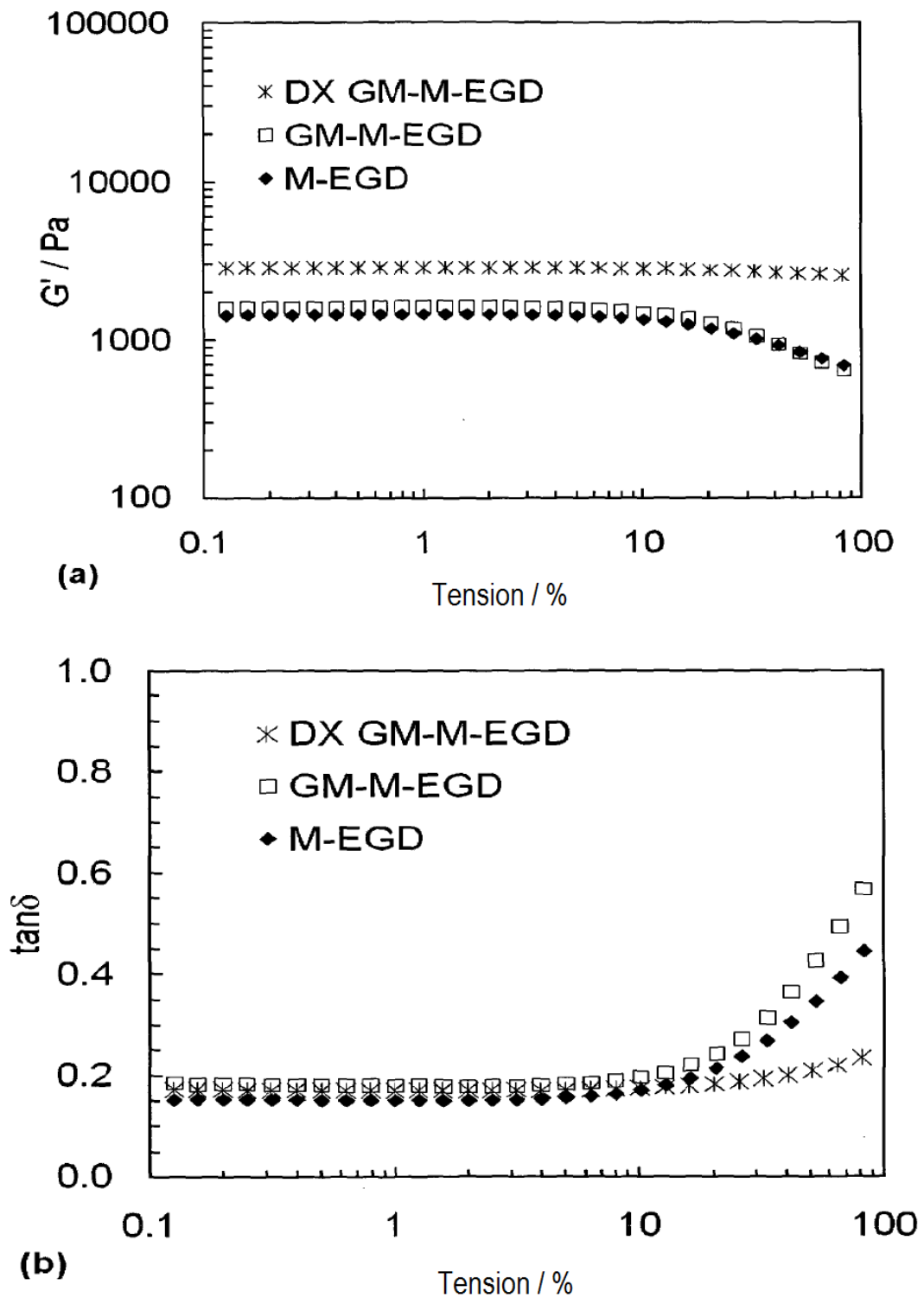


Figura 14A-1

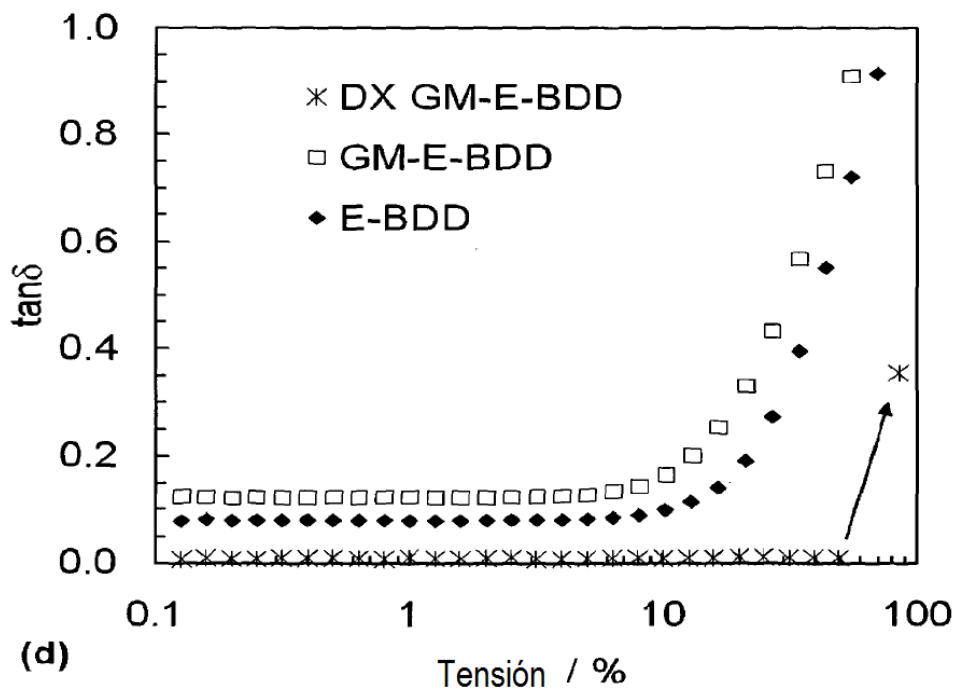
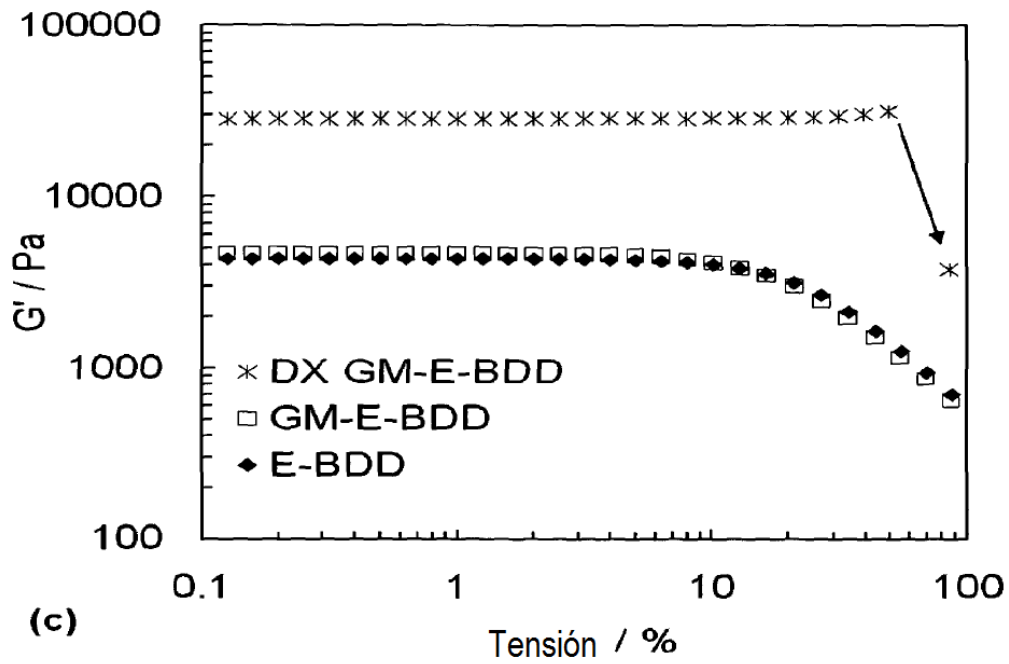
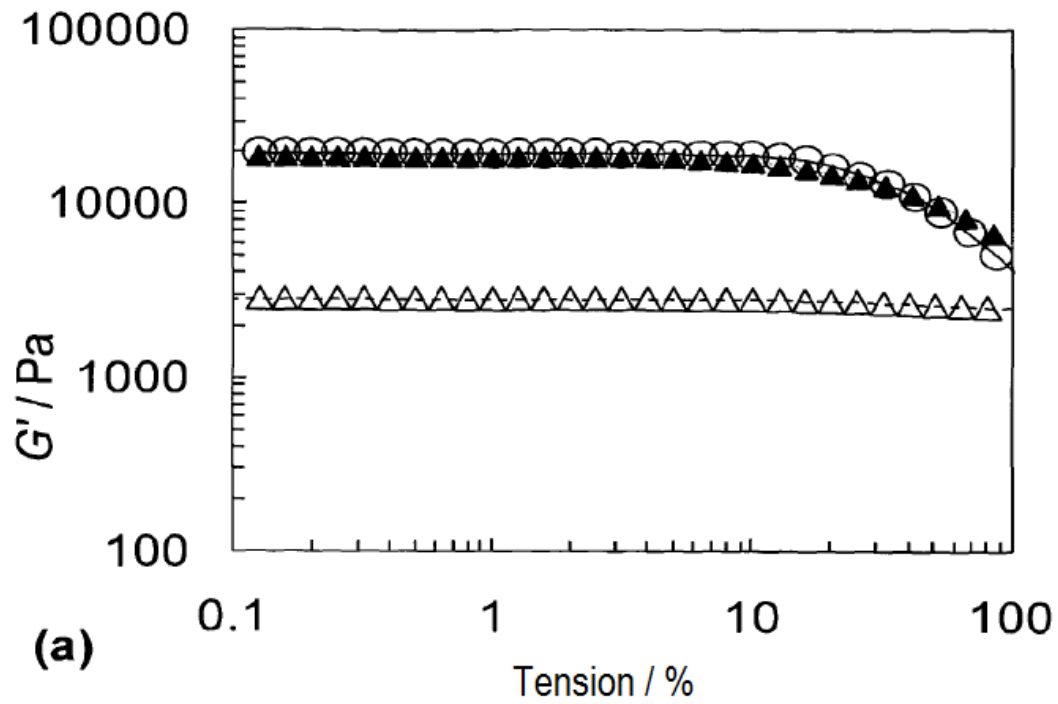
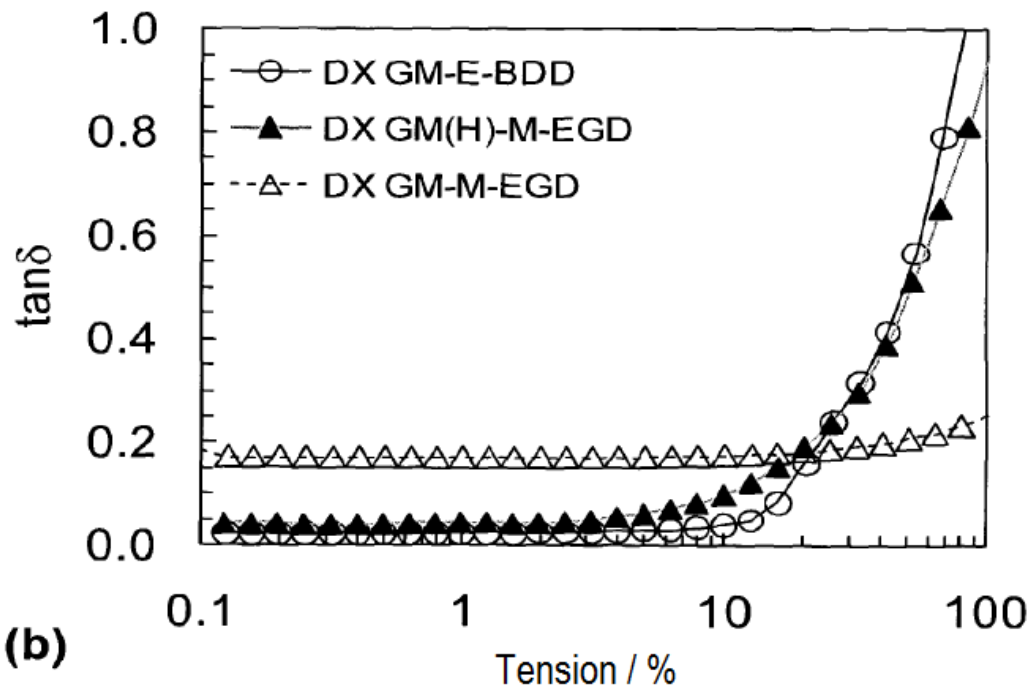


Figura 14A-1



(a)



(b)

Figura 14A-1.1

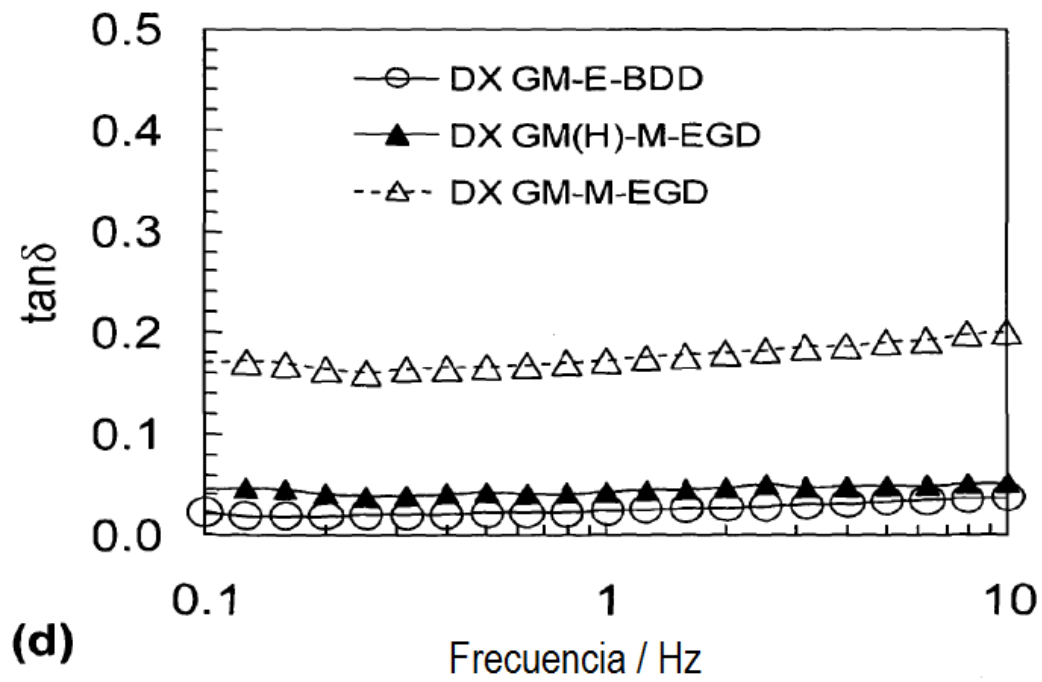
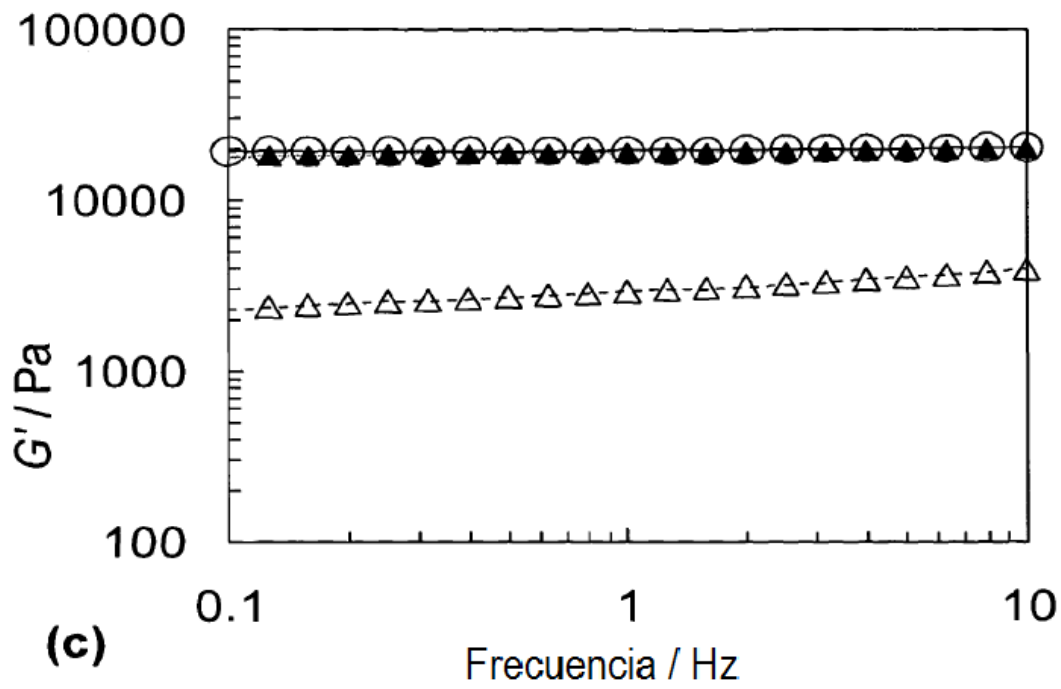


Figura 14A-1.1

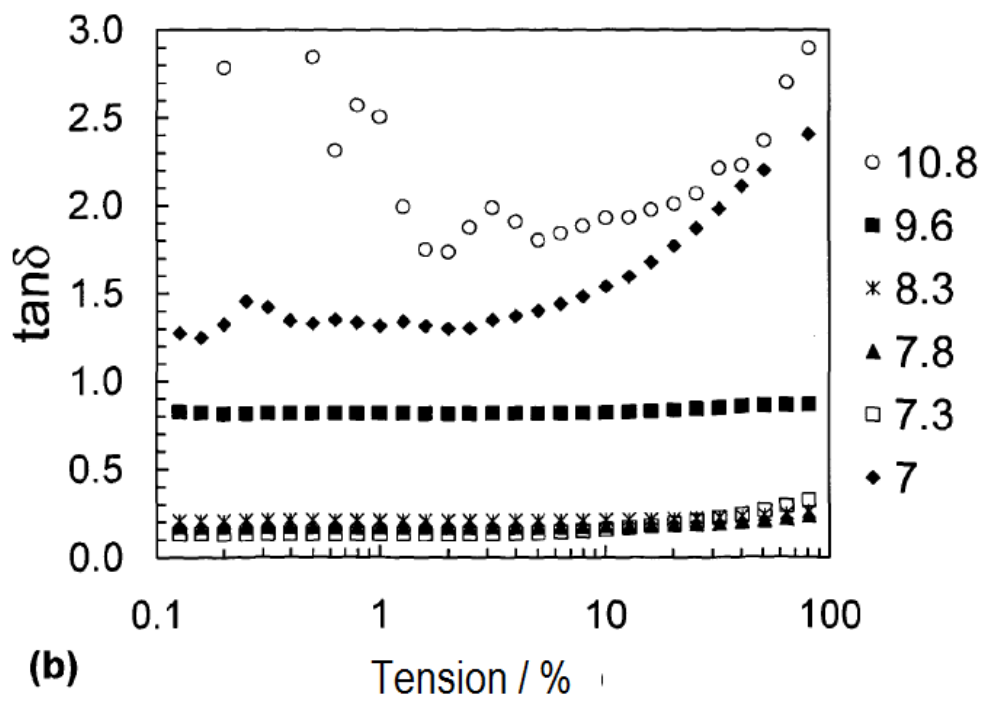
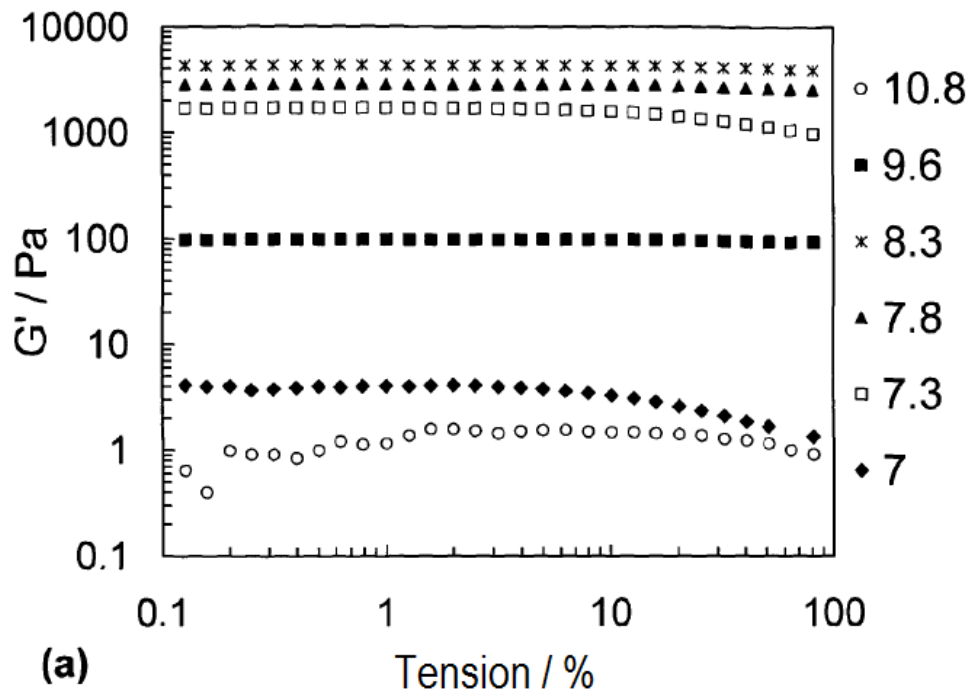


Figura 14A-2

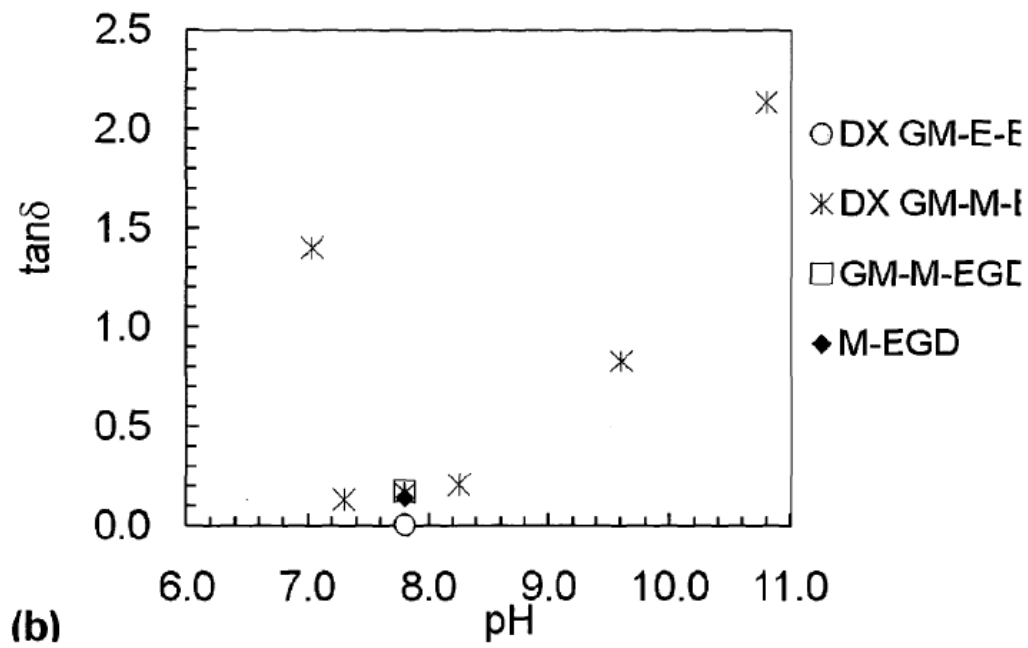
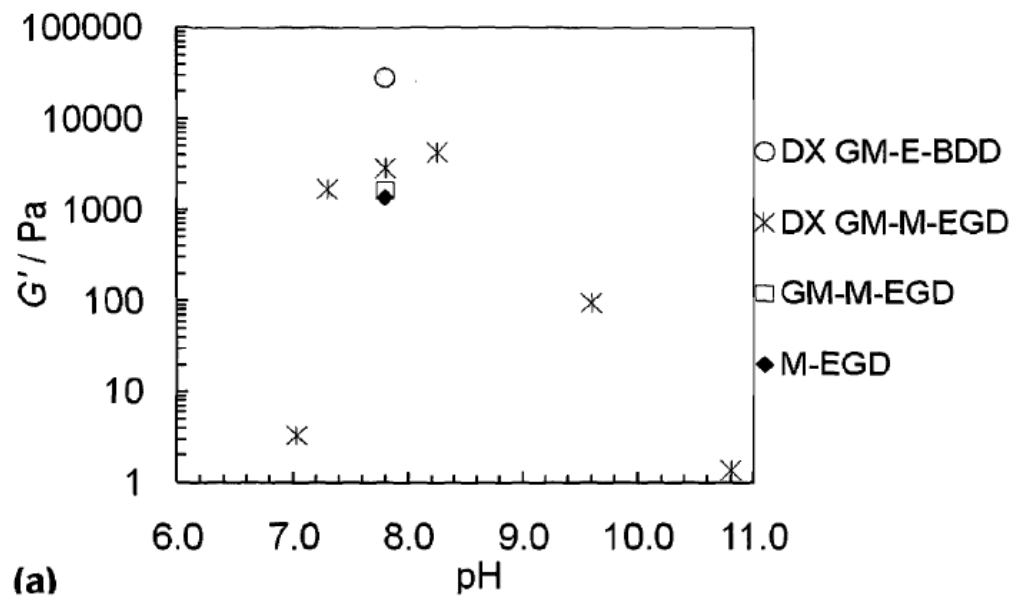


Figura 14A-3

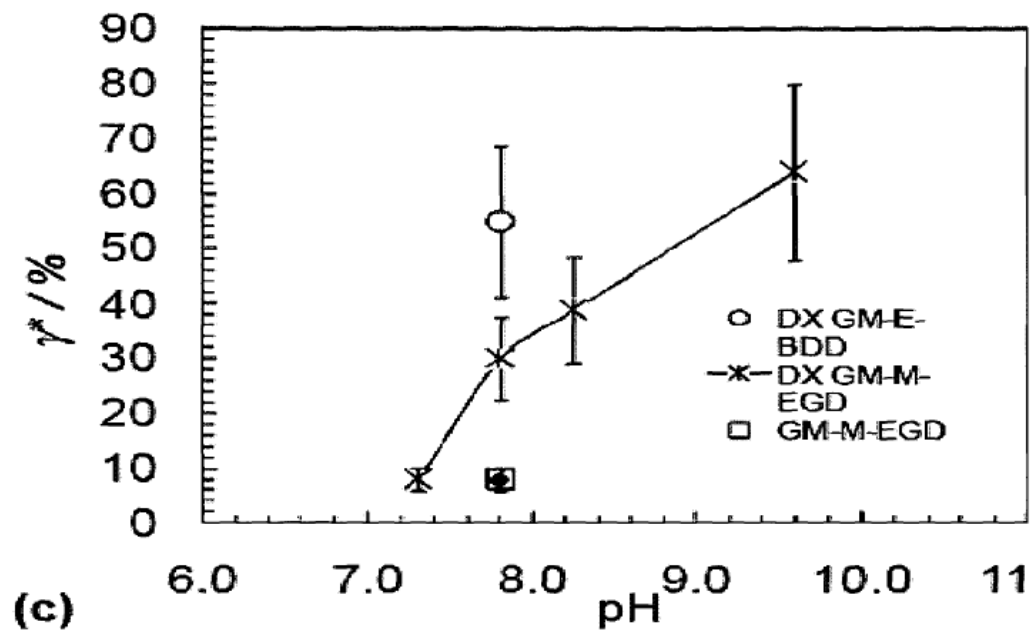


Figura 14A-3

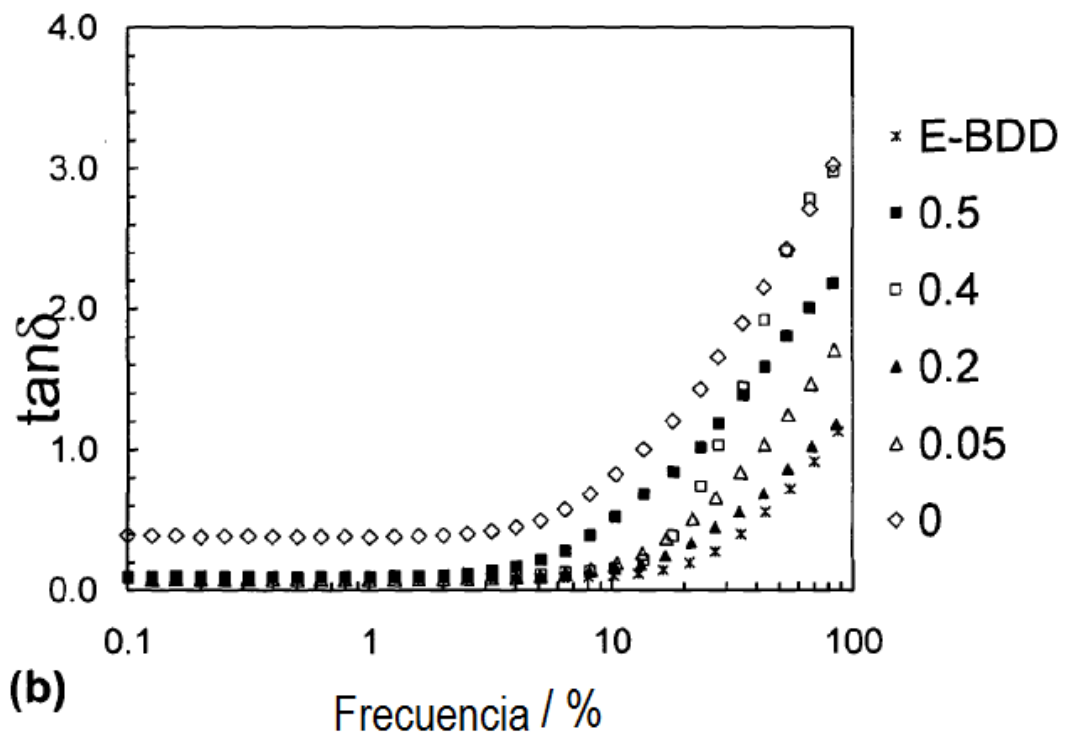
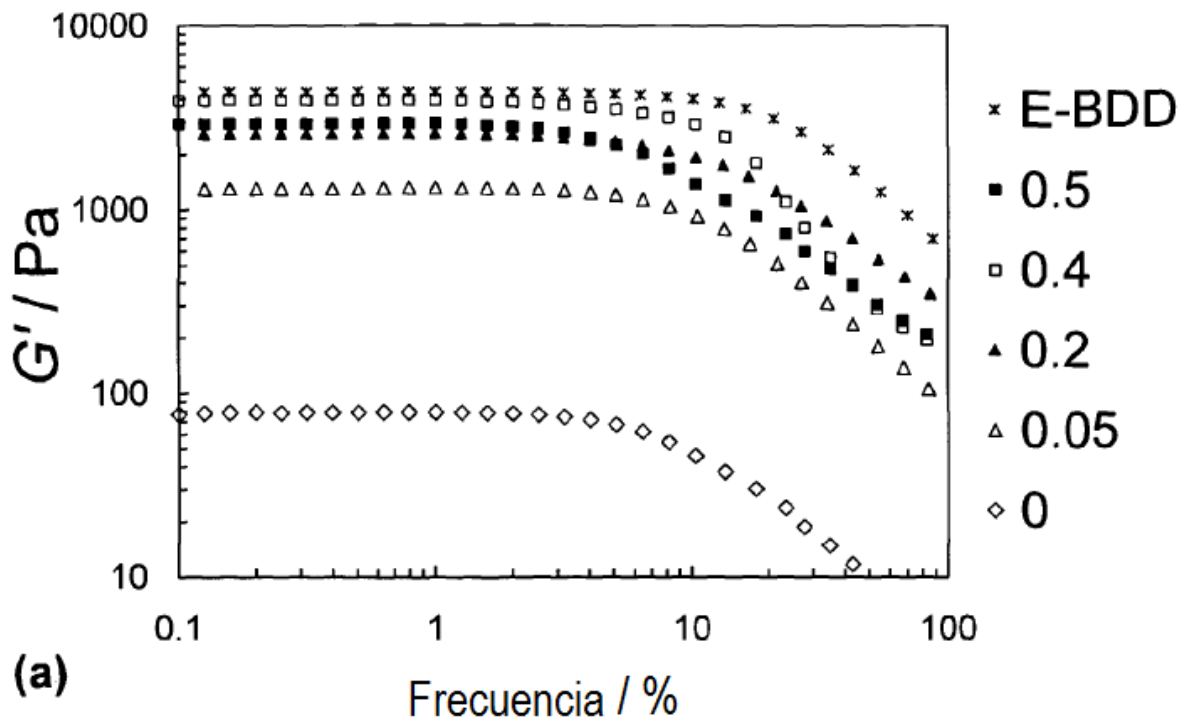


Figura 14B-1

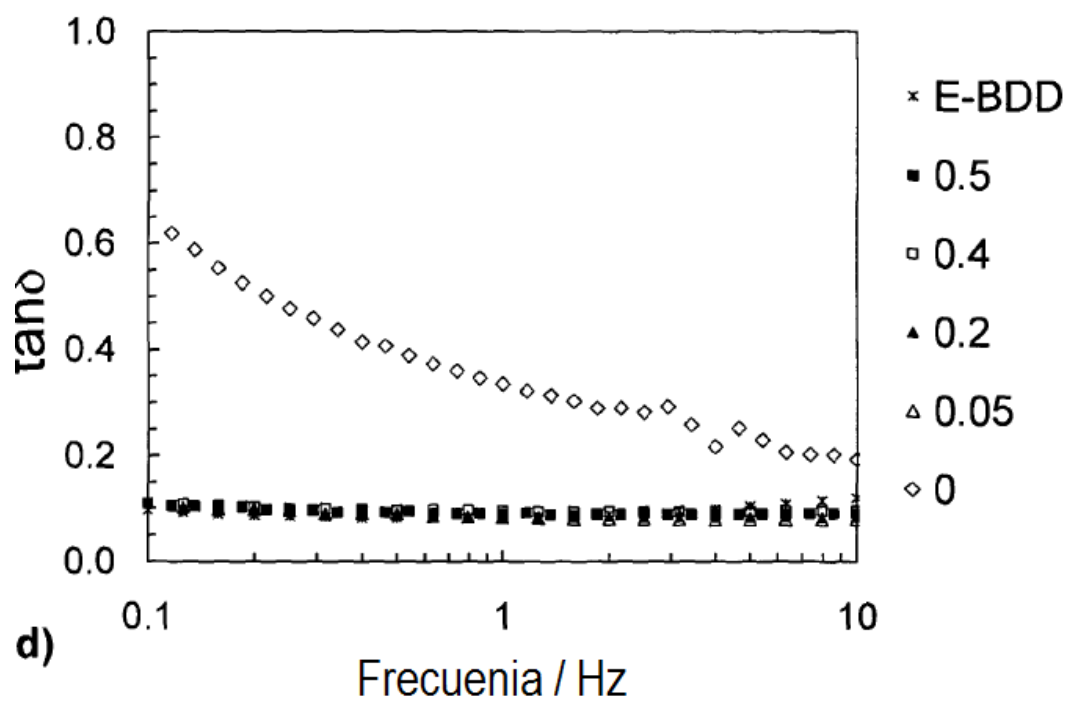
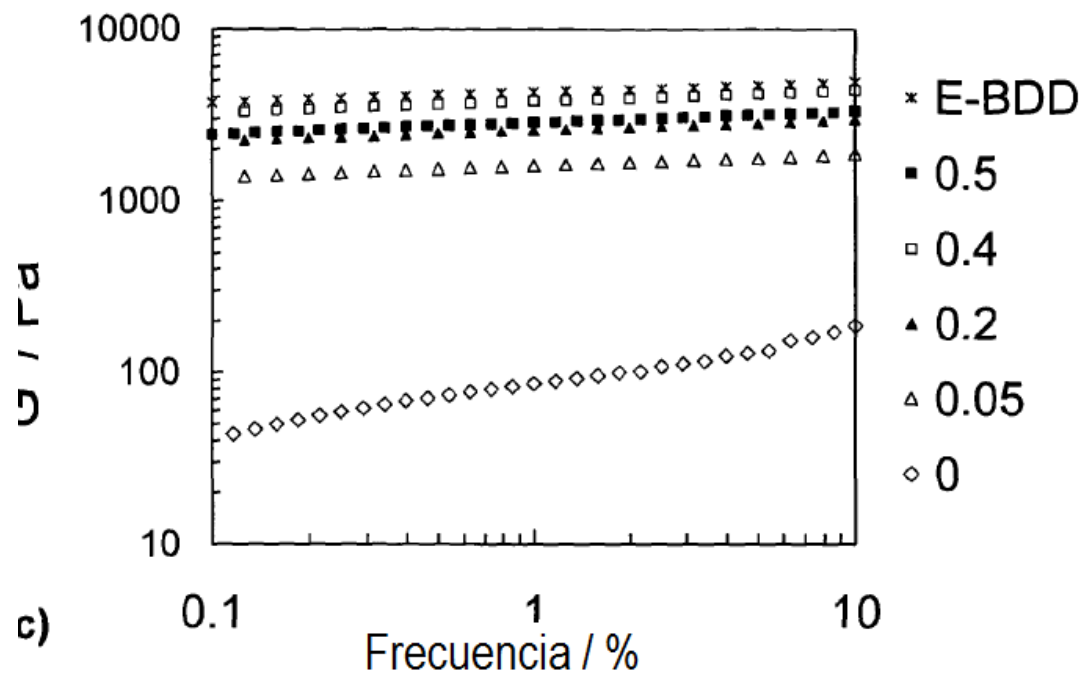


Figura 14B-1

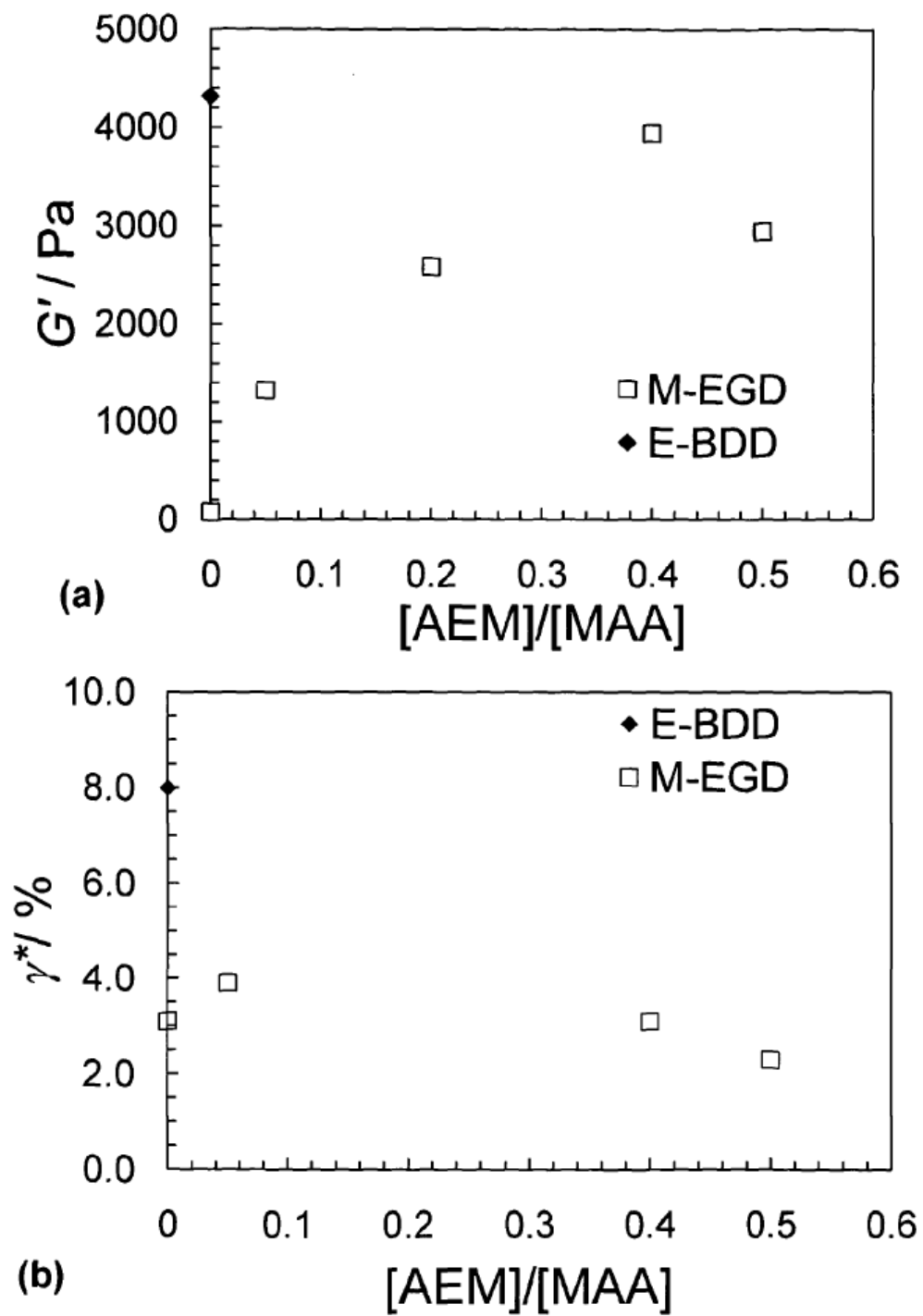


Figura 14B-2

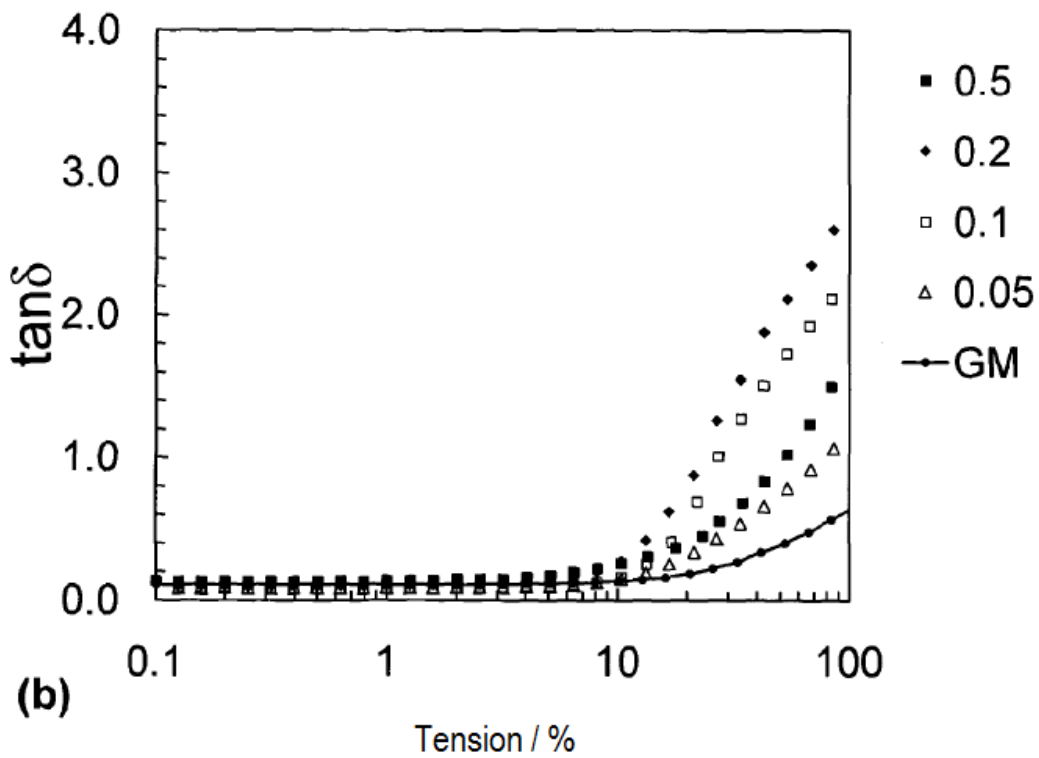
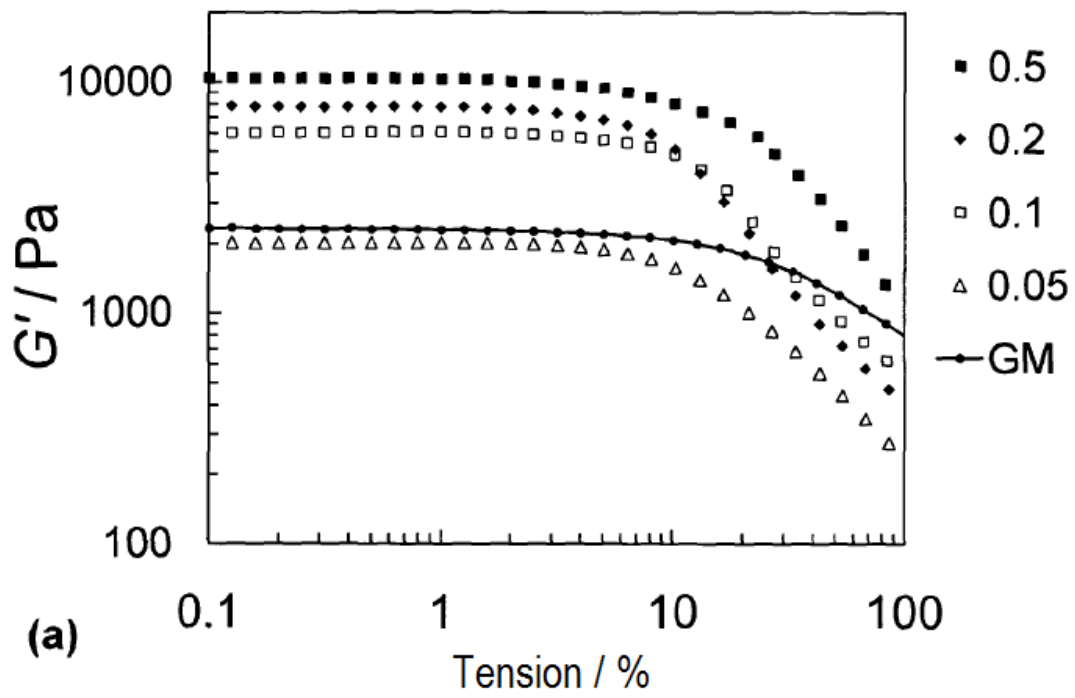


Figura 14B-3

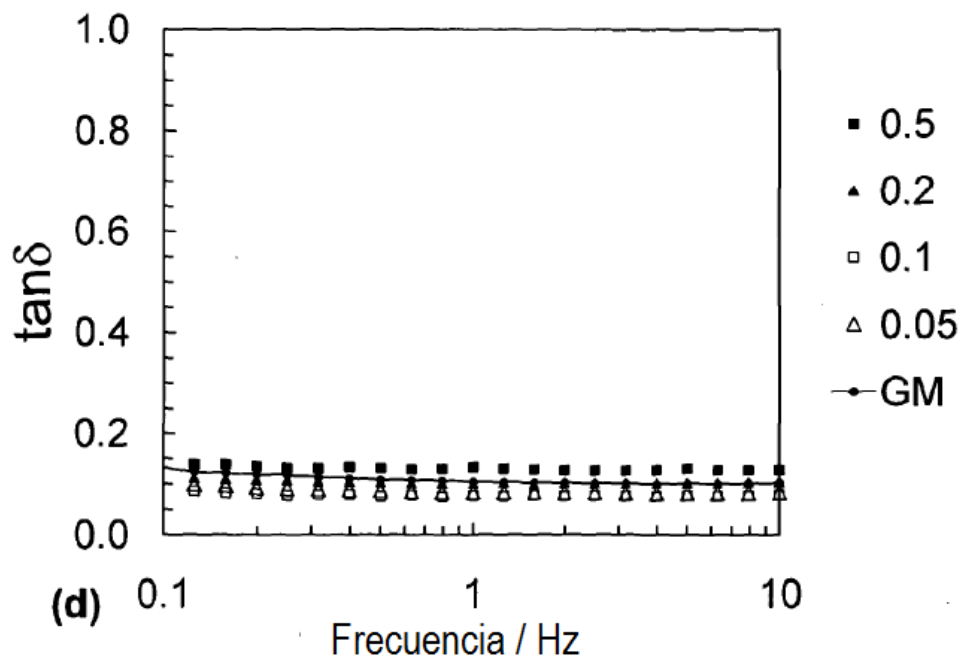
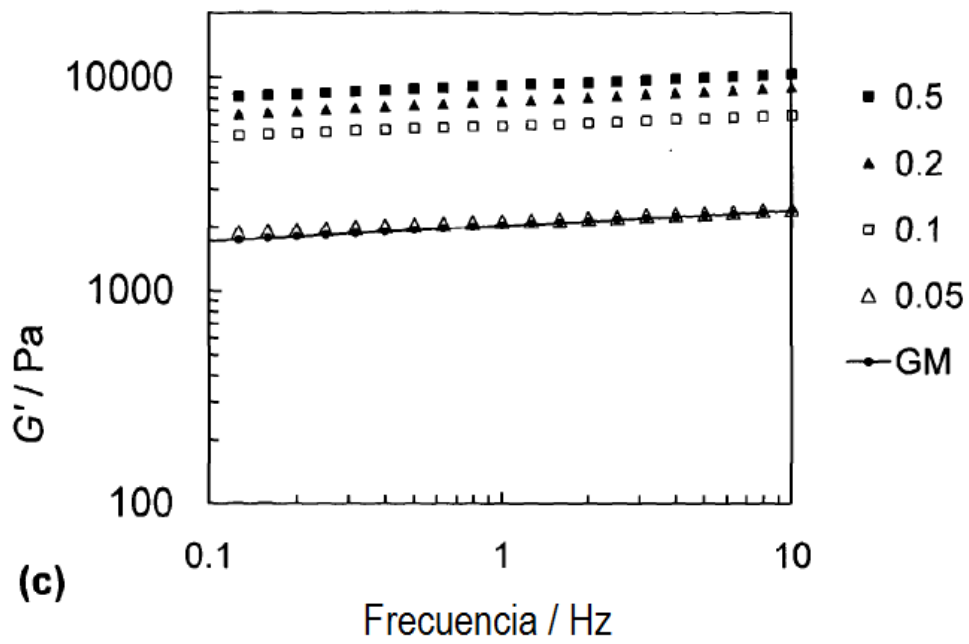


Figura 14B-3

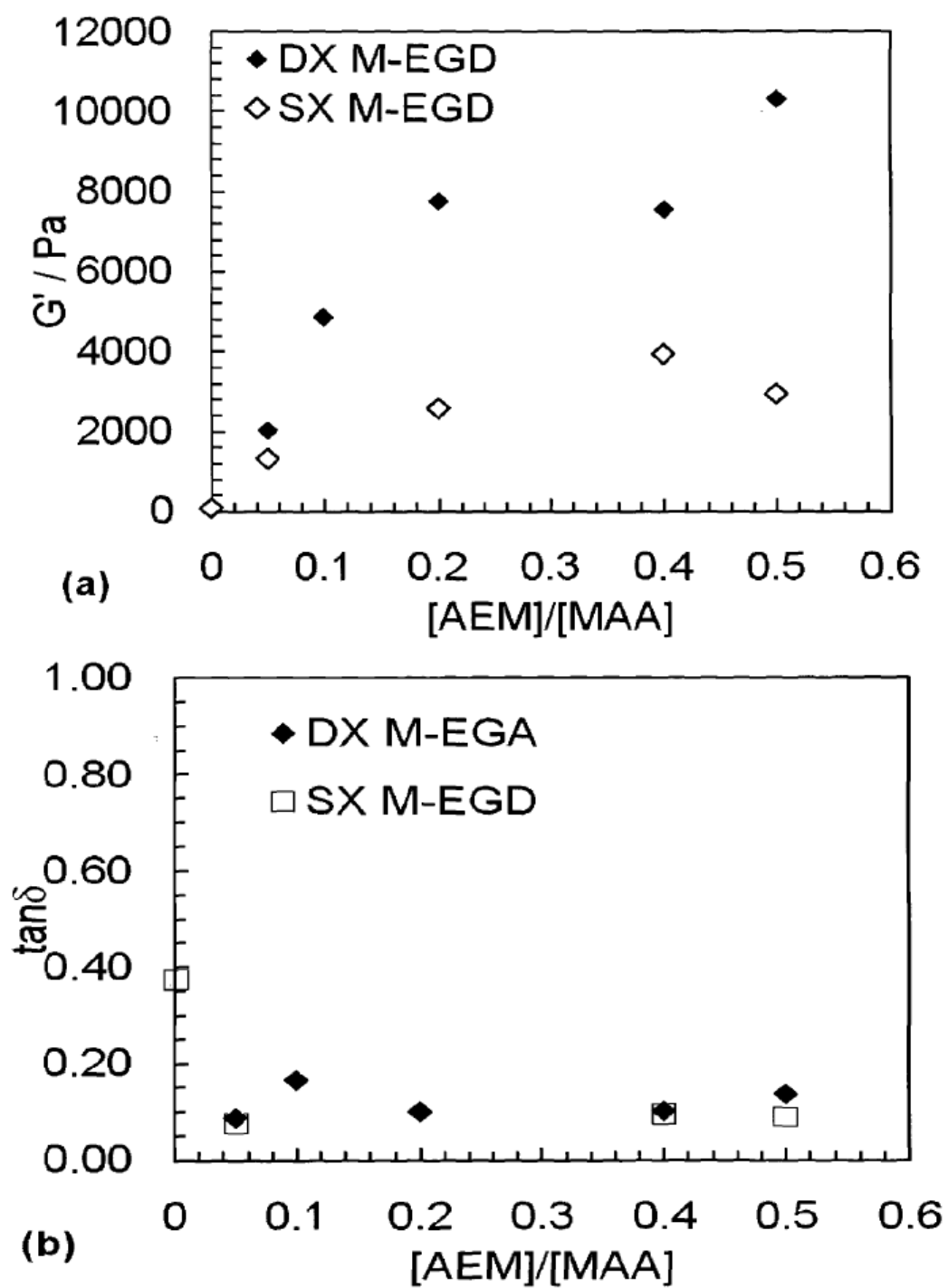


Figura 14B-4

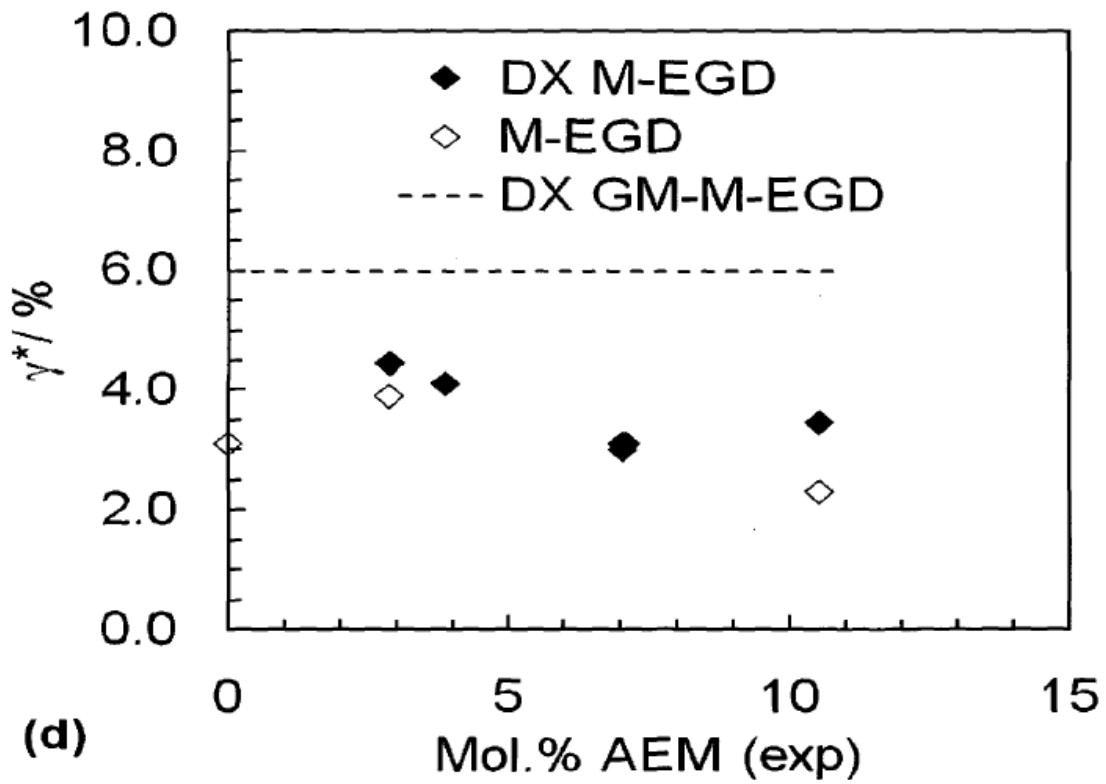
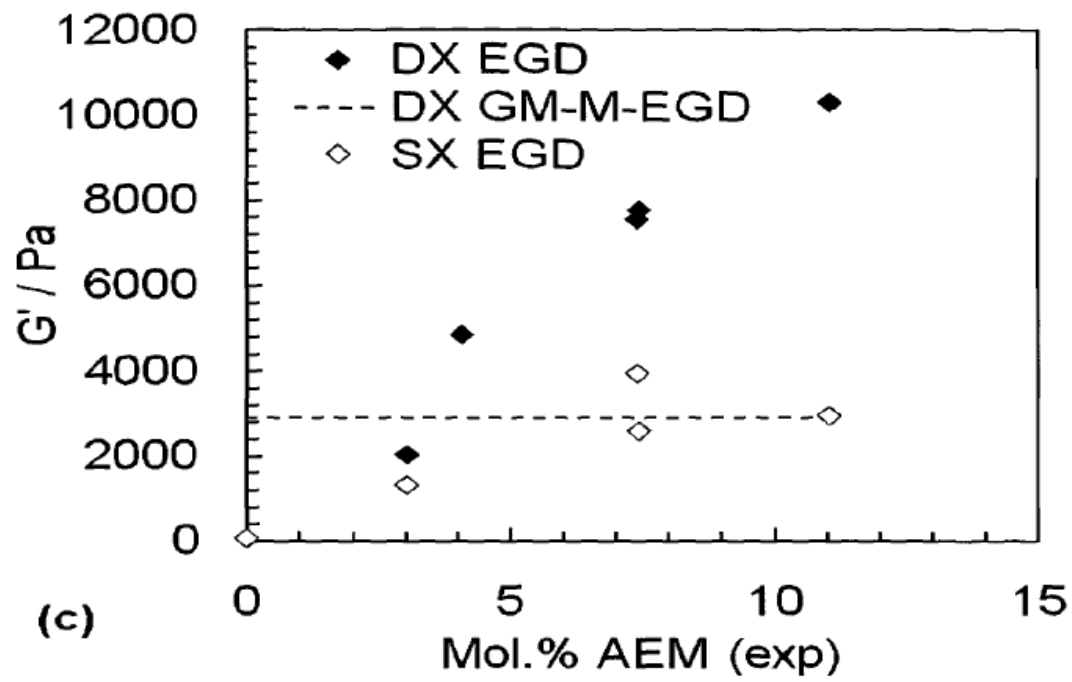


Figura 14B-4

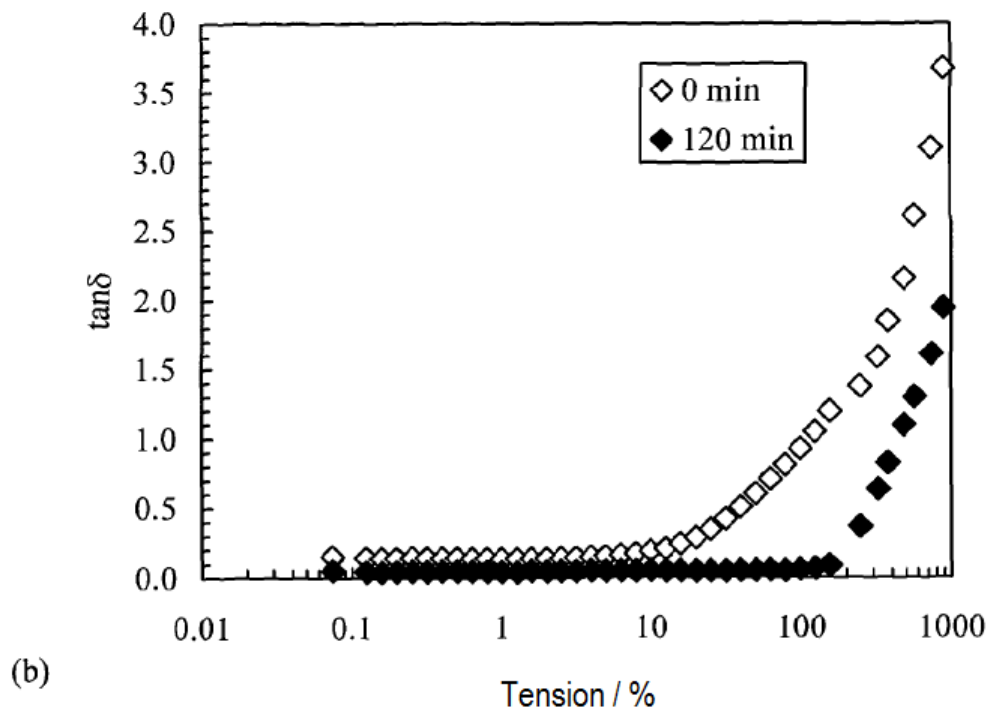
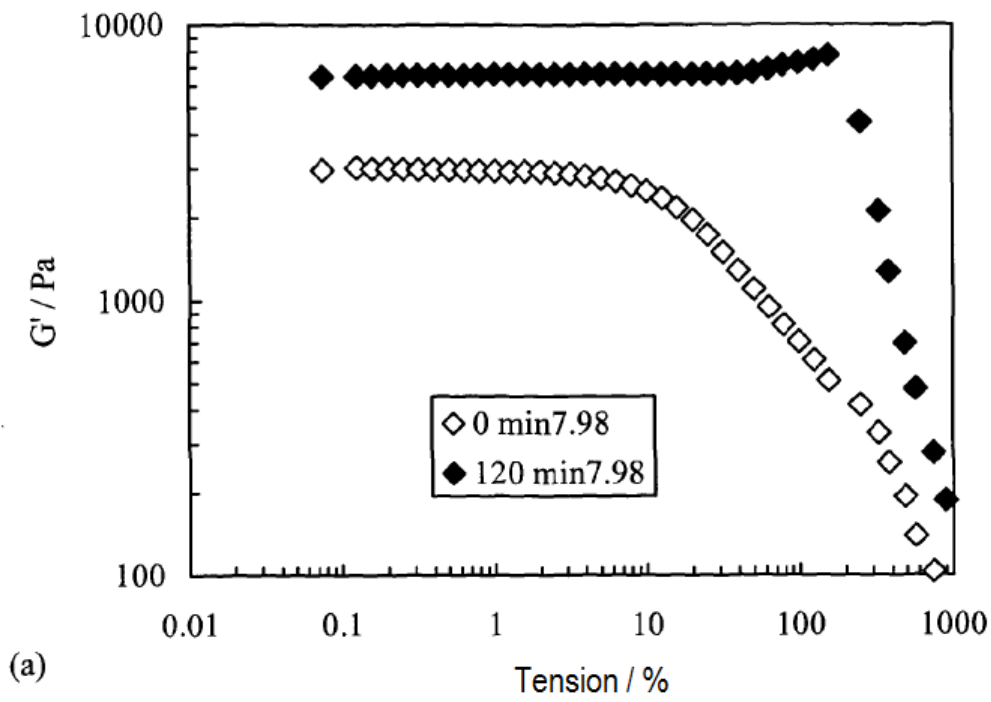


Figura 15

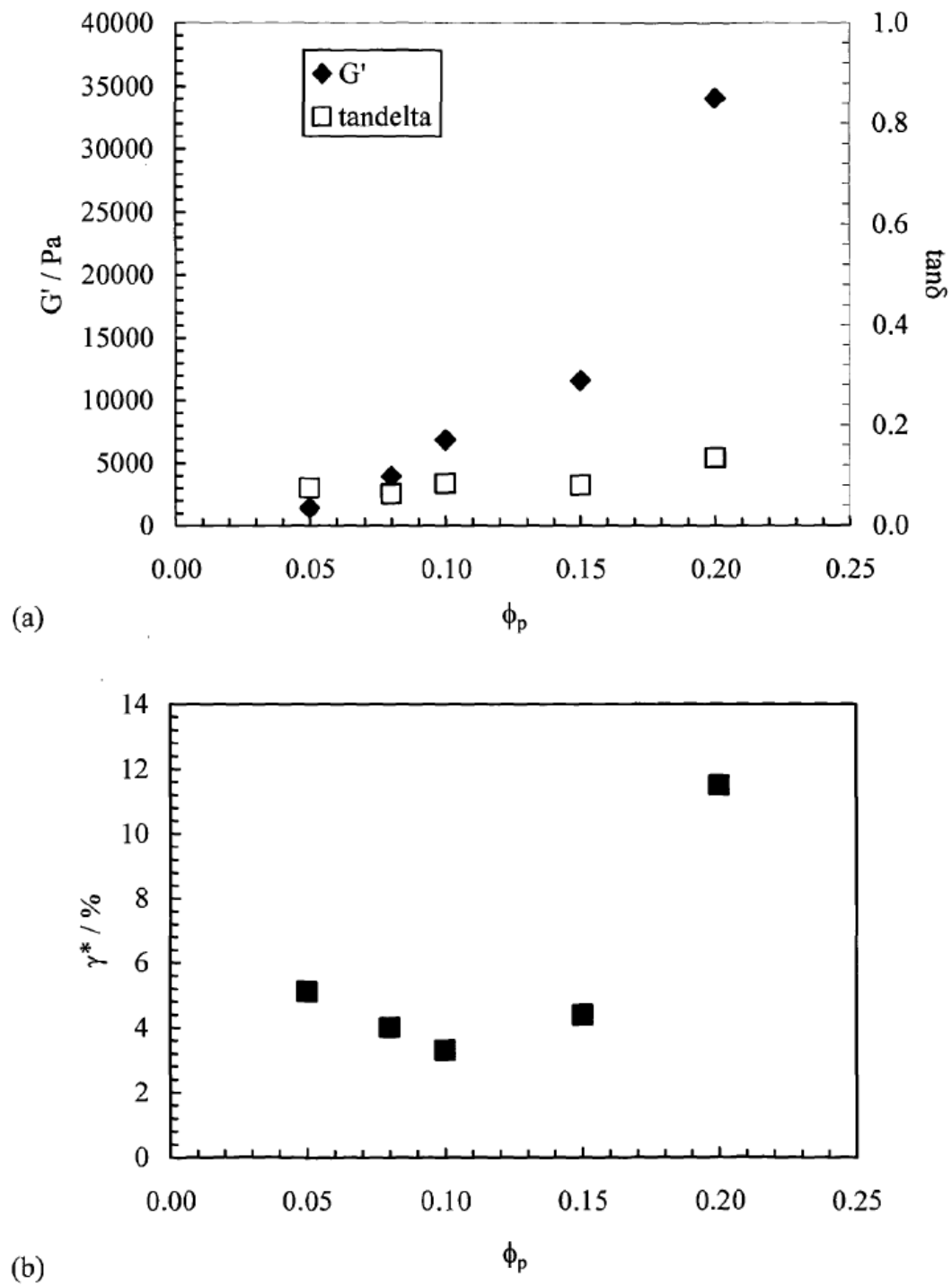


Figura 16

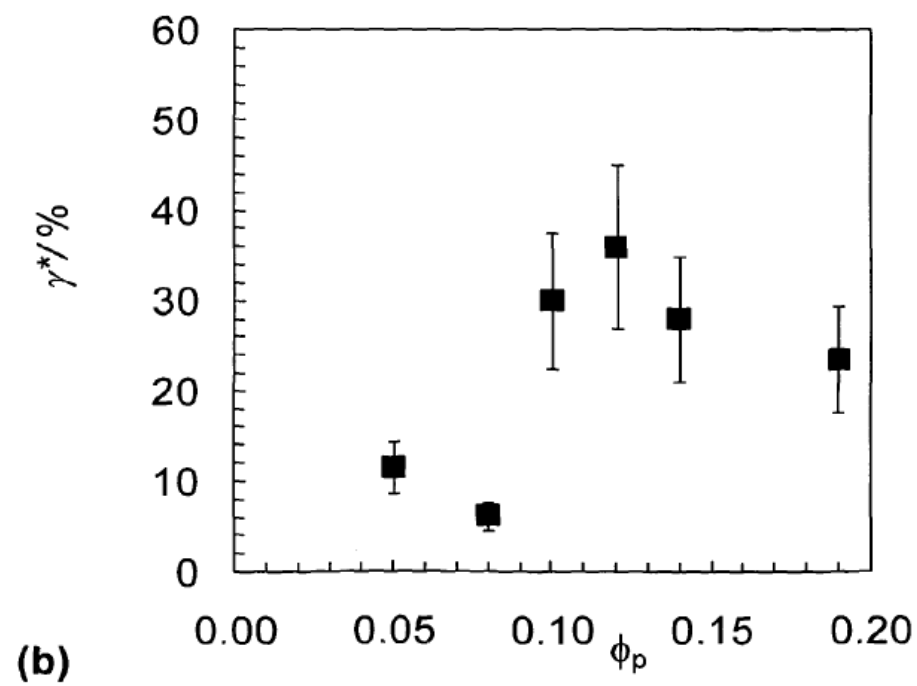
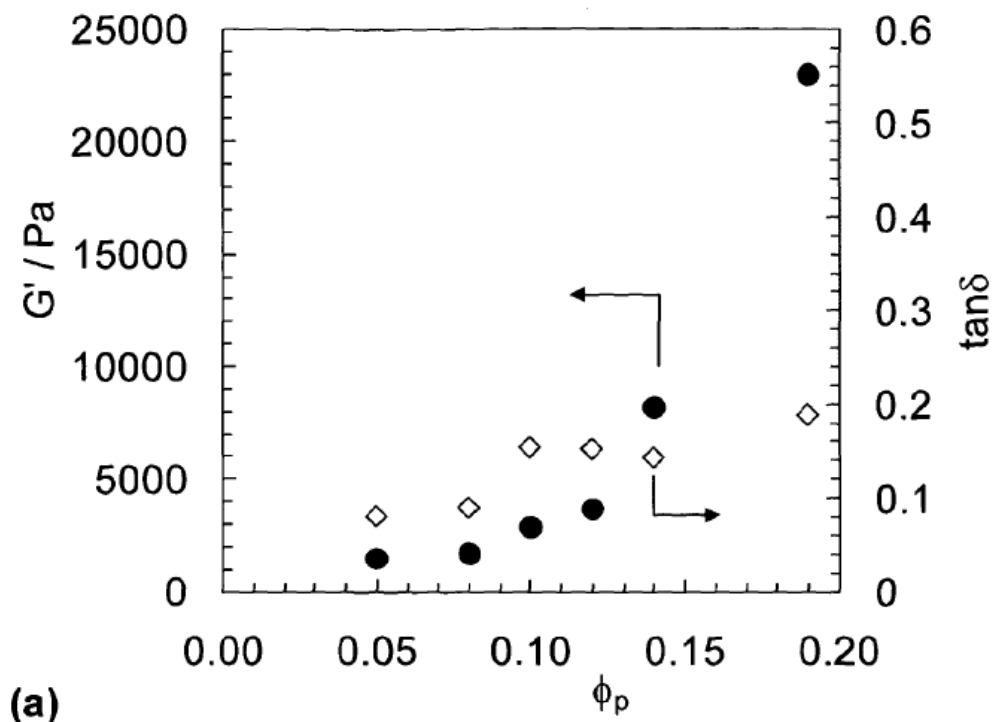


Figura 16A

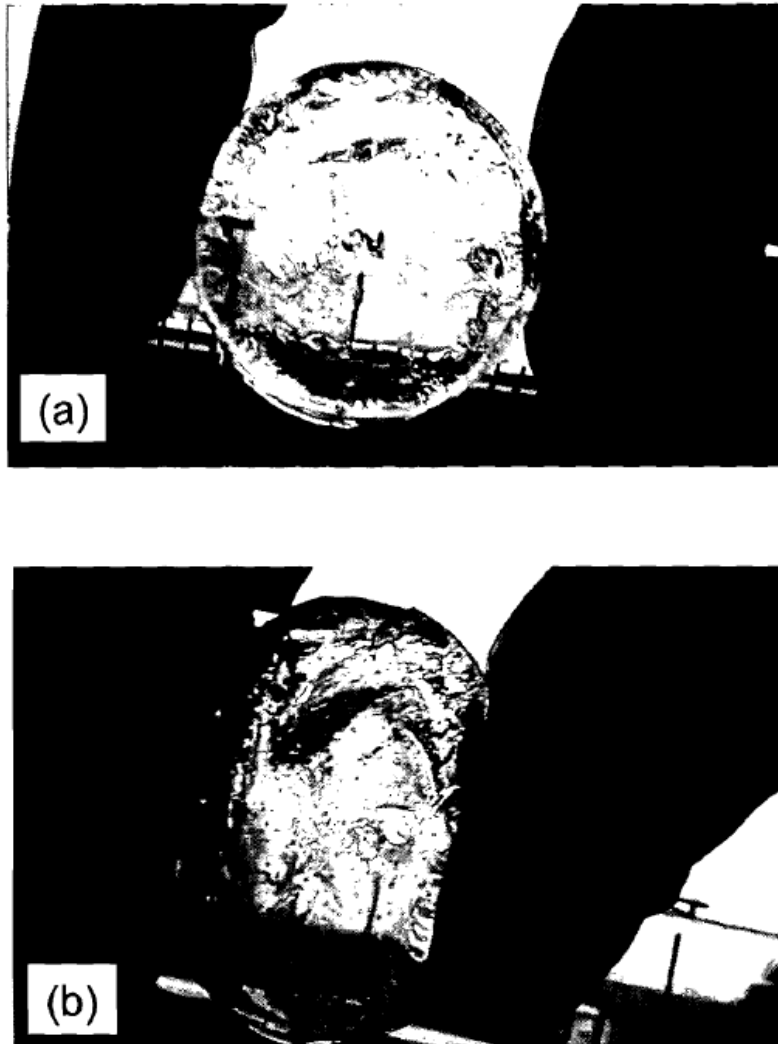


Figura 17

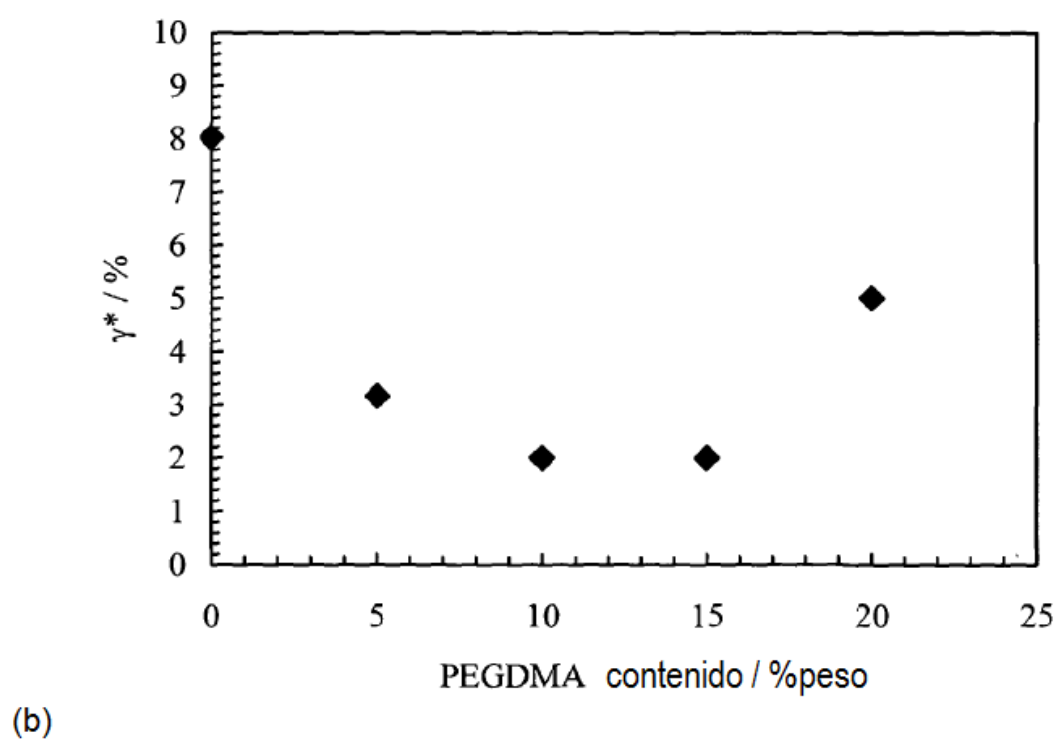
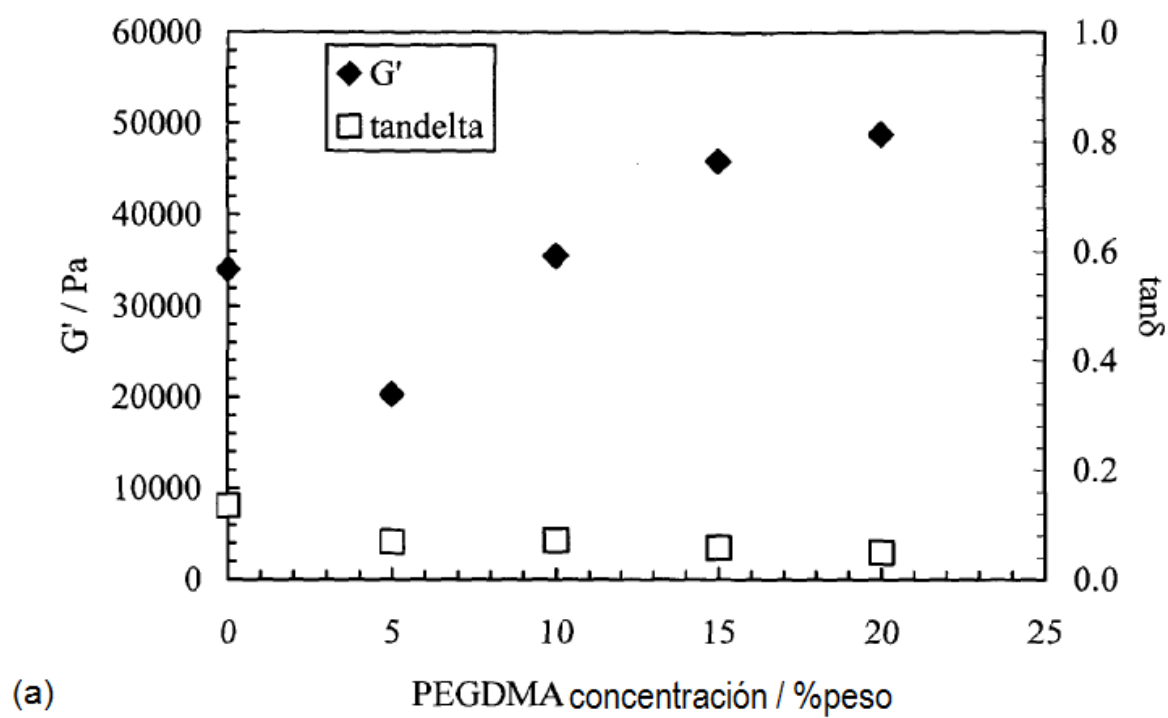


Figura 18