

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 356**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/52** (2006.01)

**A61L 27/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2012 PCT/GB2012/052046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13027051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2012 E 12753235 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2747797**

54 Título: **Partículas composite de hidrogel-arcilla**

30 Prioridad:

**23.08.2011 GB 201114446**

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

**17.10.2018**

73 Titular/es:

**SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY (100.0%)  
City Campus Howard Street  
Sheffield, South Yorkshire S1 1WB, GB**

72 Inventor/es:

**BOYES, VICTORIA L;  
SAMMON, CHRIS;  
LE MAITRE, CHRISTINE y  
BREEN, CHRIS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 686 356 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

Partículas composite de hidrogel-arcilla

La presente invención se refiere a hidrogeles composite y, en particular, aunque no de manera exclusiva, a los procedimientos de preparación, las formulaciones de hidrogel precursor y los procedimientos de creación y/o implantación de hidrogeles composite en animales o seres humanos.

Los hidrogeles poliméricos se forman como redes poliméricas tridimensionales y contienen grandes cantidades de agua y, como tales, son materiales blandos y húmedos que se usan en una amplia diversidad de aplicaciones debido a sus características físicas. Una categoría específica de hidrogeles, denominados 'hidrogeles poliméricos químicamente reticulados', es particularmente muy adecuada para una serie de aplicaciones prácticas, tales como materiales superabsorbentes y lentes de contacto blandas, debido, en gran medida, a la composición de la red y la facilidad de control del nivel de reticulación y, por tanto, el grado de hinchamiento en agua y otros disolventes.

Sin embargo, se ha encontrado que los hidrogeles que están químicamente reticulados tienen una serie de limitaciones. Esto se debe principalmente a una disposición aleatoria de un gran número de reticulaciones químicas y una amplia distribución de las longitudes de cadena de enlace. Por lo tanto, los hidrogeles poliméricos químicamente reticulados presentan (i) opacidad óptica a una densidad de reticulación alta, (ii) resistencia mecánica insuficiente y fragilidad (independientemente de la densidad de reticulación) y (iii) un grado de hinchamiento bajo y una velocidad de deshinchamiento baja debido a una restricción en el movimiento de las cadenas poliméricas.

Se han intentado una serie de enfoques diferentes para abordar los problemas anteriores que dan como resultado la creación de nuevos tipos de estructuras de red. Las mejores de ejemplo incluyen redes con reticulaciones deslizantes (geles de anillo deslizante) [Okumura, Y. & Ito, K. The polyrotaxane gel: a topological gel by figure-of-eight cross-links. *Adv. Mater.* 13, 485-487 (2001)]; redes orgánicas/inorgánicas (geles nanocomposite) [Haraguchi, K. & Takeshisa, T. Nanocomposite hydrogels: a unique organic-inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/de-swelling properties. *Adv. Mater.* 14, 1120-1124 (2002)]; redes interpenetrantes (geles de doble red) [Gong, J.P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. & Osada, Y. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength. *Adv. Mater.* 15, 1155-1158 (2003)]; redes autoensambladas (geles composite de microesferas macromoleculares) [Huang, T., Hongguang, X., Jiao, K., Zhu, L., Brown, H. R. & Wang, H. A novel hydrogel with high mechanical strength: a macromolecular microsphere composite hydrogel. *Adv. Mater.* 19, 1622-1626 (2007)]; y redes con los mismos geles (tetra-poli(etilen glicol) (PEG) de peso molecular de interreticulación [Sakai, T., Matsunaga, T., Yamamoto, Y., Ito, C., Yoshida, R., Suzuki, S., Sasaki, N., Shibayama, M. & Chung, U. I. Design and Fabrication of a high-strength hydrogel with ideally homogeneous network structure from tetrahedron-like macromonomers. *Macromolecules* 41, 5379-5384 (2008)]. De estos enfoques, los geles nanocomposite formados a partir de un polímero orgánico y una arcilla inorgánica han demostrado ser los más acertados al tratar de abordar los problemas mencionados anteriormente asociados a los hidrogeles químicamente reticulados. Se ha encontrado que estos nanocomposite basados en arcilla poseen propiedades ópticas mecánicas, de hinchamiento y sensibles a los estímulos muy mejoradas.

Durante el curso de su desarrollo, se observó que la arcilla inorgánica exfoliada dentro del gel nanocomposite actúa como un reticulante multifuncional eficaz en el que las cadenas de polímero orgánico se anclan sobre la superficie de la arcilla en uno o ambos extremos. El nanocomposite consiste en cadenas poliméricas largas y flexibles que conectan las láminas de arcilla vecinas. Se propuso que las longitudes de cadena entre láminas de arcilla pudieran ser proporcionales a la distancia entre partículas de arcilla-arcilla, dando como resultado una distribución relativamente estrecha de las longitudes de cadena a diferencia de los geles químicamente reticulados.

La síntesis establecida de geles nanocomposite implica la polimerización por radicales libres de monómeros solubles en agua que contienen grupos amida. Los monómeros adecuados incluyen N-isopropilacrilamida (NIPAM) y N,N-dimetilacrilamida. La polimerización se produce *in situ* en presencia de la arcilla inorgánica que se ha exfoliado y se ha dispersado uniformemente en un medio acuoso. Se han usado una diversidad de minerales de arcilla con estructuras fibrosas y en capas que se dispersan bien en agua y los ejemplos incluyen arcillas de grupo esmectita (hectorita, saponita, montmorillonita) y arcillas de grupo mica (mica de flúor sintética) [Haraguchi, K. synthesis properties of soft nanocomposite materials with novel organic/inorganic network structures. *Polym. J.* 43, 223-241 (2011)].

Los documentos JP 2006-95470, WO 2009/041870 y EP 1160286 desvelan sistemas de hidrogeles híbridos orgánicos/inorgánicos que incorporan polímeros unidos a arcilla.

Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar geles nanocomposite orgánicos/inorgánicos para extender su utilización a aplicaciones adicionales.

Por consiguiente, los inventores proporcionan un hidrogel nanocomposite y un procedimiento de síntesis que tienen una aplicación particular dentro del campo médico. En particular, el sistema de hidrogel presente permite una síntesis de dos fases que implica la separación de las etapas: la polimerización por radicales libres y la gelificación final. Esto resulta ventajoso ya que el hidrogel composite de arcilla puede mantenerse en una forma de suspensión precursora, indefinidamente antes de un tiempo deseado para la formación de hidrogel. Según una realización, esto

se logra mediante la selección de un iniciador térmicamente sensible en el que la disociación se produce a una temperatura apreciablemente por encima de la temperatura de gelificación de la suspensión resultante de arcilla-polímero orgánico.

5 Dentro de la memoria descriptiva, la expresión 'líquido precursor de hidrogel composite' (CHPL) se refiere a la mezcla de reacción antes de la polimerización por radicales libres del monómero. Después de la polimerización por radicales libres, se usa la expresión 'hidrogel precursor de polímero-arcilla' (PCPH) para describir la suspensión completamente reaccionada, pero no gelificada. Por lo tanto, esta expresión abarca términos alternativos para describir el hidrogel precursor, tal como el hidrogel composite de polímero-arcilla, el precursor de hidrogel composite, el precursor de hidrogel composite completamente reaccionado, la suspensión de precursor de hidrogel composite, 10 la suspensión acuosa compuesta de polímero-arcilla, el precursor líquido de hidrogel polimerizado, el gel líquido completamente reaccionado o polimerizado.

Por consiguiente, una aplicación para el presente sistema de hidrogel es la administración del PCPH en fase líquida, por ejemplo, mediante inyección, a un animal o ser humano. La temperatura del PCPH puede reducirse después y el hidrogel resultante formarse *in vivo* en una ubicación deseada. Por lo tanto, los usos médicos específicos incluyen 15 reparación de tejidos blandos, particularmente del disco espinal, o de tejidos duros.

Además, la mayoría de los iniciadores y monómeros orgánicos que son adecuados y se usan para formar los hidrogeles son tóxicos para los organismos vivos, lo que impide de este modo el dopaje de los hidrogeles con especies biológicamente activas antes de la polimerización. Los inventores han ideado un sistema en el que se pueden añadir una especie biológicamente activa y otros compuestos químicamente sensibles al PCPH (es decir, 20 polimerización posterior), pero de manera significativa antes de la gelificación. Por consiguiente, estas especies biológicas o compuestos dopantes se incorporan *in situ* dentro de la estructura gelificada resultante. Se cree que esto resulta ventajoso para la administración/liberación controlada de la especie activa *in vivo* ya que la estructura compuesta probablemente está influenciada por la presencia de la especie activa durante la gelificación.

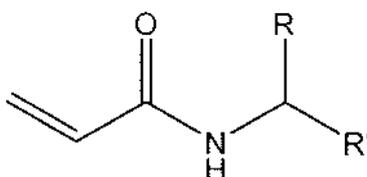
Dentro de esta memoria descriptiva, la referencia a 'gelificación' del PCPH en fase líquida se refiere al mecanismo mediante el que el líquido se solidifica para formar el gel. Se cree que este mecanismo implica uno o ambos extremos de la totalidad o un porcentaje del polímero resultante del monómero soluble en agua polimerizado, que se ancla o se une fuertemente a las partículas de arcilla dispersadas/exfoliadas suspendidas en el medio acuoso. Se cree que la estructura resultante del gel, cuando el PCPH se reduce por debajo de la temperatura de 'gelificación', 25 comprende una pluralidad de cadenas poliméricas que se extienden entre las partículas de arcilla dispersadas y exfoliadas. Tal como se ha descrito previamente, se considera que las partículas de arcilla en la presente invención actúan como reticulaciones entre las cadenas poliméricas en la matriz de gel que comprende especies de polímero y arcilla interconectadas.

La viscosidad del PCPH se configura de manera que sea inyectable a través de una aguja u otra cánula de pequeño calibre para permitir la introducción de la suspensión en/a un cuerpo animal o humano para su posterior gelificación. 35 Preferentemente, la suspensión es adecuada para la inyección a través de una aguja de calibre 23 o menor. En particular, la viscosidad de la presente suspensión es comparable a la viscosidad del agua.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de preparación de un hidrogel composite que comprende preparar una suspensión acuosa que contiene (i) partículas de arcilla dispersadas, (ii) un monómero soluble en agua y (iii) un iniciador de radicales térmicamente sensible con capacidad para la disociación 40 de radicales libres para formar un líquido precursor de hidrogel composite (CHPL); calentar el iniciador radial hasta o por encima de su temperatura de disociación para disociar el iniciador radial y proporcionar la polimerización por radicales libres del monómero a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) acuoso resultante; mantener el PCPH en una fase fluida por encima de la temperatura de gelificación; reducir la temperatura del PCPH por debajo de su temperatura de gelificación para proporcionar un hidrogel composite. 45

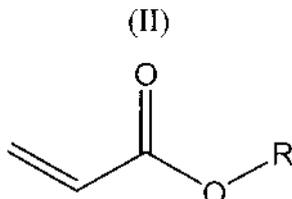
Preferentemente, el monómero soluble en agua comprende una acrilamida. Más preferentemente, el monómero de acrilamida comprende un compuesto de Fórmula I:

(I)



en la que R y R' son, ambos, alquilo, fenilo, alquil-fenilo y, preferentemente, tanto R como R' son grupos metilo.

Como alternativa, el monómero soluble en agua es un compuesto de acrilato de Fórmula II:



en la que R es un grupo hidrófilo, acrilato o amida.

5 Como alternativa, el PCPH comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: un polímero formado a partir de un monómero individual; un polímero formado a partir de al menos dos monómeros diferentes, un copolímero de bloques.

10 Preferentemente, el monómero comprende uno cualquiera o una combinación de los siguientes: ácidos acrílicos; anhídridos de ácido; acrilatos; ácidos sulfónicos; sulfonatos de vinilo; pirrolidonas; N-isopropilacrilamida (NIPAM); N,N-dimetilacrilamida, monometacrilato de glicerol, etilmetacrilato de hidroxilo, polietilenglicometacrilato, pirrolidona de vinilo; ácido estireno sulfónico.

15 Según determinadas implementaciones específicas, la temperatura de gelificación del PCPH se encuentra en el intervalo de 30 °C a 40 °C. Adicionalmente, el procedimiento comprende, además, calentar la suspensión que contiene la arcilla, el monómero y el iniciador de radicales hasta una temperatura por encima de la temperatura de disociación térmica del iniciador para proporcionar la disociación de radicales libres del iniciador y la posterior polimerización del monómero soluble en agua. Preferentemente, la etapa de calentar el iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación comprende calentar el CHPL hasta una temperatura por encima de 40 °C y, opcionalmente, una temperatura en el intervalo de 40 °C a 100 °C. Más preferentemente, esta temperatura se encuentra en el intervalo de 60 ° a 90 °C y, más preferentemente, de 75 ° a 85 °C.

20 De manera ventajosa, las partículas de arcilla, el monómero soluble en agua y el iniciador de radicales y la suspensión polimerizada resultante no se lavan, limpian o purifican de ninguna manera y no se requiere ninguna recristalización de los reactivos e iniciadores. Adicionalmente, no existe ningún requisito para desgasificar los reactivos antes de su uso.

Preferentemente, el iniciador comprende azobisisobutironitrilo (AIBN), 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AIBA) o ácido cianovalérico (CVA).

25 Preferentemente, las partículas de arcilla se exfolian en la suspensión acuosa. Más preferentemente, la arcilla comprende una arcilla hinchable, con capacidad para el intercambio iónico. Incluso más preferentemente, la arcilla comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: montmorillonita; hectorita; saponita; vermiculita; mica; bentonita o una arcilla fibrosa. Las partículas de arcilla están altamente dispersadas dentro de la suspensión compuesta y, preferentemente, esta dispersión está exfoliada o se acerca a la exfoliación. Opcionalmente, la arcilla comprende: una arcilla orgánica de intercambio catiónico; o una arcilla inorgánica de intercambio catiónico. La referencia a 'partículas de arcilla' dentro de la presente memoria descriptiva incluye: capas o plaquetas de arcilla individuales, 'agrupaciones pequeñas' de plaquetas de arcilla y asociaciones similares de partículas de arcilla fibrosa. También se puede considerar que esta expresión incluye hidróxidos de dobles capas que incorporan un metal trivalente y un metal divalente, tales como hidróxidos de Mg-Al. Tal como apreciarán aquellos expertos en la materia, estos hidróxidos tienen características adecuadas muy similares a la arcilla y se pueden considerar como alternativas a la arcilla y las partículas de arcilla dentro del ámbito de la presente invención.

En particular, se prefiere que una relación de aspecto de las partículas de arcilla no fibrosa se encuentre entre 50 y 1000, en la que la relación de aspecto es la relación entre el diámetro y el espesor de las partículas de nanoarcilla.

40 Preferentemente, la suspensión acuosa inicial comprende el 7-10 % de NIPAM, del 0,5 al 1,5 % de arcilla y una cantidad adecuada de iniciador de radicales suficiente para polimerizar por completo la NIPAM con el resto formado por agua. A continuación, se pueden añadir aditivos adicionales después de la polimerización del monómero.

Preferentemente, el procedimiento comprende, además, introducir en el PCPH al menos una o una combinación de especies biológicamente activas seleccionadas entre la lista de: células mamíferas, tales como células madre; un antimicrobiano; un anticuerpo; una bacteria; una proteína; un producto farmacéutico; un péptido.

45 Opcionalmente, el procedimiento puede comprender, además, introducir en el CHPL y/o el PCPH un compuesto no sintético natural o un compuesto sintético que comprenda uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto: un polímero soluble en agua; ácido hialurónico; geles hidrófilos; polietilen glicol, polipropilén glicol y mezclas de los mismos; éteres de celulosa; quitosano; alginatos; proteoglicanos; almidones naturales; colágeno; gelatina; hidroxiapatita.

Opcionalmente, el procedimiento puede comprender, además, introducir en el CHPL y/o el PCPH uno cualquiera o una combinación de los siguientes aditivos de procedimiento: un espesante; un modificador reológico; un tensioactivo; un pigmento o colorante; un material radiopaco.

5 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un líquido precursor de hidrogel composite (CHPL) que comprende: agua; una arcilla dispersada y suspendida dentro del agua en una cantidad no superior al 5 % en peso del CHPL; un monómero soluble en agua en una cantidad no superior al 25 % en peso del CHPL; un iniciador de radicales térmicamente sensible con capacidad para la polimerización por radicales libres del monómero mediante el calentamiento del iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación; en el que el iniciador de radicales comprende una temperatura de disociación térmica que está por encima de la temperatura de gelificación de una suspensión resultante que contiene un hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) producida mediante la reacción con el iniciador de radicales.

Opcionalmente, la arcilla no es superior al 2 % en peso del CHPL y la cantidad del monómero soluble en agua no es superior al 20 % en peso del CHPL.

15 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una suspensión de hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) en fase fluida que comprende: agua; una arcilla dispersada y suspendida dentro del agua; un polímero resultante del calentamiento de un iniciador de radicales térmicamente sensible hasta o por encima de su temperatura de disociación para proporcionar la disociación del iniciador radial y la polimerización por radicales libres de un monómero en presencia de la arcilla a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación de la suspensión de PCPH resultante.

20 Opcionalmente, el PCPH comprende una viscosidad en el intervalo de 0,6 a 10 mPa s a 54 °C. Preferentemente, el PCPH comprende una viscosidad en el intervalo de 0,6 a 5,0 mPa s a 54 °C. Más preferentemente, el PCPH comprende una viscosidad en el intervalo de 0,6 a 2,0 mPa s a 54 °C. Preferentemente, el PCPH comprende una densidad en el intervalo de 1000 a 1100 kg/m<sup>3</sup> a 54 °C y, en particular, 1060 kg/m<sup>3</sup> a 54 °C.

25 El iniciador de radicales es térmicamente estable y no experimenta disociación de radicales libres a menos que se caliente hasta o por encima de su temperatura de disociación. Según la presente invención, el iniciador se selecciona de manera que la temperatura de disociación sea superior a la temperatura de 'gelificación' del hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH). Preferentemente, las respectivas temperaturas de disociación y de gelificación están separadas por una diferencia de temperatura en el intervalo de 20 °C a 100 °C; de 20 °C a 60 °C y más preferentemente de aproximadamente 40 °C.

30 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un hidrogel composite obtenible mediante un procedimiento de: preparación de una suspensión acuosa que contiene (i) partículas de arcilla dispersadas, (ii) un monómero soluble en agua y (iii) un iniciador de radicales térmicamente sensible con capacidad para la disociación de radicales libres para formar un líquido precursor de hidrogel composite (CHPL); calentamiento del iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación para disociar el iniciador radial y proporcionar la polimerización por radicales libres del monómero a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) acuoso resultante; mantenimiento del PCPH en una fase fluida por encima de la temperatura de gelificación; y reducción de la temperatura del PCPH por debajo de su temperatura de gelificación para proporcionar el hidrogel composite.

40 Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un hidrogel composite obtenible a partir del PCPH, tal como se describe en el presente documento, mediante un procedimiento de: mantenimiento del PCPH en una fase fluida por encima de la temperatura de gelificación; y reducción de la temperatura del PCPH por debajo de su temperatura de gelificación para proporcionar el hidrogel composite.

45 Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de creación de un hidrogel composite en un animal o ser humano *in vivo* que comprende: inyectar en un ser humano o animal un hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) acuoso, manteniéndose el PCPH por encima de su temperatura de gelificación antes y durante la etapa de inyección; dejar que la temperatura del PCPH disminuya por debajo de la temperatura de gelificación *in vivo* para formar un hidrogel composite.

50 Preferentemente, el procedimiento comprende inyectar el PCPH acuoso en un disco espinal del animal o ser humano. Opcionalmente, el procedimiento puede comprender inyectar el PCPH acuoso en una región de tejido blando o duro del animal o ser humano. Opcionalmente, el procedimiento puede comprender, además, dopar el PCPH acuoso con una especie biológicamente activa antes de la etapa de inyección.

El presente sistema de hidrogel también es adecuado para los apósitos para heridas y tiene la capacidad de presentar características de absorción y donación intercambiables para absorber o liberar compuestos deseados en respuesta a un estímulo que incluye, por ejemplo, efectos mecánicos de temperatura, químicos o físicos.

55 El presente hidrogel composite también es adecuado para usos no médicos, en particular, los usos específicos del hidrogel composite, tanto en la fase líquida de baja viscosidad como en el estado de gel resultante, pueden incluir: revestimientos textiles para proporcionar un revestimiento transpirable y poroso sensible para una mayor comodidad

y regulación de la temperatura; membranas de filtración para proporcionar una absorción adaptada o un tamaño de poro intercambiable orientados o sensibles al entorno de la membrana. Por lo tanto, el presente gel puede actuar como un filtro selectivo sensible de especies orgánicas, inorgánicas y biológicas; ventanas 'pasivas' en las que el gel tiene capacidad para el intercambio entre estados transparentes y opacos en respuesta a la subida o la disminución de la temperatura. Por lo tanto, los presentes geles pueden revestirse o incorporarse dentro de los conjuntos de ventana de polímero y vidrio existentes para reflejar la luz y/o el calor alejándose del interior del edificio.

El presente hidrogel composite también puede formarse como una lámina o película de gel independiente. Esto puede lograrse mediante el revestimiento o la 'extensión' del PCPH sobre un sustrato de liberación adecuada usando cabezales de revestimiento convencionales. El presente sistema también puede usarse para el revestimiento de papel, productos textiles, películas, vidrio u otros sustratos que impliquen la 'extensión' de la suspensión polimerizada en fase líquida sobre el sustrato sólido, seguida del enfriamiento.

El presente sistema y, en particular, la suspensión compuesta de polímero-arcilla puede procesarse antes de y/o durante la etapa de reducción de la temperatura de la suspensión mediante colada, moldeado, hilado, espumación, revestimiento o pulverización de la suspensión. Preferentemente, el hilado comprende electrohilado e hilado de fibras.

A continuación, se describirán los ejemplos específicos de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

la Figura 1 muestra la viabilidad celular de las células madre mesenquimales (CMM) humanas en presencia de geles de NIPAM durante 2 semanas antes de la evaluación de la viabilidad;

la Figura 2 muestra células CMM marcadas con colorante de seguimiento celular, A: células de control cultivadas en plástico de cultivo tisular sin ninguna NIPAM, B: células cultivadas en presencia de gel 1C<sub>10</sub> (para más detalles de la composición, consúltese la Tabla 1) adheridas al plástico de cultivo tisular y C: células cultivadas en presencia de gel 1C<sub>10</sub> adheridas a la capa de hidrogel de gel 1C<sub>10</sub>;

la Figura 3 muestra la migración de las CMM a través del hidrogel de 1C<sub>10</sub> durante un cultivo de 2 semanas, en la que las células pueden visualizarse claramente en todo el hidrogel después de la siembra en la superficie del hidrogel;

la Figura 4 muestra A: CMM marcadas con un colorante de seguimiento de membrana fluorescente de color verde suspendidas en 1C<sub>10</sub> antes de la gelificación y cultivadas durante 2 semanas, en las que las células pueden observarse claramente en todo el gel y B: el hidrogel a partir de A se embebió en secciones de 4 μm de cera de parafina montadas en portaobjetos y teñidas con tinción tricrómica de Masson (tinción de colágeno), lo que demostró que las células dentro del hidrogel estaban produciendo colágenos;

la Figura 5 muestra los efectos de las propiedades de deshinchamiento de los hidrogeles después de la incorporación del dopante de gelatina en el precursor líquido antes del enfriamiento;

la Figura 6 muestra CMM marcadas con un colorante de seguimiento de membrana fluorescente de color verde suspendidas en 1C<sub>10</sub>G20 (Tabla 3) antes de la gelificación y cultivadas durante 2 semanas (A) y 4 semanas (B), células que pueden observarse claramente en todo el gel;

la Figura 7 muestra los efectos sobre las propiedades de deshinchamiento de los hidrogeles después de la incorporación del dopante de ácido hialurónico (HA) en el precursor líquido antes del enfriamiento;

la Figura 8 muestra A: CMM marcadas con un colorante de seguimiento de membrana fluorescente de color verde suspendidas en 1C<sub>10</sub>HA20 (Tabla 4) antes de la gelificación y cultivadas durante 2 semanas, en las que las células pueden observarse claramente en todo el gel y B: el hidrogel a partir de A se embebió en secciones de 4 μm de cera de parafina montadas en portaobjetos y teñidas con tinción tricrómica de Masson (tinción de colágeno), lo que demostró que las células dentro del hidrogel estaban produciendo colágenos;

la Figura 9 muestra el 1C<sub>10</sub>HA20 inyectado en discos vertebrales caudales bovinos digeridos con colagenasa; se observó que el 1C<sub>10</sub>HA20 rellenaba los huecos grandes y las fisuras más pequeñas digeridas por la colagenasa;

la Figura 10 muestra la SEM de esteras de PCCH dopadas electrohiladas típicas en (a) un aumento de 10.000 veces y (b) un aumento de 30.000 veces con los tamaños de fibra anotados;

la Figura 11 es una secuencia de fotografías que ilustran las características moldeables del presente hidrogel;

la Figura 12 es un gráfico del efecto de la composición de comonomero de la temperatura de solidificación/gelificación de una gama de PCPH basados en NIPAM-arcilla;

la Figura 13 son los datos del análisis mecánico dinámico de una gama de PCPH solidificados posteriormente, tal como se detalla en la Tabla 5, ilustrados como un gráfico del módulo de almacenamiento frente a la frecuencia logarítmica;

la Figura 14 son los datos del análisis mecánico dinámico de una gama de PCPH solidificados posteriormente, tal como se detalla en la Tabla 5, ilustrados como un gráfico de la tan δ frente a la frecuencia logarítmica;

la Figura 15 es una imagen de fluorescencia confocal que muestra la distribución uniforme de CMM proliferantes dentro de un PCPH solidificado;

la Figura 16 es la viabilidad de la CMM humana en el 1C<sub>10</sub> que contiene el 13 % de DMAC, lo que indica una buena viabilidad celular dentro del PCPH gelificado (hidrogel);

la Figura 17 es una imagen microscópica de luz blanca de una sección de un disco bovino;

la Figura 18 es una imagen microscópica de luz blanca de una sección de un disco bovino en la que las fisuras se han rellenado con PCPH en la fase líquida para generar el hidrogel composite *in vivo*.

**Optimización de la cantidad de arcilla, monómero e iniciador**

Diversas composiciones producen geles con diversas propiedades mecánicas, pero, en general, cuanto más sólidos se incluyen en el sistema, mayores son las propiedades mecánicas del gel. Adicionalmente, la variación del tipo de monómero también influirá en las propiedades mecánicas del gel final. Uno de los objetos principales del presente estudio es sintetizar con éxito un PCPH que pueda mantenerse en la fase líquida y otro que no forme un hidrogel sólido inmediatamente después de la polimerización. Con el fin de permitir que los reactivos permanezcan como un líquido de baja viscosidad después de la polimerización, se ha observado lo siguiente:

1. El contenido total de monómero preferentemente no debería exceder aproximadamente el 20 % en peso de la composición global.
2. El contenido total de arcilla preferentemente no debería exceder aproximadamente el 2 % en peso de la composición global.
3. La cantidad de iniciador no parece tan significativa como la cantidad de monómero y arcilla para influir en la capacidad de permanecer en estado líquido (por ejemplo, se ha encontrado que el 0,5 - 4 % en peso de monómero es exitoso para lograr el PCPH en la fase líquida).

Cuando el contenido de monómero total se encuentra por encima de aproximadamente el 20 % en peso o el contenido de arcilla se encuentra por encima de aproximadamente el 2 % en peso, independientemente de cualquier otro factor, se ha encontrado que el gel se solidifica (autoensambla) *in situ* durante la polimerización, que es el comportamiento típico de un hidrogel de reticulación y se observa en los sistemas de Haraguchi y col. del tipo desvelado en el documento EP 1160286. Debido, entre otros, a la cantidad de arcilla y de monómero incluida en estos tipos de sistemas existentes, la polimerización y la solidificación del hidrogel resultante se produce de manera simultánea.

Los inventores no han discernido límites inferiores en la cantidad de monómero y arcilla en la composición de CHPL *per se*, ya que, aunque se producirán geles muy débiles a partir de las formulaciones de PCPH con bajo contenido de sólidos, la capacidad de permanecer en estado líquido no se ve afectada.

Asimismo, no se ha encontrado que la desgasificación de la solución antes de la polimerización influya en la capacidad de permanecer líquida.

**Síntesis del hidrogel - Ejemplo 1**

**Formación del hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH)**

Se usó el monómero de *N*-isopropilacrilamida (NIPAM) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) tal como se recibió. La arcilla inorgánica, la hectorita sintética "Laponita RD", (Rockwood Ltd.:  $[Mg_{5,34}Li_{0,66}Si_8O_{20}(OH)_4]Na_{0,66}$ ) se usó como agente de reticulación inorgánico, sin purificar y tal como se recibió. El iniciador de radicales libres azobisisobutironitrilo (AIBN) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) se usó tal como se recibió.

En primer lugar, la arcilla se pesó y se dispersó en agua hasta que se formó una suspensión acuosa transparente. El procedimiento sintético es tal como sigue: por ejemplo, para preparar una suspensión de hidrogel precursor que contiene el 10 % de sólidos, del cual el 1 % es arcilla (o 1C<sub>10</sub>), se preparó una suspensión acuosa transparente que consistía en agua (9 g), arcilla inorgánica exfoliada (0,1 g) (o 9,1 g de la suspensión exfoliada original), AIBN (0,009 g) y NIPAM (0,9 g) (nota: en todos los casos, la concentración de AIBN es el 1 % de la de NIPAM). Después, la polimerización se dejó continuar en un baño de aceite ajustado previamente a 80 °C durante un mínimo de 25 minutos. El formato de la nomenclatura es tal como sigue:

$$x C_y$$

en la que *x* es el porcentaje global de arcilla en peso e *y* denota el porcentaje global de "sólidos" (arcilla + NIPAM) en peso del hidrogel precursor y posterior gel.

por ejemplo, "1C<sub>20</sub>" indica una muestra de 10 g de hidrogel precursor preparada usando 8 g de agua, 1,9 g de NIPAM, 0,1 g de arcilla y 0,019 g de AIBN. ".5C<sub>10</sub>" indica una muestra de 10 g de hidrogel precursor preparada usando 9 g de agua, 0,95 g de NIPAM, 0,05 g de arcilla y 0,0095 g de AIBN, tal como se detalla en la Tabla 1.

Nomenclatura de la solución de hidrogel precursor de NIPAM/arcilla. Porcentajes de los componentes en peso						
Componente	.1C <sub>1</sub>	.1C <sub>5</sub>	.1C <sub>10</sub>	.1C <sub>15</sub>	.1C <sub>20</sub>	.1C <sub>25</sub>
PNIPAM	0,9	4,9	9,9	14,9	19,9	24,9
Arcilla	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H2O	99	95	90	85	80	75

(continuación)

Nomenclatura de la solución de hidrogel precursor de NIPAM/arcilla. Porcentajes de los componentes en peso						
Componente	.1C <sub>1</sub>	.1C <sub>5</sub>	.1C <sub>10</sub>	.1C <sub>15</sub>	.1C <sub>20</sub>	.1C <sub>25</sub>
	.25C <sub>1</sub>	.25C <sub>5</sub>	.25C <sub>10</sub>	.25C <sub>15</sub>	.25C <sub>20</sub>	.25C <sub>25</sub>
PNIPAM	0,75	4,75	9,75	14,75	19,75	24,75
Arcilla	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H2O	99	95	90	85	80	75

	.5C <sub>1</sub>	.5C <sub>5</sub>	.5C <sub>10</sub>	.5C <sub>15</sub>	.5C <sub>20</sub>	.5C <sub>25</sub>
PNIPAM	0,5	4,5	9,5	14,5	19,5	24,5
Arcilla	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H2O	99	95	90	85	80	75

		1C <sub>5</sub>	1C <sub>10</sub>	1C <sub>15</sub>	1C <sub>20</sub>	1C <sub>25</sub>
PNIPAM	-	4	9	14	19	24
Arcilla	-	1	1	1	1	1
H2O	-	95	90	85	80	75

		1,5C <sub>5</sub>	1,5C <sub>10</sub>	1,5C <sub>15</sub>	1,5C <sub>20</sub>	1,5C <sub>25</sub>
PNIPAM	-	3,5	8,5	13,5	18,5	23,5
Arcilla		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H2O	-	95	90	85	80	75

		2C <sub>5</sub>	2C <sub>10</sub>	2C <sub>15</sub>	2C <sub>20</sub>	2C <sub>25</sub>
PNIPAM	-	3	8	13	18	23
Arcilla	-	2	2	2	2	2
H2O	-	95	90	85	80	75

		2,5C <sub>5</sub>	2,5C <sub>10</sub>	2,5C <sub>15</sub>	2,5C <sub>20</sub>	2,5C <sub>25</sub>
PNIPAM	-	2,5	7,5	12,5	17,5	22,5
Arcilla	-	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
H2O	-	95	90	85	80	75

		3C <sub>5</sub>	3C <sub>10</sub>	3C <sub>15</sub>	3C <sub>20</sub>	3C <sub>25</sub>
PNIPAM	-	2	7	12	17	22
Arcilla	-	3	3	3	3	3
H2O	-	95	90	85	80	75

Tabla 1

Se descubrió que, en el caso de la PNIPAM reticulada con arcilla iniciada por calor, la propagación del polímero y la acción de la reticulación se produjeron por separado. Después de polimerizarse hasta su finalización a 80 °C, el hidrogel precursor es un líquido opaco y de baja viscosidad. Cuando la temperatura del líquido se reduce hasta ~35 °C, este empieza a solidificarse, formando posteriormente un gel transparente. La formación de este gel es permanente y el gel no vuelve a licuarse cuando se aumenta la temperatura.

También se descubrió que el líquido de hidrogel precursor permanece líquido a temperaturas entre 37 °C y 80 °C, incluyendo los casos en los que el precursor experimenta una "ciclación" entre estas temperaturas (24 h mantenido a 37 °C, seguido de 24 h mantenido a 80 °C, repetido durante 14 días). El procedimiento de ciclación no influye en la capacidad del precursor de formar de manera espontánea un gel transparente después del enfriamiento. Las formulaciones de gel producidas con éxito se destacan en la Tabla 2.

5

**Tabla 2**

Soluciones de hidrogel precursor de NIPAM-arcilla						
% global de arcilla	1	5	10	15	20	25
0,1	.1C <sub>1</sub>	.1C <sub>5</sub>	.1C <sub>10</sub>	.1C <sub>15</sub>	.1C <sub>20</sub>	.1C <sub>25</sub>
0,25	.25C <sub>1</sub>	.25C <sub>5</sub>	.25C <sub>10</sub>	.25C <sub>15</sub>	.25C <sub>20</sub>	.25C <sub>25</sub>
0,5	.5C <sub>1</sub>	.5C <sub>5</sub>	.5C <sub>10</sub>	.5C <sub>15</sub>	.5C <sub>20</sub>	.5C <sub>25</sub>
1	N/A	1C <sub>5</sub>	1C <sub>10</sub>	1C <sub>15</sub>	1C <sub>20</sub>	1C <sub>25</sub>
1,5	N/A	1,5C <sub>5</sub>	1,5C <sub>10</sub>	1,5C <sub>15</sub>	1,5C <sub>20</sub>	1,5C <sub>25</sub>
2	N/A	2C <sub>5</sub>	2C <sub>10</sub>	2C <sub>15</sub>	2C <sub>20</sub>	2C <sub>25</sub>
2,5	N/A	2,5C <sub>5</sub>	2,5C <sub>10</sub>	2,5C <sub>15</sub>	2,5C <sub>20</sub>	2,5C <sub>25</sub>
3	N/A	3C <sub>5</sub>	3C <sub>10</sub>	3C <sub>15</sub>	3C <sub>20</sub>	3C <sub>25</sub>

Se llevaron a cabo una serie de experimentos para investigar la tolerancia de especies biológicamente activas vivas al gel nanocomposite, tanto en el estado gelificado final como en la fase líquida de baja viscosidad.

10 **Evaluación de la viabilidad de las células madre mesenquimales en presencia de hidrogel de NIPAM**

El precursor líquido completamente reaccionado preparado tal como se hizo anteriormente se enfrió por debajo del punto de gelificación mediante el vertido en un molde de cavidad preparado previamente para producir una lámina colada de aproximadamente 2 mm de espesor.

15 Se mantuvo una pieza de 5 mm<sup>2</sup> de la lámina de gel colada en medios de crecimiento que contenían células madre mesenquimales (CMM) humanas a una concentración de 100.000 células por ml. Las células se mantuvieron con la lámina de gel suspendida dentro de un inserto de cultivo celular a 37 °C, con el 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 14 días.

20 Se realizó un ensayo de viabilidad celular usando tinción de yoduro de propidio/Hoechst y recuentos de células vivas/muertas en muestras preparadas mediante este procedimiento y se compararon con los recuentos de los productos de control inoculados de los mismos cultivos celulares sin gel presente. Se sometieron a ensayo una serie de formulaciones de gel que incluían: 0,25C<sub>10</sub>, 0,5C<sub>10</sub> y 1C<sub>10</sub>. Los números de células viables no se vieron afectados por el cultivo con ninguna de las láminas de gel, tal como se muestra en la Figura 1, que muestran que el gel no liberó sustancias tóxicas en los medios de cultivo y, por tanto, no era citotóxico para las CMM.

**Adherencia de las CMM a los hidrogeles colados previamente**

25 El gel líquido completamente reaccionado (1C<sub>10</sub>) se enfrió hasta por debajo del punto de gelificación mediante el vertido en un molde de cavidad preparado previamente para producir una lámina colada de aproximadamente 2 mm de espesor.

30 Una muestra de la lámina de gel de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> se colocó en una placa de cultivo *in vitro*. Las CMM (marcadas previamente con un colorante de membrana fluorescente de color verde) en medios de crecimiento se inocularon en la superficie de la lámina (100.000 células por lámina de gel) y se incubaron a 37 °C, con el 5 % de CO<sub>2</sub>, durante hasta 6 semanas.

Las CMM se adherieron a la superficie de la lámina de gel durante 24 h. Las CMM fueron claramente visibles en la superficie de la lámina durante el cultivo, tal como se muestra en la Figura 2.

**Migración de las CMM a través de hidrogeles colados previamente**

35 El gel líquido completamente reaccionado (1C<sub>10</sub>) se enfrió hasta por debajo del punto de gelificación mediante el vertido en un molde de preparado previamente para colar un rollo de aproximadamente 5 mm de diámetro por 40 mm de longitud.

Se tomó un corte de 15 mm del rollo de gel para dar un cilindro de 5 mm de diámetro x 15 mm de altura. Este cilindro se colocó en una placa de 12 pocillos y la superficie expuesta superior se inoculó con 100.000 CMM. A continuación, se inoculó la muestra a 37 °C, con el 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 14 días.

5 Después del tiempo de incubación, el cilindro de gel se examinó para determinar la presencia de CMM vivas usando la tinción de núcleos con Hoescht (colorante de núcleos de color azul). Las células fueron claramente visibles en la superficie del cilindro de gel. El cilindro de gel también se seccionó en intervalos de 2,5 mm. Cada sección mostró una clara presencia de células viables, debido a la migración en y a través del gel, tal como se muestra en la Figura 3.

**Suspensión de las CMM en el PCPH líquido antes de la gelificación**

10 El PCPH (1C<sub>10</sub>) se enfrió hasta 38 °C, permaneciendo como un líquido de baja viscosidad. Un millón de CMM (marcadas previamente con colorante de seguimiento de membrana fluorescente de color verde) por ml de gel líquido (esto es similar a los números de células observados dentro del centro del disco intervertebral) se añadieron al gel líquido y se pipetearon 0,05 ml en una placa de 96 pocillos a 38 °C. A continuación, se enfrió la placa hasta 35 °C, lo que provocó que el gel líquido se solidificara de manera irreversible. Se añadieron los medios de crecimiento (0,2 ml) y se inoculó el gel a 37 °C, con el 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 28 días.

15 Después de la incubación, las CMM fueron visibles en todo el gel, lo que demostró una buena viabilidad, tal como se muestra en la Figura 4a. También se observaron pruebas a través del uso de tinciones histológicas específicas para la producción de matriz de colágeno dentro del gel mediante las células, tal como se muestra en la Figura 4b.

**Ejemplo 2:**

20 **Formación de PCPH incorporado en gelatina**

El PCPH en fase líquida se sintetizó según el Ejemplo 1.

Se fabricó una solución de gelatina mediante el calentamiento de una mezcla 1:1 p/p de gránulos de gelatina (Fluka Analytical) y agua desionizada hasta 70 °C y la agitación hasta que estaba sin grumos. Una cantidad medida de esta solución se combinó con el PCPH y se agitó con cuidado en un baño ultrasónico calentado (40 kHz a 70 °C) hasta que se formó un líquido de color amarillo claro homogéneo, el hidrogel precursor de PNIPAM-arcilla incorporado en gelatina.

El formato de la nomenclatura para estos geles dopados es tal como sigue:



30 en la que "xC<sub>y</sub>" indica la formulación de la suspensión de hidrogel precursor de base (véase el Ejemplo 1), Q denota el dopante específico usado (por ejemplo, "G" para gelatina, "H" para ácido hialurónico) y z es el porcentaje de la solución de dopante dada de la solución global en peso, tal como se muestra en la Tabla 3. por ejemplo, 1C<sub>10</sub>G10 indica un hidrogel precursor de PNIPAM-arcilla incorporado en gelatina preparado usando una suspensión de PCPH básica de 1C<sub>10</sub> (9 g de agua, 0,9 g de NIPAM, 0,1 g de arcilla, 0,009 g de AIBN) a la que se añaden 1,111 g de solución de gelatina (5,555 g de gelatina, 5,555 g de agua).

35 **Tabla 3**

	Nomenclatura del hidrogel precursor de gelatina-NIPAM-arcilla. Porcentajes de los componentes en peso						
Componente	10C <sub>10</sub> G5	10C <sub>10</sub> G10	10C <sub>10</sub> G15	10C <sub>10</sub> G20	10C <sub>10</sub> G25	10C <sub>10</sub> G50	10G <sub>10</sub> G75
PNIPAM	8,55	8,1	7,65	7,2	6,75	4,5	2,25
Arcilla	0,95	0,9	0,85	0,8	0,75	0,5	0,25
H2O	88	86	84	82	80	70	60
Gelatina	2,5	5	7,5	10	12,5	25	37,5

40 La incorporación de la gelatina en los sistemas de hidrogel precursor de NIPAM-arcilla redujeron la capacidad de deshinchamiento inducido por calor de los geles nanocomposite resultantes (medidos ópticamente después del equilibrio a las temperaturas dadas durante 24 h), tal como se muestra en la Figura 5, junto con la temperatura de gelificación que influye. El precursor líquido completamente reaccionado (1C<sub>10</sub>G20) se enfrió hasta 38 °C, permaneciendo como un líquido de baja viscosidad. Un millón de CMM (marcadas previamente con colorante de seguimiento de membrana fluorescente de color verde) por ml de gel líquido (esto es similar a los números de células observados dentro del centro del disco intervertebral) se añadieron al gel líquido y se pipetearon 0,05 ml en una placa de 96 pocillos a 38 °C. A continuación, se enfrió la placa hasta 35 °C, lo que provocó que el gel líquido se

solidificara de manera irreversible. Se añadieron los medios de crecimiento (0,2 ml) y se inoculó el gel a 37 °C, con el 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 28 días. Después de la incubación, las CMM fueron visibles a través d el gel, lo que demostró una buena viabilidad, tal como se muestra en la Figura 6.

**Ejemplo 3:**

**5 Formación del PCPH incorporado en ácido hialurónico**

El líquido de PCPH se sintetizó según el Ejemplo 1. Una solución de ácido hialurónico (HA) se fabricó mediante, en primer lugar, la preparación de una mezcla 50:1 p/p de HA bruto a partir del humo vítreo bovino (Lyophilized, Sigma) y el agua desionizada. La mezcla se refrigeró durante 48 horas, tiempo durante el que se retiró y agitó intensamente cada 12 horas. Una cantidad medida de esta solución, que ahora era un líquido homogéneo muy viscoso, se combinó, después, con el PCPH y se agitó con cuidado en un baño ultrasónico calentado (40 kHz a 40 °C) hasta que se formó un hidrogel precursor de PNIPAM-arcilla incorporado en HA líquido lácteo homogéneo.

El formato de la nomenclatura para estos geles dopantes es tal como sigue:



15 en la que "xC<sub>y</sub>" indica la formulación del PCPH de base (véase el Ejemplo 1), Q denota el dopante específico usado ("H" para ácido hialurónico) y z es el porcentaje de la solución de dopante dada de la solución global en peso, tal como se muestra en la Tabla 4. por ejemplo, 1C<sub>10</sub>H10 indica un hidrogel precursor de PNIPAM-arcilla incorporado en ácido hialurónico preparado usando un PCPH básico de 1C<sub>10</sub> (9 g de agua, 0,9 g de NIPAM, 0,1 g de arcilla, 0,009 g de AIBN) al que se añadió 1 g de solución de ácido hialurónico (0,02 g de ácido hialurónico, 0,98 g de agua).

**Tabla 4**

Nomenclatura del hidrogel precursor de ácido hialurónico-NIPAM-arcilla. Porcentajes de los componentes en peso							
Componente	10C <sub>10</sub> H5	10C <sub>10</sub> H10	10C <sub>10</sub> H15	10C <sub>10</sub> H20	10C <sub>10</sub> H25	10C <sub>10</sub> H50	10C <sub>10</sub> H75
PNIPAM	8,55	8,1	7,65	7,2	6,75	4,5	2,25
Arcilla	0,95	0,9	0,85	0,8	0,75	0,5	0,25
H2O	90,4	90,8	91,2	91,6	92	94	96
Ácido hialurónico	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	1,5

20 De manera similar a la incorporación de la gelatina en el hidrogel precursor de NIPAM-arcilla, la incorporación del ácido hialurónico en el hidrogel precursor también influyó en la capacidad de deshinchamiento después de la gelificación, tal como se muestra en la Figura 7. Adicionalmente, los hidrogeles incorporados en HA parecían más adhesivos a las placas de cultivo de plástico. El hidrogel precursor de PNIPAM-arcilla incorporado en HA se enfrió hasta 38 °C, permaneciendo como un líquido de baja viscosidad. Un millón de CMM (marcadas previamente con colorante de seguimiento de membrana fluorescente de color verde) por ml de PCPH (esto es similar a los números de células observados dentro del centro del disco intervertebral) se añadieron al PCPH y se pipetearon 0,05 ml en una placa de 96 pocillos a 38 °C. A continuación, se enfrió la placa hasta 35 °C, lo que provocó que el PCPH se solidificara de manera irreversible. Se añadieron los medios de crecimiento (0,2 ml) y se inoculó el gel a 37 °C, con el 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 28 días. Después de la incubación, las CMM fueron visibles a través d el gel, lo que demostró una buena viabilidad, tal como se muestra en la Figura 8. También se observó que el gel dopado con HA parecía soportar más crecimiento celular.

**Ejemplo 4**

**Inyectabilidad del PCPH**

35 Los líquidos se PCPH se prepararon tal como en los Ejemplos 1, 2 y 3. Los PCPH se mantuvieron a 40 °C en una forma inyectable líquida. Un disco bovino se preparó mediante la inyección de 0,1 ml a 1 mg/ml de colagenasa tipo II durante 24 h a 37 °C, con daños inducidos para simular la degeneración del núcleo pulposo (NP) y proporcionar cavidades en el NP. El disco se mantuvo a 37 °C y se inyectaron 0,1-0,2 ml de gel líquido a través del anillo fibroso (disco intervertebral externo) en el NP usando una aguja de calibre 21. Los tejidos se dejaron enfriar hasta 35 °C durante 10 minutos para permitir la solidificación del PCPH en el disco y, después, se mantuvieron a 37 °C durante 24 h.

Los discos se extirparon de los segmentos de movimiento, se fijaron en formalina, se embebieron en cera de parafina y se seccionaron para su examinación, en la que se observó que el gel relleno las cavidades en el disco y que el gel estaba bien adherido a las superficies internas. También se observó que el gel había rellenado el canal de

inyección formado a través de los tejidos sanos, tal como se muestra en la Figura 9.

### Ejemplo 5

#### Electrohilado

5 Los líquidos de PCPH se prepararon tal como en el Ejemplo 2 y, a estos, se añadió 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) para dar una relación de PCPH respecto a HFP de 10:1. El electrohilado se realizó mediante el uso de una jeringa de plástico que contenía la mezcla de HFP/PCPH unida a una bomba de jeringa controlada digitalmente. La línea de transferencia, la jeringa y la aguja se calentaron, todas, usando una camisa térmica aislada ajustada a 70 °C. La aguja se orientó verticalmente hacia el recolector y la distancia de la punta al colector se ajustó a 14 cm. La tensión de alimentación se fijó a 12 kV y el caudal volumétrico se ajustó a 0,20 ml/h. La Figura 10 muestra una imagen de SEM típica de esteras electrohiladas fabricadas usando este procedimiento.

### Ejemplo 6

#### Moldeado

15 Los líquidos de PCPH se prepararon tal como en los Ejemplos 1, 2, 3 y 4. La generación de PCPH de una forma predeterminada se logró vertiendo el PCPH líquido caliente en un molde adecuado y dejándolo enfriar. Las fotografías de la Figura 11 muestran la fácil formación de formas potencialmente intrincadas y, en particular, (1) el líquido de baja viscosidad de flujo libre, (2) el fácil pipeteado de la materia prima, (3) el completo relleno del molde, (4) el PCPH de polímero opaco, (5) el hidrogel composite ópticamente transparente formado tras el enfriamiento y (6) el hidrogel composite que se retira fácilmente tras la solidificación y la retención de su forma predeterminada.

### Ejemplo 7

#### 20 Combinaciones de monómero y su efecto sobre la temperatura de solidificación, la propiedad mecánica y la viabilidad celular.

La temperatura de solidificación del PCPH y las propiedades mecánicas del gel final solidificado posteriormente se pueden adaptar mediante el uso de un comonómero en la mezcla de reacción de partida. Se investigó el efecto sobre la temperatura de solidificación de los comonómeros, concretamente, el acrilato de dimetilo (DMA, más hidrófilo que la NIPAM) y el metacrilato de glicidilo (GMA, más hidrófobo que la NIPAM). Se anticipó que la adición del DMA elevaría la temperatura de solidificación de manera pseudolineal, mientras que, al contrario, la incorporación del GMA reduciría la temperatura de solidificación.

30 La Figura 12 muestra el efecto de la fracción de comonómero sobre la temperatura de solidificación medida de un número de formulaciones de PCPH. Debe indicarse que, a fracciones altas de GMA (>50 %), el PCPH permaneció en forma líquida incluso después de haberlo enfriado en un refrigerador con una temperatura medida de 4 °C. Tal como se predijo, la incorporación del DMA como comonómero conduce a un aumento en la temperatura de solidificación y la incorporación del GMA como comonómero conduce a una disminución de la temperatura de solidificación. Por consiguiente, se ha observado que el grado de cambio puede controlarse mediante la composición relativa de los comonómeros.

35 Las Figuras 13 y 14 muestran los resultados del análisis mecánico dinámico de una serie de formulaciones ajustadas posteriormente que incorporan diversas cantidades de aditivo soluble en agua (gelatina y ácido hialurónico) y comonómero (GMA) (Tabla 5), siendo el aumento pseudolineal en el módulo de almacenamiento en función de la frecuencia indicativo de un material viscoelástico. A partir de estos datos, resulta evidente que la incorporación de aditivos solubles en agua en el PCPH tiene un impacto significativamente más reducido sobre las propiedades mecánicas que la incorporación de un comonómero adicional, en este caso, de DMA. Sin embargo, también resulta evidente que, mediante una selección cuidadosa del contenido de arcilla, el contenido de agua, el contenido de monómero y el contenido de aditivo soluble en agua resulta posible ajustar las propiedades mecánicas particulares en el hidrogel polimerizado resultante.

**Tabla 5**

Nomenclatura	Composición de la muestra nominal
1C <sub>10</sub>	1 % de arcilla, 9 % de NIPAM, 90 % de agua
1C <sub>10</sub> G10	0,9 % de arcilla, 8,1 % de NIPAM, 5 % de gelatina, 86 % de agua
1C <sub>10</sub> G20	0,8 % de arcilla, 7,2 % de NIPAM, 10 % de gelatina, 82 % de agua
1C <sub>10</sub> H10	0,9 % de arcilla, 8,1 % de NIPAM, 0,2 % de ácido hialurónico, 90,8 % de agua
1C <sub>10</sub> H20	0,8 % de arcilla, 7,2 % de NIPAM, 0,4 % de ácido hialurónico, 91,6 % de agua

(continuación)

Nomenclatura	Composición de la muestra nominal
1C <sub>10</sub> DMA13	1 % de arcilla, 8,3 % de NIPAM, 0,7 % de DMA, 89 % de agua

### Ejemplo 8

#### Ilustraciones de la distribución homogénea de las células dentro del hidrogel.

- 5 Las CMM marcadas con un colorante fluorescente de color verde se suspendieron en medios de cultivo celular y se mezclaron a 39 °C con PCPH. La suspensión se dejó solidificar y se incubó a 37 °C durante hasta 7 días. Se tomaron secciones de la mezcla de PCPH/CMM solidificada que muestran claramente que las CMM se distribuyen y proliferan uniformemente dentro de la matriz (Figura 15) dentro de este período de tiempo. Los datos de viabilidad celular (Figura 16) confirman que no existe ningún impacto negativo sobre la capacidad de las células de sobrevivir en la matriz de hidrogel.
- 10

### Ejemplo 9

#### Eficacia de la solución de rellenar cavidades pequeñas.

- 15 Para confirmar la eficacia del PCPH de rellenar huecos en los tejidos blandos, se inyectaron muestras de disco caudal bovino con colagenasa (100 µl, 2 mg/ml, 1 h) para imitar la degeneración leve. La colagenasa digiere de manera eficaz todos los colágenos dentro del IVD y el resultado es un tejido con orificios y fisuras que son visibles usando microscopía de luz blanca (Figura 17).

- 20 Mediante el uso de una aguja de calibre 21, se inyectaron 500 µl de un 1C<sub>10</sub> que contenía unas pocas gotas de colorante alimentario de color azul en un disco caudal bovino tratado con colagenasa y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se retiró el IVD y se tomaron secciones a partir de la región de NP del tejido extirpado. La Figura 18 confirma que el PCPH (hidrogel) solidificado ha rellenado con éxito y por completo los orificios generados por la colagenasa.

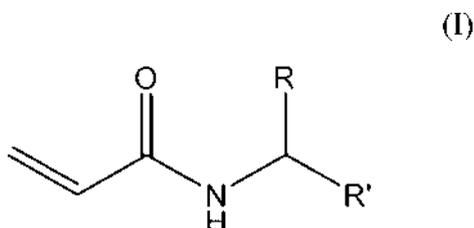
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un hidrogel composite que comprende:

5 preparar una suspensión acuosa que contiene (i) partículas de arcilla dispersadas, (ii) un monómero soluble en agua y (iii) un iniciador de radicales térmicamente sensible con capacidad para la disociación de radicales libres para formar un líquido precursor de hidrogel composite (CHPL);  
 calentar el iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación para disociar el iniciador radial y proporcionar la polimerización por radicales libres del monómero a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) acuoso resultante;  
 10 mantener el PCPH en una fase fluida por encima de la temperatura de gelificación;  
 reducir la temperatura del PCPH por debajo de su temperatura de gelificación para proporcionar un hidrogel composite.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el monómero soluble en agua comprende una acrilamida.

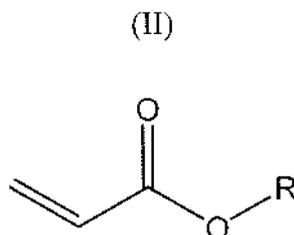
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el monómero de acrilamida comprende un compuesto de Fórmula I:



15

en la que R y R' son, ambos, alquilo, fenilo, alquil-fenilo y, preferentemente, tanto R como R' son grupos metilo.

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el monómero soluble en agua es un compuesto de acrilato de Fórmula II



20 en la que R es un grupo hidrófilo, acrilato o amida.

5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el PCPH comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de:

- 25
- un polímero formado a partir de un monómero individual;
  - un polímero formado a partir de al menos dos monómeros diferentes;
  - un copolímero de bloques.

6. El procedimiento según las reivindicaciones 2 o 3, en el que la temperatura de gelificación del PCPH se encuentra en el intervalo de 30 °C a 40 °C; y en el que la etapa de disociación del iniciador radial comprende calentar el CHPL por encima de 40 °C.

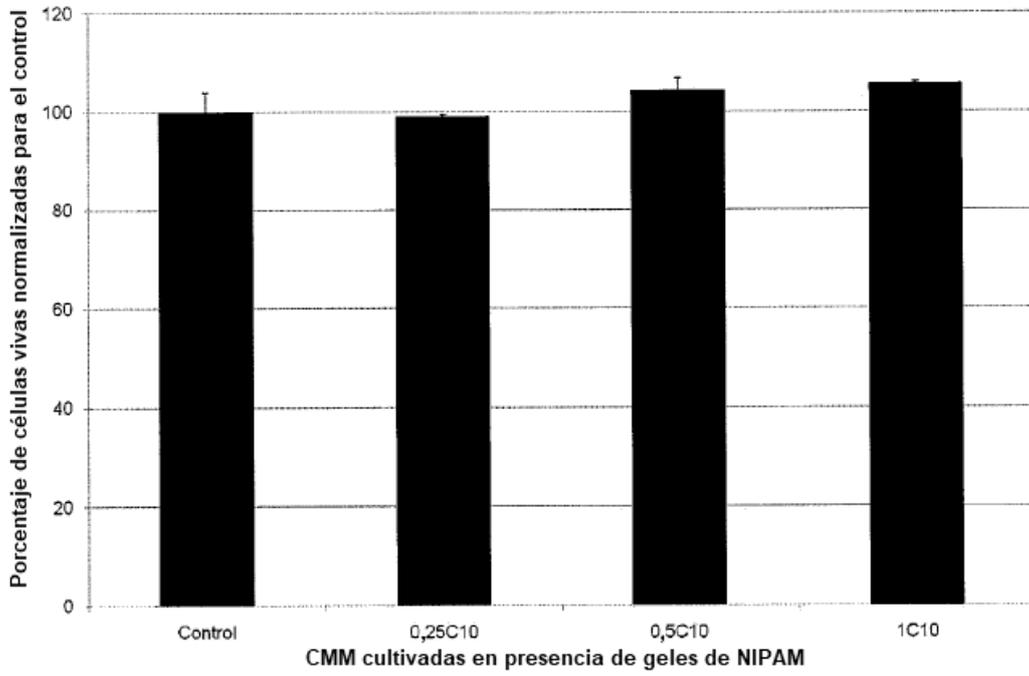
30 7. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de calentamiento del iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación comprende calentar el CHPL hasta una temperatura en el intervalo de 40 °C a 100 °C.

8. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la arcilla comprende una arcilla hinchable, con capacidad para el intercambio iónico.

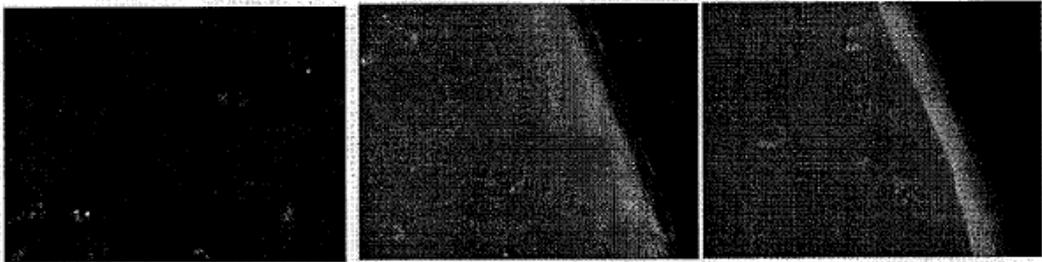
35 9. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en el que la arcilla comprende una cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de:

- montmorillonita;
- hectorita;

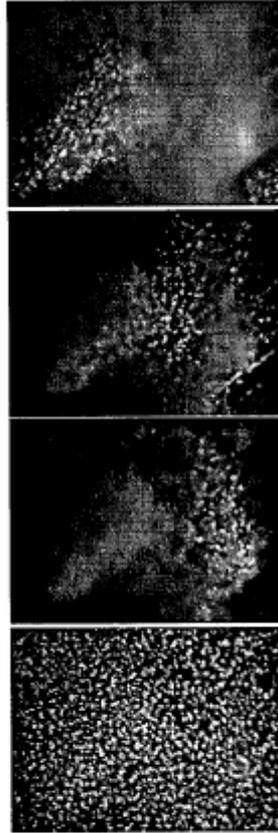
- saponita;
  - vermiculita;
  - mica;
  - bentonita;
- 5      • una arcilla fibrosa.
10. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior, que comprende, además, introducir en el PCPH al menos una o una combinación de especies biológicamente activas seleccionadas entre la lista de:
- células mamíferas, tales como células madre;
  - un antimicrobiano;
- 10      • un anticuerpo;
- una bacteria;
  - una proteína;
  - un producto farmacéutico;
  - un péptido.
- 15      11. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior, que comprende, además, introducir en el CHPL y/o el PCPH uno cualquiera o una combinación de los siguientes aditivos de procedimiento:
- un espesante;
  - un modificador reológico;
- 20      • un tensioactivo;
- un pigmento o colorante;
  - un material radiopaco.
12. Un líquido precursor de hidrogel composite (CHPL) que comprende:
- agua;
- 25      una arcilla dispersada y suspendida dentro del agua en una cantidad no superior al 5 % en peso del CHPL;
- 30      un monómero soluble en agua en una cantidad no superior al 25 % en peso del CHPL;
- 30      un iniciador de radicales térmicamente sensible con capacidad para la polimerización por radicales libres del monómero mediante el calentamiento del iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación;
- 30      en el que el iniciador de radicales comprende una temperatura de disociación térmica que está por encima de la temperatura de gelificación de una suspensión resultante que contiene un hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) producida mediante la reacción con el iniciador de radicales.
13. Una suspensión de hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) en fase fluida que comprende:
- agua;
- 35      una arcilla dispersada y suspendida dentro del agua;
- 35      un polímero resultante del calentamiento de un iniciador de radicales térmicamente sensible hasta o por encima de su temperatura de disociación para proporcionar la disociación del iniciador radial y la polimerización por radicales libres de un monómero en presencia de la arcilla a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación de la suspensión de PCPH resultante.
14. Un hidrogel composite obtenible mediante un procedimiento de:
- 40      preparación de una suspensión acuosa que contiene (i) partículas de arcilla dispersadas, (ii) un monómero soluble en agua y (iii) un iniciador de radicales térmicamente sensible con capacidad para la disociación de radicales libres para formar un líquido precursor de hidrogel composite (CHPL);
- 45      calentamiento del iniciador de radicales hasta o por encima de su temperatura de disociación para disociar el iniciador radial y proporcionar la polimerización por radicales libres del monómero a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del hidrogel precursor de polímero-arcilla (PCPH) acuoso resultante;
- 45      mantenimiento del PCPH en una fase fluida por encima de la temperatura de gelificación; y
- 45      reducción de la temperatura del PCPH por debajo de su temperatura de gelificación para proporcionar el hidrogel composite.
15. Un hidrogel composite obtenible a partir del PCPH de la reivindicación 13 mediante un procedimiento de:
- 50      mantenimiento del PCPH en una fase fluida por encima de la temperatura de gelificación; y
- 50      reducción de la temperatura del PCPH por debajo de su temperatura de gelificación para proporcionar el hidrogel composite.



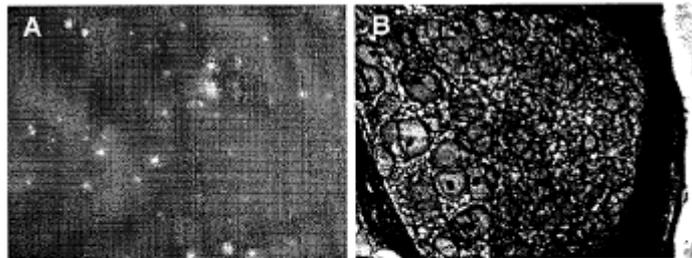
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

### Deshinchamiento en los geles de gelatina/PNIPAM en el aumento de temperatura

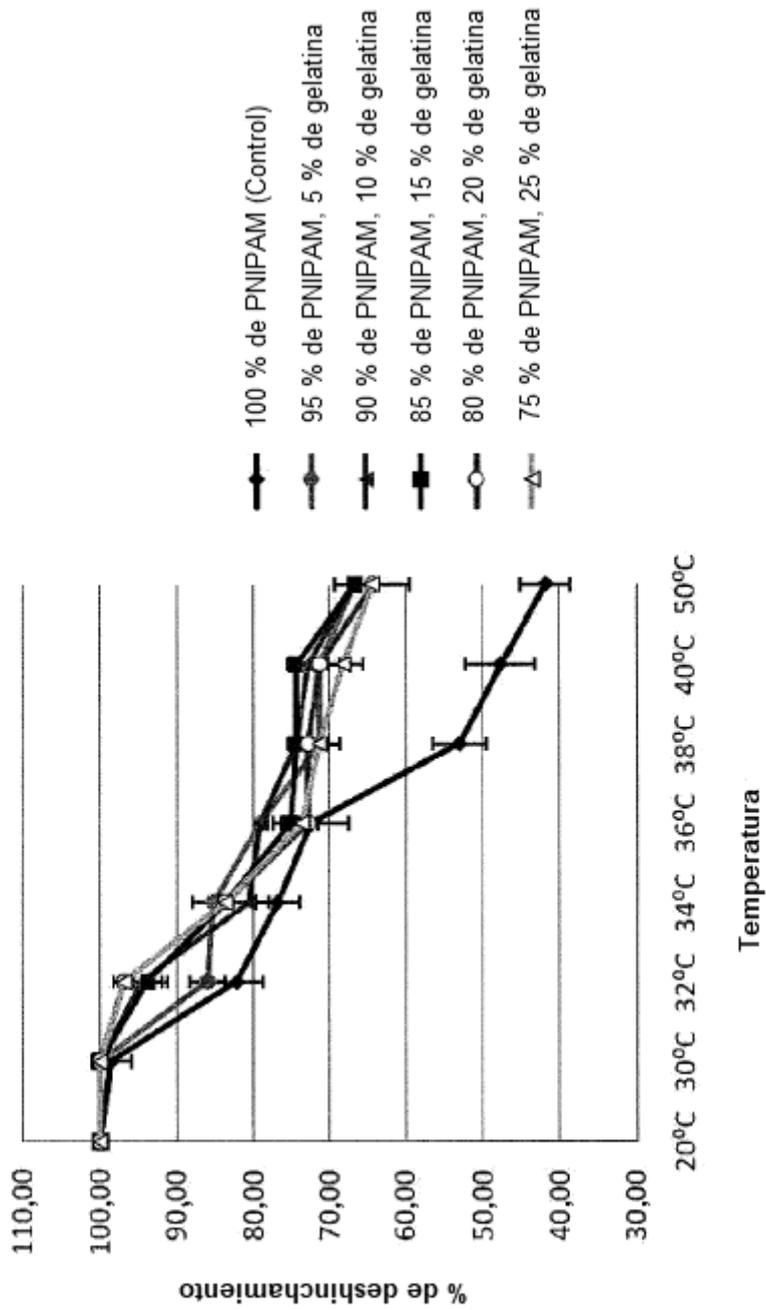


Fig. 5



**Fig. 6**

AA

### Deshinchamiento en los geles de HA/PNIPAM en el aumento de temperatura

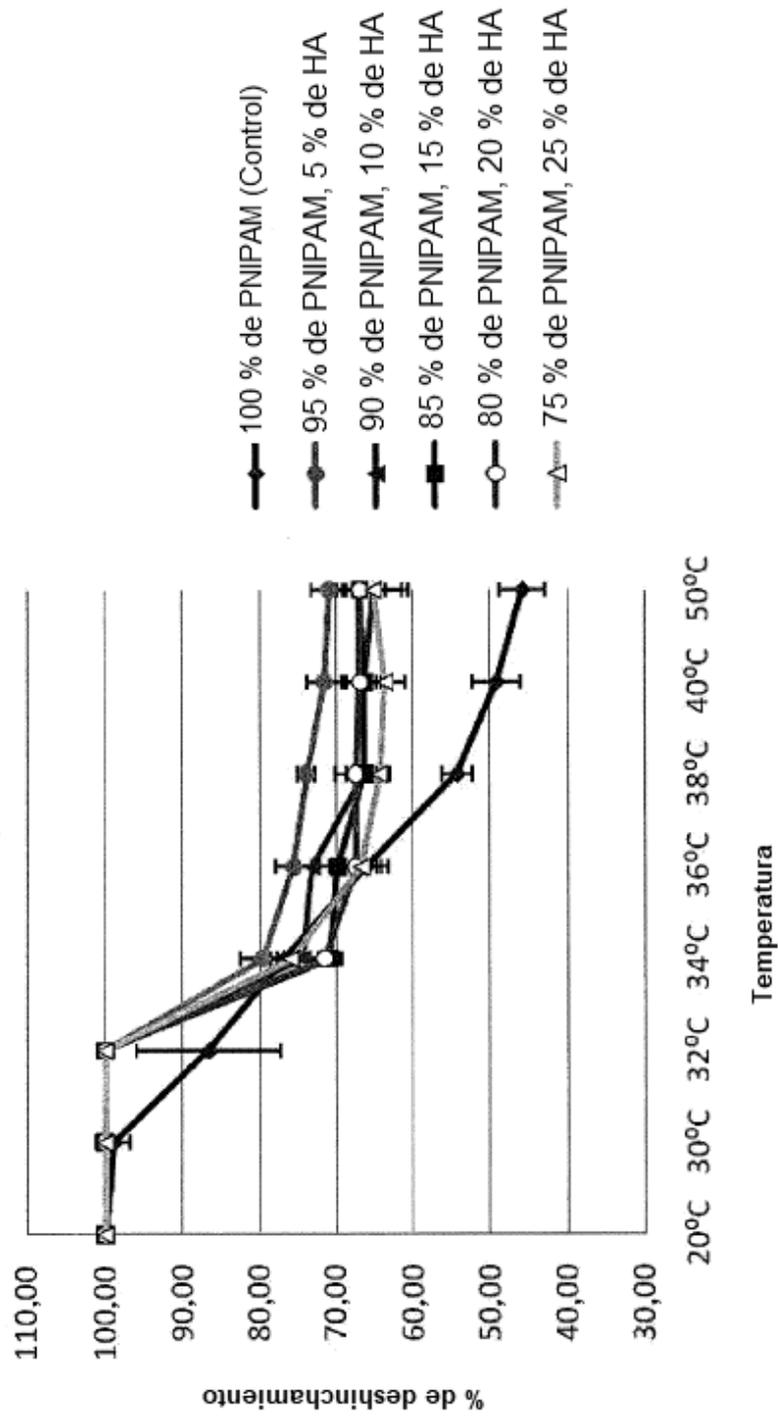
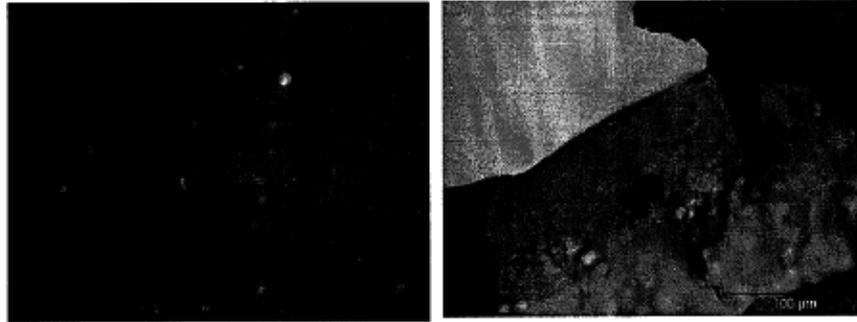


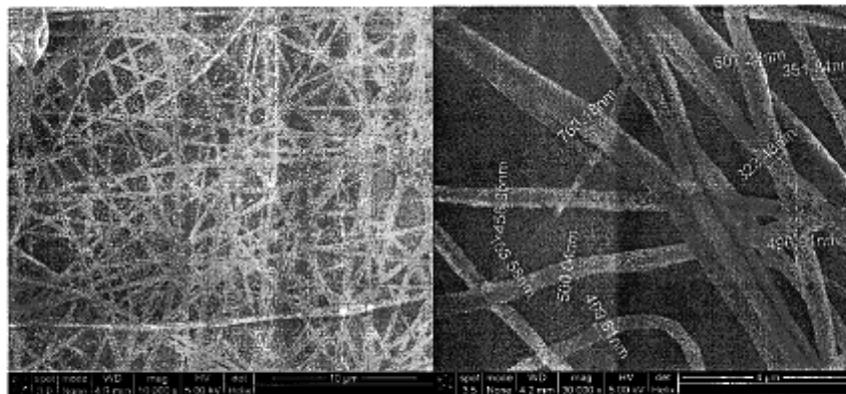
Fig. 7



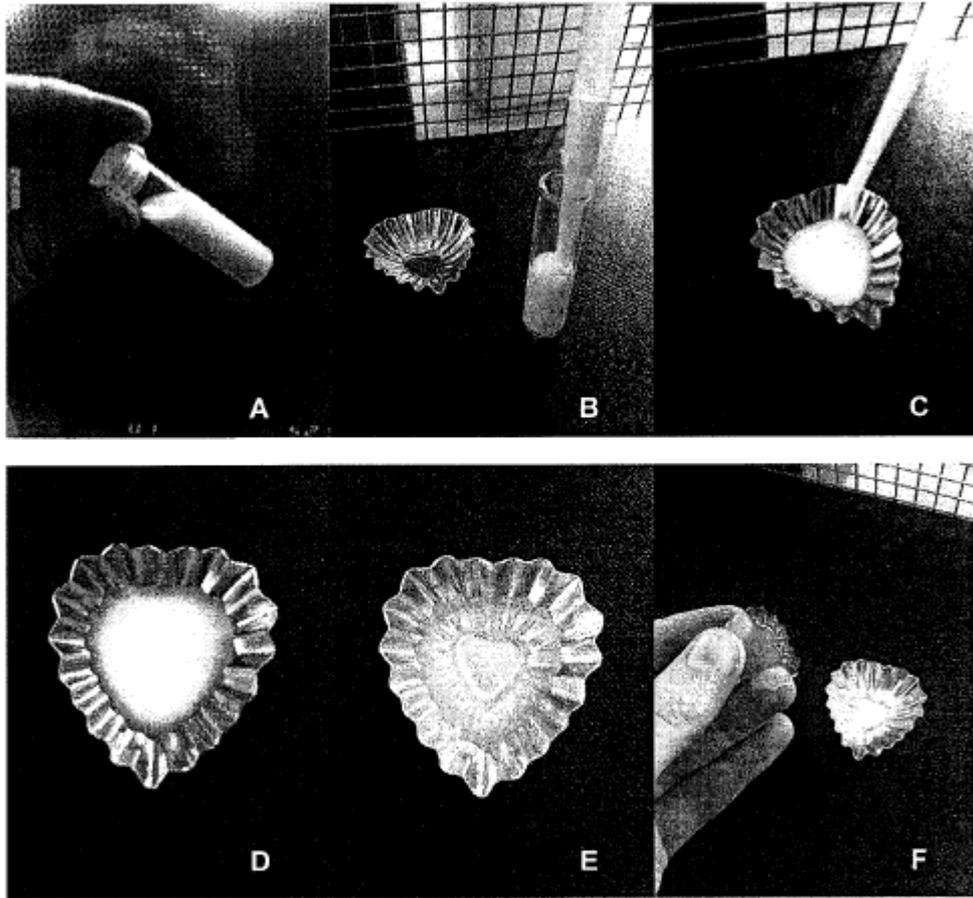
**Fig. 8**



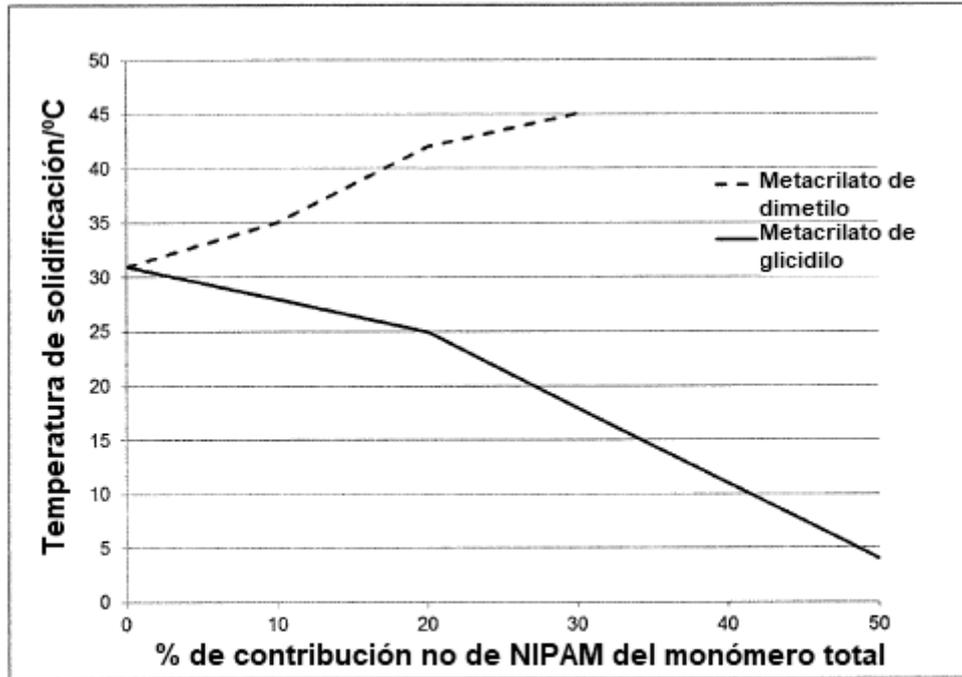
**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12**

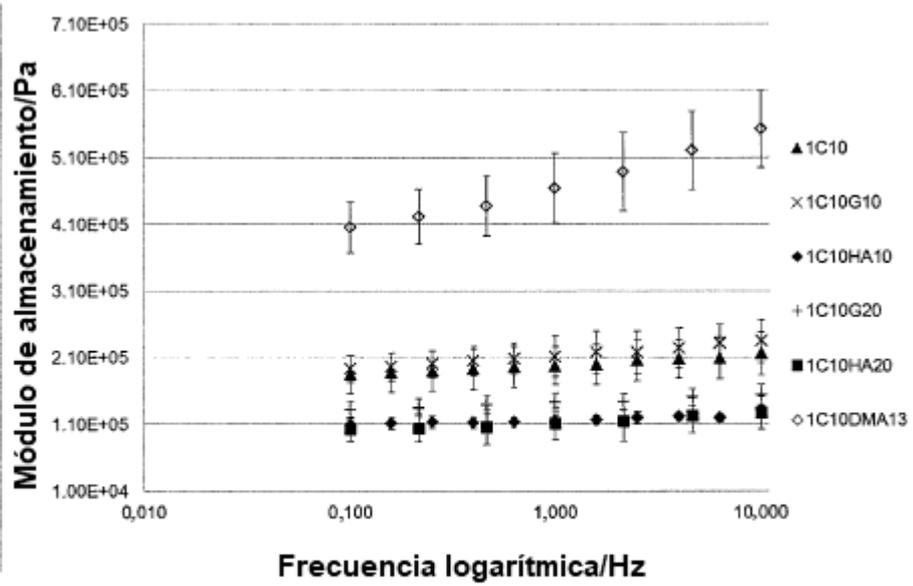


Fig. 13

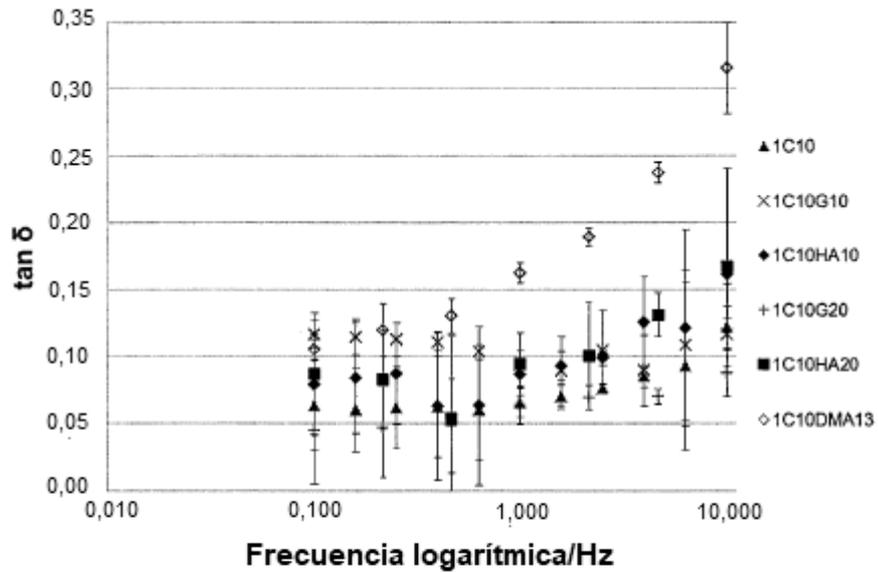
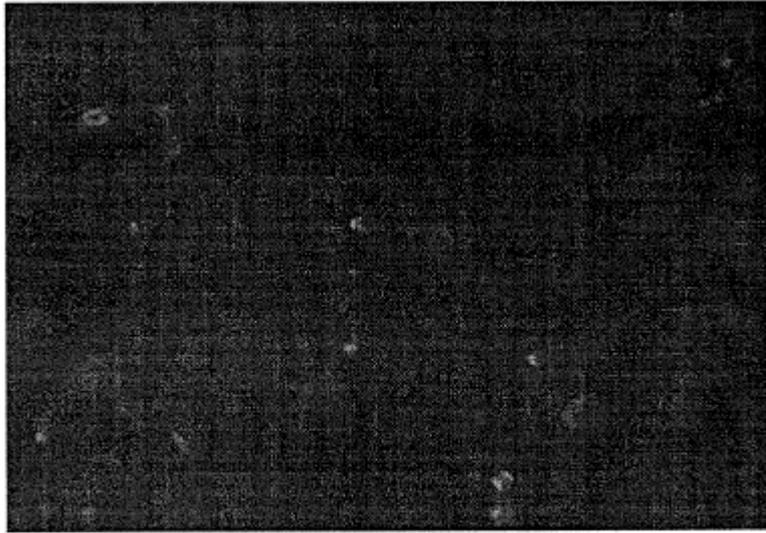
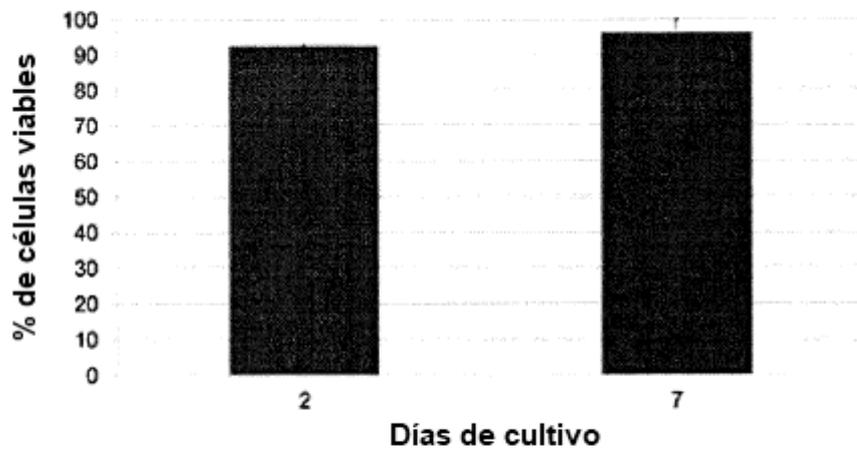


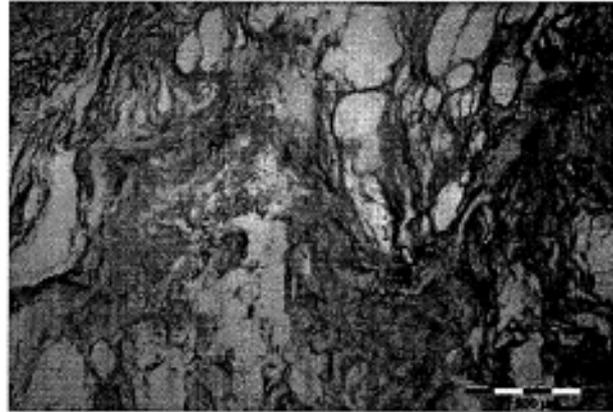
Fig. 14



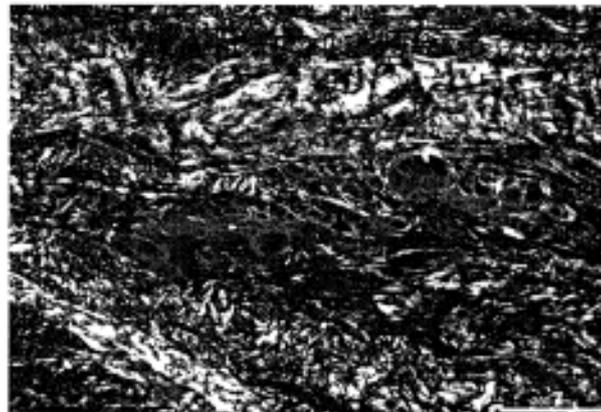
**Fig. 15**



**Fig. 16**



**Fig. 17**



**Fig. 18**