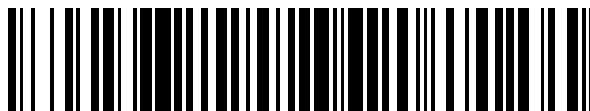


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 602**

21 Número de solicitud: 201830348

51 Int. Cl.:

C08F 226/06 (2006.01)

C08F 26/06 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.04.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.10.2019

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GALLARDO RUIZ, Alberto;
RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Juan;
REINECKE, Helmut;
ELVIRA PUJALTE, Carlos;
GARCÍA SÁNCHEZ, Carolina y
MARTÍNEZ CAMPOS, Enrique**

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **HIDROGELES BASADOS EN VINIL-CAPROLACTAMA**

57 Resumen:

Hidrogeles basados en vinil-caprolactama.

La invención se refiere a un hidrogel basado en vinil-caprolactama con o sin monómeros adicionales y al menos dos entrecruzantes. La invención se refiere también al procedimiento para obtener el material mencionado y a su aplicación para el cultivo de células/ingeniería de monocapas celulares, así como soportes para cultivo y trasplante celular.

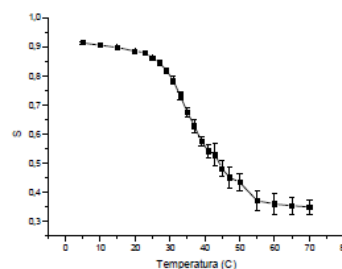


Figura 1

DESCRIPCIÓN

HIDROGELES BASADOS EN VINIL-CAPROLACTAMA

CAMPO DE LA TÉCNICA

5 La invención se refiere a un hidrogel basado en vinil-caprolactama y al menos dos entrecruzantes. Estos hidrogeles basados en vinil-caprolactama, que pueden contener o no otros monómeros adicionales, favorecen el crecimiento celular y permiten el desprendimiento posterior de células y capas de células utilizando estímulos térmicos. Estos hidrogeles presentan gran potencial, sobre todo el hidrogel sin monómero
10 adicional, por ser robusto, muy manejable y flexible. Esta invención se refiere asimismo a la aplicación de estos materiales como soportes para cultivo y trasplante celular.

ESTADO DEL ARTE

15 La ingeniería tisular y la medicina regenerativa exigen tecnologías asequibles y robustas para la manipulación celular. La cosecha *in vitro* de células y capas de células requiere metodologías robustas capaces de albergar células hasta la confluencia y además suministrar las células o capas de células de forma no agresiva, en contraste con los procedimientos tradicionales y potencialmente dañinos que usan enzimas o raspado
20 celular, que pueden dañar las células. Una de estas metodologías no agresivas se basa en el uso de sustratos termosensibles basados en poli-N-isopropilacrilamida (pNIPAm), capaces de albergar las células hasta confluencia y de proporcionar un despegado de las células y capas de células inducido por la disminución de la temperatura. Una capa celular despegada de esta manera mantiene sus uniones célula a célula, y célula a matriz
25 extracelular (ECM, matriz extracelular) imitando así la arquitectura nativa de los tejidos para que estas capas celulares puedan usarse para construcciones biomédicas bidimensionales (2D) o tridimensionales (3D) o en reparación de daños tisulares. Sin embargo, en muchas técnicas que dependen de los revestimientos basados en pNIPAm se produce adhesión dependiendo del espesor celular (preferiblemente, injertos
30 ultradelgados), que hacen que estos soportes sean caros y complejos. Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar más alternativas para el despegado suave de células y capas de células.

Un polímero termosensible alternativo es la poli-vinilcaprolactama (pVCL), que exhibe
35 valores de temperatura crítica inferior de disolución (LCST) similares a pNIPAm (también en un intervalo fisiológicamente relevante) y citocompatibilidad. Lee y col. (Lee, B.; Jiao,

A.; Yu, S.; You, J. B.; Kim, D.-H.; Im, S. G., *Initiated chemical vapor deposition of thermoresponsive poly (N-vinylcaprolactam) thin films for cell sheet engineering, Acta biomaterialia*; 2013; **9**(8): 7691-7698) divulgaron la preparación de películas de pVCL delgadas (alrededor de 50 nm) en sustratos de tela de Nylon, obteniendo solo un despegado parcial de la capa celular. Lim et al. (Lim, Y. M.; Jeun, J. P.; Lee, J. H.; Lee, Y. M.; Nho, Y. C., *Cell sheet detachment from poly (N-vinylcaprolactam-co-N-isopropylacrylamide) grafted onto tissue culture polystyrene Dishes*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 2007, 13 (1), 21-26.) injertaron copolímeros de NIPAm y VCL en placas de PS (poliestireno) y consiguieron despegado de la capa celular.

10

Yang et al. (*Polymer Chemistry*; 2015; 6(18): 3431-3442) prepararon hidrogeles de VCL con un metacrilato zwitteriónico, los cuales fueron capaces de despegar células mediante descenso de temperatura. Sin embargo, este estudio se limitó al uso de un metacrilato zwitteriónico como monómero adicional. La adhesión celular sobre sus materiales con zwitteriones impide el *cell spreading* sobre la superficie. Transcurridos 7 días no se consigue una monocapa densa, sino crecimiento en clusters más o menos numerosos y sus células duplican la actividad metabólica. Con los pVCL, con zwitterion, descritos se consigue un despegue casi completo a las 2 h a 4 °C o 25 °C.

15

20

Los materiales objeto de la invención en base VCL, a diferencia de NIPAm, no son recubrimientos, sino hidrogeles independientes, y no tienen requerimiento de espesor ni necesitan sustrato para el trasplante. Estos nuevos hidrogeles son sistemas hidratados capaces de ser cargados con compuestos activos, que luego pueden ser liberados de forma controlada, y son robustos mecánicamente. Esta robustez está asociada al uso, de acuerdo con la presente invención, de al menos dos entrecruzantes de diferente naturaleza.

25

Además de la mezcla de entrecruzantes, la estructura de los hidrogeles de la invención, puede ser funcionalizada de forma simple mediante la incorporación de monómeros adicionales. Estos hidrogeles, que son robustos y fáciles de manipular y maniobrar, se obtienen en un procedimiento de fotopolimerización radical, o térmica, o redox.

30

El hidrogel sin monómeros adicionales, ofrece una alta termosensibilidad y muy buenas prestaciones en cultivo y despegado celular. Para estos sistemas celulares, el uso de hidrogeles permitió trasplantar las células sin la necesidad de un sustrato, y sin

necesidad de un bajo espesor, siendo éstas las limitaciones habituales para el uso de soportes de poli-N-isopropilacrilamida (pNIPAm), tales como los injertos comerciales.

Para el caso de monómeros adicionales tipo metacrilato iónico, la naturaleza y el tipo de carga han demostrado una gran influencia en el crecimiento celular. Aunque todos los hidrogel

5 hidrogel de la invención que incorporan monómero adicional iónico (independientemente del tipo de componente iónico) han mostrado ser capaces de formar monocapas celulares, especialmente los hidrogel con monómeros adicionales zwitteriónicos y pseudo-zwitteriónicos han mostrado una excelente eficacia de desprendimiento al disminuir la temperatura, cercana a la que ofrecen los hidrogel sin

10 monómeros adicionales mencionados antes. Utilizando el hidrogel basado en VCL con metacrilato zwitteriónico como monómero adicional, las células presentan una morfología adherida y extendida, lo que favorece el crecimiento del cultivo y el desarrollo de la monocapa. Las células llegan a sextuplicar el valor inicial en 3 días. Además, se despegan monocapas densas, íntegras, viables y metabólicamente activas con sólo 45

15 min a 25 °C.

Toda la familia de hidrogel objeto de la invención es candidata para competir con las costosas y complejas plataformas celulares termosensibles basadas en esos injertos de pNIPAm. La capacidad de las superficies de estos hidrogel para permitir la recolección

20 de células está relacionada con las primeras interacciones moleculares durante el proceso de unión temprana. Una vez que se establece la interacción célula-superficie, el despegado completo de la capa celular solo es posible si la fuerza de tracción del citoesqueleto predomina sobre la atracción superficial. En este sentido, cada material exhibe numerosas interacciones, a menudo no controladas, con proteínas y células *in vitro* e *in vivo*, lo que lleva a varias conclusiones y determinaciones con respecto a la "biocompatibilidad" de los materiales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La expresión "basado en" se debe entender como "formado por" o bien "formado a partir de", es decir que los constituyentes del producto al que se hace referencia, pueden no

30 estar en el estado inicial en el cual se utilizaron para obtener dicho producto.

La expresión "tipo" o "del tipo" se debe entender como "similar a", o que comprende un grupo funcional determinado, por ejemplo: "tipo vinil-lactama" se debe interpretar como

35 que incluye al menos un grupo funcional lactama, e incluye cualquier vinil-lactama.

En esta memoria el término “entrecruzante”, se refiere a derivados alquénicos o vinílicos polimerizables con funcionalidad igual o superior a dos, es decir, que contienen al menos dos grupos alquénicos polimerizables por vía radicalaria.

5

El término “monómero adicional” se debe entender como un derivado alquénico polimerizable por vía radicalaria con carácter monofuncional, es decir con un solo grupo vinílico, y diferente de la vinilcaprolactama.

10

En esta memoria la expresión “menos activada” en relación a las funcionalidades polimerizables tipo alqueno, se refiere a la menor capacidad del sustituyente de estabilizar un radical en el proceso de polimerización radicalaria, tal y como es usado por ejemplo en *Polymer* 115 (72017), 285-307, por ejemplo: monómeros como vinillactamas, vinilaminas, vinilésteres, viniléteres, olefinas, alilos o cloruro de vinilo poseen grupos menos activados que metacrilatos, acrilatos, metacrilamidas, acrilamidas, cianoacrilatos, o estirenos.

15

En esta memoria se usa el prefijo (Met) antes de acrílico, acrilato o acrilamida, para englobar en un mismo término compuestos acrílicos y metacrílicos, por ejemplo: ácido (met)acrílico engloba tanto al ácido acrílico como al metacrílico.

20

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un hidrogel caracterizado porque está basado en monómeros tipo vinil-caprolactama, y al menos dos entrecruzantes, exceptuando el hidrogel formado por vinil-caprolactama, sulfopropilmetacrilato de potasio y los entrecruzantes etilenglicol dimetacrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

25

En una realización preferida, el hidrogel está caracterizado porque comprende además al menos un monómero adicional.

30

Según la presente invención, los entrecruzantes son:

- un primer entrecruzante portador de al menos dos funcionalidades tipo alqueno,
- y un segundo entrecruzante portador de, al menos, una funcionalidad tipo alqueno menos activada que en el caso del primer entrecruzante.

El hidrogel de la invención comprende al menos un entrecruzante de cada uno de estos dos tipos, y puede comprender combinaciones de ellos.

5 En una realización preferida, al menos un entrecruzante se selecciona de entre estructuras alquénicas (met)acrílicas (A y B) (estructuras α , β insaturada) o divinilbenceno,



10 donde:

- R_1 se selecciona de entre hidrógeno o metilo,
- R_2 puede ser di, tri, tetra o penta alcoxi sustituidos, derivados dialcoxi disustituidos, un grupo diariloxi sustituido o no sustituido, diaminoalquil C_1 - C_6 N, N' disustituidos o hexatriazina N, N', N'' trisustituida,
- 15 - R_3 se selecciona de entre oxígeno o un grupo $-O-R_4-$, donde R_4 es un alquil C_1 - C_6 , lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos carbonato o urea
- n se selecciona de entre 2, 3, 4 o 5.

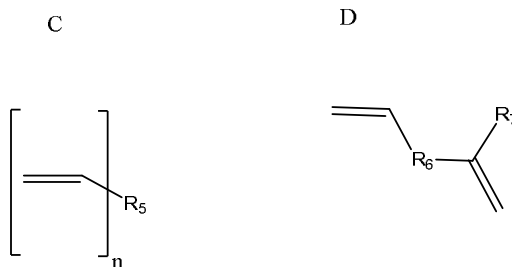
20 A modo de ejemplo, se describen distintos sustituyentes para las estructuras seleccionadas para R_2 :

- di, tri, tetra o penta alcoxis sustituidos respectivamente 2, 3, 4 o 5 veces con la estructura $R_1C=CH_2$ según la fórmula A; di, tri, tetra o penta alcoxis C_1 - C_{12} lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo, fosfato, uretano, polisiloxano, isocianurato, oligo(etoxi) $_m$, oligo(propoxi) $_m$, oligo(glicerol) $_m$ (siendo m, 25 1,2...5). A modo de ejemplo, derivados alcoxi de etilenglicol, butanodiol, pentanodiol, nonanediol, triciclododecano dimetanol, decanodiol, hexanodiol, trimetilolpropano, pentaeritrol, glicerol, dipentaeritrol, neopentilglicol,
- derivados dialcoxi disustituidos con la estructura $R_1C=CH_2$ según la fórmula A, de oligo o polióxido de etileno, oligo o polióxido de propileno o copolímeros de bloque de 30 ambas unidades. A modo de ejemplo, derivados alcoxi de etilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol glicol, polietilén glicol, polipropilenglicol, copolímero de bloque polietilenglicol/polipropilén glicol,

- un grupo diariloxi (tal como derivados oxi de bencenodiol o bisfenol A) sustituidos 2 veces con la estructura $R_1C=CH_2$ según la fórmula A, no sustituido o sustituido con grupos oligo(etoxi)_m, oligopropoxi)_m, oligo(glicerol)_m (siendo m, 1,2...5),
- diaminoalquil C₁-C₆ N, N' disustituidos con la estructura $R_1C=CH_2$ según la fórmula A
- hexatriazina N, N', N'' trisustituida con la estructura $R_1C=CH_2$ según la fórmula A.

En otra realización preferida, al menos un segundo entrecruzante posee al menos un alqueno polimerizable menos activado que los alquenos polimerizables tipo divinilbenceno o tipo estructura (met)acrílica.

En una realización preferida, el segundo entrecruzante se selecciona de entre las siguientes estructuras alquénicas vinílicas (C y D),



15

donde:

- R₅ se selecciona, a modo de ejemplo, de entre dialcoxis C₁-C₁₂ disustituidos, dialcanoiloxis C₁-C₁₂ disustituidos, -imidazolin-2-ona N, N' disustituido o 3,3'-(alquil)-di-1-vinil-2-lactama N, N' disustituida,
- R₆ se selecciona, a modo de ejemplo, de entre un grupo oxicarbonil, carbonato o urea, sustituidos o no con grupos alquilo C₁-C₄, alcoxi o alcanoiloloxi,
- R₇ se selecciona de entre hidrógeno o metilo,
- n se selecciona de entre 2 o 3.

25

A modo de ejemplo, se describen los distintos sustituyentes para las estructuras seleccionadas para R₅:

- dialcoxis C₁-C₁₂ disustituidos con la estructura CH=CH₂ de la fórmula C; lineales o ramificados, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos hidroxilo, fosfato, uretano, polisiloxano, isocianurato, oligo(etoxi)_m, (oligopropoxi)_m, oligo(glicerol)_m (siendo m, 1,2...5),
- 5 - dialcanoiloxis C₁-C₁₂ disustituidos con la estructura CH=CH₂ de la fórmula C; lineales o ramificados, opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo, fosfato, uretano, polisiloxano, isocianurato, oligo(etoxi)_m, (oligopropoxi)_m, oligo(glicerol)_m (siendo m, 1,2...5),
- imidazolin-2-ona N, N' disustituido con el resto CH=CH₂ de la fórmula C,
- 10 - 3,3'-(alquil)-di-1-vinil-2-lactama N, N' disustituida con el resto CH=CH₂ de la fórmula C; alquil C₁-C₁₂ lineal o ramificada, conteniendo opcionalmente uno o más grupos éter; lactama puede ser pirrolidona o caprolactama.

En una realización preferida, los entrecruzantes se seleccionan de entre etilenglicol di(met)acrilato, trietilenglicol di(met)acrilato, tetraetilenglicol glicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, bisfenol A di(met)acrilato, etoxilato bisfenol A di(met)acrilato, pentaeritritol tri-, and tetra(met)acrilato, tetrametileno di(met)acrilato, N,N' metilénbisacrilamida, metacriloxietil vinil carbonato, trialilcianurato, metacriloxietil vinil urea, divinil benceno, dialil itaconato, alil metacrilato, dialil ftalato, polisiloxanilbisalquil (met)acrilato, N, N dialilacrilamida, vinilmetacrilato, alilmetacrilato, diuretano dimetacrilato, polietilén glicol di(met)acrilato, divinil-adipato, derivados de divinil-pirrolidona, 1,3-divinilimidazolin-2-ona o combinaciones de los anteriores.

La mezcla de al menos dos entrecruzantes de diferente naturaleza, uno portador de al menos una funcionalidad tipo alqueno, y otro portador de una funcionalidad tipo alqueno menos activada, proporciona robustez al hidrogel.

En una realización preferida, los entrecruzantes están presentes cada uno de ellos en concentraciones en el intervalo 0,01- 20 % molar con respecto a los moles de monómeros totales.

Preferiblemente, los entrecruzantes son etilenglicol dimetacrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

En otra realización preferida, los entrecruzantes son preferiblemente etilenglicol dimetacrilato y 1,3-divinilimidazolin-2-ona.

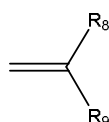
5 En otra realización preferida, al menos un entrecruzante es un compuesto portador de grupos hidrolíticos acetal.

En una realización más preferida, los entrecruzantes son (((4-hidroxifenil)metileno)bis(oxi))bis(etano-2,1-diil)bis(2-metacrilato) y 3,3'-(((fenilmetileno)bis(oxi))bis(propano-3,1-diil))bis(1-vinilpirrolidin-2-ona). Los hidrogeles
10 que contienen estos dos entrecruzantes son reabsorbibles. Esto se asocia al carácter hidrolítico de las estructuras de ambos entrecruzantes, que permite que el hidrogel vaya rompiendo con el resultado final de formación de cadenas solubles.

15 En otra realización preferida, el hidrogel comprende como monómeros adicionales derivados alquénicos polimerizables con una sola funcionalidad polimerizable.

En una realización preferida, el monómero adicional se selecciona de entre maleimidias, ácido maleico, ácido fumárico, maleatos, fumaratos o estructuras alquénicas (met)acrílicas.
20

En una realización preferida, el monómero adicional es una estructura alquénica (met)acrílica,



donde

25 - R₈ se selecciona de entre hidrógeno o metilo,
- R₉ se selecciona, por ejemplo, de entre un grupo nitrilo, ácido carboxílico, un grupo éster sustituido, un grupo amida, un grupo amida N sustituido, un grupo amida N, N sustituido, un grupo arilo no sustituido o sustituido, un grupo oxicarbonil sustituido, un grupo oxi sustituido, una amina sustituida, un grupo amino carbonil sustituido, un grupo N-lactama
30 unido por el nitrógeno, formamida, fosfónico, sulfonato de sodio, acetamida, carbazol, imidazol, trimetilsilano o piridina.

A modo de ejemplo, se describen los distintos sustituyentes para las estructuras seleccionadas para R₉:

- un grupo nitrilo, ácido carboxílico,
- un grupo éster sustituido con
 - 5 o un grupo alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxilo, amino, amino hidrocloreto, carboxilo, sales de ácido carboxílico, alquilo, sulfónico, sal de sulfonato, sal de amina cuaternaria, fosfato, estructura zwitteriónica tipo betaína, estructura fosforilcolina, dietilamino, dimetilamino, alcoxi, arilo, aralquilo, amino, alquilamino, dialquilamino,
 - 10 o un derivado sililado (como trimetilsilil),
 - o succinimida,
- éster de oligo o polióxido de etileno, oligo o polióxido de propileno o copolímeros de bloque de ambas unidades, hidroxilo, metilo o etilo terminadas,
- un grupo amida,
- 15 - un grupo amida N sustituido con un grupo alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxilo, amino, amino hidrocloreto, carboxilo, sales de ácido carboxílico, alquilo, sulfónico, sal de sulfato, sal de amina cuaternaria, fosfato, estructura zwitteriónica tipo betaina, estructura fosforilcolina, dietilamino, dimetilamino, alcoxi, arilo, aralquilo, amino, alquilamino, dialquilamino,
- 20 - un grupo amida N, N sustituido con dos grupos alquílicos C₁-C₁₂ (tales como metilo o etilo), lineales o ramificados, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos halógeno, hidroxilo, amino, amino hidrocloreto, carboxilo, sales de ácido carboxílico, alquilo, sulfónico, sal de sulfato, sal de amina cuaternaria, fosfato, estructura zwitteriónica tipo betaina, estructura fosforilcolina, dietilamino, dimetilamino, alcoxi, arilo, aralquilo, amino, alquilamino, dialquilamino,
- 25 - un grupo arilo (tal como fenilo) no sustituido o sustituido con uno o más grupos alquilo C₁-C₃, halógeno, alcoxi, carboxilo, sales de ácido carboxílico, sulfónico, amino, sal de sulfonato,
- un grupo oxicarbonilo sustituido con un grupo arilo o alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado,
 - 30 opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxilo, amino, amino hidrocloreto, carboxilo, sales de ácido carboxílico, alquilo, alcoxi, arilo, aralquilo, alquilamino, dialquilamino,
 - un grupo oxo sustituido con un grupo arilo o alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxilo, amino, amino

hidrocloruro, carboxi, sales de ácido carboxílico, alquilo, alcoxi, arilo, aralquilo, alquilamino, dialquilamino,

- una amina sustituida con un grupo arilo o alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxil, amino, amino

5 hidrocloruro, carboxi, sales de ácido carboxílico, alquilo, alcoxi, arilo, aralquilo, alquilamino, dialquilamino,

- un grupo amino carbonil sustituido con un grupo arilo o alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxil, amino, amino hidrocloruro, carboxi, sales de ácido carboxílico, alquilo, alcoxi, arilo, aralquilo, alquilamino, dialquilamino,

10

- un grupo N-lactama, unido por el nitrógeno. La lactama puede ser un anillo de 5, 6, 7, sustituido o no sustituido en posición 3 con

o grupos grupo alquílico C₁-C₁₂, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos halógeno, hidroxil, amino, amino hidrocloruro, carboxi, sales de ácido carboxílico, alquilo, sulfónico, sal de sulfonato, sal de amina cuaternaria, fosfato, estructura zwitteriónica tipo betaina, estructura fosforilcolina, dietilamino, dimetilamino, alcoxi, arilo, aralquilo, amino, alquilamino, dialquilamino,

15

o grupos carbonil, sulfona, éster, amida,

- formamida, fosfónico, sulfonato de sodio, acetamida, carbazol, imidazol, trimetilsilano o piridina.

20

En una realización más preferida, el monómero adicional se selecciona de entre las siguientes estructuras (met)acrílicas: hidroxietil(met)acrilato, ácido (met)acrílico, sulfopropilacrilato de potasio, monoacrilato etilfosfato, (met)acrilatos de oligoetilenglicol, trimetilsililmetacrilato, (met)acrilatos de polietilenglicol, N,N dimetilacrilamida, acrilamida, alquil (met)acrilato (donde alquil es un grupo alquílico con n átomos de carbono siendo n=1,2,...12), N-isopropilacrilamida, hidroxipropilmetacrilamida, N-dodecilacrilamida, N-(3-Aminopropil)metacrilamida hidrocloruro, 2-aminoetil (met)acrilato hidrocloruro, 2-(N,N-dietilamino)etil (met)acrilato, N-(met)acriloisuccinimida, 2-Acrilamido-2-metil-1-propanesulfonato de sodio, 2-Acrilamido-2-metil-1-propanesulfónico, sales de [2-((met)acriloiloxi)alquill]trimetilamonio, metacrilato de sulfobetaina zwitteriónica, metacrilamida de sulfobetaina zwitteriónica, metacrilato de fosforilcolina, metacrilato-L-lisina, carboxietilacrilato, 2-sulfoetilmetacrilato, o combinaciones de los anteriores.

30

35 En una realización preferida, el monómero adicional es una estructura estirénica.

En una realización más preferida, la estructura estirénica se selecciona de entre estireno, cloroestireno, bromoestireno, vinilnilina, vinilnaftaleno, vinilbenzoico o vinilanol.

5 En una realización preferida, el monómero adicional es una estructura vinílica.

En una realización más preferida, la estructura vinílica se selecciona de entre N-vinilacetamida, vinilpirrolidona, vinilcarbazol, vinilpiridona, vinilimidazol, acetato de vinilo, vinilformamida, vinilfosfónico, vinilsulfonato de sodio o viniltrimetilsilano,

10

En una realización preferida, el hidrogel comprende combinaciones de los diferentes monómeros adicionales.

15

En una realización preferida, la relación molar vinil-caprolactama / monómeros adicionales está en el intervalo 2/1 a 100/1.

En una realización preferida, los entrecruzantes se usan en un porcentaje comprendido entre 0,01% y 20% en moles respecto al contenido total de monómeros.

20

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener el hidrogel definido en el primer aspecto de la invención.

El procedimiento comprende al menos las siguientes etapas:

25

a) mezcla de los monómeros de vinilcaprolactama, uno o más monómeros adicionales, si están presentes, disolvente, si está presente, y al menos dos entrecruzantes,

b) burbujeo con un gas de la mezcla (a),

c) transferencia del producto obtenido en la etapa b) a un molde,

d) polimerización, e

30

e) hinchamiento del producto obtenido en (d) mediante su inmersión en agua o en alcoholes.

35

Una polimerización radical, se puede diferenciar en el modo de iniciación: puede ser fotoiniciada, o iniciada térmicamente, o iniciada mediante el uso de una pareja redox, o mediante otros métodos. En otro nivel también se puede distinguir el tipo de

polimerización radical en cuanto a componentes: polimerización en disolución si hay disolvente, o polimerización en masa si no hay.

5 En una realización preferida, la polimerización se lleva a cabo en un cámara de fotocurado y la radiación UV se mantiene entre 0,01 y 60 minutos.

En una realización preferida, la polimerización se lleva a cabo sin adición de disolvente (etapa a). Es decir, polimerización en masa.

10 En una realización preferida, la polimerización se lleva a cabo a temperatura de entre 30 °C y 120 °C durante un tiempo de entre 0,1 y 24 horas. Esto es, se realiza mediante iniciación térmica.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del hidrogel para la obtención de materiales para cultivos y trasplantes celulares. En una realización preferida, se utiliza la línea celular endotelial o la línea osteoblástica.

A no ser que se diga lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende uno de los
20 expertos en la técnica al que pertenece esta invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, pueden usarse en la práctica en la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes
25 para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos e ilustraciones se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIG. 1. Hinchamiento S en función de la temperatura para el hidrogel basado en VCL sin monómeros adicionales descrito en el ejemplo 1.

35 **FIG. 2.** Hinchamiento S en función de la temperatura para los hidrogeles descritos en el ejemplo 2 basados en VCL con monómeros adicionales tipo metacrilatos iónicos.

FIG. 3. La etiqueta 'F' corresponde a imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de cultivos sobre las muestras 4, 5, 6, 7 y 8 de la Tabla 1. La etiqueta 'T' corresponde a imágenes obtenidas mediante microscopio óptico de células 48 horas después de ser trasplantadas. Escala=200 μm .

5 **FIG. 4.** A) Proliferación (5d) y B) trasplante (2d) de osteoblastos MC3T3 desde hidrogeles de VCL descritos en el ejemplo 5.

FIG. 5. A9) Proliferación (5d) y B) trasplante (2d) de osteoblastos MC3T3 desde hidrogeles reabsorbibles de VCL descritos en el ejemplo 6.

10 **FIG. 6.** A) Actividad metabólica de los trasplantes procedentes de hidrogeles de VCL preparados con disolvente y en masa. B) Imágenes del trasplante y despegue, respectivamente para hidrogeles de VCL obtenidos con disolvente y en masa.

EJEMPLOS

15 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Materiales y métodos

20 El sulfopropilmetacrilato de potasio (M-SO_3^-), la disolución de cloruro de [2-(metacrililoiloxi)etil] trimetilamonio (M-N^+), el hidróxido de [2-(metacrililoiloxi)etil]dimetil-(3-sulfopropil)amonio ($\text{M-N}^+-\text{SO}_3^-$), el 2-Metacrililoiloxietyl fosforilcolina ($\text{M-PO}_3^{--}\text{N}^+$), el hidroxietilmetacrilato (M-OH), el ácido metacrílico (M-COOH), la vinilcaprolactama (VCL), el etilenglicol dimetacrilato (C1), la 1-hidroxil ciclohexil fenil cetona (HCPK) y el azobisisobutironitrilo (AIBN) utilizados en los ejemplos, fueron adquiridos en Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El monoacrililoiloxi etil fosfato ($\text{M-PO}_4\text{H}_2$) fue suministrado por Polysciences. La 1,3-divinilimidazolin-2-ona (C2') fue suministrada por BASF. Se obtuvieron C166-GFP (proteína fluorescente verde) procedente de ATTC (ATCC® CRL-2583™), suero bovino fetal de Thermo (Hyclone®, Thermo Scientific, Waltham, MA) y DMEM y antibióticos (penicilina, estreptomycin y G418) de Sigma. Las placas de 24 pocillos (tratados y no tratados) y las placas de 6 pocillos se adquirieron de Corning Costar (Nueva York, NY), todos los demás objetos de plástico para cultivo celular se obtuvieron de Deltalab (España).

Se sintetizó 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona (C2) siguiendo un protocolo similar a aquel descrito previamente en nuestro laboratorio para otros derivados de VP: Se enfrió una

disolución de N, N- diisopropil amina (7,0 ml, 50,0 mmol) en THF anhidro (80 ml) bajo atmósfera inerte a -78 °C, luego se añadió n-BuLi (17,3 ml, 43 mmol) lentamente. Después de agitar durante 10 minutos a 0 °C, se enfrió nuevamente a -78 °C y se añadió gota a gota una disolución recién destilada de VP (5,0 ml, 43 mmol) y se agitó durante 1 h. Después de la formación de enolato de VP, se añadió gota a gota 1,3-dibromopropano (1,1 ml, 10,75 mmol) en THF (20 ml). Esta disolución se dejó luego alcanzar temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. Después la disolución se hidrolizó en CH₂Cl₂/H₂O (1:1,80 ml). La capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 ×100 ml), las capas orgánicas se combinaron y secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂: Et₂O 20:1) para dar C2 (1,184 g, 42%) como un sólido amarillento untuoso.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,08 (dd, J = 16,0, 9,1 Hz, 2H, CH=CH₂), 4,43 (d, J = 9,1 Hz, 2H, CH=CHH_{cis}), 4,39 (d, J = 16,0 Hz, 2H, CH=CHH_{trans}), 3,50 (td, J = 9,8, 3,1 Hz, 2H, N-CHH), 3,38 (dt, J = 9,8, 8,0 Hz, 2H, N-CHH), 2,58 – 2,46 (m, 2H, CO-CH), 2,36 – 2,24 (m, 2H, N-CH₂CHH), 1,82 - 1,97 (m, 2H, VP-CHH), 1,81 – 1,67 (m, 1H, m, 2H, N-CH₂CHH), 1,58 – 1,37 (m, 4H, VP-CHH y VP-CH₂-CH₂-CH₂-VP).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,1 (C=O), 129,7 (CH=CH₂), 94,3 (CH=CH₂), 43,0 (N-CH₂), 42,3 (CO-CH), 31,1 (VP-CH₂), 24,8 (VP-CH₂-CH₂-CH₂-VP), 24,6 (CO-CH-CH₂).

HRMS (ESI) Calculado para C₁₅H₂₂N₂O₂ 262,1681 encontrado 263,1757 [M⁺H]⁺ y 285,1576 [M⁺Na]⁺

Se sintetizaron hidrogeles basados en VCL en una etapa mediante fotopolimerización radicalaria convencional en masa o usando agua Milli-Q o mezclas de agua/etanol como disolventes. En el caso de uso de disolvente, se preparó una disolución de VCL (6 mol/l) y, en su caso, M (cualquiera de los metacrilatos o mezcla de los mismos, 1, 0,5, 0,25 ó 0,05 mol/l), y se añadieron los entrecruzantes C1 y C2 (o C1 y C2') en proporciones adecuadas y en el rango 1- 4 % mol (frente al contenido de monómero total). Se usó 1-hidroxi-ciclohexilfenilcetona (HCPK) como fotoiniciador (0,5% en peso). Las mezclas de reacción se burbujearon con N₂ y se transfirieron con jeringa a los moldes adecuados. En el caso de filmes, los moldes de polipropileno se separaron con espaciadores de silicona de espesor entre 0,3 y 1 mm. La fotopolimerización se llevó a cabo durante 40 minutos bajo radiación UV (λ=365 nm) en una lámpara ultravioleta UVP (modelo CL-1000L, 230V). Después de la fotopolimerización, se recuperaron las redes de los moldes y se dejaron expandir en agua Milli-Q hasta que se llegó a un equilibrio. Posteriormente, se lavaron exhaustivamente con agua para eliminar cualquier material soluble. Para los estudios de

respuesta celular, las muestras se conservaron en etanol a 4 °C hasta que fueron necesarias para experimentación. 24 h antes de los diferentes experimentos, las muestras se transfirieron nuevamente a agua Milli-Q y se lavaron varias veces hasta eliminar por completo el etanol.

5

Experimentos de hinchamiento

Se realizaron experimentos de hinchamiento de los hidrogeles basados en VCL preparados según se explica anteriormente, en agua destilada en función de temperatura (5- 70 °C) mediante gravimetría. Las muestras se dejaron hinchar durante un día a cada temperatura para permitir el hinchado en equilibrio a esa temperatura en particular. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado. El grado de hinchamiento se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$(S, \%) = \frac{W_t - W_0}{W_t} \quad (\text{ec. 1})$$

donde W_t y W_0 son los pesos de la muestra hinchada (a cada temperatura) y seca, respectivamente. La temperatura de transición en fase de volumen, VPTT, se definió como el inicio de la curva, es decir, la temperatura de la intersección de la situación inicial y la línea de ajuste de los puntos desde la región cercana al punto de inflexión, en donde la situación inicial está debajo de la temperatura de transición. VPTT es el parámetro válido para describir la termosensibilidad de tipo LCST en las redes.

20

Propiedades mecánicas de los hidrogeles

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles basados en VCL preparados según se explica anteriormente, se midieron mediante compresión dinámica. Esta técnica implica disponer el material entre dos placas y comprimirlo. En una prueba de compresión, hay una región lineal en deformaciones inferiores en donde el material sigue la ley de Hooke. En esta región se puede calcular el módulo de Young.

Se llevaron a cabo mediciones de compresión en geles hinchados con agua en equilibrio a 25 °C en una máquina de pruebas MTS® QTest1/L Elite equipada con una celda de carga de 100 N en modo de compresión. Todas las muestras de hidrogel se prepararon en una forma cilíndrica en su estado de hinchado en equilibrio con un diámetro de 6 mm (y un espesor de la muestra de 1 mm). Para pruebas compresivas de los hidrogeles, las muestras se sumergieron completamente en un baño de agua y se dispusieron entre platinas de compresión en donde la muestra superior tiene un diámetro de 5 mm. Cada muestra se deformó posteriormente a 0,1 mm/min. Para obtener resultados

30

estadísticamente fiables, todas las mediciones se efectuaron en 5 muestras de cada sistema de hidrogel.

Preparación de hidrogeles para cultivo celular

5 Todos los hidrogeles de VCL se esterilizaron con una disolución de etanol al 70% enjuagando seis veces durante 10 minutos cada vez. Luego se lavaron seis veces con PBS, se expusieron a radiación UV durante 30 minutos de cada lado del hidrogel y se lavaron dos veces con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (D6429). Con el fin de simular la temperatura de las condiciones de cultivo (37 °C), encima de la LCST, se utilizó una placa caliente con una temperatura constante para el proceso de corte del material, obteniendo muestras de 2 cm² que se ajustan a las placas de 24 pocillos (Corning Costar).
10 Después de cortarlas, las muestras se dejaron durante la noche incubando a 37 °C y 5% de CO₂ con DMEM 10% suero bovino fetal (FBS) y 1% de antibiótico (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml sulfato de estreptomicina).
15

Cultivo celular

C166-GFP (ATCC® CRL-2583™) es una línea celular endotelial de ratón transfectada con proteína fluorescente verde (GFP). Las condiciones de cultivo son DMEM enriquecido con 10% suero bovino fetal más 1% antibiótico (penicilina y sulfato de estreptomicina) y 0,2 mg/ml de antibiótico G-418 al medio de cultivo para la selección de las células retenedoras de GFP. Las células se sembraron en las redes con una densidad de 1,5x10⁴ células / cm² y se incubaron a 37 °C con 5% CO₂. Las células se monitorearon usando un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX51) con un filtro FITC (λ_{exc}/λ_{em}488/568 nm).
20
25

Metodología para desprendimiento térmico de la lámina de células

Se dispusieron boca abajo todos los hidrogeles de cultivo celular evaluados con células en los ejemplos 4 a 7, y que fueron preparados según se describe en los ejemplos 1,2 y 3, así como en los ejemplos 6 y 7, y se colocaron en pocillos de TCP (*tissue culture plates*) nuevos. Después de esto, se añadió medio frío a cada pocillo con el fin de alcanzar T≤27 °C. Se usó una sonda de temperatura (SC1, Biocote, Reino Unido) para monitorear este proceso. Después de 45 min, se extrajeron los hidrogeles y las muestras se volvieron a incubar a 37 °C con CO₂.
30
35

Caracterización de trasplantes

Las células trasplantadas se observaron a diario usando un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX51) y se tomaron microfotografías.

5 Alamar Blue

Se midió la actividad metabólica de los trasplantes de células con un ensayo de Alamar Blue, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biosource, CA, EE. UU.). Este método no es tóxico, tiene capacidad de ampliación y usa el polvo reductor natural de las células vivas, generando una medida cuantitativa de la viabilidad celular y la citotoxicidad. En síntesis, se añadió tinte Alamar Blue (10% del volumen de cultivo) a cada pocillo, que contenía células trasplantadas vivas, y se incubó durante 90 minutos. Se realizaron ensayos en cada tipo de muestra por triplicado. La fluorescencia ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 535/590 nm) de cada pocillo se midió usando una lectora de placas (Synergy HT, Brotek).

15 Se evaluaron los hidrogeles citados en la Tabla 1 como soportes para cultivo celular usando células endoteliales C166-GFP de ratón. Se seleccionaron células C166-GFP para este estudio como línea de modelo adherente. Este modelo genera una monocapa de células con una fuerte adhesión al sustrato a través de complejos de proteínas específicos. Se dejó que se desarrollaran las células durante 72 h a 37 °C encima de la VPTT de los hidrogeles. Una vez formada la monocapa de células, se observaron los hidrogeles usando microscopia de fluorescencia y se dispusieron boca abajo en otra placa de cultivo de tejido (TCP). Con el fin de estudiar el desprendimiento de las células, los hidrogeles se enfriaron ligeramente hasta 20 °C, debajo de la VPTT usando medio de cultivo frío. La temperatura se vigiló usando una sonda de temperatura. Finalmente, la monocapa de células se desprende como consecuencia de la expansión del hidrogel y se trasplanta a una superficie de TCP (*tissue culture plate*). A las 48 horas del trasplante, se observó el cultivo usando microscopia óptica y se midió la actividad metabólica usando una prueba de azul de Alamar.

30 Se emplearon microscopias fluorescente y óptica para evaluar los procesos de desarrollo celular y trasplante. Las imágenes de los cultivos celulares en los diferentes hidrogeles tomadas después de 72 horas, además de las imágenes ópticas obtenidas para los trasplantes después de 48 horas se pueden hallar en la Figura 3. Cabe mencionar que el tiempo de cultivo celular, fijado en 72 h para todos los experimentos, se escogió con el propósito de facilitar un análisis de proliferación temprana de las células. De igual

manera, se observó la superficie del hidrogel después del proceso de desprendimiento con el fin de determinar la presencia de monocapas de células residuales y, por consiguiente, analizar, la eficiencia del trasplante. Finalmente, se observó la actividad metabólica (Azul de Alamar) de los trasplantes de células 48 horas después del proceso de desprendimiento.

Ejemplo 1. Preparación de hidrogeles basados en VCL sin monómeros adicionales

Se preparó una primera serie de hidrogeles basados en VCL según el procedimiento descrito anteriormente en "Métodos" y usando etanol o mezclas agua/etanol como disolvente, pero sin usar monómero adicional. Se preparó una segunda serie de hidrogeles basados en VCL según el mismo procedimiento, pero sin adicionar disolvente (polimerización en masa). En este caso, para caracterizar gravimétricamente el posible efecto de la vitrificación en la conversión total en esta serie, se llevaron a cabo estudios de secado, y se comparó el peso final seco con la masa de la formulación precursora. Se encontró que la conversión para esta serie estaba en el rango 80- 95 %, mientras que la primera serie que si usaba disolvente superaba el 95%. Estos hidrogeles mostraron una alta termosensibilidad en rangos de temperatura fisiológicos (Figura1).

Ejemplo 2. Preparación de hidrogeles basados en VCL con diferentes metacrilatos iónicos como monómeros adicionales

Se prepararon hidrogeles basados en VCL que contenían como monómeros adicionales diferentes metacrilatos (M) iónicos según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, con las relaciones molares VCL/M indicadas en la Tabla 1, porcentajes molares de C1 y C2 de 2 y 0,1% respectivamente, y usando mezcla agua/etanol como disolvente. Las estructuras de los precursores se pueden hallar en la Tabla 1. Es particularmente relevante el pequeño porcentaje de 0,1% mol del compuesto de divinilo requerido para obtener hidrogeles robustos y evitar que se rompan durante la manipulación. Como se mencionó previamente, C2 puede cumplir una función clave en las propiedades de la red por su posible participación en enlaces entre cadenas ricas en metacrilato y cadenas ricas en VCL. Se han descrito heteroenlaces análogos para potenciar las propiedades mecánicas de DN verdaderos.

Tabla 1

	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a
Vinil-lactama													
M													
Relación molar VCLM	12/1	6/1	12/1	6/1	12/1	6/1	6/1	6/1	12/1	6/1	12/1	6/1	12/1
VPPT	39	40	37	39	35	35	33	35	36	33	35	34	37
Hinchamiento a 37 °C	90±3	89±1	83±2	91±2	71±1	69±1	87±1	87±2	68±2	61±1	75±1	82±1	63±2
Estructuras de los entrecruzantes													

La relación molar $M-SO_3^-/ M-N^+$ en los sistemas 4a, 4b, 5a y 5b son respectivamente 1/1, 1/1, 3/1 y 1/3.

Independientemente de las composiciones químicas, todos los hidrogeles exhiben
5 termosensibilidad como se indica en la Figura 2, que muestra la dependencia del
hinchamiento de las muestras en función de la temperatura. Se muestra que la cantidad
y el tipo de monómero adicional (M) tienen una fuerte influencia sobre el grado de
termosensibilidad (cambio en la capacidad de hinchamiento) pero no en los valores de
temperaturas de transición de fase de volumen (VPTT). Todas las muestras tienen VPTTs
10 similares, próximas a 37 °C, es decir, en un intervalo fisiológicamente relevante.
En términos de hinchamiento, todas las muestras exhiben hinchamientos similares
debajo de la VPTT, es decir, en el estado 'hidrófilo', en donde la red está probablemente
en su máxima expansión (el valor máximo determinado por la densidad de
entrecruzamiento). Encima de la VPTT, no obstante, el tipo y la cantidad de M tienen una
15 fuerte influencia sobre la conducta de hinchamiento y sobre la contracción del volumen,
como se mencionó anteriormente. En promedio, la incorporación de monómeros
adicionales iónicos reduce el grado de termosensibilidad en un modo dependiente de la
composición (la influencia sobre hinchamiento es mayor para los hidrogeles con una
relación molar VCL/M de 6/1 cuando se compara con hidrogeles con una relación 12/1),
20 ya que aumenta la hidrofiliidad del sistema. Sin embargo, se han descubierto fuertes
diferencias entre los sistemas. Los hidrogeles que contienen cargas individuales
(muestras negativas 2 de la Tabla 1, o muestras positivas 3) o exceso de un tipo de carga
(muestras 5) exhiben menos cambios en el volumen que los sistemas que incorporan
cantidades estequiométricas de cargas, es decir, la sulfobetaina zwitteriónica (muestras
25 6), la fosforilcolina zwitteriónica (muestras 7) o los sistemas pseudo-zwitteriónicos
(muestras 4). Esta diferencia se debe relacionar con la neutralización de cargas en el
último grupo, mientras que los materiales de cargas individuales (o los hidrogeles con
exceso de un tipo de carga) no pueden evitar la repulsión electrostática entre las unidades
(manteniendo un alto grado de expansión) que, además de la hidrofiliidad intrínseca de
30 los restos iónicos – reduce la contracción por encima de la VPTT, en el estado 'hidrófobo'.
La fosforilcolina zwitteriónica no corresponde al caso de la neutralización de la carga
completa, ya que el grupo fosfato tiene una baja pK y no se ioniza por completo, de
conformidad con su cambio en volumen intermedio. Todas estas diferencias entre los
distintos hidrogeles encima de la VPTT tienen lugar, en un grado menor, a temperatura

de cultivo, 37 °C, que es una temperatura intermedia. Los valores de hinchamiento a esta temperatura se han compilado en la Tabla 1 para respaldar el análisis que sigue.

Se ha observado que el contenido de agua, y en consecuencia el equilibrio hidrófilo/hidrófobo, a 37 °C varía de manera significativa para los distintos sistemas que también pueden ser muy relevantes para la respuesta celular. En particular, se puede observar que aquellos hidrogeles que portan monómeros adicionales cargados y tienen bien una carga neta negativa o bien positiva exhiben valores de hinchamiento S mayores, (véase ec. 1), que oscilan entre 89 y 91% (muestras 2b y 3b). Tras la neutralización de la carga, el hinchamiento se reduce de aproximadamente 89-91% en las series 2b, 3b a 69-71% en la serie 4.

El uso de monómeros adicionales zwitteriónicos requiere un análisis particular. Los hidrogeles preparados usando $M-N^+-SO_3^-$ (6a y 6b) exhiben, tal como estaba previsto, bajo hinchamiento en comparación con los hidrogeles cargados. En contraste con esta observación, los hidrogeles preparados usando $M-PO_3--N^+$ presentaron mayor hinchamiento.

Ejemplo 3. Preparación de hidrogeles basados en VCL conteniendo como monómeros adicionales combinaciones de hidroxietilmetacrilato, ácido metacrílico y monoacrilato de etil fosfato

Los hidrogeles se prepararon según el procedimiento indicado en Métodos y ejemplo 2. Los hidrogeles preparados se han recogido en las Tablas 2, 3 y 4. Se obtuvieron primero dos series que contienen como monómeros adicionales $M-COOH$ o $M-OH$, y se obtuvo una tercera serie que contiene ambos. Para las dos primeras series y para estudiar la influencia de la cantidad de monómero adicional, se han preparado relaciones molares VCL/M de 12/2, 12/1, y 12 / 0,5). Se preparó además un hidrogel control basado en VCL sin monómeros adicionales. Se ha encontrado que se requiere que los hidrogeles que contienen $M-OH$ se desmolden y se laven primero en agua destilada. Si se utilizó etanol para desmoldar y lavar, las películas con $M-OH$ se rompieron probablemente a causa de las tensiones de hinchamiento (mayores en etanol que en agua). Todos los hidrogeles preparados en estas tres series son robustos, transparentes y fáciles de manejar y maniobrar.

Tabla 2




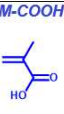
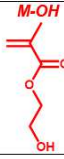
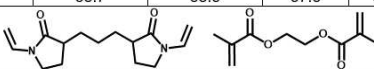


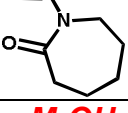
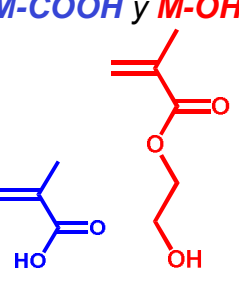
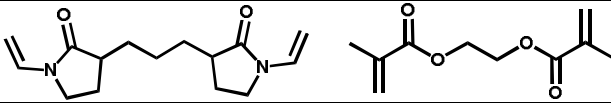
	VCL/M-COOH 12:2	VCL/M-COOH 12:1	VCL/M-COOH 12:0.5	VCL/M-COOH 12:0.25	VCL/M-COOH 12:0.05	VCL/M-OH 12:2	VCL/M-OH 12:1	VCL/M-OH 12:0.5	VCL
									
Vinil-lactama Componente principal	c								
M									Sin M
Relación molar VCL/M	12/2	12/1	12/0.5	12/0.25	12/0.05	12/2	12/1	12/0.5	
Hinchamiento a 37°C VPTT(°C)	160%	93%	197%	234%	186%	788%	92%	105%	158%
Estructuras de los entrecruzantes									

Tabla 3

	VCL/M-COOH 12:1:2	VCL/M-COOH/M-OH 12:1:1	VCL/M-COOH/M-OH 12:0.5:1	VCL/M-COOH/M-OH 12:0.25:0.25 5	VCL
					
Vinil lactama Componente principal					
M					Sin M
Relación molar VCL/M-COOH/M-OH	12/1/2	12/1/1	12/0.5/1	12/0.25/0.25	
Hinchamiento a 37°C	35%	97%	94%	149%	158%
VPTT (°C)	35	37.9	36.9	34.9	36.5
Estructuras de los entrecruzantes					

A continuación, se prepararon hidrogeles conteniendo M-PO₄H₂ como monómero adicional. Para esta serie, el etanol se reemplazó con trietilamina (TEA) para evitar la degradación de los vinilos. TEA es una base orgánica capaz de capturar el primer protón del ácido fosfórico, formando una sal. Para esta serie, se llevó a cabo una optimización completa al reemplazar no solo disolventes sino también el porcentaje de entrecruzantes. El agua se sustituyó por metanol (MetOH) aumentando la hidrofobicidad de la solución.

En la Tabla 4 se recogen los hidrogeles de esta serie. Los cambios específicos de la formulación original realizada se detallan en cada caso. La cantidad y el tipo de monómero adicional (M) parecen tener una gran influencia en la termosensibilidad, pero no tanto en los valores de temperatura de transición de volumen (VPTT). Todas las muestras, incluido el hidrogel sin monómero adicional, tienen un VPTT similar, cercano a 37°C, que es un rango fisiológicamente relevante. Los VPTT obtenidos en este estudio son similares a los reportados en la literatura para sistemas VCL puros.

Tabla 4

	VCL/M-PO ₄ H ₂ 12/2.1.5% C1	VCL/M-PO ₄ H ₂ 12/1.4% C1	VCL/M-PO ₄ H ₂ 12/1.2% C1	VCL/M-PO ₄ H ₂ 12/1.1% 0.4%C2	VCL/M-PO ₄ H ₂ 12/0.5 1.5%C1/ 0.4%VC2	VCL/M-COOH/M-PO ₄ H ₂	VCL/M-OH/M-PO ₄ H ₂	VCL/M-COOH/M-OH/M-PO ₄ H ₂ 0.4%C2	VCL/M-COOH/M-OH/M-PO ₄ H ₂ 6%C1	VCL
Vinil-lactama, componente principal										
M										Sin M
VCL/M-PO ₄ H ₂ /M-COOH/M-OH	12/2/0/0	12/1/0/0			12/0.5/0/0	12/1/1/0	12/0/1/1	12/1/1/1		
Hinchamiento a 37% y VPTT					97% (40°C)	263% (39.5°C)	282% (35°C)	258% (41 °C)	73% (35°C)	158% (36.5°C)
Cambios en la formulación, comparado con las series 1 a 3.	1.5%C1 TEA:MetOH 1:1	4% C1 TEA:MetOH 1:1		0.4%C2 TEA:MetOH 1:1	1.5%C1/ 0.4%C2 TEA:MetOH 1:1	TEA:MetOH 1:1	TEA:MetOH 1/3:2/3	0.4%C2 TEA:MetOH 1:1	6%C1 TEA:MetOH 1:1	

Ejemplo 4. Adhesión, proliferación y desprendimiento de las células utilizando los hidrogeles de VCL con y sin monómeros adicionales tipo metacrilato iónico.

La carga total de hidrogel cumple, según trabajos anteriores, una función importante tanto en la modulación de la adhesión celular como en la proliferación, y además en el

desprendimiento de las células que también es un paso crucial para emplear los materiales con fines de manipulación de células y modificación de tejidos. Por otra parte, las distintas cargas iónicas pueden modular la adhesión celular a través de procesos de superficie que implican tanto adsorción de proteínas del suero como adhesión temprana de células. Por otro lado, en función de los resultados demostrados en la sección anterior, el tipo y la cantidad de carga influyen fuertemente en la extensión de la termosensibilidad, principalmente en términos de absorción de agua y cambio de volumen. Por consiguiente, la carga de hidrogel puede ser muy relevante en el desprendimiento eventual de las células tras la disminución de la temperatura que será la propiedad empleada para el desprendimiento

Todos los hidrogeles basados en VCL sin monómeros adicionales permitieron la adhesión y la proliferación celular de las siguientes líneas: células endoteliales C166-GFP, células premitóticas C2C12-GFP y células macrofágicas RAW264.7. Para la mayoría de las muestras, se forma una monocapa de células desde las etapas tempranas (72 h), en el caso de modelos celulares adherentes. En el caso de los macrófagos RAW 264.7, se ha observado un crecimiento de células aisladas óptimo, tal y como se espera con este modelo no adherente. De la misma manera, se han obtenido trasplantes viables de cultivos procedentes de las tres líneas mediante descenso de temperatura, tanto en monocapa como de manera aislada.

En el análisis de hidrogeles de VCL con monómeros adicionales, se observaron diferencias en la adhesión y la proliferación celular, así como en el despegado en los soportes de hidrogel, dependiendo de su composición.

Cuando monómeros adicionales con cargas positivas y negativas se incorporan simultáneamente, bien mediante combinación estequiométrica de ambas unidades (formulación pseudo-zwitteriónica, muestras 4 de la Tabla 1) o bien mediante el uso de sulfobetaina zwitterión (muestras 6), se obtiene una buena proliferación celular del modelo endotelial C166-GFP (imágenes 4a y 4b de la Figura 3) comparable o superior a la del hidrogel sin monómero adicional 8. Parece haber una influencia de la composición para las muestras 6 dado que las muestras con carga iónica inferior (6a) demostraron un efecto disminuido de carga superficial sobre la adhesión y proliferación de las células en comparación con la muestra 6b. La conducta de desprendimiento (imágenes 4a-T, 4b-T, 6a-T, 6b-T y Figura 4) que es excelente para algunas de estas muestras (como por ejemplo 6b) concuerda con el análisis anterior. Los trasplantes de células tuvieron, en promedio, igual o mejor calidad que aquellos obtenidos con la muestra 8 sin monómero adicional, con ECM conservada y uniones celulares. Las actividades metabólicas de

trasplantes efectuados con la muestra 6b fueron claramente superiores que en la muestra 6a. En la muestra 6b, se detectaron muy pocos grupos de pequeñas células en el hidrogel después del desprendimiento, sugiriendo un proceso de desprendimiento óptimo (Figura 5, imagen 6b-D). Se observa una situación similar para los hidrogeles 6a, 4a y 4b después del proceso de desprendimiento, con agregados celulares menores adheridos a la superficie (Figura 5, imágenes 6a-D, 4a-D y 4b-D). En términos de termosensibilidad, estas muestras zwitteriónicas o (pseudo)zwitteriónicas 4 y 6 demuestran un alto cambio de volumen (aunque inferior a aquel exhibido por la muestra a 8 sin monómero adicional), que es beneficioso para el desprendimiento de las monocapas. Asimismo, se sabe que los componentes zwitteriónicos y pseudo-zwitteriónicos demuestran una conducta anti-adhesiva. Esta naturaleza anti-adhesiva puede también favorecer el desprendimiento en el estado 'hidrófilo' debajo de la VPTT.

Las respuestas celulares a los hidrogeles 5 (combinación no estequiométrica de cargas positivas y negativas) y 7 (fosforilcolina zwitterión) concuerdan con el análisis precedente. Destaca la muestra 5a, que presentó una buena capacidad de trasplante, con lecturas de alta actividad metabólica (Figura 6).

Ejemplo 5. Adhesión, proliferación y desprendimiento de las células utilizando hidrogeles de VCL con diferentes combinaciones molares de hidroxietimetacrilato, ácido metacrílico y monoacrololoxi etil fosfato.

Para analizar la biocompatibilidad, los hidrogeles se han probado con la línea endotelial C166-GFP y con la línea osteoblástica MC3T3. En primer lugar, se detallarán los resultados obtenidos con la línea endotelial. Todas las superficies VCL / M-COOH permitieron la adhesión celular y la proliferación de células endoteliales con algunas diferencias entre las formulaciones. El VCL sin monómero adicional ha demostrado una monocapa bien desarrollada con uniones estrechas entre las células, en concordancia con los resultados mostrados en el ejemplo anterior. A excepción del VCL / M-COOH 12: 2 esta serie de hidrogeles de VCL / M-COOH permitieron el desarrollo de monocapas celulares con alta densidad celular y apariencia saludable. En relación al trasplante, el control con hidrogel VCL sin monómero adicional y el VCL / M-COOH 12: 0,25 lograron un trasplante óptimo tipo monocapa.

La siguiente familia de hidrogeles que se evaluaron fue VCL / M-OH. Una vez más, todos los hidrogeles permitieron la adhesión celular y la proliferación de células endoteliales. Con las formulaciones VCL / M-OH 12: 1 y VCL / M-OH 12: 0,5, se encontraron grandes monocapas en toda la superficie. VCL / M-OH 12: 1 dio lugar a un buen trasplante y a

lecturas de actividad metabólica tras trasplante dobles que las de VCL control sin monómero adicional.

5 La última serie con un monómero adicional evaluada fue la serie VCL / M-PO₄H₂. En los hidrogeles VCL / M-PO₄H₂, las imágenes revelaron una buena cobertura de células endoteliales sobre toda la superficie del hidrogel, con cultivos celulares proliferando sobre las muestras. En detalle, grupos de células densas y grandes fueron encontrados en VCL / M- PO₄H₂ 12: 2 1,5% C1. El resto de los hidrogeles permitieron el desarrollo de monocapa, con una rápida cobertura sobre la superficie del material, a excepción de VCL
10 / M- PO₄H₂ 12: 1 4% C1.

Se analizaron los comportamientos de trasplante y 48 horas después del desprendimiento, se observaron monocapas celulares más grandes en VCL / M-PO₄H₂ 12: 2 1,5% C1, 12: 1 0,4% C2 o 12: 0,5, 0,4% C2. 12: 1 4% C1, 12: 1 2% C1, y 12: 1 0,1% C2 2% C1. En términos de la actividad metabólica de las superficies trasplantadas, 12: 2
15 y 12 0,5 son las medidas más altas, casi el doble de los trasplantes de VCL sin monómero adicional.

Combinaciones de M-COOH, M-OH y / o M-PO₄H₂ fueron evaluados. La proliferación sobre muestras que incluían combinaciones de los diferentes monómeros adicionales, M-COOH, M-OH y / o M-PO₄H₂, se desarrolló también en monocapas para VCL / M-
20 COOH / M-OH 12: 0,5, VCL / M-OH / M-PO₄H₂ y VCL / M-COOH / M-PO₄H₂. Las muestras VCL / M-COOH / M-OH 12: 0,5: 1; 12: 1: 2 y 12: 0,25: 0,25 dieron lugar a extensas áreas trasplantadas.

Empleando la línea osteoblástica MC3T3 y un protocolo de cultivo y trasplante similar al descrito, se observó que los hidrogeles VCL/M-COOH 12:1 y VCL-M-OH 12:1 permiten
25 el crecimiento y trasplante de monocapas de osteoblastos, siendo más numerosas con VCL/M-OH 12:1 (Figura 4).

El análisis de combinaciones de 2 comonómeros demostró un comportamiento bastante heterogéneo. Por un lado, se describió un crecimiento óptimo de monocapas de osteoblastos sobre superficies con ambos grupos M-COOH y M-OH, sea en proporción
30 12:1:2 o 12:1:1 (Figura 4). Sin embargo, el trasplante de estas monocapas fue bastante parcial. Por otro lado, la formulación VCL/M-OH/M-PO₄H₂ 12:1 demostró un comportamiento superior al hidrogel control, con monocapas extensas y un buen rendimiento de trasplante (Figura 4).




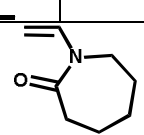
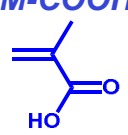
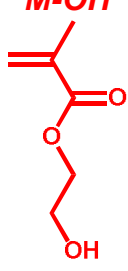
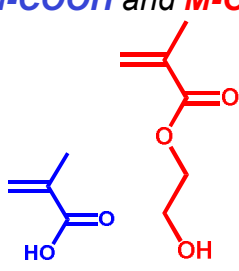
Ejemplo 6. Preparación de hidrogeles reabsorbibles de VCL con diferentes combinaciones molares de hidroxietimetacrilato y ácido metacrílico. Adhesión, proliferación y desprendimiento de las células utilizando estos hidrogeles.

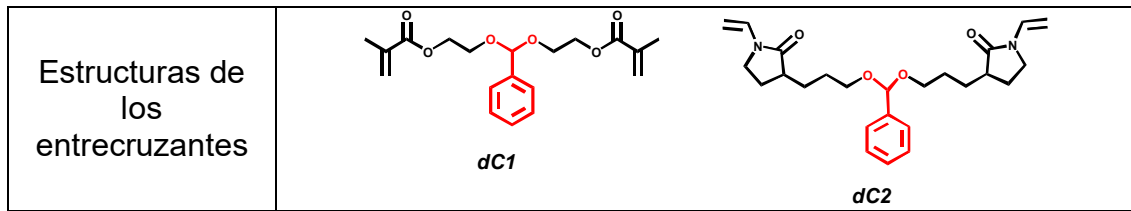
Estos hidrogeles se prepararon de igual manera a los del ejemplo 5, pero usando los entrecruzantes hidrolizables dC1 y dC2 (véanse las estructuras y los hidrogeles obtenidos en la Tabla 5) en vez de los entrecruzantes C1 y C2. Estos entrecruzantes se han sintetizado usando rutas descritas en la literatura (*Macromolecular Bioscience* (2007), 7(4), 446-455; RSC Adv. 2014, 4, 35950-35958). Tras la degradación, los nudos de la red desaparecen y el hidrogel se expande hasta que las cadenas de polímero finalmente se disuelven.

En este caso, los hidrogeles han sido evaluados en términos de citocompatibilidad con la línea celular endotelial C166-GFP y la línea osteoblástica MC3T3, tanto para analizar el crecimiento celular en superficie como su habilidad para desprender monocapas celulares mediante descenso de temperatura. Todos estos materiales reabsorbibles demostraron ser biocompatibles y permitieron el trasplante de monocapas a nuevos pocillos de poliestireno con ambos modelos celulares. En algunos casos, como en el comportamiento de VCL/M-COOH/M-OH 12:1:2 con la línea osteoblástica, el rendimiento de estas superficies fue incluso superior a su contrapartida no reabsorbible (Figura 5).

20

Tabla 5

	VCL/M-COOH degradable 12:1	VCL/M-OH degradable 12:1	VCL/M-COOH/M-OH degradable 12:1:2
			
Vinil lactama, componente principal			
M	<i>M-COOH</i> 	<i>M-OH</i> 	<i>M-COOH and M-OH</i> 
Relación molar VCL/M- COOH/M-OH	12/1/0	12/0/1	12/1/2



Ejemplo 7. Preparación de hidrogeles de VCL mediante polimerización en masa. Adhesión, proliferación y desprendimiento de las células utilizando estos hidrogeles.

5

Se prepararon hidrogeles basados en VCL según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero sin adicionar disolvente (polimerización en masa). Los hidrogeles obtenidos fueron más robustos mecánicamente que los obtenidos con disolvente. Se pueden doblar y adaptar a cualquier superficie. También resultaron ser superiores como soportes en cultivo celular. Se procedió a la siembra de los hidrogeles con la línea celular murina autofluorescente de linaje endotelial C166-GFP con objeto de evaluar la bio compatibilidad de los soportes y su capacidad de despegue del cultivo por descenso controlado de temperatura. En la Figura 6 se puede observar el crecimiento de la monocapa celular 72h tras la siembra (primera columna de imágenes) y del trasplante celular 72h tras el descenso de temperatura (segunda columna de imágenes) para el hidrogel obtenido con disolvente (arriba) y en masa (abajo). Todos los hidrogeles permitieron el crecimiento del cultivo y su trasplante, existiendo diferencias entre los mismos. En función de los resultados obtenidos, se observa una diferencia significativa entre ambas muestras, siendo el preparado en masa superior en adhesión y proliferación. Los trasplantes que provienen del hidrogel preparado en masa son más íntegros y abundantes.

10

15

20

Ejemplo 8. Preparación de hidrogeles basados en VCL mediante iniciación térmica.

25

Se prepararon hidrogeles basados en VCL según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero usando AIBN al 1% en peso en vez de HCPK, y polimerizando a 60 °C durante 24 horas en vez de en la cámara de fotocurado. Se obtuvieron hidrogeles comparables a los obtenidos por fotopolimerización.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel caracterizado porque:

5

está basado en monómeros tipo vinil-caprolactama, y al menos dos entrecruzantes, exceptuando el hidrogel formado por vinil-caprolactama, sulfopropilmetacrilato de potasio y los entrecruzantes etilenglicol dimetacrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

2. Un hidrogel según la reivindicación 1, que comprende además al menos un monómero adicional.

10

3. Un hidrogel según la reivindicación 1 o 2 que comprende

- un primer entrecruzante portador de al menos dos funcionalidades tipo alqueno,
- y un segundo entrecruzante portador de, al menos, una funcionalidad tipo alqueno menos activada que en el caso del primer entrecruzante.

15

4. Un hidrogel según la reivindicación 3, en el que al menos un entrecruzante se selecciona de entre estructuras alquénicas (met)acrílicas (A y B) o divinilbenceno,



20

donde:

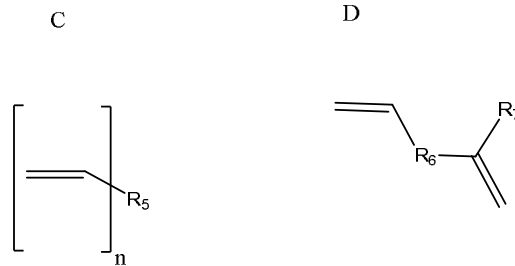
- R_1 se selecciona de entre hidrógeno o metilo,
- R_2 se selecciona de entre di, tri, tetra o penta alcoxis sustituidos, derivados dialcoxi disustituidos, un grupo diariloxi sustituido o no sustituido, diaminoalquil C_1-C_6 N, N' disustituidos o hexatriazina N, N', N'' trisustituida,
- R_3 se selecciona de entre oxígeno o un grupo $-O-R_4-$, donde R_4 es un alquil C_1-C_6 , lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más grupos carbonato o urea,
- n se selecciona de entre 2, 3, 4 o 5.

25

5. Un hidrogel según la reivindicación 3, en el que al menos un segundo entrecruzante posee al menos un alqueno polimerizable menos activado que los alquenos polimerizables tipo divinilbenceno o tipo estructura (met)acrílica.

30

6. Un hidrogel según la reivindicación 5, en el que el segundo entrecruzante se selecciona de entre las siguientes estructuras alquénicas vinílicas (C y D),



5

donde:

- R_5 se selecciona de entre dialcoxis $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ disustituidos, dialcanoiloxis $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ disustituidos, -imidazolin-2-ona N, N' disustituido o 3,3'-(alquil)-di-1-vinyl-2-lactama N, N' disustituida,
- R_6 se selecciona de entre un grupo oxicarbonil, carbonato o urea, sustituidos o no con grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, alcoxi o alcanoiloloxi,
- R_7 se selecciona de entre hidrógeno o metilo,
- n se selecciona de entre 2 o 3.

15

7. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los entrecruzantes se seleccionan de entre etilenglicol di(met)acrilato, trietilenglicol di(met)acrilato, tetraetilenglicol glicol di(met)acrilato, trimetilolpropano tri(met)acrilato, bisfenol A di(met)acrilato, etoxilato bisfenol A di(met)acrilato, pentaeritritol tri-, and tetra(met)acrilato, tetrametileno di(met)acrilato, N,N'-metilenbisacrilamida, metacriloxietil vinil carbonato, trialilcianurato, metacriloxietil vinil urea, divinil benceno, dialil itaconato, alil metacrilato, dialil phthalato, polisiloxanilbisalquil (met)acrilato, N,N-dialilacrilamida, vinilmetacrilato, alilmetacrilato, Diuretano dimetacrilato, polietilen glicol di(met)acrilato, divinil-adipato, derivados de divinil-pirrolidona, 1,3-divinylimidazolin-2-ona o combinaciones de los anteriores.

25

8. Un hidrogel según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 7, en el que los entrecruzantes están presentes cada uno de ellos en concentraciones en el intervalo 0,01- 20 % molar con respecto a los moles de monómeros totales.

30

9. Un hidrogel según la reivindicación 8, en el que los entrecruzantes son etilenglicol dimetacrilato y 3,3'-(propil)-di-1-vinil-2-pirrolidona.

5 10. Un hidrogel según la reivindicación 8, en el que los entrecruzantes son etilenglicol dimetacrilato y 1,3-divinilimidazolin-2-ona.

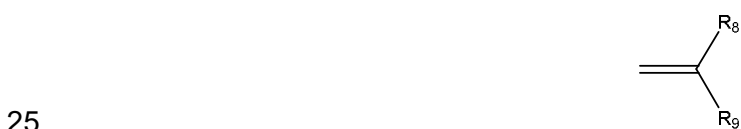
11. Un hidrogel según la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un entrecruzante es un compuesto portador de grupos hidrolíticos acetal.

10 12. Un hidrogel según la reivindicación 11, en el que los entrecruzantes son (((4-hidroxifenil)metileno)bis(oxi))bis(etano-2,1-diil)bis(2-metacrilato) y 3,3'-(((fenilmetileno)bis(oxi))bis(propano-3,1-diil))bis(1-vinilpirrolidin-2-ona).

15 13. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, que comprende como monómeros adicionales derivados alquénicos polimerizables con una sola funcionalidad polimerizable.

20 14. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que el monómero adicional se selecciona de entre maleimidas, ácido maleico, ácido fumárico, maleatos, fumaratos, o estructuras alquénicas (met)acrílicas.

15. Un hidrogel según la reivindicación 14, en el que el monómero adicional es una estructura alquénica (met)acrílica,



donde

- R₈ se selecciona de entre hidrógeno o metilo,

30 - R₉ se selecciona de entre un grupo nitrilo, ácido carboxílico, un grupo éster sustituido, un grupo amida, un grupo amida N sustituido, un grupo amida N, N sustituido, un grupo arilo no sustituido o sustituido, un grupo oxicarbonil sustituido, un grupo oxi sustituido, una amina sustituida, un grupo amino carbonil sustituido, un grupo N-lactama unido por

el nitrógeno, formamida, fosfónico, sulfonato de sodio, acetamida, carbazol, imidazol, trimetilsilano o piridina.

5 16. Un hidrogel según la reivindicación 15, en el que el monómero adicional se selecciona de entre las siguientes estructuras (met)acrílicas: hidroxietil(met)acrilato, ácido (met)acrílico, sulfopropilacrilato de potasio, monoacrilato etilfosfato, (met)acrilatos de oligoetilenglicol, trimetilsililmetacrilato, (met)acrilatos de polietilenglicol, N,N dimetilacrilamida, acrilamida, alquil (met)acrilato, N-isopropilacrilamida, hidroxipropilmetacrilamida, N-dodecilacrilamida, N-(3-Aminopropil)metacrilamida
 10 hidrocioruro, 2-aminoetil (met)acrilato hidrocioruro, 2-(N,N-dietilamino)etil (met)acrilato, N-(met)acrilato succinimida, 2-Acrlamido-2-metil-1-propanesulfonato de sodio, 2-Acrlamido-2-metil-1-propanesulfónico, sales de [2-((met)acrilato)alquil]trimetilamonio, metacrilato de sulfobetaina zwitteriónica, metacrilamida de sulfobetaina zwitteriónica, metacrilato de fosforilcolina, metacrilato-L-lisina, carboxietilacrilato, 2-sulfoetilmetacrilato,
 15 o combinaciones de los anteriores.

17. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que en el que el monómero adicional es una estructura estirénica.

20 18. Un hidrogel según la reivindicación 17, en el que en el que la estructura estirénica se selecciona de entre estireno, cloroestireno, bromoestireno, vinilánilina, vinilnaftaleno, vinilbenzoico o vinilanol.

25 19. Un hidrogel según las reivindicaciones 2 y 13 en el que el monómero adicional es una estructura vinílica.

30 20. Un hidrogel según la reivindicación 20, en el que la estructura vinílica se selecciona de entre N-vinilacetamida, vinilpirrolidona, vinilcarbazol, vinilpiridona, vinilimidazol, acetato de vinilo, vinilformamida, vinilfosfónico, vinilsulfonato de sodio o viniltrimetilsilano,

21. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que comprende combinaciones de monómeros adicionales.

35 22. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que la relación molar vinil-caprolactama / monómeros adicionales está en el intervalo 2/1 a 100/1.

23. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que los entrecruzantes están presentes cada uno de ellos en concentraciones de entre 0,01- 20 % molar con respecto a los moles de monómeros totales.

5

24. Un procedimiento para obtener el hidrogel definido en una de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende al menos las siguientes etapas:

a) mezcla de los monómeros de vinilcaprolactama, uno o más monómeros adicionales, si están presentes, disolvente, si está presente, y al menos dos entrecruzantes,

10

b) burbujeo con un gas de la mezcla (a),

c) transferencia del producto obtenido en la etapa b) a un molde,

d) polimerización, e

e) hinchamiento del producto obtenido en (d) mediante su inmersión en agua o en alcoholes.

15

25. Un procedimiento según la reivindicación 24, en el que la polimerización se lleva a cabo en un cámara de fotocurado y la radiación UV se mantiene entre 0,01 y 60 minutos.

20

26. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 24 a 25, en el que la polimerización se lleva a cabo sin adición de disolvente (etapa a).

27. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que la polimerización se lleva a cabo a temperatura de entre 30 °C y 120 °C durante un tiempo de entre 0,1 y 24 horas.

25

28. Uso del hidrogel definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para obtener materiales para cultivos y trasplantes celulares.

30

29. Uso del hidrogel definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para cultivos y trasplantes celulares de la línea celular endotelial o la línea osteoblástica.

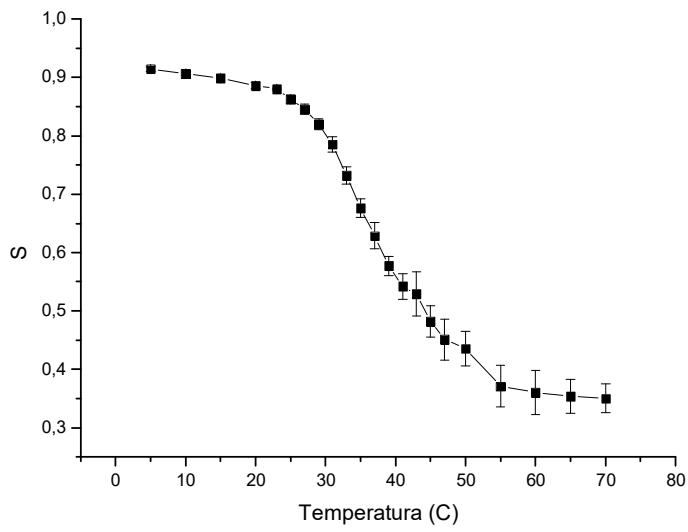


Figura 1

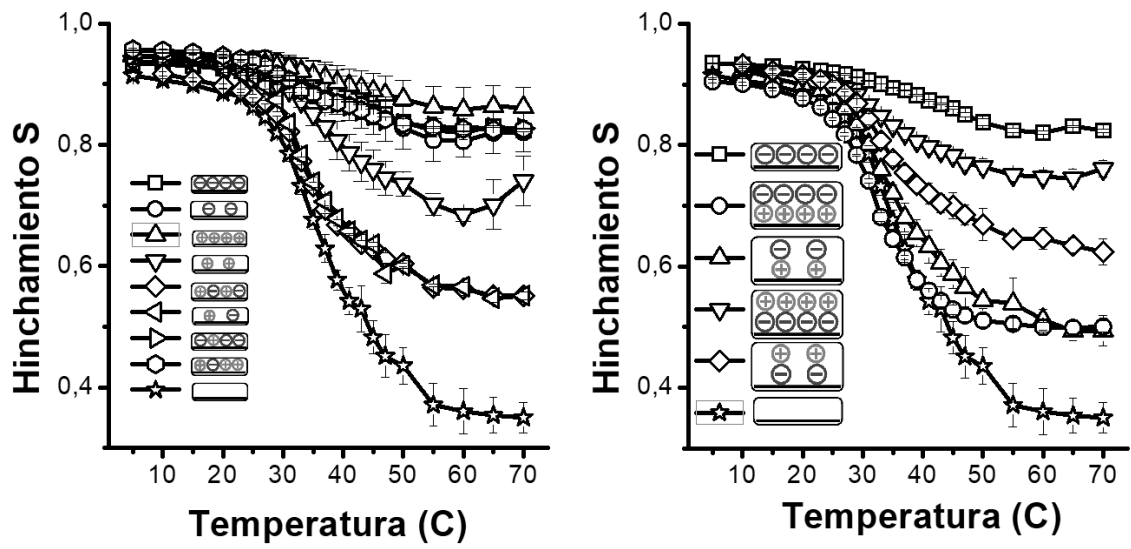


Figura 2

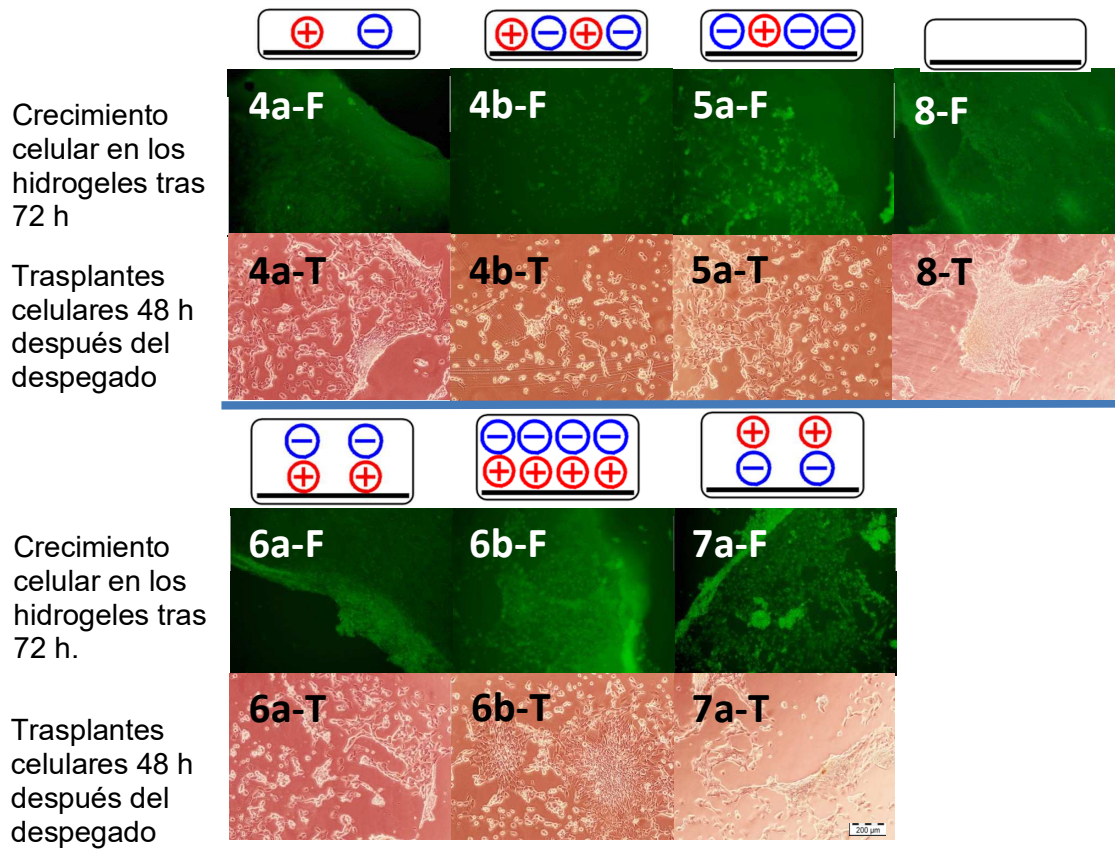


Figura 3

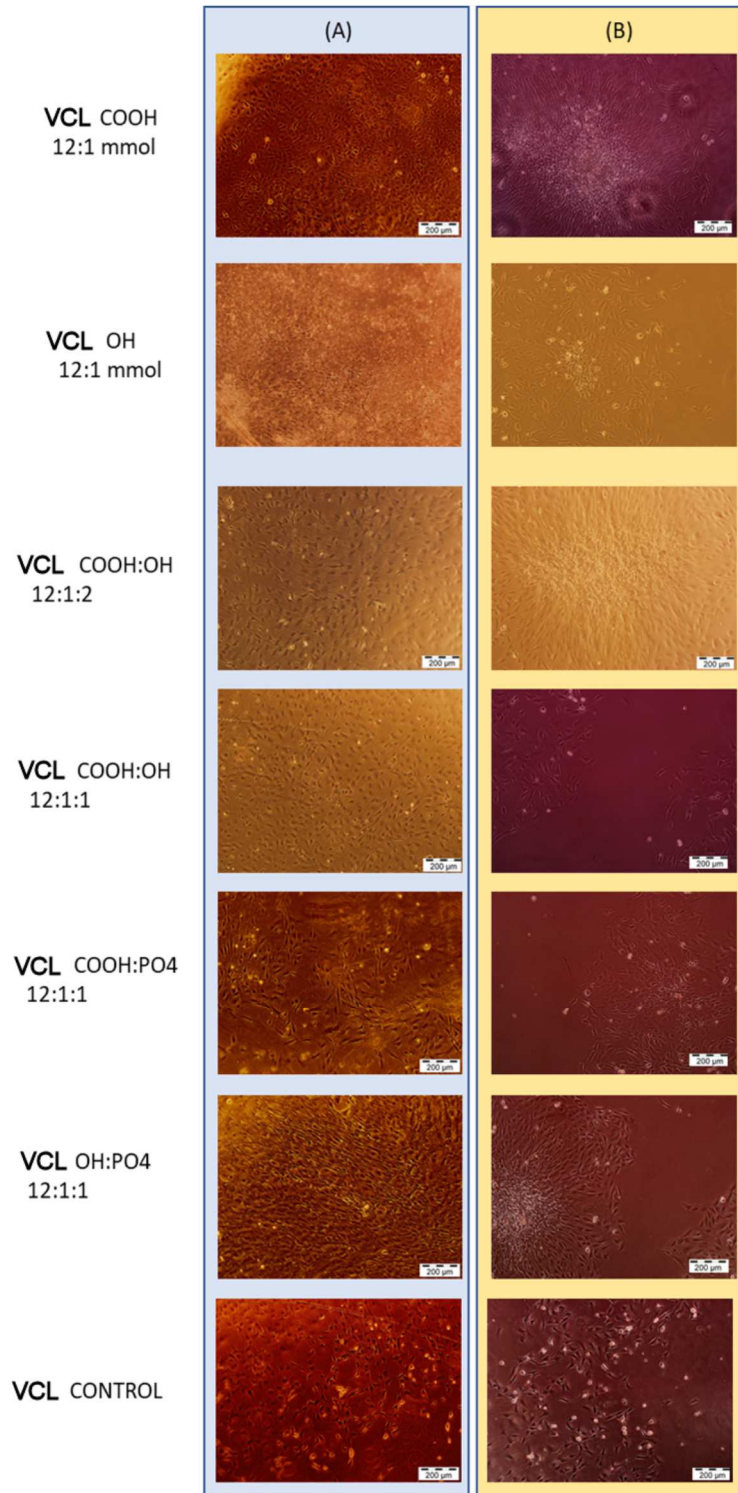


Figura 4

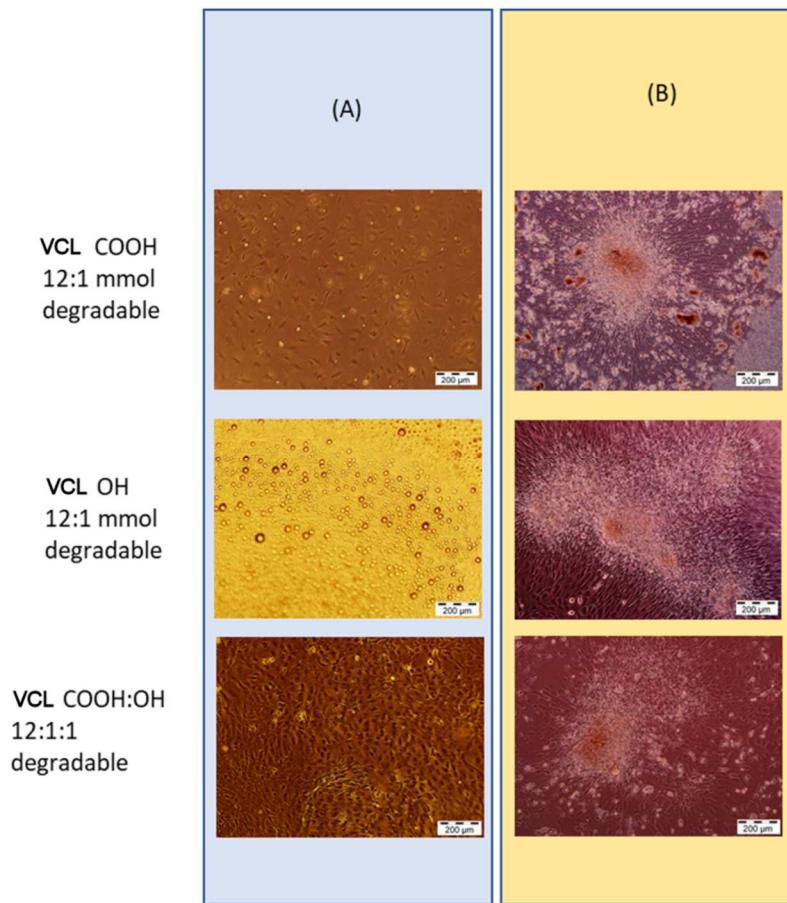
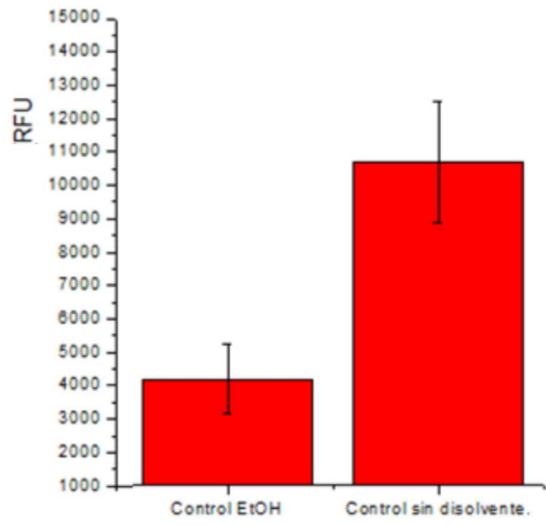


Figura 5

a)



b)

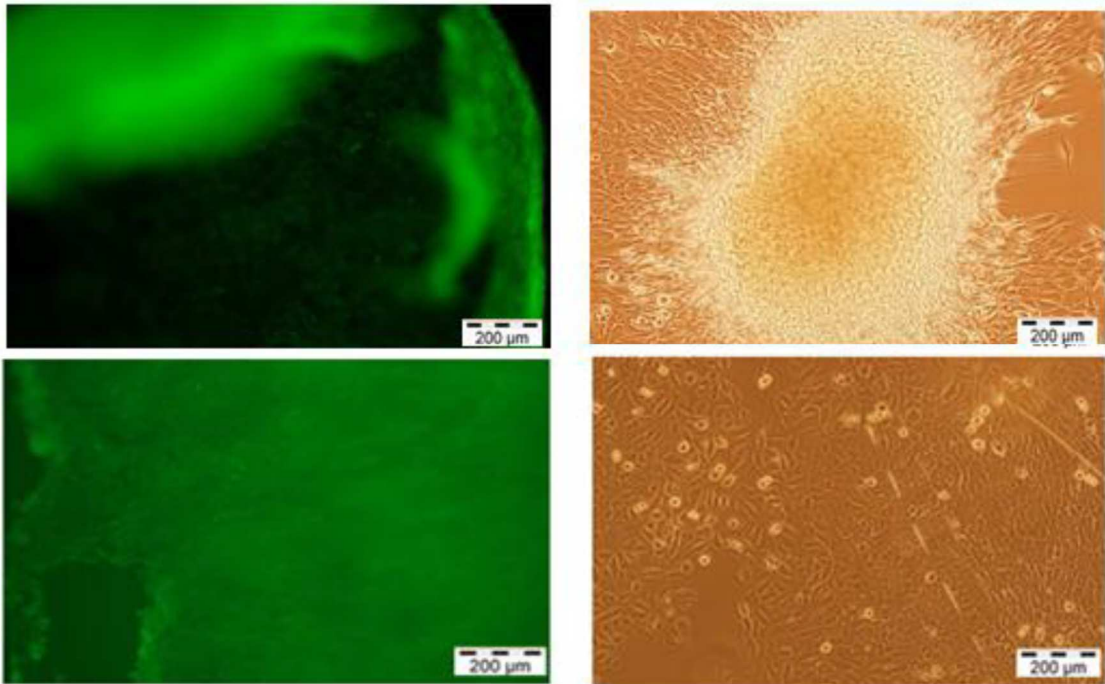


Figura 6



- ②① N.º solicitud: 201830348
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.04.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 4436887 A (CHROMECEK RICHARD C et al.) 13/03/1984, Columnas 4-9, ejemplos, tabla III.	1-8, 10, 13-29
X	ELÇIN ÇAKAL et al. Novel Poly (N-vinylcaprolactam-co-2-(diethylamino) ethyl methacrylate) Gels: Characterization and Detailed Investigation on Their Stimuli-Sensitive Behaviors and Network Structure. Ind. Eng. Chem. Res., 2010, vol. 49, páginas 11741-11751, sección experimental: apartado 2.2. Síntesis de geles.	1-8, 10, 13-29
E	ES 2678773 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIG CIENTIFICAS CSIC et al.) 17/08/2018, todo el documento.	1-10, 13-16 y 19-29
A	KUN SHI et al. Novel Biocompatible Thermoresponsive Poly (N-vinyl Caprolactam)/Clay Nanocomposite Hydrogels with Macroporous Structure and Improved Mechanical Characteristics. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, vol. 9, páginas 21979-21990, resumen, sección experimental: cultivo celular, conclusiones.	1-29
A	BOGUANG YANG et al. A thermoresponsive poly(n-vinylcaprolactam-co-sulfobetaine methacrylate) zwitterionic hydrogel exhibiting switchable anti-biofouling and cytocompatibility. Polymer Chemistry, 2015, vol. 6, páginas 3431-3432, apartados 2.2. Síntesis y caracterización del copolímero P (VCL-co-SBMA) y 3.7. Adhesión y proliferación celular.	1-29
A	RENATA L. SALA et al. Thermosensitive Poly (N-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. Tissue Engineering, 2017, vol. 23, N° 17-18, páginas 935-945, todo el documento.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.01.2019

Examinador
M. C. Bautista Sanz

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08F226/06 (2006.01)

C08F26/06 (2006.01)

C12N5/077 (2010.01)

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

C08F, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, HCAPLUS, Bases de datos de patentes de texto completo