(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 663 820**

(51) Int. CI.:

***A61L 27/22*** (2006.01)
***A61L 27/52*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/EP2012/060277**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164032**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12727813 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2714109**

(54) Título: **Hidrogeles de gelatina reticuladas**

(30) Prioridad:

**01.06.2011 IT MI20111009**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**17.04.2018**

(73) Titular/es:

**POLITECNICO DI MILANO (100.0%)**
**Piazza Leonardo da Vinci 32**
**20133 Milano, IT**

(72) Inventor/es:

**TANZI, MARIA CRISTINA;**
**FARE', SILVIA y**
**GERGES, IRINI**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

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

## DESCRIPCIÓN

Hidrogeles de gelatina reticuladas

La presente invención se sitúa en el campo de la medicina regenerativa, y en particular se refiere a la regeneración de tejidos blandos. Más específicamente, la invención se refiere a matrices de hidrogel y a sus aplicaciones biomédicas como sistemas para la liberación controlada de medicamentos o para cultivo celular, suministro e implantación.

Antecedentes de la invención

Los hidrogeles son materiales poliméricos adecuados para usar como sustratos para la regeneración de tejidos blandos debido a sus escasas características mecánicas y su alta hidrofilicidad. Son redes de polímeros macromoleculares tridimensionales, capaces de absorber una gran cantidad de soluciones acuosas o fluidos biológicos, sin someterse a solubilización.

Entre los diversos tipos de hidrogeles, los que contienen gelatina han demostrado ser materiales muy prometedores en el sector biomédico. La gelatina es un producto de origen natural, derivado del colágeno, que ayuda a la adhesión celular pero no presenta inmunogenicidad en condiciones fisiológicas, es altamente biocompatible, completamente reabsorbible *en vivo,* barato y se encuentra fácilmente disponible. El principal inconveniente asociado con la gelatina es sus escasas propiedades mecánicas, que limitan sus posibles usos como biomaterial en estado no reticulado.

De hecho, aunque la gelatina puede formar espontáneamente un gel en solución acuosa a baja temperatura (< 5-10 °C), esta presenta un comportamiento termorreversible, es decir, se licua nuevamente a temperaturas superiores a 30 °C. En consecuencia, para que se pueda usar como un biomaterial en el campo biomédico, es necesario aumentar su estabilidad y propiedades mecánicas en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, la formación de enlaces covalentes intermoleculares e intramoleculares (reticulación) es importante para mejorar algunas propiedades, como la densidad y la solubilidad, para facilitar el control de su degradación y la posible liberación de sustancias *en vivo,* y, en general, para mejorar su estabilidad térmica, mecánica y química en un entorno biológico.

La literatura científica describe una serie de metodologías para la reticulación de gelatina, mediante el uso de dos métodos de reticulación diferentes, físico y químico.

La reticulación física, por irradiación UV o tratamiento térmico, presenta la ventaja de no introducir agentes químicos externos que son potencialmente tóxicos para el cuerpo, pero no es muy eficaz y dificulta el control de la estabilidad y densidad de la reticulación en la matriz final.

La reticulación química incluye el uso de agentes químicos, que se dividen en dos clases: de longitud no nula (como aldehídos, epóxidos e isocianatos) y de longitud cero (como azidas de acilo y carbodiimidas) e implica la formación de enlaces covalentes a través de un reacción de condensación, como es descrito por Kuijpers AJ, y otros, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 11 (3) 225-243, 2000.

Estado de la técnica

La literatura describe productos basados en gelatina reticulada y el uso de metilenbisacrilamida (MBA) como reticulante. Ver por ejemplo AJ Kuijpers y otros, J Biomater Sci Polymer Edn, 2000, 11 (3): 225-24; P. Dubruel y otros, Biomacromolecules 2007, 8: 338-344; S. Van Vlierberghe y otros, Biomacromolecules 2007, 8: 331-337.

WO 2010/060104 A2 describe matrices implantables semisólidas que comprenden un hidrogel, que son útiles para transportar liposomas que contienen materiales bioactivos a sitios o tejidos de interés. La matriz puede consistir en diversos materiales biodegradables, entre los que se menciona la gelatina, y también puede contener un agente reticulante capaz de formar una matriz semisólida con el hidrogel. Los diversos agentes reticulantes mencionados incluyen N,N'-metilenbisacrilamida (MBA). Sin embargo, el documento no describe un hidrogel de gelatina reticulado con N,N'-metilenbisacrilamida.

WO 2008/121422 A2 describe matrices implantables semisólidas que contienen células monocíticas y que comprenden un material con las características de un hidrogel. La gelatina se menciona entre los diversos hidrogeles posibles. La matriz también puede contener un agente reticulante, seleccionado de una lista que incluye MBA. Una vez más, el documento no describe un hidrogel de gelatina reticulado con N,N'-metilenbisacrilamida.

Sadeghi M y otros, Materials vol. 4, núm. 3 (págs. 543-552) y Kumari M y otros, Journal of Applied Polymer Science, vol. 119 núm. 1 (págs. 363-370) informan la preparación de hidrogel a base de gelatina reticulado con MBA. En ambos casos, la reacción de reticulación entre la gelatina y la N,N'-metilenbisacrilamida implica un mecanismo radical y genera enlaces carbono-carbono no hidrolizables. Por el contrario, la reacción de tipo Michael de acuerdo con la presente invención procede a través de una adición nucleófila de grupos amino libres presentes en la gelatina y el grupo carbonilo α,β insaturado en la bisacrilamida.

Van Vlierberghe S y otros, Biomacromolecules vol. 8 núm. 2 (2007), págs. 331-337, describen la reacción entre la gelatina B y el anhídrido metacrílico, en donde la reticulación tiene lugar en la cadena de carbono de la gelatina sin involucrar restos de lisina.

Descripción de la invención

La invención proporciona hidrogeles de gelatina reticulados con bisacrilamidas obtenidas por la funcionalización de aminas primarias o secundarias, que poseen propiedades mecánicas y de estabilidad ventajosas en un entorno fisiológico y son particularmente ventajosas para usar en cultivo celular, crecimiento y proliferación, para la liberación controlada de moléculas bioactivas, y para promover la regeneración tisular.

Específicamente, el tema de la presente invención son los hidrogeles de gelatina reticulados con bisacrilamidas de aminas primarias o secundarias, obtenibles mediante un proceso de reacción de adición de tipo Michael a través de la adición nucleófila de grupos amino libres en gelatina (grupos laterales de lisina y los pocos grupos amino terminales) y el grupo carbonilo α,β insaturado en la bisacrilamida seleccionada, dicho proceso comprende las siguientes etapas:

(a) reacción de la gelatina con bisacrilamida en un medio acuoso;
(b) purificación del producto obtenido en la etapa (a);
(c) secado o liofilización opcional.

Las bisacrilamidas de aminas primarias o secundarias se seleccionan preferentemente de N,N'-metilenbisacrilamida (MBA), N,N'-etilenbisacrilamida, bis-acriloilpiperazina y bis-acriloilcitamina (CH2=CH- (C=O) -NH-SS-NH-(C=O)-CH=CH2) (agentes de reticulación). Las bisacrilamidas hidrosolubles que pueden obtenerse mediante la funcionalización de oligómeros homobifuncionales tales como polioxialquilendiamina usando la reacción de Schotten-Bauman (N,N'-polioxialquilen bisacrilamida) también se pueden usar. El agente reticulante N,N'-metilenbisacrilamida (MBA) es el más preferido.

La gelatina usada para preparar los hidrogeles de acuerdo con la invención puede ser de origen diferente. Se usa preferentemente la gelatina tipo A.

La reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto de amina terciaria con bajo peso molecular o una base inorgánica para obtener un pH adecuado para la desprotonación de los grupos de amina primaria de la gelatina, y su activación en presencia del agente de reticulación.

La reacción se realiza en solución acuosa, usando concentraciones de gelatina que varían entre 5 y 40 % p/v, con una relación molar de entre 0,5 y 2,5 entre los grupos equivalentes de amina presentes en la gelatina (mM $(NH)_2$) lisina) y los grupos equivalentes de acrilamida presentes en el agente de reticulación. Las operaciones se realizan a una temperatura entre 30 y 70 °C, preferentemente entre 40 y 50 °C, en presencia de trietilamina (0,1-0,3 ml/g de gelatina), o un compuesto de amina terciaria similar con un peso molecular bajo tal como trietanolamina, trietilendiamina o N,N,N',N'-tetraetilendiamina (TEMED), o una base inorgánica, tal como NaOH o LiOH, preferentemente monohidrato de LiOH. El agente de reticulación se agrega por último a la mezcla de reacción, bajo agitación. La mezcla de reacción se transfiere después a una estufa con regulación de temperatura a una temperatura entre 30 y 70 °C, preferentemente entre 40 y 50 °C, y se deja reaccionar durante 4 a 24 horas, preferentemente 12 horas.

Los hidrogeles así obtenidos se someten a un proceso de lavado diseñado específicamente para eliminar cualquier exceso del agente de reticulación y otros constituyentes sin reaccionar, que consiste en lavados sucesivos con etanol puro, solución de HCl 0,1 M, y finalmente con agua destilada.

Los hidrogeles de acuerdo con la invención pueden almacenarse en un ambiente acuoso hasta su uso, o más preferentemente en condiciones anhidras, después de secado en estufa hasta un peso constante o secado por congelación.

Un objeto adicional de la invención es, por lo tanto, una composición que contiene, en un medio acuoso o en forma seca, un hidrogel de gelatina reticulado con una bisacrilamida como se definió anteriormente.

Los hidrogeles de acuerdo con la invención se obtienen en condiciones suaves, evitando así las altas temperaturas, los disolventes orgánicos, o el uso de reacciones químicas complejas o compuestos que pueden liberar residuos potencialmente tóxicos. La reacción de adición de Michael que se usa para preparar los hidrogeles de acuerdo con la invención es particularmente ventajosa porque puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o justo por encima, en un tiempo corto y en solución acuosa.

Además, los hidrogeles de la invención pueden hidrolizarse en condiciones fisiológicas y con una cinética de degradación adecuada para la regeneración tisular. La degradación de los grupos amida se produce por hidrólisis en condiciones fisiológicas y es inducida por la deslocalización de electrones mesoméricos M+ desde los grupos amino secundarios a los grupos carbonilo en posición beta.

Ninguno de los mecanismos de reticulación de la gelatina informados previamente en la literatura tiene lugar mediante el procedimiento de adición de Michael descrito en la presente invención.

Los hidrogeles de acuerdo con la invención son insolubles en disolventes acuosos y pueden aumentar su volumen y peso hasta en 3 órdenes de magnitud. Estos se caracterizaron por pruebas de estabilidad en soluciones acuosas y en un entorno fisiológico a 37 °C (hinchazón y pérdida de peso), y por caracterización dinámico-mecánica.

Los resultados de los ensayos dinámico-mecánicos demuestran que los hidrogeles basados en la gelatina de acuerdo con la invención tienen mejores propiedades que los materiales de comparación que no contienen gelatina.

La metodología de síntesis que se usa para preparar los hidrogeles de acuerdo con la invención produce matrices bio- y hemocompatibles con una estabilidad mucho mayor en un entorno fisiológico (más de 35 días) que las sustancias similares ya presentes en el mercado o sometidas a ensayos.

Los hidrogeles de acuerdo con la invención tienen características ventajosas en términos de citotoxicidad y citocompatibilidad *in vitro* lo que los hace adecuados para usar como medio de cultivo celular, de crecimiento y de proliferación. En particular, los hidrogeles de acuerdo con la invención garantizan un microambiente adecuado para la adhesión celular y el mantenimiento posterior de las condiciones ideales para el cultivo celular, que incluyen células madre adultas aisladas del tejido adiposo.

Un objeto adicional de la invención es, por lo tanto, el uso de un hidrogel de gelatina reticulado como se define en la presente, o de una composición que lo contiene, para cultivo celular, diferenciación o la proliferación.

Los hidrogeles y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar como sustratos para promover la regeneración de tejidos blandos *en vivo* o *in vitro* tales como tejido adiposo, tejido vascular y piel. También son útiles en el campo de la liberación controlada de medicamentos, en particular polipéptidos y biomoléculas activas, tales como factores de crecimiento. También son adecuados para usar como portadores de células.

Otros objetos de la invención son, por lo tanto, un hidrogel de gelatina reticulado como se define en la presente memoria, que contiene una sustancia o células biológicamente activas, y el uso de un hidrogel de gelatina reticulado como se define en la presente descripción, o de una composición que lo contiene, para la regeneración in vitro de tejidos blandos, liberación controlada de medicamentos, polipéptidos y biomoléculas activas, y como un portador celular.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a la implantación o injerto de tejidos o células, particularmente células madre adultas aisladas de tejido adiposo, en donde dichas células están contenidas en un hidrogel como se define en la presente descripción.

La invención se ilustrará ahora con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Procedimiento de síntesis experimental y ejemplos de productos

Todos los reactivos usados se obtuvieron de Sigma Aldrich: MBA, código 146072, gelatina porcina tipo A, código G2500-100G, hexametilendiamina, código HI 1696 y trietilamina, código T0886. El disolvente de reacción es agua destilada (Idrochimica Srl, Milán).

Un material sintetizado mediante la sustitución de gelatina con una diamina alifática, hexametilendiamina (HEX), se usó como material de comparación; dicho material está indicado por el código MBA/HEX.

Se sintetizaron diferentes hidrogeles variando la cantidad de reactivos. Por ejemplo, la Tabla 1 muestra tres métodos de síntesis diferentes. El producto de comparación, que no contiene gelatina, se indica con el código MBA/HEX.

El procedimiento experimental se realizó como sigue:

Una solución al 15% (15MBA47, 15MBA23) o una solución al 25% (25MBA47) p/v de gelatina A en agua destilada se vertió en una placa de Petri (ø = 5 cm), se seleccionó como recipiente de reacción y se calentó a 50 ºC en una placa con temperatura controlada; después, se añadieron 0,1 ml de trietilamina bajo agitación. Se añadió MBA en las cantidades indicadas en la Tabla 1 después de 30 minutos, nuevamente bajo agitación a 50 ºC. Después de unos minutos de agitación, la mezcla de síntesis se transfirió a una estufa con temperatura controlada a 50 ºC y se dejó durante la noche. Al final, el producto de reacción se sometió a tres lavados sucesivos: inmersión durante 12 horas en etanol puro, reemplazado con etanol fresco cada dos horas; inmersión en HCl 0,1 M durante una hora; inmersión en agua destilada durante 12 horas, con reemplazo cada dos horas, seguido por inmersión en agua destilada durante la noche.

Cuando finalizó el proceso de lavado, se usó una perforadora manual de un diámetro adecuado para obtener muestras de dimensiones adecuadas para las pruebas de caracterización posteriores.

*Tabla 1: Códigos y cantidades de reactivos usados para sintetizar las diferentes muestras de hidrogel*

| hidrogel | GELATINA tipo A | | MBA | | HEX | | TEA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg | mM ($NH_2$lisina) | mg | mM | mg | mM | (ml) |
| MBA/HEX | - | - | 1000 | 6,490 | 367,52 | 3,24 | 0,1 |
| 15MBA47 | 1000 | 0,31 | 47,8 | 0,310 | - | - | 0,1 |
| 25MBA47 | 1000 | 0,31 | 47,8 | 0,310 | - | - | 0,1 |
| 15MBA23 | 1000 | 0,31 | 23,9 | 0,155 | - | - | 0,1 |

El estimado de los grupos amina presentes en la gelatina se determinó experimentalmente mediante valoración, de acuerdo con el método descrito por Cayot P. y otros, Analytical Biochemistry 249, 184-200, 1997.

Ejemplo 2 - Pruebas de hinchazón y pérdida de peso

Las pruebas se realizaron en muestras con dimensiones iniciales de ø=12 mm y h=5 mm, secadas en horno a 30 °C hasta peso constante. Se usaron tres muestras para cada tipo de hidrogel sintetizado. El peso seco de cada uno se midió antes de comenzar la prueba. Cada muestra se sumergió en agua destilada y se colocó en una estufa con temperatura controlada a 37 °C durante toda la prueba. Los puntos de tiempo considerados fueron entre 5 y 840 horas (35 días). En cada punto de tiempo, las muestras se pesaron y los valores de peso en los estados seco e hinchado se usaron para calcular la variación de peso de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta Peso\ \% = \frac{W_{punto\ de\ tiempo} - W_{seco}}{W_{seco}} \text{ X } 100$$

donde $W_{punto\ de\ tiempo}$ es el peso hinchado de la muestra en el punto de tiempo considerado y $W_{seco}$ es el peso seco.

La variación de peso de cada tipo de hidrogel analizado se expresó como la media y la desviación estándar de los valores obtenidos para las tres muestras del mismo tipo.

El proceso de hinchamiento se realizó en agua destilada y en solución salina tamponada (solución salina tamponada con fosfato, PBS, pH = 7,4, Sigma, P4417), para establecer la estabilidad a pH fisiológico.

La Figura 1 muestra los valores de variación de peso medidos en PBS. Todos los hidrogeles basados en gelatina/MBA demostraron ser estables en un entorno fisiológico *in vitro* durante hasta 35 días, presentando una cinética de hinchazón rápida en las primeras horas de la prueba, alcanzando una meseta entre 50 y 100 horas después de la inmersión, sin reducciones de peso durante hasta 35 días. El valor de hinchamiento en la meseta fue el mayor (aproximadamente 800 %) para los hidrogeles sintetizados bajo las condiciones de dilución más altas, mientras que en el caso de la síntesis a concentraciones más altas, el valor de hinchamiento máximo permaneció alrededor de 550 %. No se observaron diferencias entre los hidrogeles sintetizados con diferentes cantidades de MBA, la concentración de la mezcla de reacción es igual. Por el contrario, el material de comparación (MBA-HEX) resultó estable en los tiempos de prueba considerados, pero los valores de hinchazón fueron muy bajos (no excedieron el 50 %).

Ejemplo 3 - Caracterización espectroscópica

La caracterización espectroscópica de los hidrogeles de gelatina/MBA se realizó por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), usando el espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation). El análisis se realizó con el accesorio Single Bounce-ATR (reflectancia total atenuada), que permite el estudio de superficies pequeñas. Las muestras analizadas por FTIR se secaron en horno previamente al vacío a 37 °C durante 72 horas, de manera de eliminar del espectro la contribución del agua presente en las muestras. Los análisis FTIR se realizaron con los siguientes parámetros experimentales: ventana espectral = 4000-600 $cm^{-1}$, número de escaneos = 64, cristal = ZnSe.

La espectroscopia IR permitió verificar la presencia de las bandas relacionadas con los grupos funcionales característicos de la formación de enlaces amida-amina (estiramiento del enlace NC de las aminas secundarias a 1220-1047 $cm)^{-1}$ y aminas terciarias a 1111-1087 $cm^{-1}$; estiramiento de C=O del enlace de amida a 1548 $cm^{-1}$; deformación angular del enlace N-H amida a 1642 $cm^{-1}$) Los espectros IR de los hidrogeles obtenidos en el ejemplo 1 se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 4 - Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles de gelatina/MBA se estudiaron con un analizador mecánico dinámico (DMA mod. 2980, TA Instruments), usando pruebas de compresión mecánica en barrido de frecuencia y pruebas de relajación de tensión con recuperación de la deformación posterior. Todas las pruebas mecánicas se realizaron en probetas cilíndricas (ø = 5 mm, h = 3 mm) previamente llevadas a una meseta de hinchamiento en agua destilada. Se caracterizaron tres muestras para cada formulación de la gelatina y los hidrogeles MBA y para la formulación MBA/HEX usada como comparador.

*Pruebas de compresión mecánica*

Las pruebas de compresión se realizaron en barrido de frecuencia (f = 0,5 - 10 Hz, T = 37 °C, n = 10 ciclos) a una temperatura constante (37 °C) para obtener la tendencia del módulo complejo en la variación de frecuencia. En particular, se puede obtener información sobre el componente real del módulo complejo, conocido como el módulo conservativo (E'), que representa la energía acumulada en el material y consecuentemente correlacionada con su comportamiento elástico, y el componente imaginario, llamado el módulo disipativo (E"), que representa la energía disipada vinculada al componente viscoso del material. La relación E"/E', llamada *tan delta,* permite evaluar la contribución de los dos componentes en la variación de los parámetros de prueba.

En los ensayos dinámicos de compresión mecánica, los hidrogeles de acuedo con la invención presentaron valores de módulo conservativo y disipativo que variaban de acuerdo con su composición química. Como se muestra en la Tabla 2, el módulo conservativo (E') estaba entre 4 y 21 kPa.

*Tabla 2 - Valores del módulo conservativo (E') para hidrogeles a base de gelatina de acuerdo con la invención y para el material de control (MBA-HEX)*

| | f [Hz] | ciclo #1 | ciclo #5 | ciclo #10 | | f [Hz] | ciclo #1 | ciclo #5 | ciclo #10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MBA-HEX | 0,5 | 9,97±7,41 | 9,33±7,50 | 9,10±7,42 | 15MBA47 | 0,5 | 13,68±3,49 | 13,32±3,53 | 13,09±3,52 |
| | 1 | 10,17±7,50 | 9,47±7,63 | 9,23±7,56 | | 1 | 14,24±3,60 | 13,77±3,63 | 13,56±3,58 |
| | 2 | 10,40±7,64 | 9,67±7,75 | 9,44±7,67 | | 2 | 14,76±3,64 | 14,36±3,70 | 14,02±3,76 |
| | 3 | 10,80±7,75 | 9,96±7,88 | 9,73±7,83 | | 3 | 15,12±3,82 | 14,72±3,83 | 14,42±3,91 |
| | 4 | 11,19±8,02 | 10,31±8,17 | 10,08±8,05 | | 4 | 15,46±3,93 | 15,01±3,98 | 14,71±3,99 |
| | 5 | 11,59±8,27 | 10,72±8,43 | 10,38±8,35 | | 5 | 15,78±4,17 | 15,32±4,15 | 15,01±4,19 |
| | 6 | 12,09±8,50 | 11,09±8,64 | 10,80±8,53 | | 6 | 16,17±4,10 | 15,65±4,18 | 15,23±4,24 |
| | 7 | 12,56±8,82 | 11,43±9,02 | 10,98±9,05 | | 7 | 16,23±4,27 | 15,57±4,48 | 15,47±4,38 |
| | 8 | 13,03±8,99 | 11,73±9,38 | 11,60±9,20 | | 8 | 16,44±4,33 | 15,93±4,41 | 15,70±4,41 |
| | 9 | 12,94±8,51 | 12,20±9,41 | 12,01±9,54 | | 9 | 16,84±4,45 | 16,21±4,64 | 15,86±4,50 |
| | 10 | 13,70±9,44 | 12,45±9,48 | 12,33±9,34 | | 10 | 16,87±4,23 | 16,14±4,23 | 15,96±4,62 |
| 15MBA23 | 0,5 | 17,91±0,66 | 17,91±0,33 | 17,91±0,12 | 25MBA47 | 0,5 | 4,65±0,09 | 4,33±0,08 | 4,00±0,20 |
| | 1 | 18,18±0,83 | 18,11±0,54 | 18,11±0,18 | | 1 | 4,83±0,13 | 4,54±0,04 | 4,18±0,15 |
| | 2 | 18,45±0,76 | 18,45±0,51 | 18,42±0,27 | | 2 | 4,99±0,17 | 4,67±0,03 | 4,33±0,14 |
| | 3 | 18,75±1,06 | 18,72±0,79 | 18,72±0,50 | | 3 | 5,13±0,28 | 4,78±0,05 | 4,45±0,08 |
| | 4 | 19,09±1,14 | 19,04±0,79 | 19,10±0,58 | | 4 | 5,11±0,29 | 4,90±0,10 | 4,49±0,12 |
| | 5 | 19,34±1,23 | 19,28±0,94 | 19,34±0,71 | | 5 | 5,25±0,37 | 4,99±0,13 | 4,65±0,13 |
| | 6 | 19,44±1,07 | 19,40±0,98 | 19,49±0,58 | | 6 | 5,45±0,21 | 5,04±0,22 | 4,72±0,13 |
| | 7 | 19,54±1,26 | 19,48±0,92 | 19,62±0,68 | | 7 | 5,50±0,28 | 5,15±0,15 | 4,76±0,06 |
| | 8 | 19,84±1,25 | 19,70±1,00 | 19,87±0,48 | | 8 | 5,37±0,60 | 5,31±0,30 | 4,85±0,04 |
| | 9 | 20,09±1,34 | 19,69±1,16 | 20,21±0,59 | | 9 | 5,72±0,05 | 5,79±0,60 | 5,26±0,35 |
| | 10 | 20,08±1,41 | 20,53±0,40 | 20,45±0,64 | | 10 | 5,75±0,67 | 5,71±0,23 | 5,10±0,42 |



ES 2 663 820 T3

Para todos los hidrogeles basados en gelatina de acuerdo con la invención, se observó una prevalencia del componente elástico a medida que aumentaba la frecuencia de tensión y el número de ciclos de prueba, mientras que para el material de control prevalecía el componente viscoso a medida que aumentaba la frecuencia. Este comportamiento se muestra claramente en los gráficos de la Figura 3, que muestran la tendencia *tan delta* en tres ciclos de prueba diferentes, en la variación de la frecuencia de tensión para el material de comparación (MBA-HEX) y para el hidrogel 15MBA23.

*Pruebas de recuperación de la tensión y de la deformación*

Se realizaron pruebas de relajación de la tensión seguidas de la recuperación de la deformación en compresión a 37 °C. Se aplicó una deformación constante (5%) a las muestras, y se estudió la tendencia en el tiempo de tensión requerido para mantener el valor de deformación impuesto; cuando se eliminó la deformación, se estudió la capacidad de recuperación del tamaño original. Se realizaron cinco ciclos de relajación de la tensión, seguidos cada uno de recuperación de la deformación, para obtener las tendencias de tensión y deformación a lo largo del tiempo.

Se observó una ligera relajación de la tensión para todos los hidrogeles basados en gelatina de acuerdo con la invención, que permanecieron constantes durante los 5 ciclos de prueba; además, aunque la deformación residual permaneció después del primer ciclo, se eliminó por completo en los ciclos posteriores. Este comportamiento indica que el componente elástico prevalece bajo condiciones cíclicas o de tensión repetida. Por el contrario, el material de comparación no mostró un componente viscoso, pero parecía mucho más débil. Por ejemplo, la Figura 4 muestra la tendencia de la relajación de la tensión en la compresión para el material de comparación (MBA-HEX) y para el hidrogel 15MBA23.

Los resultados de las pruebas mecánicas dinámicas indican que los hidrogeles basados en gelatina presentan las mejores propiedades generales en comparación con el material de comparación que no contiene gelatina. También se pueden seleccionar condiciones de síntesis de manera que los hidrogeles basados en gelatina presenten un comportamiento en donde el componente elástico prevalece sobre el componente viscoso.

Ejemplo 5 - Pruebas de citocompatibilidad indirecta con la línea celular L929

Se realizaron pruebas de citotoxicidad *in vitro* para verificar que no se liberaran productos con bajo peso molecular y/o residuos de reacción. Estos productos, si están presentes, pueden liberarse en el entorno de crecimiento celular e influir en la actividad celular, incluso causando la muerte celular.

La viabilidad de fibroblastos murinos en la línea L929 cultivada durante 24 horas en contacto con medio de cultivo en donde los hidrogeles se sumergieron durante diferentes tiempos (eluidos a 4-168 h) se evaluó mediante ensayo colorimétrico MTT (M5655, Sigma).

Los hidrogeles demostraron no ser citotóxicos; de hecho, las células cultivadas en presencia de eluatos obtenidos durante hasta 7 días de inmersión presentaron niveles de viabilidad no significativamente diferentes de los obtenidos para las células cultivadas en medio de cultivo limpio (control), como se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 6 - Pruebas de interacción con células madre de tejido adiposo (ASC)

Se realizaron pruebas de interacción *in vitro* con células madre aisladas de tejido adiposo obtenido por liposucción de pacientes sometidos a mastectomía. Las células ASC se aislaron de acuerdo con el protocolo descrito por Rigotti y otros, Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose derived adult stem cells, Plast Reconstr Surg. 2007; 119(5):1409-1422, por digestión enzimática de tejido graso y ciclos de centrifugación. Las células se cultivaron en hidrogeles, la diferenciación se indujo por medio de inducción adipogénica (AIM) en medio Eagle modificado por Dulbecco DMEM (albúmina sérica humana de Ham F12 + 1%) y las células se cultivaron posteriormente en medio de diferenciación adipogénico (ADM) en DMEM (albúmina sérica humana de Ham F12 + 1%). La diferenciación en adipocitos se estudió mediante la evaluación de la presencia de gotas lipídicas producidas y detectadas mediante tinción con Oil Red O (Sigma-Aldrich).

7 días después de la siembra, la tinción con Oil Red O confirmó la diferenciación con la formación de adipocitos, como se muestra en la Figura 6.

En vista de los hallazgos informados en la literatura (Tanzi MC y otros, Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. Expert Rev Med Devices. 2009; 6(5):533-51), este resultado puede considerarse muy bueno.

Ejemplo 7 - Pruebas de interacción con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

El propósito de estos ensayos de interacción celular fue establecer la idoneidad de los hidrogeles de acuerdo con la invención para regenerar vasos sanguíneos y, generalmente, para aplicaciones en contacto con el sistema cardiovascular.

Se prepararon dos hidrogeles diferentes: gelatina/MBA 25MBA47 y 15MBA23.

Después de un procedimiento de purificación realizado bajo campana de flujo laminar, las muestras (n = 3) se secaron hasta un peso constante y después se hincharon en una solución acuosa que contenía 0,02 % p/v de una elastina recombinante (HELP) con una secuencia similar a la de la elastina humana (Bandiera A, y otros, Biotechnol Appl Biochem. 2005; 42 (Pt 3): 247-56), obteniendo así redes de gelatina/HELP interpenetrantes.

A continuación, estos hidrogeles se sembraron con células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) cultivadas en medio de crecimiento celular endotelial $MV_2$ (medio basal, Promocell, Heidelberg, Alemania). 48 horas después de la siembra, los cultivos se fijaron con formalina al 4 % v/v y se tiñeron con azul de toluidina.

Una vez más, los resultados fueron muy buenos: para todas las muestras analizadas, se observó la formación de una capa única confluente homogénea (Figura 7), lo que indica la idoneidad de estas matrices para aplicaciones que implican la reconstrucción y el tratamiento del tejido vascular.

Descripción de las figuras

Figura 1 - Grado de hinchamiento en un entorno fisiológico a 37 °C de hidrogeles de gelatina/metilenobisacrilamida obtenidos con diversas formulaciones, y del material de comparación MBA-HEX.

Figura 2 - Espectros FTIR de tres hidrogeles de gelatina/MBA obtenidos con diferentes formulaciones.

Figura 3 - tendencia del parámetro *tan delta* en tres ciclos de prueba diferentes, en cuanto a la variación de la frecuencia de la tensión, para el material de comparación (MBA-HEX) y el hidrogel 15MBA23.

Figura 4 - Curvas que representan la tendencia de la relajación de la tensión en compresión (5 % de deformación constante) para el material de comparación (MBA-HEX) y el hidrogel 15MBA23.

Figura 5 - Resultados del ensayo de viabilidad de MTT realizado en células L929 en contacto con eluatos obtenidos en diferentes tiempos de incubación con los diversos tipos de hidrogeles. Los datos relacionados con el medio de cultivo solo se muestran en blanco.

Figura 6: tinción con solución Oil Red O de ASC diferenciadas en adipocitos en a) 15 MBBA23, y b) 15 MBBA47. Ampliación: 500X.

Figura 7 - Cultivos HUVEC en gel (A) 25MBA47 y (B) 15MBA23 acondicionados con 0,02% p/v de HELP 24 horas después de la siembra. Tinte: azul de toluidina. Ampliación: 100X.

Reivindicaciones

1. Hidrogel de gelatina reticulado con bisacrilamidas de aminas primarias o secundarias que se seleccionan de N,N'-metilen-bisacrilamida (MBA), N,N'-etilen-bisacrilamida, bisacriloilpiperazina, bisacriloilcistamina y N,N'-polioxialquilen-bisacrilamida en donde dicho hidrogel puede obtenerse mediante un proceso de reacción de adición de tipo Michael mediante la adición nucleofílica de grupos amino libres en gelatina y el grupo carbonilo α,β insaturado en la bisacrilamida seleccionada, dicho proceso comprende las siguientes etapas:

(a) reacción de la gelatina con bisacrilamida en un medio acuoso;
(b) purificación del producto obtenido en la etapa (a);
(c) secado o liofilización opcional.

2. Hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la reacción de la etapa (a) comprende:

(a') preparar una solución acuosa de gelatina a una temperatura de 30 a 70 °C en presencia de un compuesto de amina terciaria o una base inorgánica, en donde la concentración de gelatina está entre 5 y 40 % p/v;
(b') añadir bisacrilamida a la solución obtenida en (a') en una cantidad tal que la relación molar entre los grupos amino presentes en la gelatina (mM ($NH_2$) lisina) y los grupos acrilamida presentes en la bisacrilamida esté en el intervalo de 0,5 a 2,5;
(c') calentar la solución obtenida en (b') a una temperatura de entre 30 y 70 °C durante un período de tiempo de 4 a 24 horas.

3. Hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde la purificación de la etapa (b) comprende lavados consecutivos con etanol seguido de HCl 0,1 M y de agua.

4. Hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde dicha bisacrilamida es N,N'-metilen-bisacrilamida (MBA);

5. Hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde dicha amina terciaria es trietilamina en cantidades en el intervalo de 0,1 a 0,3 ml por gramo de gelatina.

6. Hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene una sustancia biológicamente activas o células.

7. Composición que contiene un hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 en un medio acuoso o en forma seca.

8. Hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 7 para usar en la liberación controlada de fármacos, polipéptidos o biomoléculas activas.

9. Hidrogel o composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichas biomoléculas activas son factores de crecimiento.

10. Uso de un hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 8 para el cultivo, diferenciación o proliferación celular in vitro.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dichas células son células madre adultas aisladas de tejido adiposo y de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC).

12. Uso de un hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 7 para la regeneración de un tejido blando *in vitro*.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho tejido blando es tejido adiposo, tejido vascular o piel.

14. Portador de células que contienen un hidrogel de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 7.

15. Implante o injerto de un hidrogel que contiene células de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 7.

Figura 1

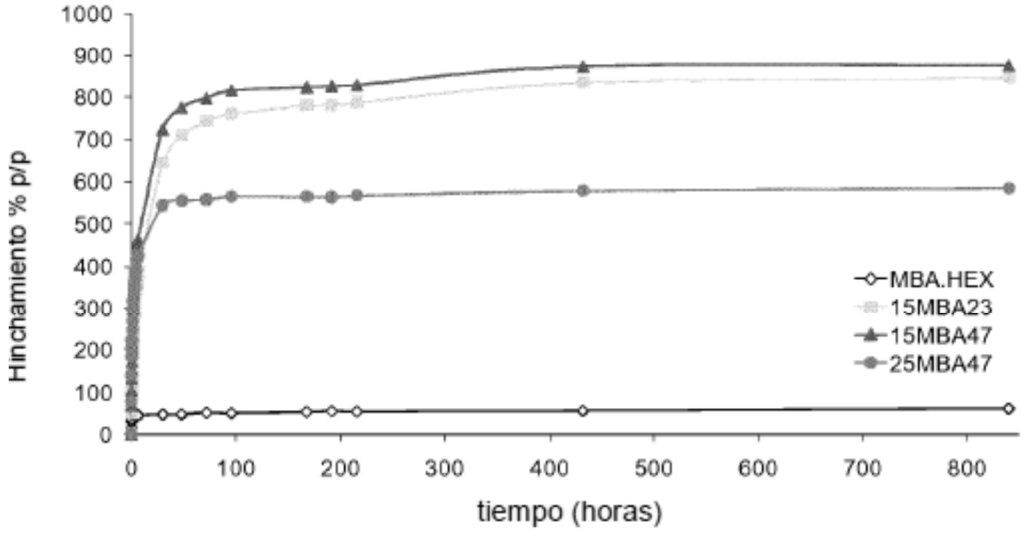

Hinchamiento % p/p
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
tiempo (horas)
MBA.HEX
15MBA23
15MBA47
25MBA47

Figura 2

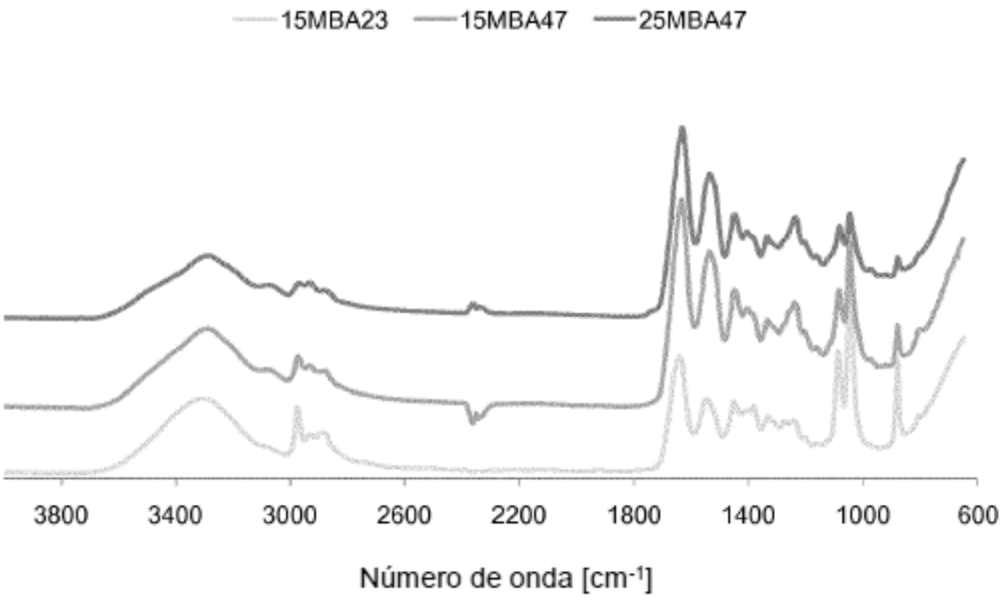
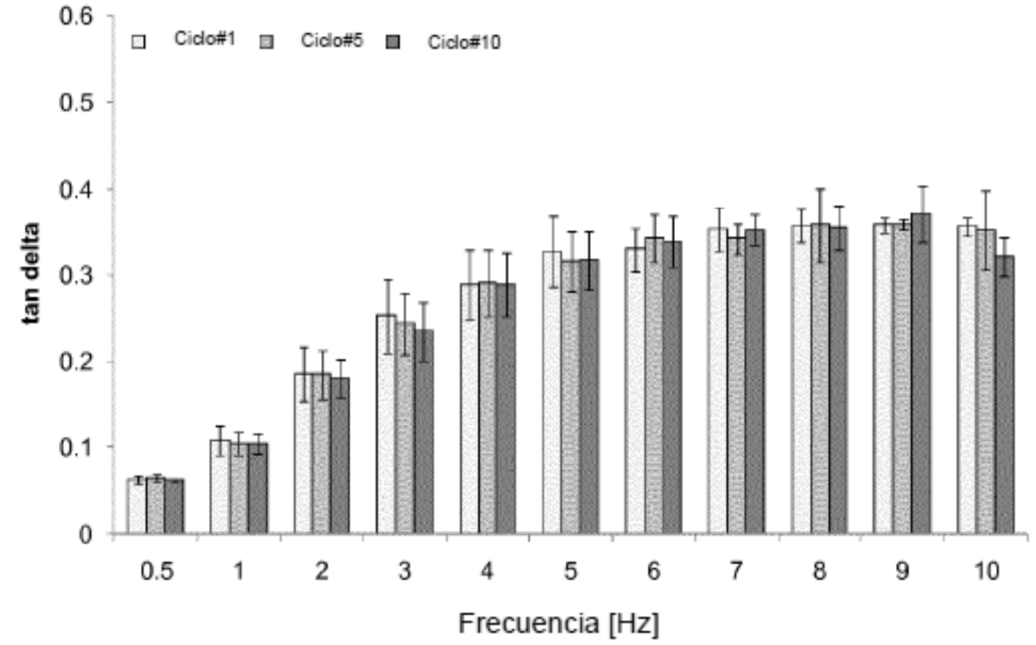

15MBA23
15MBA47
25MBA47
3800
3400
3000
2600
2200
1800
1400
1000
600
Número de onda [cm-1]

Figura 3

**(MBA-HEX)**




**(GEL 15MBA23)**

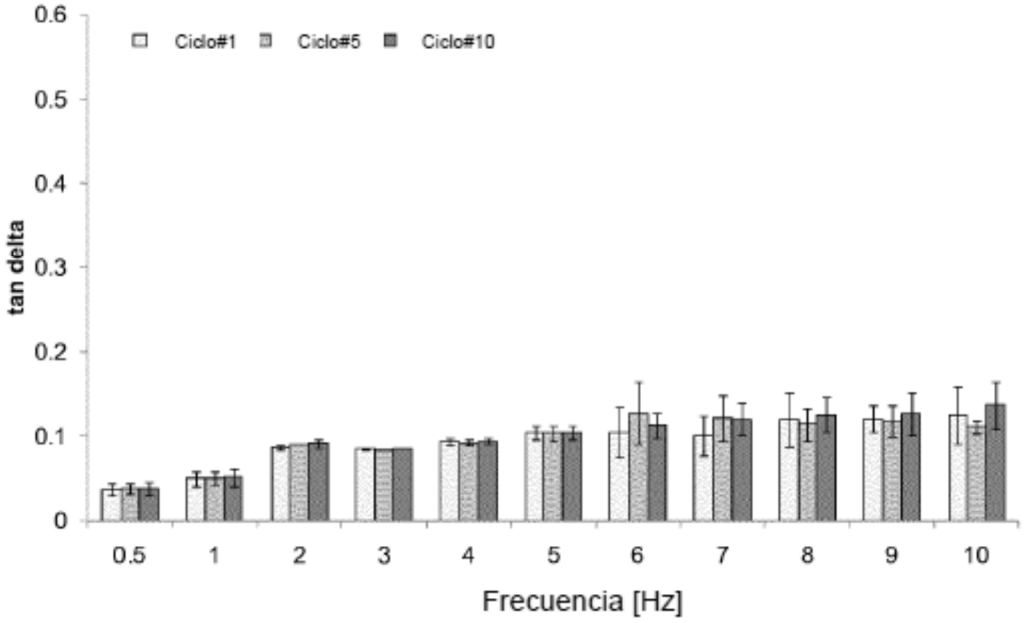


Figura 4

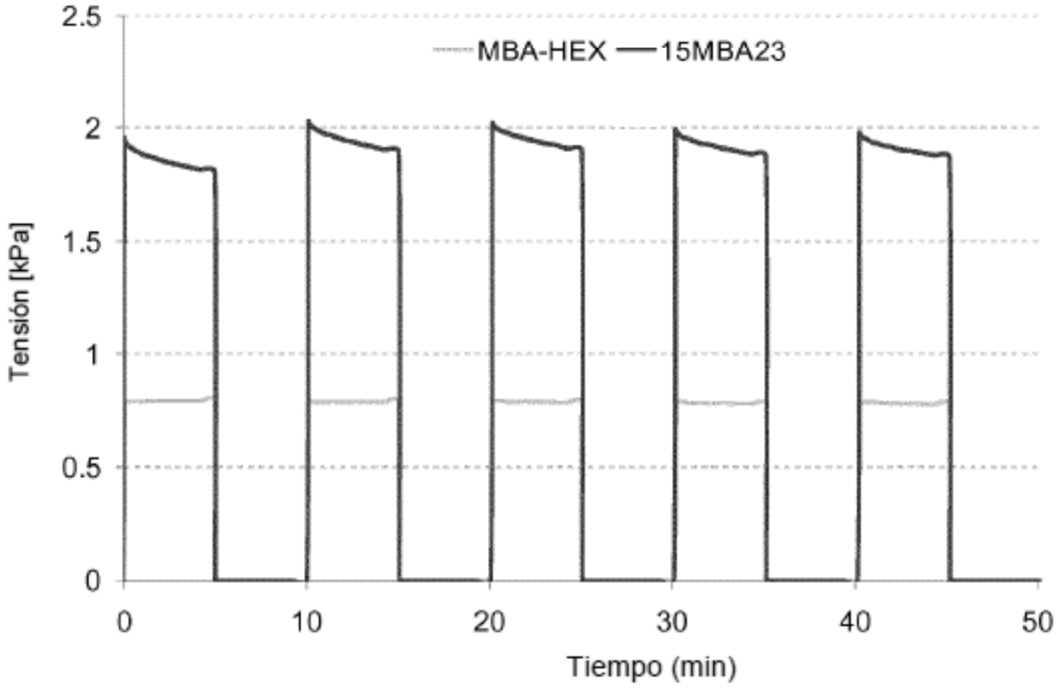

MBA-HEX
15MBA23
Tensión [kPa]
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)

Figura 5

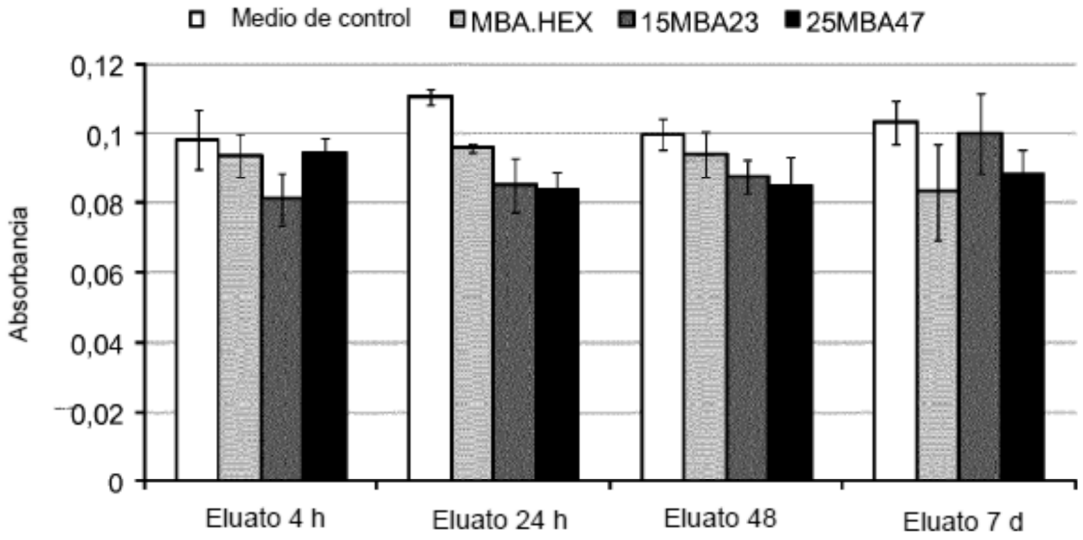

Medio de control
MBA.HEX
15MBA23
25MBA47
Absorbancia
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
Eluato 4 h
Eluato 24 h
Eluato 48
Eluato 7 d

Figura 6

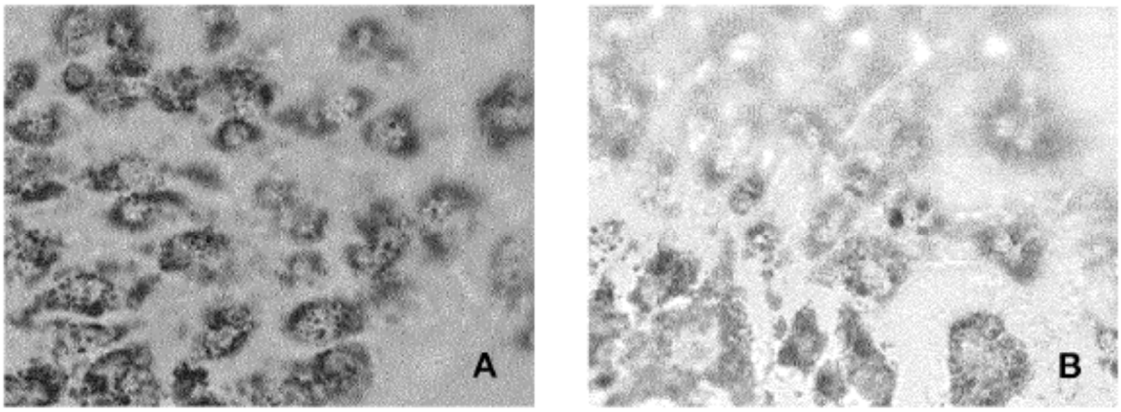
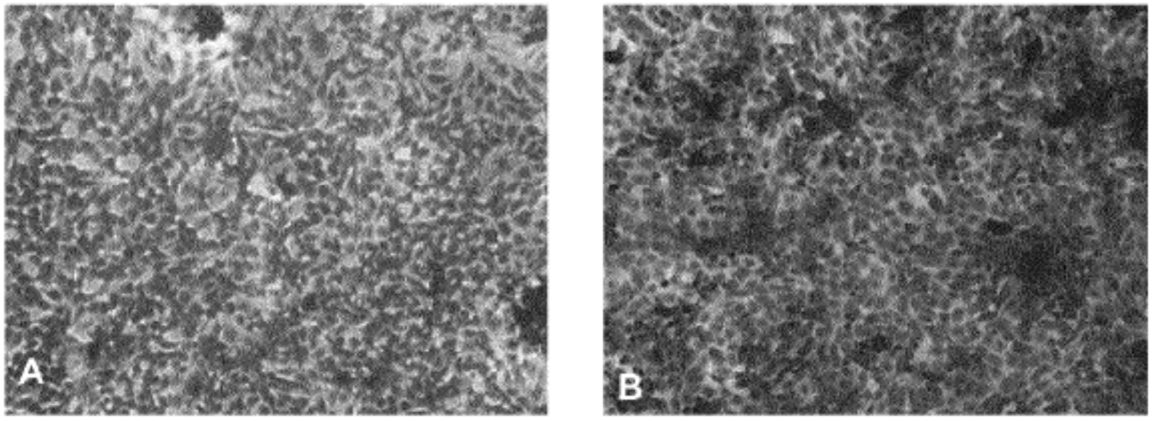



Figura 7