

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 109**

51 Int. Cl.:

A61L 27/52 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C08F 220/22 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/US2013/023183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112863**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13740716 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2806908**

54 Título: **Hidrogeles polimerizables fluorados para vendajes de heridas y procedimientos para hacerlos**

30 Prioridad:

25.01.2012 US 201261590379 P

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

09.12.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF AKRON (100.0%)
302 East Buchtel Common
Akron, OH 44325, US**

72 Inventor/es:

**LEIPZIG, NIC y
WIJEKON, ASANKA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 798 109 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

Hidrogeles polimerizables fluorados para vendajes de heridas y procedimientos para hacerlos

5 CAMPO DE LA INVENCION

Una o más realizaciones de esta invención están dirigidas a hidrogeles fluorados, procedimientos de preparación de hidrogeles fluorados, procedimientos de carga de oxígeno y moléculas pequeñas oxigenadas dentro de hidrogeles fluorados, procedimientos de liberación de oxígeno y moléculas pequeñas oxigenadas de hidrogeles fluorados
10 cargados, y usos para hidrogeles fluorados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Un ambiente rico en oxígeno es vital para la curación de heridas y para la medicina regenerativa. Numerosos
15 resultados experimentales y clínicos han establecido que la oxigenoterapia (hiperbárica, tópica o vendaje) puede proporcionar beneficios significativos para promover y acelerar la regeneración y curación de tejidos en heridas agudas y crónicas. El tratamiento preferido de las heridas grandes de cicatrización lenta consiste en el desbridamiento, que produce resultados muy variados. Se ha demostrado que el tratamiento con oxígeno promueve la curación al mejorar el metabolismo, la síntesis de la matriz extracelular (MEC) y la oxigenación a través de la herida desde una matriz de
20 soporte que aún no se ha desarrollado. Por lo tanto, existe una gran necesidad de habilitar tecnologías de plataforma en el área del cuidado de heridas para soportar niveles regenerativos de oxigenación en un paquete total único.

EP 0 253 515 A2, US 5 214 452 A, US 4 954 587 A, EP 0 493 320 A2, US 2003/199697 A1, Atsushi Matsuda y col.,
25 Fluorinated Water-Swollen Hydrogels with Molecular and Supramolecular Organization, *Macromolecules*, 33 (2000), 2535-2538, Sang-Yeon Shim y col., *Photocurable Fluorinated Methacrylates: Synthesis and Polymerization*, *Macromol. Symp.* 277 (2009), 201-206, EP 0 050 934 B1 and EP 0 188 110 A1 describen hidrogeles que comprenden un polímero reticulado que tiene un grupo flúor pendiente.

RESUMEN DE LA INVENCION

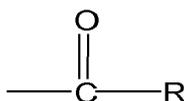
30 Según un primer aspecto, en una primera realización, la presente invención proporciona un hidrogel que comprende polímeros reticulados, los polímeros tienen cadenas principales de polisacáridos, donde las cadenas principales de polisacáridos tienen un grupo flúor pendiente unido a las mismas y gas O₂ disuelto.

35 Una segunda realización proporciona un hidrogel como en la primera realización, donde el polímero tiene un grupo acetilamino pendiente.

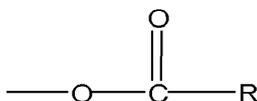
Una tercera realización proporciona un hidrogel como en la primera realización o en la segunda realización, donde el polímero tiene un grupo amino pendiente.
40

Una cuarta realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a tercera, donde el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en quitosano, dextrano, ácido hialúrico, agarosa y combinaciones de los mismos.

45 Una quinta realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a cuarta, donde el grupo flúor pendiente se selecciona del grupo que consiste en grupos fluorocarbono; grupos carbonilo definidos por la fórmula:

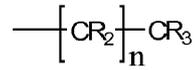


50 donde R es un grupo fluorocarbono; y grupos carboxilato definidos por la fórmula:



donde R es un grupo fluorocarbono.

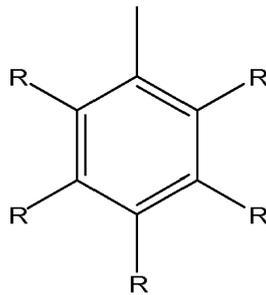
Una sexta realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a quinta, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono definido por la fórmula:



donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor.

10

Una séptima realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a sexta, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono definido por la fórmula:

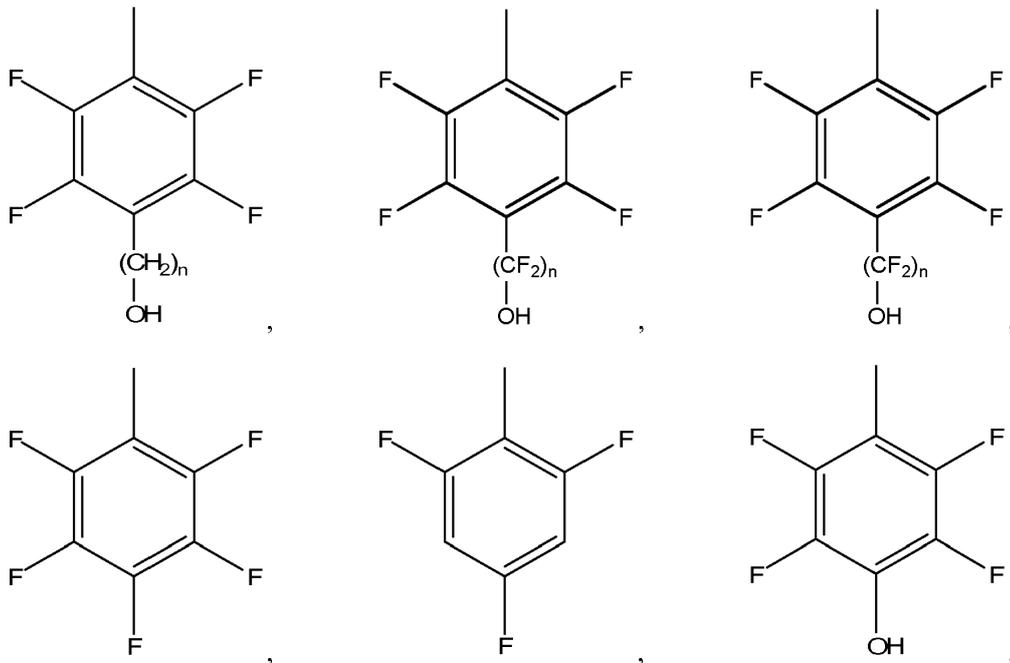


15

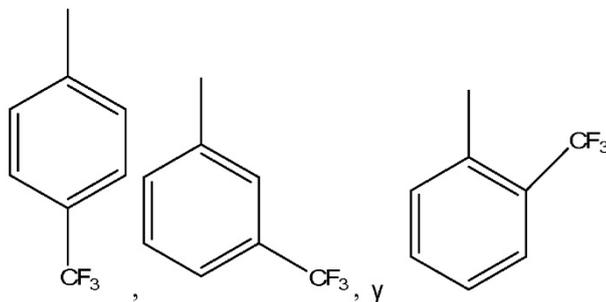
donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo, un grupo hidrocarbano, o un grupo fluorocarbono.

Una octava realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a séptima, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono aromático seleccionado del grupo que consiste en:

20

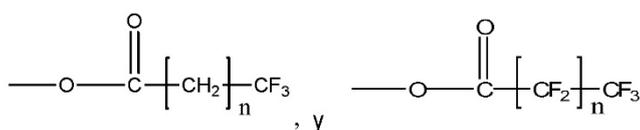


25



donde n es de 0 a 9.

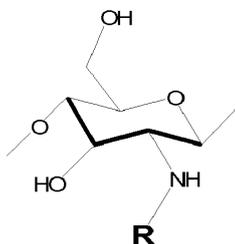
- 5 Una novena realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a octava, donde el grupo flúor pendiente es un grupo carboxilato seleccionado del grupo que consiste en:



10 donde n es de 0 a 20.

Una décima realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a novena, donde el grupo flúor pendiente está unido a una cadena de polisacáridos a través de una unidad de polisacárido definida por la fórmula:

15



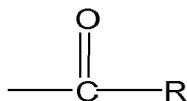
donde R es un grupo flúor.

- 20 Según un segundo aspecto, en una undécima realización, la presente invención proporciona un método de preparación de un hidrogel que comprende: polímeros reticulados, los polímeros tienen cadenas principales de polisacáridos, donde las cadenas principales de polisacáridos tienen un grupo flúor pendiente y un grupo reticulable unidos a las mismas; y cargando el polímero reticulado con gas O₂ disuelto.

- 25 Una duodécima realización proporciona un procedimiento como en la undécima realización donde la etapa de reticulación del polímero se inicia por fotoiniciación.

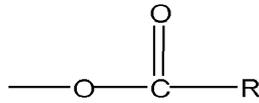
Una decimotercera realización proporciona un hidrogel como en cualquiera de las realizaciones primera a duodécima, donde el grupo flúor pendiente se selecciona del grupo que consiste en grupos fluorocarbono; grupos carbonilo

30 definidos por la fórmula:



donde R es un grupo fluorocarbono; y

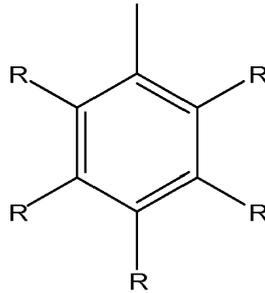
35 grupos carboxilato definidos por la fórmula:



donde R es un grupo fluorocarbono.

5

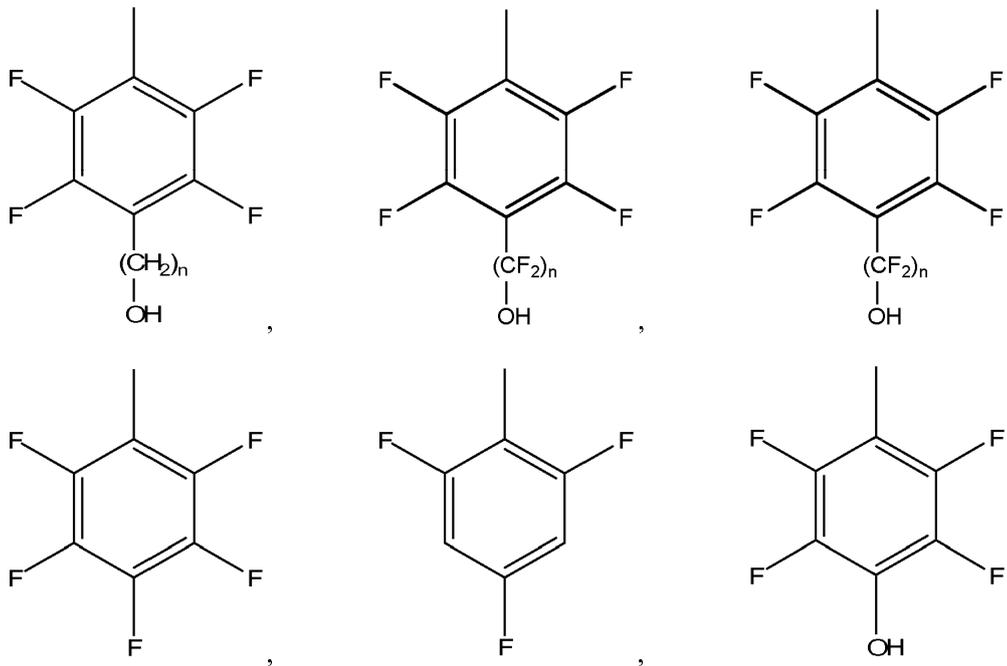
Una decimocuarta realización proporciona un procedimiento como en cualquiera de las realizaciones undécima a decimotercera, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono definido por la fórmula:



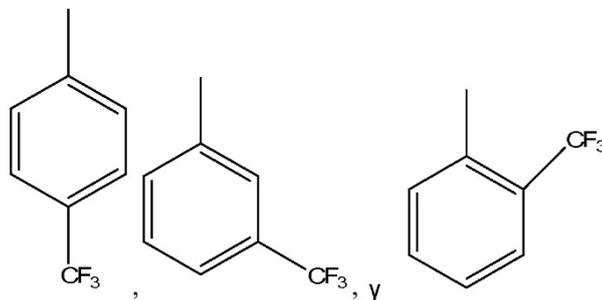
10

donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo, un grupo hidrocarbónico, o un grupo fluorocarbono.

Una decimoquinta realización proporciona un procedimiento como en cualquiera de las realizaciones undécima a decimocuarta, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono aromático seleccionado del grupo que consiste en:

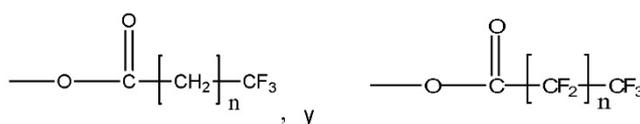


20



donde n es de 0 a 9.

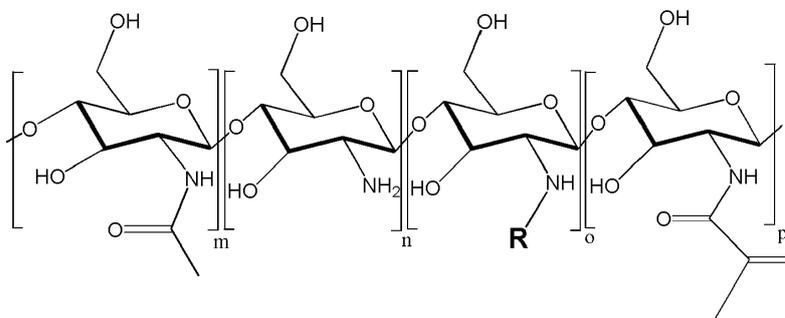
5 Una decimosexta realización proporciona un procedimiento como en cualquiera de las realizaciones undécima a decimoquinta, donde el grupo flúor pendiente es un grupo carboxilato seleccionado del grupo que consiste en:



10 donde n es de 0 a 20.

Una vigésima primera realización proporciona un procedimiento como en cualquiera de las realizaciones undécima a decimosexta, donde el polímero polisacárido es un copolímero aleatorio de unidades de sacáridos definido por la fórmula:

15



20 donde R un grupo flúor, m es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % del total de unidades de sacáridos, n es de aproximadamente 15 % a aproximadamente 70 % del total de unidades de sacáridos, o es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % del total de unidades de sacáridos, y p es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % del total de unidades de sacáridos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 proporciona una metodología sintética para la creación de una o más realizaciones.

La Figura 2 proporciona una metodología sintética para la creación de una o más realizaciones.

30 La Figura 3 proporciona un diagrama de una cámara de absorción/liberación de oxígeno. Los puertos están unidos a los tubos con válvulas para permitir la apertura y el cierre. El punto de detección interactúa con un sensor óptico de trazas de oxígeno conectado a un ordenador para la recolección de datos.

La Figura 4 proporciona un espectro 19F RMN de alta resolución para una o más realizaciones, MAC(Ali5)F, confirmando las sustituciones de flúor.

35

La Figura 5 proporciona un espectro ^{19}F RMN de alta resolución para una o más realizaciones, MAC(Ar5F), confirmando las sustituciones de flúor.

La Figura 6 proporciona un espectro ^{19}F RMN de alta resolución para una o más realizaciones, MAC(Al i 5)F, confirmando las sustituciones de flúor.

La Figura 7 proporciona absorción de oxígeno, de una comparación y una o más realizaciones, MAC, MAC(Al i 5)F, MAC(Ar5)F y MAC(Al i 15)F (I, II, III y IV) a TA (temperatura ambiente) en 5 % CO_2 /95 % aire en condiciones estáticas a TA. Los hidrogeles estaban compuestos de 2 % en peso de MAC o MACF, con volúmenes de hidrogel de 9,6 cm^3 .
10 Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.

La Figura 8 proporciona desorción de oxígeno, de una comparación y una o más realizaciones, MAC, MAC(Al i 5)F, (I* y II*) a TA en 5 % CO_2 /95 % aire en condiciones estáticas a TA. Los hidrogeles estaban compuestos de 2 % en peso de MAC o MACF, con volúmenes de hidrogel de 9,6 cm^3 . Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.
15

La Figura 9 proporciona desorción de oxígeno, de una o más realizaciones, MAC(Ar5)F (III*) a TA en 5 % CO_2 /95 % aire en condiciones estáticas a TA. Los hidrogeles estaban compuestos de 2 % en peso de MAC, con volúmenes de hidrogel de 9,6 cm^3 . Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.

La Figura 10 proporciona desorción de oxígeno, de una o más realizaciones, MAC(Al i 5)F (III*) a TA en 5 % CO_2 /95 % aire en condiciones estáticas a TA. Los hidrogeles estaban compuestos de 2 % en peso de MAC con volúmenes de hidrogel de 9,6 cm^3 . Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.
20

La Figura 11 proporciona tres ciclos repetidos de absorción y liberación de oxígeno para una o más realizaciones, MAC(Al i 5)F, mostrando la absorción (II) y la correspondiente liberación (II*) a TA. Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.
25

La Figura 12 proporciona tres ciclos repetidos de absorción y liberación de oxígeno para una o más realizaciones, MAC(Ar5)F, mostrando la absorción (III) y la correspondiente liberación (II*) a TA. Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.
30

La Figura 13 proporciona tres ciclos repetidos de absorción y liberación de oxígeno para una o más realizaciones, MAC(Al i 15)F, mostrando la absorción (IV) y la correspondiente liberación (IV*) a TA. Cada punto de datos representa $n = 3$, media \pm DE.
35

La Figura 14 proporciona ensayos (A) metabólico MTT y (B) de ADNdc total PicoGreen de cultivos de células de fibroblastos para una o más realizaciones. MAC(Al i 5)F, MAC(Ar5)F y MAC(Al i 15)F sin recarga de oxígeno ($-\text{O}_2$) o con recarga ($+\text{O}_2$) a 4 min día^{-1} , excepto para MAC(Al i 15)F, que recibió 4 min 4 días^{-1} . Inicialmente, se sembraron 9,5 x 10³ células (línea punteada) sobre los hidrogeles y se cultivaron en condiciones normales (5 % de CO_2 , 37°C) durante 4 días. ***Diferencia significativa en $P < 0,0001$; **diferencia significativa en $P = 0,007$). Las letras sobre los corchetes de agrupación son significativamente diferentes entre sí por ANOVA multifactorial ($P < 0,0001$). Todos los datos $n = 3$, medias \pm DE.
40

La Figura 15 proporciona un gráfico de una o más realizaciones, MAC/MAC(Al i 5)F, que muestra un metabolismo mejorado con más flúor y oxígeno suplementarios. Los resultados se informan como tasa de cambio en comparación con las regiones 100 % MAC- O_2 . ***Diferencia significativa por ANOVA trifactorial ($P < 0,0001$). Todos los datos $n = 3$, medias \pm DE.
45

La Figura 16 proporciona un gráfico de una o más realizaciones, MAC/MAC(Ar5)F, que muestra un metabolismo mejorado con más flúor y oxígeno suplementario. Los resultados se informan como tasa de cambio en comparación con las regiones 100 % MAC- O_2 . ***Diferencia significativa por ANOVA trifactorial ($P < 0,0001$). Todos los datos $n = 3$, medias \pm DE.
50

La Figura 17 proporciona un gráfico de una o más realizaciones, MAC/MAC(Al i 15)F, que muestra un metabolismo mejorado con más flúor y oxígeno suplementario. Los resultados se informan como tasa de cambio en comparación con las regiones 100 % MAC- O_2 . ***Diferencia significativa por ANOVA trifactorial ($P < 0,0001$). Todos los datos $n = 3$, medias \pm DE.
55

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

En una o más realizaciones, la presente invención proporciona un hidrogel formado por un polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente. Los flúor permiten que el hidrogel disuelva el oxígeno, que luego puede liberarse del hidrogel a un área de baja concentración de oxígeno. En una o más realizaciones, el hidrogel puede liberar oxígeno a una herida. En una o más realizaciones, el hidrogel incluye grupos acetilamino. En esta o más realizaciones, el hidrogel incluye grupos amino. Para los fines de esta memoria descriptiva, el hidrogel formado por un polímero reticulado que tiene grupos fluorados pendientes se denomina hidrogel fluorado.

En una o más realizaciones, el polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente es un hidrogel fluorado que comprende sustancialmente agua. En una o más realizaciones, el polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente es un hidrogel fluorado que puede comprender al menos 90 % de agua. En una o más realizaciones, el polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente es un hidrogel fluorado que puede comprender al menos 97 % de agua. En una o más realizaciones, el polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente es un hidrogel fluorado que puede comprender al menos 99 % de agua. Para los propósitos de esta memoria descriptiva, el polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente puede denominarse un polímero de hidrogel fluorado.

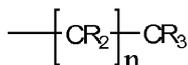
Con el entendimiento de que los hidrogeles son matrices de polímeros, o polímeros reticulados, que absorben agua, en una o más realizaciones, el hidrogel fluorado es un polímero reticulado al menos parcialmente seco capaz de absorber medios acuosos muy parecidos a una esponja. Los expertos en la materia pueden referirse a esto como comportamiento de hinchazón. Un hidrogel fluorado que está al menos parcialmente seco puede denominarse hidrogel fluorado seco o una esponja. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado seco puede estar sustancialmente deshidratado o completamente deshidratado.

El hidrogel fluorado puede absorber oxígeno cuando se mueve de un entorno inicial a un entorno de mayor tensión de oxígeno. El hidrogel fluorado tras la exposición a un entorno de tensión de oxígeno más baja puede liberar oxígeno.

En su sentido más amplio, un grupo flúor debe entenderse como un grupo que incluye al menos un átomo de flúor. En una o más realizaciones, el flúor está unido directamente a un átomo de carbono. En una o más realizaciones, el grupo flúor es un grupo flúor pendiente. Un grupo flúor pendiente está unido de forma pendiente a un polímero o a un hidrogel. En otras palabras, un grupo flúor pendiente es una cadena lateral que está unida a la cadena o eje principal de un polímero o un hidrogel.

En una o más realizaciones, el grupo flúor puede ser un grupo fluorocarbono. En una o más realizaciones, un grupo fluorocarbono puede ser un grupo hidrocarburo donde uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos con un átomo de flúor. Los grupos fluorocarbono adecuados que pueden estar sustituidos con átomos de flúor incluyen grupos alquilo tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, terc-butilo, n-butilo, sec-butilo, isopentilo, terc-pentilo, n-pentilo, sec-pentilo, terc-hexilo, n-hexilo, isohexilo y sec-hexilo. Para el propósito de esta descripción, el término fluorocarbono y perfluorocarbono se pueden usar indistintamente. Por simplicidad, el perfluorocarbono puede abreviarse PFC.

En una o más realizaciones, un grupo fluorocarbono puede definirse mediante la fórmula:

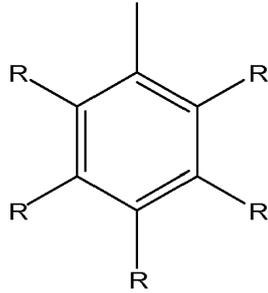


donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor. En una o más realizaciones, n puede variar de 0 a 20. En una o más realizaciones, n puede variar de 1 a 9. En una o más realizaciones, n puede variar de 6 a 8.

Ejemplos específicos de grupos fluorocarbono incluyen $-\text{CF}_3$, $-(\text{CF}_2)_n-\text{CF}_3$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{CF}_3$, y $-(\text{CH}_2)_n-(\text{CF}_2)_n-\text{CF}_3$. En una o más realizaciones, n puede variar de 0 a 20. En una o más realizaciones, n puede variar de 1 a 9. En una o más realizaciones, n puede variar de 6 a 8.

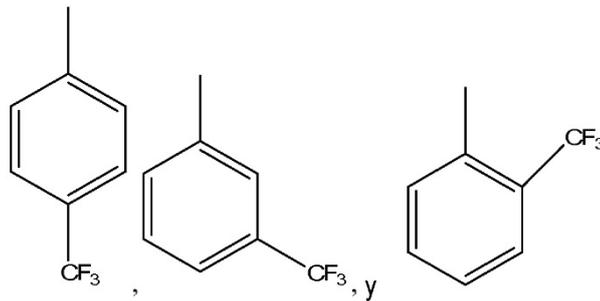
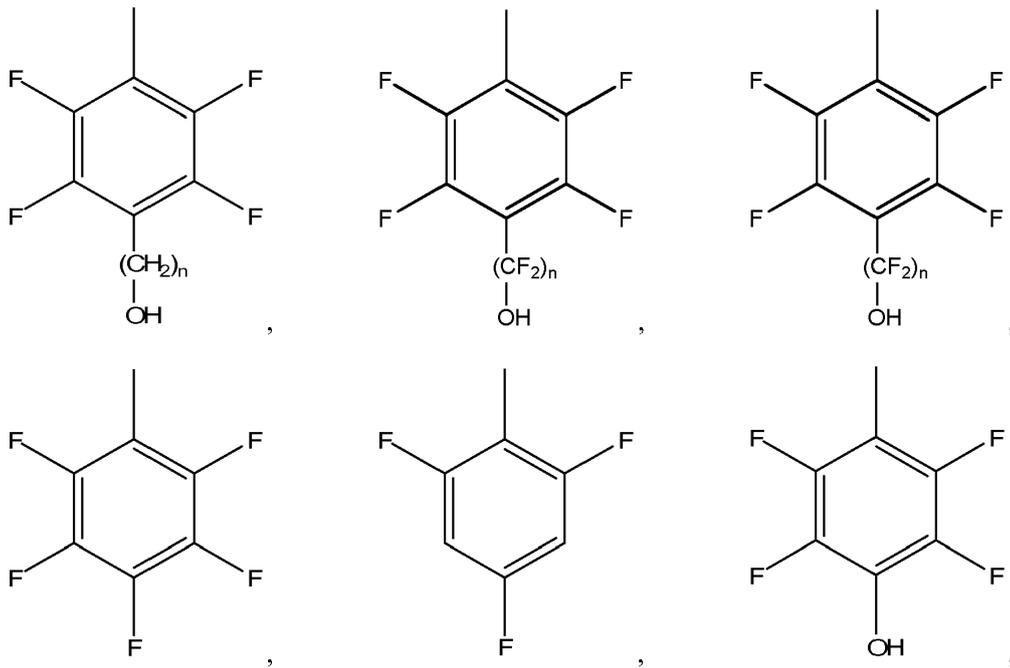
En una o más realizaciones, el fluorocarbono puede ser un grupo fluorocarbono aromático. En una o más realizaciones, un grupo fluorocarbono aromático puede ser definido como un grupo aromático donde uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos con un átomo de flúor. En una o más realizaciones, un grupo fluorocarbono aromático puede definirse mediante la fórmula:

55



donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo, un grupo hidrocarbano o un grupo fluorocarbano. Ejemplos específicos de grupos fluorocarbano aromáticos incluyen

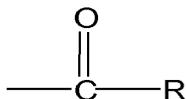
5



10

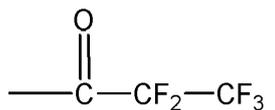
En una o más realizaciones, n puede variar de 0 a 9. En una o más realizaciones, n puede variar de 1 a 6. En una o más realizaciones, n puede variar de 2 a 4.

15 En una o más realizaciones, el grupo flúor puede ser un grupo carbonilo definido por la fórmula:



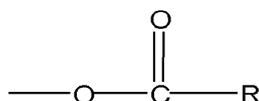
donde R es un grupo fluorocarbono. Ejemplos específicos de carbonilo definidos por la fórmula anterior incluyen grupos que incluyen

5

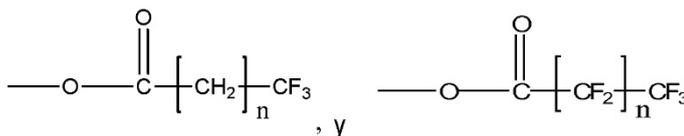


En una o más realizaciones, el grupo flúor puede ser un grupo carboxilato definido por la fórmula:

10



donde R es un grupo fluorocarbono. Ejemplos específicos de grupos carboxilato definidos por la fórmula anterior incluyen



15

En una o más realizaciones, n puede variar de 0 a 20. En una o más realizaciones, n puede variar de 1 a 9. En una o más realizaciones, n puede variar de 6 a 8.

20 En una o más realizaciones, el grupo flúor se puede unirse primero a un monómero que se puede polimerizar opcionalmente con otros comonómeros. En otras realizaciones, el grupo fluorocarbono puede estar unido a un polímero o hidrogel preformado.

25 En una o más realizaciones, el grupo flúor puede estar unido a un monómero, polímero o hidrogel que incluye una fracción reaccionable. Fracciones reaccionables adecuadas incluyen grupos hidroxilo, grupos amino, grupos de ácido carboxílico, grupos sulfhidrilo, grupos maleimida y grupos tirosina. En estas u otras realizaciones, un compuesto de flúor se une al monómero, polímero o hidrogel a través de la fracción reaccionable. Un compuesto de flúor adecuado puede seleccionarse de compuestos que incluyen un grupo flúor y un grupo seleccionado de grupos halógeno, grupos de ácido carboxílico, grupos alcohol, grupos aldehído y haluros de acilo. Otros compuestos de flúor adecuados son
30 los anhídridos ácidos de ácidos carboxílicos fluorados.

35 En una o más realizaciones, se puede formar un hidrogel fluorado reticulando un polímero que incluye un grupo flúor y un grupo capaz de ser reticulado. En una o más realizaciones, el grupo capaz de ser reticulado puede unirse primero a un monómero que se puede polimerizar opcionalmente con otros comonómeros. En estas u otras realizaciones, el grupo fluorado puede unirse a un monómero y copolimerizarse con el grupo capaz de reticularse o añadirse después de la polimerización. En otras realizaciones, el grupo capaz de ser reticulado puede estar unido a un polímero preformado. En estas u otras realizaciones, el polímero puede contener grupos fluorados. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede unirse antes o después de la formación de un hidrogel.

40 En una o más realizaciones, se puede preparar un hidrogel fluorado reticulando el polímero con un iniciador radical. Iniciadores radicales adecuados incluyen compuestos azoicos y peróxidos orgánicos. Ejemplos de iniciadores radicales pueden incluir persulfato de amonio y metabisulfito de sodio, o fijadores como gluraldehído, formaldehído, acetona, metanol y etanol.

45 En ciertas realizaciones, el iniciador radical empleado para reticular el polímero puede ser un fotoiniciador. En estas u otras realizaciones, se puede preparar un hidrogel fluorado iniciando una reacción de reticulación exponiendo el reticulante a la luz. Fotoiniciadores adecuados incluyen fotoiniciadores usados comúnmente para aplicaciones

biológicas. Ejemplos de fotoiniciadores incluyen 4-(2-hidroxi-2-propil)cetona, 1-hidroxiciclohexil benzofenona y 2,2-dimetoxi-1,2-di(fenil)etanona.

5 En una o más realizaciones, el grupo capaz de ser reticulado es un grupo alqueno. En una o más realizaciones, un grupo alqueno es un grupo hidrocarbilo o hidrocarbilo sustituido que incluye al menos un doble enlace carbono-carbono. Grupos hidrocarbilo sustituidos incluyen grupos en los que un carbono o un hidrógeno se reemplaza con un heteroátomo. Heteroátomos ejemplares incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, cloro, bromo y yodo. En una o más realizaciones, el grupo alqueno es un grupo vinilo. En una o más realizaciones, el grupo alqueno es un grupo carbonilo α,β no saturado. Ejemplos específicos de grupos alqueno incluyen grupos metacrílicos o acrilatos.

10 En ciertas realizaciones, se puede preparar un hidrogel reticulando el polímero a través de la adición de Michael. En esta u otra realización, una molécula de reticulación con al menos dos grupos nucleófilos puede reticular un polímero que contiene grupos alqueno. Una molécula de reticulación puede ser una molécula con al menos dos grupos sulfhidrilo.

15 En una o más realizaciones, el grupo capaz de ser reticulado es un grupo sulfhidrilo. Los expertos en la materia reconocerán que un grupo sulfhidrilo también puede denominarse como un grupo tiol. La reticulación se puede lograr a través de enlaces disulfuro que se forman a partir de la oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH). En una o más realizaciones, se puede agregar una molécula de reticulación separada con sulfhidrilos que terminan en cualquier extremo para reticular cadenas de polímero juntas mediante la formación de dos enlaces disulfuro. Los ejemplos de moléculas de reticulación separadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias cortas de aminoácidos /péptidos, PEG, cadenas de hidrocarburos. Se prefieren condiciones acuosas con un pH entre 3 y 8 para la formación de enlaces covalentes estables.

25 En una o más realizaciones, el grupo sulfhidrilo puede reaccionar con un grupo alqueno en otra cadena de polímero o molécula reticuladora separada para formar una reticulación de enlaces covalentes. Los expertos en la materia reconocerán como adición de Michael o reacción de Michael. Se prefieren condiciones acuosas con un pH entre 3 y 8 para la formación de enlaces covalentes estables.

30 En una o más realizaciones, el grupo sulfhidrilo puede reaccionar con un grupo maleimida en otra cadena de polímero o molécula reticuladora separada para formar una reticulación de enlaces covalentes. Se prefieren condiciones acuosas con un pH entre 3 y 8 para la formación de enlaces covalentes estables.

35 En una o más realizaciones, el grupo capaz de ser reticulado es un grupo tirosina. El grupo tirosina puede reaccionar con un grupo tirosina en otra cadena de polímero o molécula reticuladora separada para formar una reticulación de enlaces covalentes. Las condiciones adecuadas para la reticulación son en presencia de peroxidasa de rábano y peróxido (H_2O_2) a 1-50 mM.

40 En una o más realizaciones, los hidrogeles fluorados se preparan reticulando un polímero que comprende un grupo reticulado y un grupo flúor. En una o más realizaciones, el polímero comprende además un grupo acetilamino. En una o más realizaciones, el grupo acetilamino puede estar unido de forma pendiente al polímero. En una o más realizaciones, el polímero comprende además un grupo amino. En una o más realizaciones, el grupo amino puede estar unido de forma pendiente al polímero. En una o más realizaciones, el polímero es soluble en agua.

45 En una o más realizaciones, la relación de grupos reticulables a grupos flúor es aproximadamente 1:1 a 1:5 o 5:1. En una o más realizaciones, la relación de grupos reticulables a grupos flúor es aproximadamente 1:1 a 1:3 o 3:1. En una o más realizaciones, la relación de grupos reticulables a grupos flúor es aproximadamente 1:1 a 1:2 o 2:1.

50 La cantidad de grupos flúor también puede considerarse en términos de porcentaje de grupos sustituidos. En una o más realizaciones, el polímero que comprende un grupo reticulado y un grupo flúor puede contener 10 % a 25 % de grupos reticulables y 10 % a 40 % de grupos flúor. En una o más realizaciones, donde el polímero que comprende un grupo reticulado y un grupo flúor comprende además un grupo acetilamino, el grupo acetilamino puede estar presente hasta 20 %. En una o más realizaciones, donde el polímero que comprende un grupo reticulado y un grupo flúor comprende además un grupo amino, el grupo amino puede estar presente de 15 % a 70 %.

55 En una o más realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 5.000 a 40.000 Da. En una o más realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 a 30.000 Da. En una o más realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 15.000 a 25.000 Da.

60

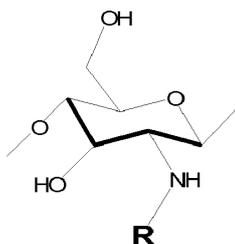
En una o más realizaciones, los polímeros incluyen aquellos con una fracción reaccionable. Fracciones reaccionables adecuadas incluyen grupos hidroxilo, grupos amino, grupos de ácido carboxílico, grupos sulfhidrilo, grupos maleimida, grupos tirosina o combinaciones de los mismos.

5 Polímeros ejemplares incluyen polietileno glicol, poli(N-isopropilacrilamida), poliacrilamida, péptidos o una combinación de los mismos.

En una o más realizaciones, el polímero puede ser un polisacárido. Polisacáridos ejemplares incluyen quitosano, dextrano, ácido hialurónico, agarosa, alginato, almidón, celulosa, glucógeno, carragenanos, galactomananos y
10 combinaciones de los mismos.

En una o más realizaciones, el polisacárido se compone de unidades de sacárido polimerizado. Para el propósito de esta memoria descriptiva, una unidad de sacárido es una unidad mer de un polímero de polisacárido. En una o más realizaciones, el polímero de polisacárido puede estar compuesto por unidades de sacárido que tienen una
15 funcionalidad. En estas u otras realizaciones, el polímero de polisacárido puede comprender una unidad de sacárido que incluye un grupo fluorocarbono y una unidad de sacárido que incluye un grupo alqueno. En una o más realizaciones, el polímero de polisacárido puede comprender además una unidad de sacárido que incluye un grupo acetilamino. En esta u otras realizaciones, el polímero de polisacárido puede comprender además una unidad de sacárido que incluye un grupo acetilamino.
20

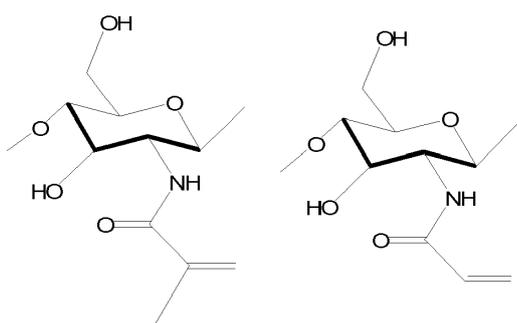
En una o más realizaciones, los polisacáridos pueden incluir una unidad de sacárido que incluye un grupo fluorocarburo definido por la fórmula:

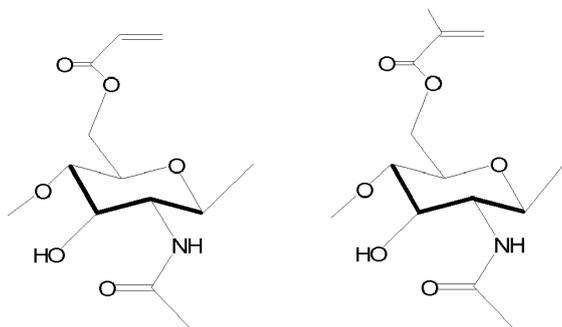


25 donde R es un grupo flúor.

En una o más realizaciones, los polisacáridos pueden incluir una unidad de sacárido que incluye un grupo alqueno definido por una de las fórmulas:

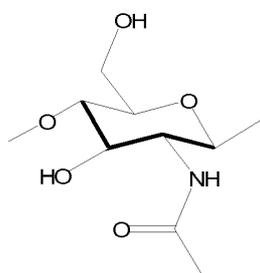
30





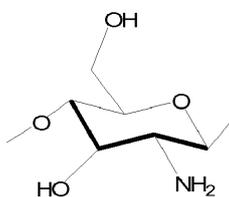
En una o más realizaciones, los polisacáridos pueden incluir una unidad de sacárido que incluye un acetilamino definido por una de las fórmulas:

5



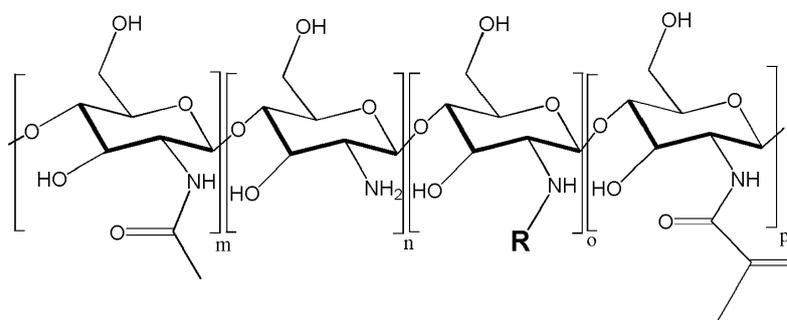
En una o más realizaciones, los polisacáridos pueden incluir una unidad de sacárido que incluye amino definido por la fórmula:

10



En una o más realizaciones, el polímero polisacárido es un copolímero aleatorio de unidades de sacáridos definido por la fórmula:

15



donde R un grupo flúor, m es de aproximadamente 0 % a aproximadamente 20 % del total de unidades de sacáridos, n es de aproximadamente 15 % a aproximadamente 70 % del total de unidades de sacáridos, o es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % del total de unidades de sacáridos, y p es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % del total de unidades de sacáridos.

En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede cargarse con oxígeno colocando un hidrogel fluorado o una

esponja de polímero deshidratada que comprende un polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente en una solución acuosa. Antes o durante la adición del hidrogel fluorado o una esponja polimérica deshidratada que comprende un polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente, se puede agregar oxígeno a la solución acuosa haciendo burbujear gas oxígeno a través de la solución o agregando una solución oxigenada que contacta con el polímero. El hidrogel fluorado también puede cargarse con oxígeno al aumentar la presión parcial del gas oxígeno en el ambiente que rodea el hidrogel fluorado.

En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado tiene una capacidad de absorción de oxígeno. La capacidad de absorción de oxígeno se refiere a la presión parcial de oxígeno absorbido por el hidrogel fluorado por unidad de masa del hidrogel fluorado seco. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede tener una capacidad de absorción de oxígeno de al menos 2 mmHg de presión parcial de oxígeno (P_{O_2})/mg polímero a 20 °C y 760 mmHg. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede tener una capacidad de absorción de oxígeno de al menos 20 mmHg P_{O_2} /mg polímero a 20 °C y 760 mmHg. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede tener una capacidad de absorción de oxígeno de al menos 20 mmHg P_{O_2} /mg polímero a 20 °C y 760 mmHg.

El uso de hidrogeles fluorados es ventajoso porque el hidrogel fluorado puede cargarse repetidamente con oxígeno disuelto y luego liberar dicho oxígeno. La capacidad del hidrogel fluorado para cargarse con oxígeno disuelto se puede denominar ciclo de regeneración. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede experimentar 3 o más ciclos de regeneración con una pérdida de capacidad de oxígeno de menos de 10 %. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede experimentar 3 o más ciclos de regeneración con una pérdida de capacidad de oxígeno de menos de 7 %. En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede experimentar 3 o más ciclos de regeneración con una pérdida de capacidad de oxígeno de menos de 5 %.

En una o más realizaciones, la solubilidad en oxígeno del hidrogel fluorado puede mejorarse en al menos un orden de magnitud sobre la solubilidad en oxígeno del hidrogel no fluorado. La solubilidad del oxígeno se puede medir utilizando un sensor de oxígeno disuelto u otros procedimientos colorimétricos establecidos.

Los hidrogeles fluorados disuelven O_2 , así como otras especies oxigenadas, como CO_2 , CO y NO, por difusión. Por lo tanto, los hidrogeles fluorados pueden utilizarse no solo para suministrar oxígeno, sino también para eliminar el gas dióxido de carbono residual o mitigar las especies reactivas de oxígeno. Grupos fluorados del hidrogel fluorado también pueden usarse para disolver otras moléculas tales como CO_2 , CO o NO solo o en combinación con O_2 . Por ejemplo, se puede preparar un vendaje para heridas que administrará NO y O_2 simultáneamente a una herida.

En una o más realizaciones, el hidrogel fluorado tiene propiedades hemostáticas ventajosas. En esta o más realizaciones, el hidrogel fluorado puede incluir grupos amino. Se cree que la carga positiva neta que liberan las aminas primarias en el quitosano conduce a una mayor adsorción de proteínas que impulsa el reclutamiento de plaquetas y toda la vía de curación.

En una o más realizaciones, se puede usar un hidrogel o esponja fluorada para preparar un vendaje para heridas. El hidrogel fluorado o la esponja se pueden cortar a la forma para preparar un vendaje para heridas. Alternativamente, un polímero que contiene un grupo reticulable y un grupo flúor pendiente puede colocarse en un molde y luego reticularse.

En una o más realizaciones, un vendaje para heridas preparado a partir de un hidrogel fluorado puede cargarse con oxígeno y luego sellarse en un paquete hermético. El vendaje para heridas puede almacenarse sin pérdida de oxígeno y colocarse en el sitio de la herida en un momento posterior.

En una o más realizaciones, se puede preparar un vendaje para heridas administrando un polímero que contiene un grupo flúor pendiente a un sitio de la herida y luego reticulando el polímero para preparar un hidrogel fluorado en el sitio de la herida. El hidrogel fluorado puede cargarse con oxígeno antes o después de la etapa de reticulación.

En una o más realizaciones, se puede preparar un vendaje para heridas a partir de una esponja que comprende un polímero reticulado que contiene un grupo flúor pendiente. En una o más realizaciones, el vendaje para heridas preparado a partir de una esponja puede hidratarse y luego aplicarse a una herida. En una o más realizaciones, el vendaje para heridas preparado a partir de una esponja puede hidratarse por humedad secretada por la herida.

Los vendajes para heridas pueden tener opcionalmente un refuerzo. En una o más realizaciones, el refuerzo del vendaje para heridas puede proporcionar una o más características ventajosas tales como el intercambio de gases impermeables a la rigidez y el intercambio de gases limitado con la atmósfera abierta. En estas u otras realizaciones, se puede aplicar un adhesivo al refuerzo del vendaje para heridas.

En una o más realizaciones, la carga con oxígeno de un hidrogel fluorado puede tener lugar por medios químicos. En estas u otras realizaciones, se puede usar un peróxido metálico en combinación con el hidrogel para producir oxígeno tras la hidratación. Ejemplos de peróxidos metálicos adecuados para producir oxígeno tras la hidratación incluyen

5 CaO₂, MgO₂ y combinaciones de los mismos.

En realizaciones particulares, se puede colocar un peróxido metálico en una membrana sellada y, tras la hidratación, el peróxido metálico reaccionará para formar y liberar oxígeno. La membrana sellada puede estar unida al hidrogel fluorado. Por ejemplo, se puede preparar un vendaje para heridas que incluye una membrana sellada unida a un

10 hidrogel seco. Los vendajes para heridas pueden tener opcionalmente un refuerzo. Tras la hidratación de la membrana y el hidrogel fluorado seco, se forma y libera oxígeno. El oxígeno puede ser disuelto por el hidrogel fluorado. La membrana sellada también puede incluirse por separado y aplicarse más tarde al hidrogel.

En una o más realizaciones, el peróxido metálico puede incluirse en el hidrogel fluorado. Por ejemplo, el peróxido

15 metálico puede encapsularse junto con el hidrogel en el momento de la reticulación.

A la luz de lo anterior, debe apreciarse que la presente invención avanza significativamente en la técnica al proporcionar un hidrogel fluorado que se mejora estructural y funcionalmente de varias maneras. Si bien las realizaciones particulares de la invención se han revelado en detalle en esta invención, debe apreciarse que la

20 invención no está limitada a las mismas, y que las variaciones de la invención en esta invención serán fácilmente apreciadas por los expertos en la materia. El alcance de la invención se apreciará a partir de las reivindicaciones que siguen.

EJEMPLOS

25

1. Materiales y procedimientos

El quitosano de metacrilamida fotopolimerizable (MAC) se sintetizó modificando el quitosano de peso molecular medio (MW 190,000-230,000 Da, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con anhídrido metacrílico (Sigma) para producir MAC que

30 contiene 23 % de grupos metacrílicos. El grado de desacetilación del quitosano se determinó mediante ¹H RMN como se describió anteriormente y se encontró que era 84 %. Brevemente, MAC se disolvió en 0,25 % DCI en D₂O al 0,5 % (w/v), luego se registró el espectro 1H RMN (espectrómetro de RMN Varian 400 MHz, Palo Alto, CA). El grado de metacrilación se calculó comparando el área integrada de los picos H2-H6 a 2.8-4.0 ppm con la de los picos de metileno a 5,6 y 6,0 ppm Para agregar fracciones PFC, el quitosano se modificó primero con ligandos fluorados

35 (anhídrido pentafluoropropiónico, 2, 3,4,5,6-pentafluorobenzaldehído y cloruro de pentadecafluorooctanoilo (Sigma-Aldrich) seguido de anhídrido metacrílico para producir metacrilamidaquitosanos fluorados (MACF). La metodología sintética (Fig. 1 y Fig. 2) fue formulada para permitir la creación de hidrogeles de MACF por polimerización radical.

1.1. Preparación de anhídrido de pentafluoropropiónico metacrilamida modificado quitosano (MAC(Ali5)F)

40

El quitosano se disolvió por primera vez en 3 % w/v in 2 % vol. ácido acético/agua. Se modificó una metodología de síntesis previamente informada para preparar MAC(Ali5)F. Para la reacción, se añadió anhídrido pentafluoropropiónico 0,141 M a la solución de quitosano y se agitó durante 48 h a baja velocidad (60 rpm) a temperatura ambiente (TA). La solución se colocó luego en una membrana de diálisis (límite de peso molecular de 12.000-14.000 Spectra/Por,

45 Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA) y se dializó contra agua desionizada durante 3 días con tres cambios por día, luego se liofilizó. Este producto se disolvió en 2 % en volumen de ácido acético/agua, modificado con anhídrido metacrílico como se describió anteriormente, luego liofilizado para producir MAC(Ali5)F.

1.2. Preparación de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehído modificado metacrilamida quitosano (MAC(Ar5)F)

50

Primero se mezclaron 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehído 0,04 M y cianoborohidruro de sodio 0,085 M con 10 ml de metanol al 100 %. A continuación, se añadió 10,58 g de 3 % w/v solución quitosano/ácido acético y se agitó a baja velocidad (60 rpm) durante 48 h a TA. Esta metodología sintética se basó en trabajos previamente reportados. La mezcla de reacción se dializó luego contra agua desionizada durante 3 días con tres cambios por día, luego se liofilizó.

55 El producto liofilizado que contiene quitosano se disolvió en 2 % en volumen de ácido acético/agua y reaccionó adicionalmente con anhídrido metacrílico para producir MAC(Ar5)F.

1.3. Preparación de metacrilamida quitosano modificado con cloruro de pentadecafluorooctanoilo (MAC(Ali15)F)

60

21,53 g al 3 % w/v de una solución de quitosano/ácido acético se mezcló con cloruro de pentadecafluorooctanoilo 0,14 M. La mezcla de reacción se agitó a baja velocidad (60 rpm) durante 24 h a TA. La solución se dializó luego contra agua desionizada durante 3 días con tres cambios por día, luego se liofilizó. Este quitosano liofilizado que contiene flúor se modificó adicionalmente con anhídrido metacrílico, como se describió anteriormente, para producir el producto 5 MAC(Ali15)F.

1.4. Preparación de hidrogeles e hidrogeles de gradiente.

Para la formación de hidrogel, MAC/MACF fue disuelto por primera vez en agua ultrapura (sistema MilliQ Direct 8 con resistencia de 18 MX, Millipore, Billerica, MA) al 2 % w/v y luego esterilizado por autoclave. Solución fotoiniciadora, 300 mg ml⁻¹ se añadió 1-hidroxiciclohexil fenil cetona (Sigma-Aldrich) en 1-vinil-2-pirrolidiona (Sigma-Aldrich,) a todas las soluciones a 3 µl g⁻¹ (solución iniciador/polímero). Estas soluciones se mezclaron y desgasificaron completamente (1 min, 3000 rpm, Speed Mixer DAC 150 FVZ, Hauschild Engineering, Hamm, Alemania). Antes de la polimerización, se purgaron muestras con exceso de N₂ para eliminar el oxígeno disuelto en el sistema. Las soluciones se transfirieron a una placa de pocillos para moldeo, y la polimerización se logró mediante exposición a luz UV (365 nm) durante 20 min.

[0077] Los sistemas de hidrogel en gradiente MAC/MAC(Ali5)F, MAC/MAC(Ar5)F y MAC/MAC(Ali15)F se prepararon mediante mezcla continua usando dos bombas de jeringa variables (Cole Palmer, Court Vernon Hills, IL) que se alimentaron a una sola salida. Los flujos se ajustaron de 0 a 1 o de 1 a 0 ml min⁻¹ para dos canales que contienen MAC y MACF, respectivamente. Los gradientes se crearon en una placa de cultivo rectangular de 20 x 40 mm ajustando el flujo de cada componente a ± 10 % cada 4,0 mm a medida que la salida se movía longitudinalmente a través del pozo.

25 1.5. Estudios de alta resolución 19F RMN de MACF

Para todas las cuantificaciones de RMN, se disolvieron quitosano, MAC y MACF en ácido acético deuterado al 2 % en volumen./D₂O. La existencia de sustituciones de flúor y la confirmación de las estructuras MACF se lograron mediante RMN de ¹⁹F de alta resolución (Varian pulsado a 400 MHz). Las áreas de pico correspondientes se utilizaron para calcular el grado de sustitución, similar al cálculo del grado de desacetilación usando ¹H RMN. Brevemente, el grado de fluoración (GF) se calculó utilizando la ecuación:

$$DF = \sum [1 + \{(I_{CFn}) / (I_{ref} / m_{ref})\}] \times 100\%$$

35 donde I_{CFn} representa la intensidad integral para cada pico de flúor y m es el número de flúor en cada pico. I_{ref} representa la intensidad integral de un grupo CF de referencia. Empleamos triclorofluorometano (CFCl₃) como referencia, y $m_{ref} = 1$

40 1.6. Estudios de absorción y liberación de oxígeno.

La capacidad de oxígeno de los hidrogeles (2 % w/v formado en placas de 6 pocillos, de 3,5 cm de diámetro por 1 cm de altura) se midió indirectamente mediante el estudio de la absorción de oxígeno y la cinética de liberación de la solución circundante en una cámara sellada utilizando un sensor de trazas de oxígeno (PreSens, Regensburg, Alemania) conectado a un ordenador que ejecuta OxyView PST6-V5.41 para la recopilación de datos (Fig. 3). Durante todas las mediciones de absorción y liberación, la cámara se mantuvo estancada para crear un entorno similar a las condiciones de cultivo o un vendaje para heridas. La absorción de oxígeno se midió colocando primero hidrogeles polimerizados purgados de nitrógeno en agua ultrapura saturada de oxígeno (burbujeada con O₂ puro a 258 mmHg durante 15 minutos) en el sistema sellado y luego midiendo la cantidad de oxígeno eliminado de la solución a medida que se adsorbía en el gel P_{O_2} de las soluciones fue monitoreado continuamente a TA. Los datos de P_{O_2} se adquirieron hasta que el sistema alcanzó el equilibrio. A continuación, la liberación de oxígeno se midió cambiando el agua del sistema a libre de oxígeno 5 % CO₂ agua ultrapura (burbujeada con 5 % CO₂/95 % aire a 258 mm Hg durante 15 min). Los datos de liberación de oxígeno P_{O_2} se registraron hasta que el sistema alcanzó el equilibrio. Las respuestas repetidas de absorción y liberación de oxígeno del hidrogel MACF se midieron durante tres ciclos para ver si ocurrieron cambios en la capacidad o cinética del oxígeno del hidrogel. Estos estudios fueron diseñados para evaluar si los hidrogeles de MACF podrían utilizarse como sistemas de suministro de oxígeno recargables.

Tabla 1. Metacrilamida fluorada quitosano

Nombre	Abreviatura	Grado de sustitución de PFC por monómero unitario (%)	Capacidad de adsorción de O ₂ (mmHg)	Capacidad de adsorción de O ₂ (mmHg)
Quitosano modificado por anhídrido metacrílico	MAC	0	0	0
Metacrilamida quitosano modificada por anhídrido pentafluoropropiónico	MAC(Ali5)F	37-40	47,34 ± 1,08	0,88 ± 0,21
2,3,4,5,6-Metacrilamida quitosano modificada por pentafluorobenzaldehído	MAC(Ar5)F	40-43	89,10 ± 2,11	3,79 ± 0,55
Metacrilamida quitosano modificada por pentadecafluorooctanoil cloruro	MAC(Ali15)F	39-43	134,20 ± 6,07	0,81 ± 0,37

.7. Experimentos de reología de hidrogel, hinchazón y escaneo de microscopía electrónica (SEM)

- 5 Para preparar muestras para reometría 10 ml de solución de MAC/MACF se vertió en un molde de silicona y se reticuló como se describió anteriormente. La lámina de hidrogel resultante se retiró del molde y se equilibró en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche. Se cortaron geles de 8 mm de diámetro de la lámina de hidrogel usando un punzón de biopsia redondo y se determinaron las propiedades mecánicas de cada grupo de hidrogel con un reómetro (Rheometric Scientific RFS-III, Piscataway, NJ). Las pruebas proporcionaron el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''). G^* se calculó, ya que incorpora tanto el módulo de almacenamiento como el de pérdida y se calculó directamente mediante el software de reometría (TA Orchestrator) utilizando el teorema de Pitágoras:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

15

Para estimar las relaciones de hinchamiento, 500 µl de hidrogel se reticularon durante 20 minutos y se liofilizaron. A continuación, se midieron sus masas secas (M_D), seguido de hinchamiento de los andamios de hidrogel previamente secos en 1 x PBS a 37 °C. El hinchamiento se completó en 24 h, de modo que no se observó un cambio notable en la masa de hidrogel después de este momento. Las muestras se centrifugaron cuidadosamente en coladores de células de 50 µm (1500 rpm) para eliminar cualquier PBS residual. La masa después del hinchamiento (M_S) se determinó cuando la masa ya no cambió y la relación de hinchamiento (Q_M) se calculó como:

$$Q_M = M_S / M_D$$

- 25 Las muestras se prepararon para SEM mediante la reticulación de hidrogeles como se describió anteriormente, seguido de liofilización. Se tomaron imágenes de las muestras usando un SEM ambiental FEI Quanta 200 (FEI, Hillsboro, OR).

1.8. Pruebas de biocompatibilidad in vitro.

30

Los fibroblastos NIH-3T3 se cultivaron en hidrogeles de MACF para, en primer lugar, confirmar si los hidrogeles que incorporan PFC eran realmente no tóxicos y, en segundo lugar, para determinar si los PFC proporcionan algún beneficio para mejorar la proliferación y la viabilidad celular. Los hidrogeles MACF y MAC se crearon mediante fotopolimerización en placas de 48 pocillos (11 mm de diámetro por 5 mm de alto), se lavaron con PBS, luego se recubrieron con 2,36 lg ml⁻¹ de colágeno de cola de rata durante 5 h y finalmente se lavaron con PBS. Se añadió colágeno para proporcionar uniones de integrina celular para maximizar las interacciones célula-material. Se ha demostrado previamente que esta concentración está en el intervalo óptimo para este propósito. Se sembraron fibroblastos sobre la superficie de MAC y los tres hidrogeles de MACF a una densidad celular real de 1 x 10⁴ células cm⁻². Se usó un medio químicamente definido para todos los cultivos celulares (Thera PEAK, Lonza, Basal, Suiza) que contiene 1 % penicilina/estreptomina (Life Technologies, Grand Island, NY). Los hidrogeles sembrados se colocaron

40

en una incubadora de cultivo celular (5 % de CO₂) mantenida a 37 °C. La mitad de los hidrogeles de MAC y MACF recibieron carga de oxígeno a través de burbujas de oxígeno puro en los pocillos de cultivo durante 4 minutos. Los grupos de tratamiento MAC, MAC(Ali5)F y MAC(Ar5)F que recibieron oxigenación inicial se reabastecieron con oxígeno durante 4 minutos cada 24 h. Los hidrogeles se cultivaron durante un total de 4 días, ya que las pruebas
5 preliminares revelaron que los fibroblastos se acercaban a la confluencia durante ese tiempo en las superficies con mayor proliferación. Al final del período de cultivo, se tomaron imágenes de los cultivos con un microscopio de campo brillante (Olympus IX-81, Tokio, Japón) y se prepararon para 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro (MMT) (Sigma-Aldrich) o Quant-iTPicoGreen (Life Technologies) total de ADN de doble cadena (ADNdc).

10 1.9. Análisis MTT

La actividad metabólica total de las células en cada hidrogel después de 4 días de cultivo se estimó utilizando el ensayo MTT. Brevemente, se preparó una solución madre de MTT (5 mg ml⁻¹) en PBS y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 μ m, luego se añadió a cada pocillo. Los hidrogeles sembrados con células y los controles
15 sembrados se incubaron en medio químicamente definido (medio sin rojo de fenol) durante 5 h en una Incubadora con 5 % de CO₂ a 37°C para permitir que el ensayo desarrollase la sal púrpura de formazán. A continuación, el medio se retiró cuidadosamente y la sal de formazán se disolvió agregando 100 μ l de DMSO e incubando durante 15 minutos. La absorbancia de la solución se midió con un lector de microplacas (Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria) a 570 y 690 nm. Los resultados se informan como tasa de cambio en la actividad metabólica en comparación con los controles
20 MAC sembrados con células no oxigenadas después de la corrección usando los controles no sembrados. Se siguió un protocolo similar para determinar la actividad metabólica de las células a través de hidrogeles en gradiente. Cada hidrogel de gradiente se cortó cuidadosamente en ocho tiras de 5 x 20 mm a través de la longitud total del gel de 40 mm y cada tira se cortó en tres piezas iguales. A continuación, cada pieza se transfirió a un pocillo separado de una placa de 24 pocillos y el ensayo MTT se realizó como se describió anteriormente. Los resultados se informaron como
25 tasa de cambio en la actividad metabólica en comparación con la región 100 % MAC de los hidrogeles de gradiente no oxigenado.

1.10. Análisis de ADNdc total de PicoGreen

El número total de células se cuantificó utilizando el kit ADNdc Quant-iT PicoGreen. Se preparó una solución de trabajo 1x TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) diluyendo el tampón concentrado 20 veces con agua ultrapura estéril libre de DNasa. Se preparó una solución de trabajo del reactivo Quant-iTPicoGreen haciendo una dilución de 200 veces de solución concentrada de DMSO en TE y protegida de la luz. La curva estándar se preparó usando el estándar de λ -ADN suministrado. La solución de trabajo se añadió a cada pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura
30 ambiente protegida de la luz. La fluorescencia se midió con un lector de microplacas (Infinite M200) utilizando una excitación de 480 nm y una emisión de 520 nm. La concentración total de ADNdc se determinó por correlación con una curva estándar después de la corrección usando los controles no sembrados y convertida al número total de células usando un factor de conversión de 6,6 pg de ADN por célula.

40 1.11. Estadísticas

Todos los análisis estadísticos se realizaron con JMP 9 (SAS Institute, Cary, NC). ANOVA con el análisis post hoc de Tukey se realizó para detectar diferencias significativas entre los grupos. Se usó un nivel α de 0,05 para determinar la significancia entre los grupos. Las letras mayúsculas se usan para denotar significancia cuando se detectaron múltiples
45 diferencias significativas. Las diferentes letras implican que existe una diferencia significativa entre los grupos. Los datos se informan como media \pm desviación estándar (DE).

2. Resultados

50 2.1. Síntesis y caracterización de MACF

La Tabla 1 resume los materiales MACF que se sintetizaron en estos estudios. La espectroscopía ¹⁹F RMN de alta resolución (Fig. 4 a Fig. 6) reveló que el grado de sustitución de PFC se encuentra en el intervalo del 37-43 % para los tres MACF. Durante la conjugación de PFC, cada mezcla de reacción de MACF permaneció homogéneamente
55 mezclada a baja viscosidad durante todo el período de la reacción. Por lo tanto, se supone que los ligandos de PFC se distribuyeron uniformemente por toda la red de polímeros. Esto fue confirmado por el espectro ¹⁹F RMN, que indicaba la ausencia de picos adicionales (Fig. 4 a Fig. 6).

2.2. Comportamiento de absorción y liberación de oxígeno de MACF

Utilizamos nuestro dispositivo personalizado (Fig. 3) para determinar si la adición de PFC realmente confiere la capacidad de tomar oxígeno de una solución de alta tensión de oxígeno y luego liberar oxígeno en un ambiente acuoso de baja tensión de oxígeno. La absorción y liberación de oxígeno estático por MAC(Ali5)F, MAC(Ar5)F, MAC(Ali15)F y los hidrogeles MAC no modificados se presentan en la Fig. 7 a la Fig. 9 y la Fig. 10. El MAC solo no tenía sustitución de flúor y, por lo tanto, no consumía oxígeno. MAC(Ali5)F, que contiene el menor número de sustituciones de flúor, mostró una capacidad de absorción de $32,31 \pm 1,2$ mm Hg. Curiosamente, MAC(Ar5)F, un material con un número similar de flúor en un PFC aromático, fue capaz de absorber $112,5 \pm 1,8$ mm Hg de oxígeno. Nuestro material más sustituido de flúor, MAC(Ali15)F, mostró una capacidad de absorción de $137,50 \pm 3,07$ mm Hg. Todas las capacidades de absorción de oxígeno en equilibrio fueron significativamente diferentes entre sí por ANOVA monofactorial ($P < 0,0001$).

La liberación de oxígeno de nuestros materiales mostró que los hidrogeles de MAC(Ali5)F liberaron $8,21 \pm 0,80$ mm Hg, MAC(Ar5)F liberaron $89,10 \pm 2,45$ mm Hg y MAC(Ali15)F liberaron $134,20 \pm 3,73$ mm Hg de oxígeno en condiciones estáticas. Todos los datos de liberación de equilibrio de P_{O_2} son significativamente diferentes entre sí por ANOVA monofactorial ($P < 0,0001$). El material menos fluorado, MAC(Ali5)F, mostró liberación de equilibrio dentro de las 3,5 h. MAC(Ar5)F y MAC(Ali15)F demostraron liberación de oxígeno en equilibrio dentro de 13,2 y 120 h (5 días) respectivamente. Para comprender si nuestros sistemas de hidrogel MACF podrían usarse varias veces, repetimos los procedimientos de absorción y liberación en las muestras de cada grupo MACF (Fig. 11 a Fig. 13). Nuestra investigación indicó tres ciclos de regeneración exitosa con una pérdida de capacidad de O_2 de $2,5 \pm 1,5$ % para todos los materiales combinados.

2.3. Propiedades reológicas MACF, propiedades de hinchamiento y SEM

Los resultados de reología e hinchazón y los análisis estadísticos que se acompañan se resumen en la Tabla 2. G' fue mayor que G'' en todo el intervalo de frecuencia de las pruebas reológicas para los cuatro materiales probados, lo que indica las propiedades del gel. MAC resultó en los hidrogeles más rígidos, mientras que MAC(Ar5)F resultó en los más blandos ($P < 0,0001$). En términos generales, para los MACF, cuanto mayor es el número de flúor por adición, más rígido es el hidrogel. El hinchamiento de los hidrogeles fluorados también demostró una correlación entre el número de flúor por adición y la relación de hinchamiento. El análisis estadístico mostró que MAC(Ali5)F tenía una relación de hinchamiento significativamente más alta que los otros hidrogeles probados ($P < 0,0001$).

[0089]imágenes SEM mostraron que MAC estaba muy ordenado, coincidiendo con el hecho de que no tiene cadenas laterales que interactúen. MAC(Ali5)F mostró una superficie desordenada y porosa. Esta composición desordenada también se observó para MAC(Ali15)F. Se observó una diferencia en la densidad del polímero en ambos MACF alifáticos. MAC(Ali15)F mostró una estructura aleatoria y no fue muy porosa. Finalmente, MAC(Ar5)F era muy poroso y el más ordenado de los MACF. Los poros eran grandes en comparación con los otros MACF, y aunque la estructura reticulada no estaba tan ordenada como el MAC puro, todavía mostraba cierta organización, a diferencia de la estructura desordenada de los MACF alifáticos.

Tabla 2. Resumen de los resultados de reología e hinchazón.

Material	$G^*(Pa)$	Estadística	Relación de hinchazón	Estadística
MAC	$2451,9 \pm 604,7$	A	$11,3 \pm 0,3$	B
MAC(Ali5)F	$1497,2 \pm 508,7$	BC	$14,6 \pm 0,6$	A
MAC(Ar5)F	$963,4 \pm 79,7$	C	$11,1 \pm 0,6$	B
MAC(Ali15)F	$2105,1 \pm 877,4$	AB	$10,6 \pm 0,2$	B

Datos de reometría = 10, datos de hinchazón n = 5, medias \pm DE.

Diferentes letras son significativamente diferentes entre sí por ANOVA multifactorial ($P < 0,0001$).

2.4. Respuestas celulares a MACF

Las imágenes de microscopía del día 4 muestran que los fibroblastos prefieren MACF con más flúor por sustitución de PFC. Las tasas metabólicas y el número total de células soportadas por cada tipo de hidrogel MACF se presentan en la Fig. 14. ANOVA trifactorial (tipo de material, regeneración de O_2 , tipo de material x regeneración de O_2 , todo con un apalancamiento significativo $P < 0,0001$) se utilizó para analizar la actividad metabólica. ANOVA bifactorial (tipo de material, regeneración de O_2 , todo con apalancamiento significativo $P < 0,0001$) fue usado para analizar los datos del

número total de células. La actividad metabólica (Fig. 14A) fue mejorada por el tipo de material/número de flúor por adición ($P < 0,0001$) así como la recarga de O_2 en el intervalo especificado ($P < 0,0001$). El número total de células soportadas por cada hidrogel (Fig. 14B) fue significativo para todos los MACF en comparación con los controles MAC ($P < 0,0001$) y la recarga de O_2 fue significativa ($P = 0,007$).

5

3.5. Respuestas celulares a gradientes de MACF

Para demostrar cómo la sustitución y la cantidad de flúor pueden controlar la liberación de oxígeno de un hidrogel de biomaterial a nivel espacial, desarrollamos una serie de sistemas de gel de gradiente. ANOVA trifactorial (posición, regeneración de O_2 , posición x regeneración de O_2 , todo con un apalancamiento significativo $P < 0,0001$) se utilizó para analizar la actividad metabólica sobre los gradientes. Nuestros estudios indican que la actividad metabólica celular aumenta a medida que aumenta el porcentaje de MACF (Fig. 15 a Fig. 17) ($P < 0,0001$). Esta respuesta fue más evidente en gradientes MAC/MAC(Ali15)F, en los que se incorporaron más PFC en el lado derecho del hidrogel (Fig. 17). Estos resultados indican además que los sistemas de gradiente tratados con oxígeno tienen una mayor actividad metabólica en comparación con los geles de gradiente que no reciben oxígeno durante el período de cultivo (Fig. 16 y Fig. 17) ($P < 0,0001$).

15

3. Discusión

La modificación PFC de MAC crea un sistema inyectable y moldeable que se puede formar en hidrogeles con técnicas establecidas. La inmovilización de PFC en un biomaterial reticulado proporciona una estructura de soporte estable para facilitar el suministro de oxígeno, que es difícil de lograr in vivo con suspensiones de PFC coloidales. Además, demostramos que la modificación de PFC se puede cambiar para modificar la absorción de oxígeno y la capacidad de liberación y la cinética.

20

El quitosano es un polisacárido naturalmente abundante que contiene muchos sitios reactivos (aminas libres y grupos hidroxilo) para incorporar de forma covalente varias moléculas pequeñas como los PFC y se han informado muchos materiales a base de quitosano en diversas áreas con numerosas aplicaciones. El quitosano por sí solo se ha estudiado intensamente en la curación de heridas dérmicas, ya que es hemostático y antibacteriano. Hemos estudiado previamente un MAC de quitosano fotopolimerizable modificado y su utilidad en la ingeniería de tejidos, y los resultados de este estudio se basan en este trabajo. MAC es soluble en tampones acuosos y típicamente se forma en hidrogeles. El quitosano fluorado y materiales similares derivados del flúor han sido reportados previamente, sin embargo, la absorción de oxígeno y las propiedades de liberación de estos materiales no han sido bien caracterizadas o ampliamente estudiadas con respecto a su capacidad para soportar células o en aplicaciones de curación de heridas.

25

Investigaciones previas de sistemas de quitosano fluorado han demostrado que la sustitución de flúor es óptima en el intervalo de 40-45 % para soportar células, y se observan efectos indeseables por encima de este intervalo de sustitución. Nuestras sustituciones caen dentro de este intervalo ideal (Tabla 1) y asumimos que los ligandos de PFC estaban distribuidos uniformemente a través de la red de polímeros, ya que las reacciones se agitaban continuamente sin un precipitado notable. Además, las condiciones de reacción se realizaron en ácido acético diluido con un pH que favoreció solo la reacción de aminas primarias sobre cualquier otro grupo reactivo potencial en el quitosano. Una distribución uniforme de flúor es crucial para facilitar una absorción y liberación de oxígeno uniforme y controlada espacialmente, especialmente para guiar las respuestas celulares.

30

Los resultados de los estudios de absorción y liberación de oxígeno (Fig. 7 a Fig. 10) indican la importancia de seleccionar la modificación PFC apropiada para ajustar la capacidad y el tiempo total de liberación. La absorción se produjo rápidamente, alcanzando el equilibrio de P_{O_2} en 2-6 h, seguido de una liberación más lenta al ambiente circundante (5 % de CO_2 /95 % aire) dentro de 12-120 h, a una P_{O_2} de 1-25 mm Hg h^{-1} . Esto muestra que nuestra estrategia permite un ajuste del sistema excepcional, que es importante para diversas aplicaciones en la curación de heridas y la regeneración de tejidos.

35

El comportamiento de absorción y liberación demostró una correlación directa con el tipo de ligando y la cantidad de flúor unido a la molécula de PFC. Curiosamente, la dinámica de movimiento de los ligandos unidos juega un papel importante en este proceso. Esto ayuda a explicar las diferencias drásticas en la absorción y liberación de oxígeno al comparar MAC(Ar5)F y MAC(Ali5)F (Fig. 7 a Fig. 10). MAC(Ar5)F demostró tasas de disociación aún mayores que MAC(Ali5)F y mostró un retraso notable, como MAC(Ali5)F y MAC(Ali15)F (Fig. 8 a Fig. 10). MAC(Ar5)F contiene anillos aromáticos fluorados que tienen movilidad relativamente restringida en comparación con las cadenas lineales de PFC. Por lo tanto, las modificaciones aromáticas de PFC orientan todos los átomos de flúor en un solo plano proporcionando una alta accesibilidad al oxígeno. Esto está en contraste directo con MAC(Ali5)F, que consiste en la misma cantidad de flúor por modificación de PFC, sin embargo, estos ligandos fluorados son altamente móviles, lo

40

que resulta en interacciones de F-O₂ menos estables y, por lo tanto, una capacidad de absorción de oxígeno reducida y una liberación acelerada (Fig. 7 y Fig. 8). MAC(Ali15)F contiene largas cadenas de carbono fluoradas que proporcionan aún menos accesibilidad al oxígeno en comparación con MAC(Ar5)F debido a ligandos de PFC aún más móviles. Sin embargo, MAC(Ali15)F contiene más flúor por sustitución y, por lo tanto, el sistema requiere más tiempo para alcanzar los puntos de equilibrio de absorción y liberación (Fig. 4).

Nuestras mediciones estáticas de absorción y liberación de P_{O2} demostraron que la desorción de oxígeno siempre es menor que la adsorción para todos los sistemas de gel (Figuras 7 a 13). Esto confirma que un cierto porcentaje de oxígeno permanece dentro del hidrogel una vez que se produce la liberación de equilibrio. Esto es ventajoso durante el cultivo celular porque el exceso de oxígeno siempre está disponible para la proliferación celular. Se ha demostrado previamente que los fibroblastos dérmicos son sensibles a los niveles de oxígeno y muestran una mayor actividad metabólica en P_{O2} superior a 50 mm Hg. Además, los estudios de liberación mostraron que nuestros sistemas exhiben una curva de disociación sigmoidal de oxígeno, que es similar a la disociación de oxígeno en la sangre. Los sistemas de emulsión de PFC no muestran este comportamiento y proporcionan una liberación lineal. Las células pueden preferir las características de transporte de oxígeno similares de nuestro sistema MACF a las de la hemoglobina, según lo seleccionado por la evolución.

Los resultados de nuestros experimentos cíclicos de absorción/liberación (Fig. 11 a Fig. 13) fueron vitales para confirmar que nuestros materiales se desempeñaron de manera similar cuando se regeneraron. Los resultados de la Fig. 11 a la Fig. 13 demuestran además que nuestros hidrogeles podrían usarse durante períodos de tiempo más largos y aún conservan características similares de suministro de oxígeno. Esto es importante, ya que en nuestros experimentos con células los materiales fueron recargados hasta cuatro veces (Figs. 14 a 17). Este trabajo indica además que los MACF podrían desplegarse para mejorar los tratamientos de curación de heridas a corto y largo plazo. El aumento de los niveles de oxigenación de la herida en incrementos de P_{O2} de solo 5-10 mm Hg muestra beneficios curativos significativos tanto para heridas agudas como crónicas.

Aunque nuestros resultados de hinchazón y reología (Tabla 1) no son completamente paralelos entre sí, existen tendencias importantes en ambos estudios. La reología mostró que los hidrogeles de MAC eran más rígidos, lo que sugiere que las cadenas de polímeros de quitosano menos sustituidas permitieron menos inhibición durante la polimerización por radicales libres y, por lo tanto, una mayor reticulación. La sustitución de PFC en las cadenas MAC disminuyó la reticulación química, lo que resultó en hidrogeles menos rígidos. Se observó otro comportamiento importante al estudiar los resultados para los materiales sustituidos con PFC (MACF), lo que demuestra que los PFC más móviles más largos le dieron elasticidad al hidrogel. Basado en este concepto, creemos que el hecho de que MAC(Ali15)F fuera el más rígido de los hidrogeles sustituidos con PFC tiene sentido, porque aunque la sustitución adicional en MAC disminuye la reticulación química, cuanto más larga sea la cadena, mayores serán las fuerzas intermoleculares presentes. Luego se deduce que MAC(Ali5)F es el siguiente en rigidez, ya que es similar en composición pero con cadenas PFC más cortas. MAC(Ar5)F es el hidrogel más blando, lo que indica bajas fuerzas intermoleculares debido a la estabilidad y la naturaleza de las moléculas aromáticas.

La hinchazón de los hidrogeles fluorados mostró que MAC(Ali5)F se hinchó más, y significativamente más que los otros tres hidrogeles que mostraron resultados similares entre sí. Uno podría esperar que los resultados de la hinchazón estuvieran inversamente correlacionados con los valores de G* informados, sin embargo, como se observó por la reometría, existen interacciones interesantes que ocurren debido a cómo las adiciones de PFC interrumpen de manera diferente la reticulación iniciada por radicales libres, así como también cómo cada sustitución de PFC agrega interacciones intermoleculares variadas a los hidrogeles. Esperábamos que un mayor número de flúor por sustitución conduciría a geles más rígidos y menos hinchazón. Del mismo modo, menos flúor conduciría a geles más suaves debido al impedimento estérico y, por lo tanto, debería conducir a una mayor hinchazón, como se vio con MAC(Ali5)F. Sin embargo, MAC(Ar5)F no se ajusta completamente a este comportamiento. Creemos que esto se debe a que los anillos aromáticos en MAC(Ar5)F muestran una asociación lo suficientemente fuerte como para afectar la hinchazón, pero no lo suficientemente fuerte como para afectar las propiedades mecánicas medidas por reometría. Por lo tanto, MAC(Ar5)F tiene una estructura ordenada, pero no en el grado de MAC. MAC(Ar5)F no permite un mayor grado de hinchazón y es simultáneamente un material más blando. Se deben realizar más pruebas en el futuro para comprender mejor cómo las modificaciones de PFC cambian las propiedades del hidrogel a nivel molecular.

Nuestro trabajo demuestra que aumentar el número total de flúor conjugado aumenta el número total de células en hidrogeles de MACF (Fig. 14B), así como la actividad metabólica celular (Figs. 14A y Fig. 15 a Fig. 16). Las morfologías celulares fueron más redondeadas de lo que se observa típicamente en placas de cultivo o hidrogeles más rígidos. Sin embargo, se observaron respuestas celulares activas (Fig. 14) y fueron independientes de la rigidez del hidrogel subyacente. Esto sugiere que la oxigenación local anula los efectos de la rigidez que se han informado previamente sobre sustratos de polímeros que no aumentan los niveles de oxígeno. Además, es interesante que el metabolismo y

la celularidad mejorados fueran independientes de la recarga de oxígeno durante el período de cultivo. Estos resultados son fascinantes, y no creemos que este resultado se haya informado antes con los sistemas coloidales de PFC. Estos resultados nos sugieren que las modificaciones de PFC facilitan la recuperación de oxígeno del entorno medio/aire, haciendo que el oxígeno esté más disponible para las células. Las respuestas metabólicas en las superficies de gradiente de cada MACF (Fig. 15 a Fig. 17) demuestran que los niveles de oxígeno mediados por MACF son lo suficientemente sensibles como para cambiar las respuestas de proliferación celular en una escala espacial de milímetros, si no menos. Esto podría ser extremadamente valioso para modelar entornos in vitro donde los gradientes de oxígeno impulsan las respuestas de desarrollo y reparación, como la vascularización y la curación de fracturas. Es importante señalar que las respuestas celulares se mejoraron con más flúor por adición (Fig. 14 a Fig. 17), así como mejores respuestas a MAC(Ar5)F vs. MAC(Ali5)F, sin embargo, estas respuestas no fueron tan diferentes como los datos de absorción/liberación de O₂ para cada material (Fig. 7 a Fig. 10). Creemos que esto se debe al hecho de que los experimentos de absorción y liberación se realizaron en un sistema cerrado, mientras que los experimentos celulares se realizaron en un sistema abierto. Al principio, las fuerzas impulsoras de transporte fueron mayores en los experimentos de absorción/liberación, resultando en un transporte mejorado de O₂ en grupos con una modificación de PFC más ideal.

Nuestra estrategia de suministro de oxígeno utilizando un biomaterial es única en comparación con el trabajo anterior y nuestro sistema permite una gran flexibilidad. Creemos que la aplicación de nuestro sistema MACF para heridas profundas podría apoyar la supervivencia celular prolongada hasta que se logre la neovascularización del huésped. Se ha demostrado que nuestro MAC de polímero exhibe una degradación del 50 % después de 28 días en condiciones de enzimas fisiológicas, por lo que los MACF deberían proporcionar días, si no semanas, de beneficios de curación de heridas. Dado que los PFC disuelven oxígeno y otras especies oxigenadas, como NO, CO₂ y CO, los MACF pueden utilizarse no solo para suministrar oxígeno sino también otros gases beneficiosos, para eliminar gases residuales o para reducir la exposición a especies reactivas de oxígeno. Además de las emulsiones de PFC, otros trabajos centrados en el suministro de oxígeno han estudiado biomateriales que facilitan las reacciones generadoras de oxígeno. Trabajos recientes han demostrado que el peróxido de calcio encapsulado y los perclorocarbonatos pueden crear oxígeno al entrar en contacto con una solución acuosa. Sin embargo, los subproductos producidos son biológicamente desfavorables y se sabe que se acumulan en los tejidos. Además, la descomposición del peróxido es rápida y, por lo tanto, puede generar cantidades excesivas de oxígeno y energía. Como resultado, las concentraciones de los reactivos generadores de oxígeno deben controlarse cuidadosamente para evitar niveles nocivos de estrés oxidativo. Por último, en estos sistemas generadores de oxígeno, el proceso de descomposición del peróxido también cambia el nivel de pH local, creando potencialmente un ambiente dañino si se tampona incorrectamente.

4. Conclusiones

En este estudio, informamos el desarrollo de biomateriales biocompatibles, clínicamente relevantes y altamente ajustables ricos en oxígeno. Esta nueva clase de materiales de quitosano fluorados y biológicamente derivados se puede formar en hidrogeles reticulados o moldeables inyectables. Nuestra estrategia se desvía de los procedimientos existentes (por ejemplo, suspensiones de PFC o generadores de oxígeno) ya que podemos controlar el contenido de oxígeno dentro del hidrogel modificando el tipo de sustitución de PFC en la red de hidrogel. Esto nos permite controlar tanto la capacidad como la tasa de suministro de oxígeno, proporcionando niveles beneficiosos de PO₂ por hasta 5 días. Dado que estos sistemas son capaces de recargar oxígeno más de una vez, pueden utilizarse durante largos períodos de tiempo (potencialmente semanas). Mostramos que los fibroblastos responden favorablemente a entornos de oxígeno mejorados creados por MACF, incluso sin oxígeno suplementario, lo que debería traducirse directamente en la curación acelerada de heridas in vivo.

REIVINDICACIONES

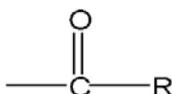
1. Un hidrogel que comprende:

5 polímeros reticulados, los polímeros tienen cadenas principales de polisacáridos, donde las cadenas principales de polisacáridos tienen un grupo flúor pendiente unido a las mismas, y gas O₂ disuelto.

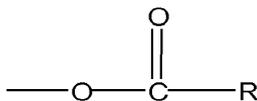
10 2. El hidrogel de la reivindicación 1, donde las cadenas principales de polisacáridos tienen un grupo acetilamino pendiente y/o un grupo amino pendiente unido al mismo.

3. El hidrogel de la reivindicación 1, donde el grupo flúor pendiente se selecciona de entre el grupo que consiste en:

15 grupos fluorocarbono;
grupos carbonilo definidos por la fórmula:



20 donde R es un grupo fluorocarbono; y grupos carboxilato definidos por la fórmula:



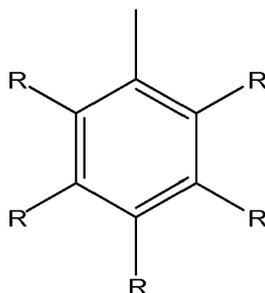
25 donde R es un grupo fluorocarbono.

4. El hidrogel de la reivindicación 3, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarburo definido por la fórmula:



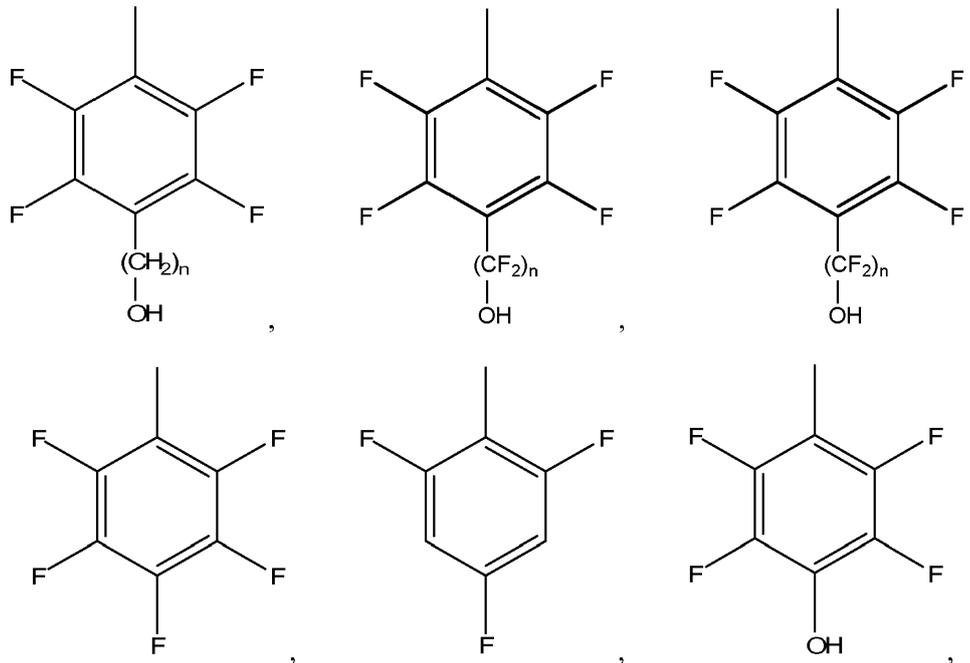
donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno o un átomo de flúor.

35 5. El hidrogel de la reivindicación 3, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarburo definido por la fórmula:

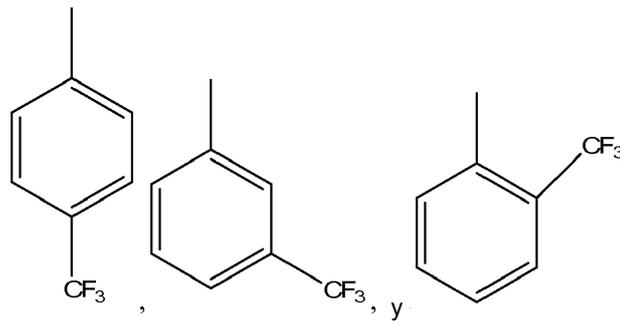


40 donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo, un grupo hidrocarburo, o un grupo fluorocarbono.

6. El hidrogel de la reivindicación 5, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono aromático seleccionado del grupo que consiste en:

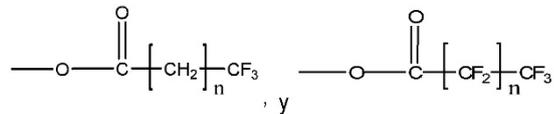


5



donde n es de 0 a 9.

10 7. El hidrogel de la reivindicación 3, donde el grupo flúor pendiente es un grupo carboxilato seleccionado del grupo que consiste en:



15 donde n es de 0 a 20.

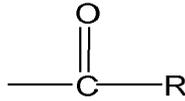
8. Un procedimiento de preparación de un hidrogel que comprende:

20 reticular los polímeros, teniendo los polímeros cadenas principales de polisacáridos, donde las cadenas principales de polisacáridos tienen un grupo flúor pendiente y un grupo reticulable unido a las mismas; y cargar el polímero reticulado con gas O_2 .

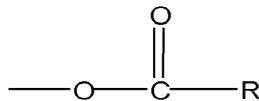
9. El procedimiento de la reivindicación 8, donde la etapa de reticulación del polímero se inicia por fotoiniciación.

10. El procedimiento de la reivindicación 8, donde el grupo fluor pendiente se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- 5 grupos fluorocarbono;
grupos carbonilo definidos por la fórmula:

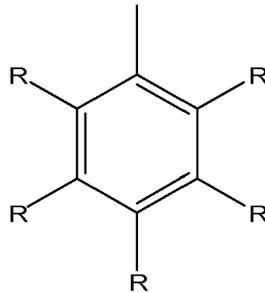


10 donde R es un grupo fluorocarbono; y grupos carboxilato definidos por la fórmula:



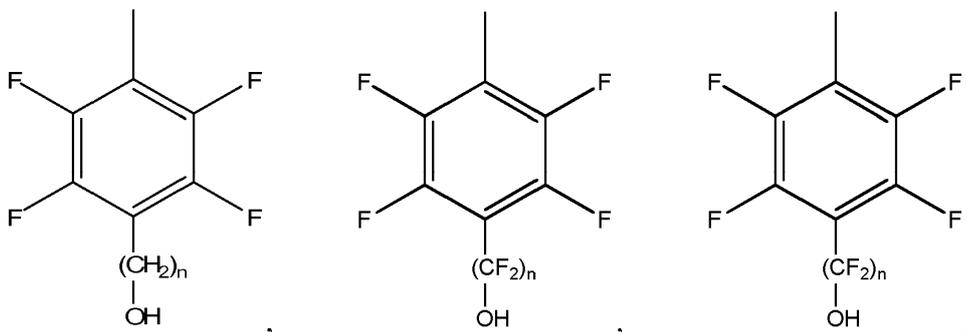
15 donde R es un grupo fluorocarbono.

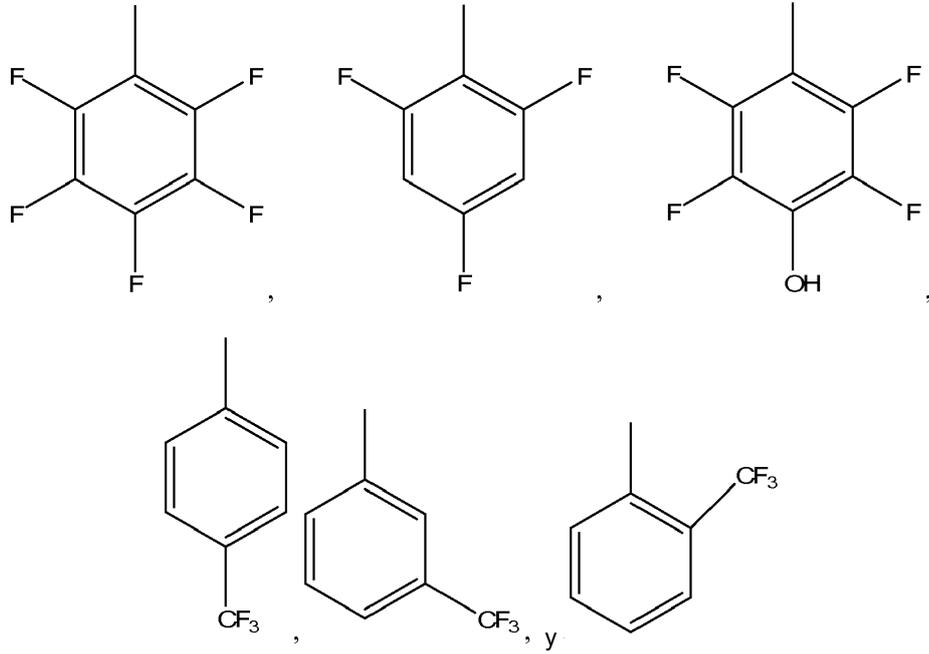
11. El procedimiento de la reivindicación 8, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarburo definido por la fórmula:



20 donde cada R es individualmente un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo hidroxilo, un grupo hidrocarburo, o un grupo fluorocarbono.

12. El procedimiento de la reivindicación 8, donde el grupo flúor pendiente es un grupo fluorocarbono aromático
25 seleccionado del grupo que consiste en:





5 donde n es de 0 a 9.

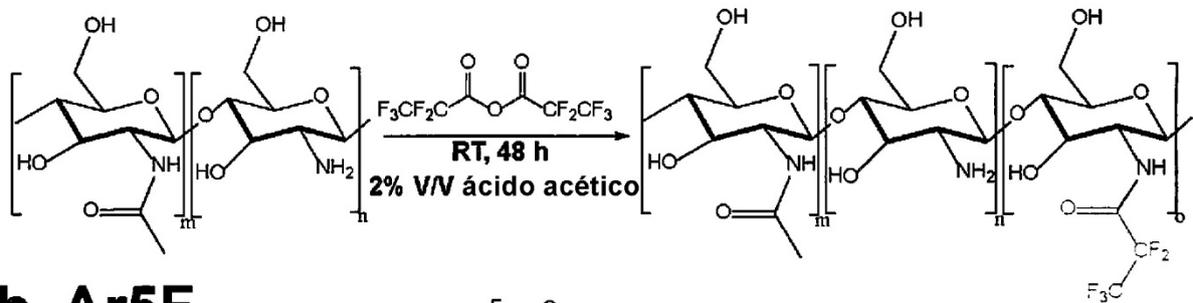
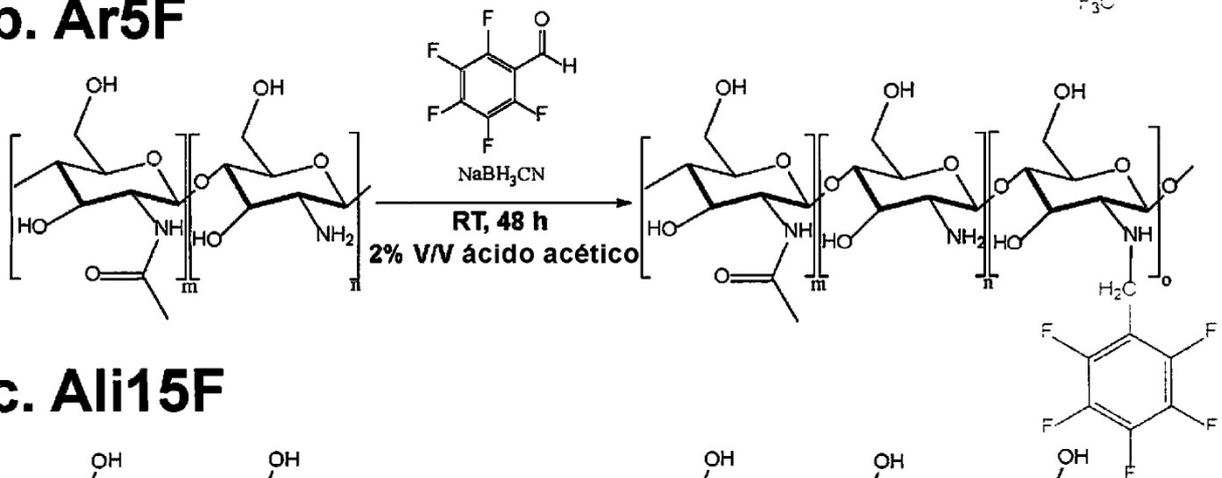
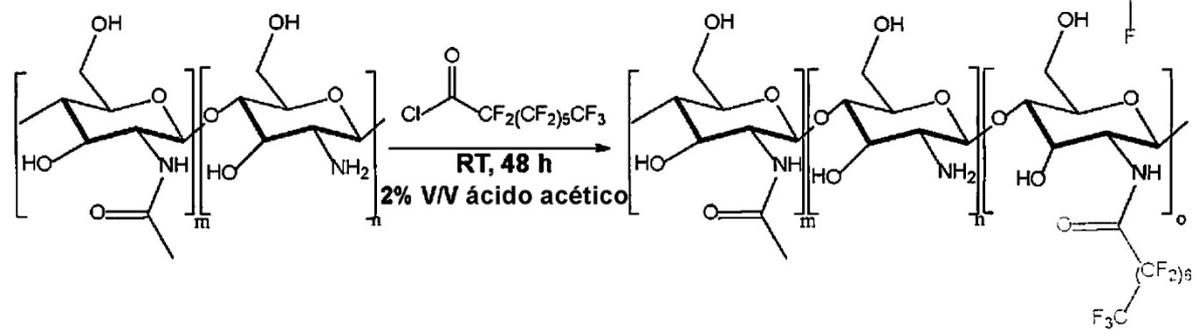
a. Ali5F**b. Ar5F****c. Ali15F**

Figura 1

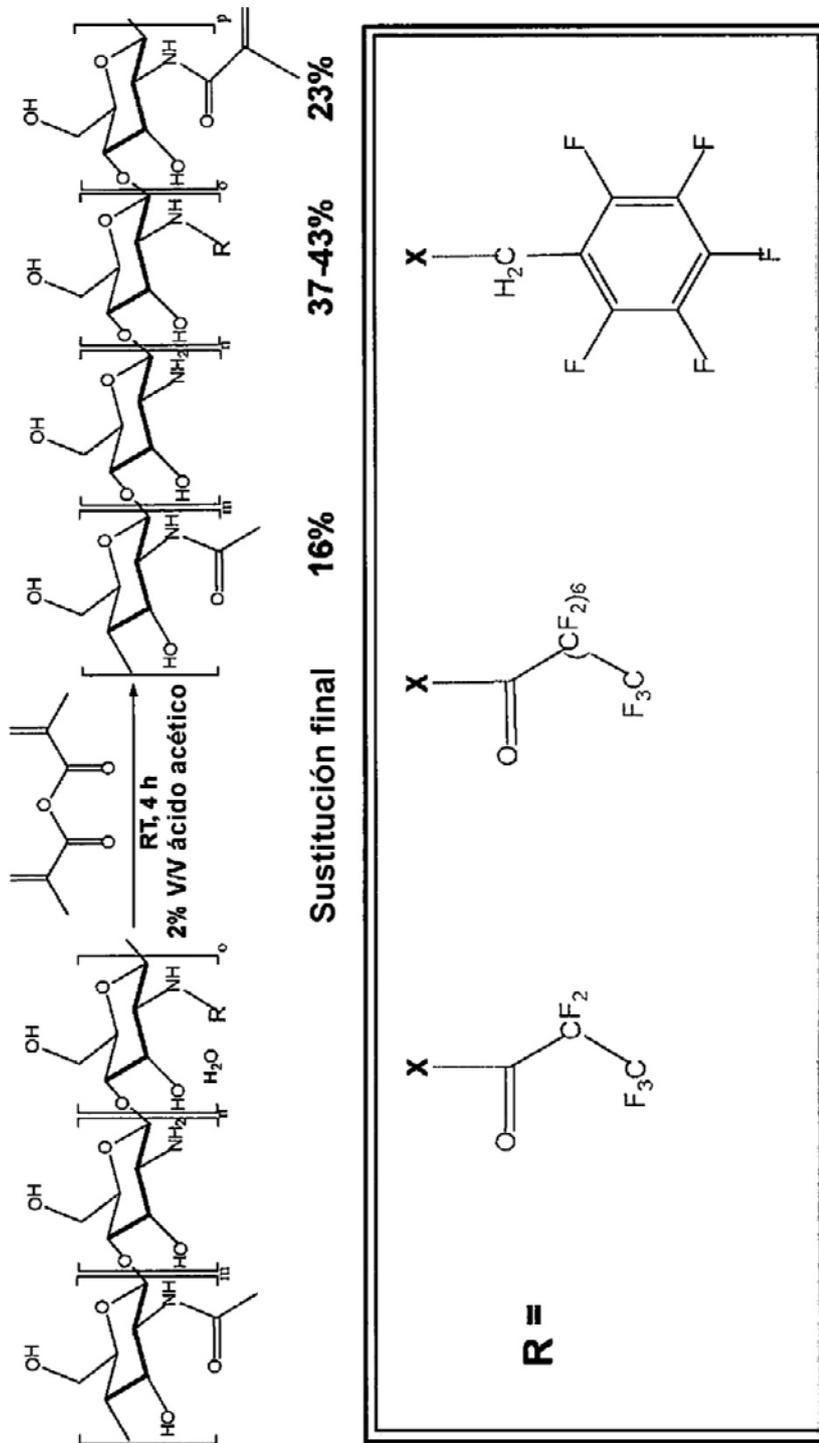


Figura 2

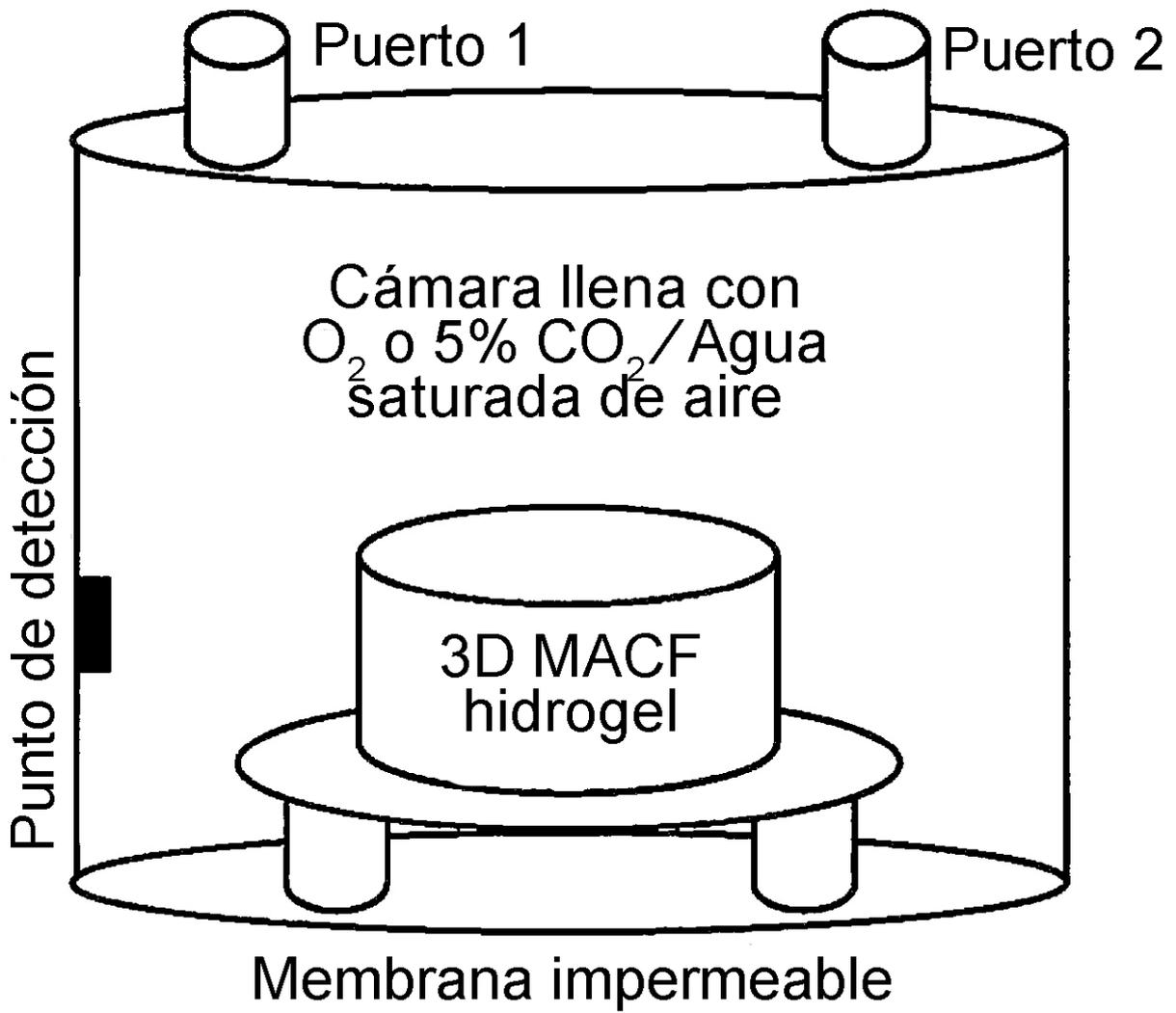


Figura 3

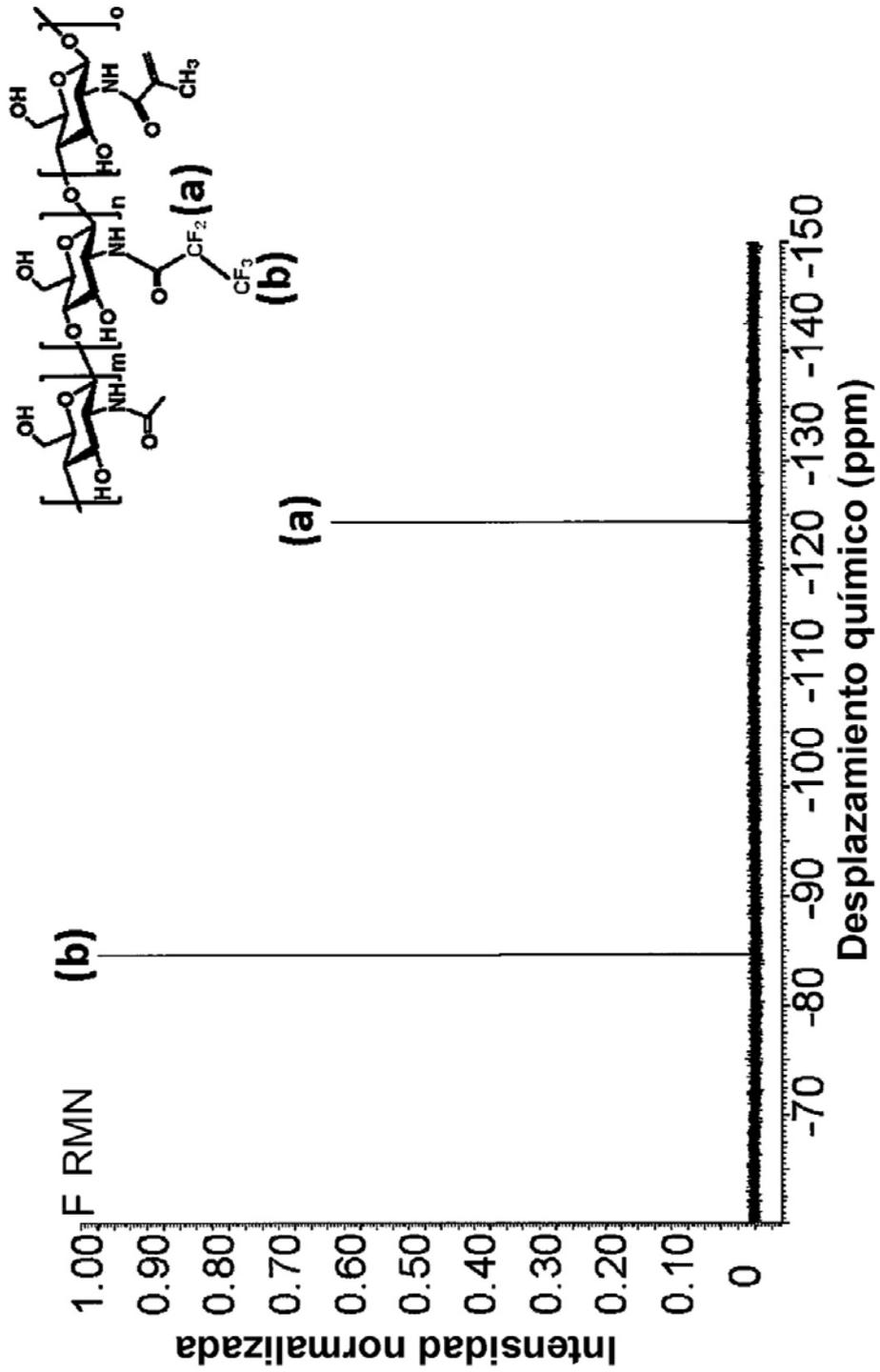


Figura 4

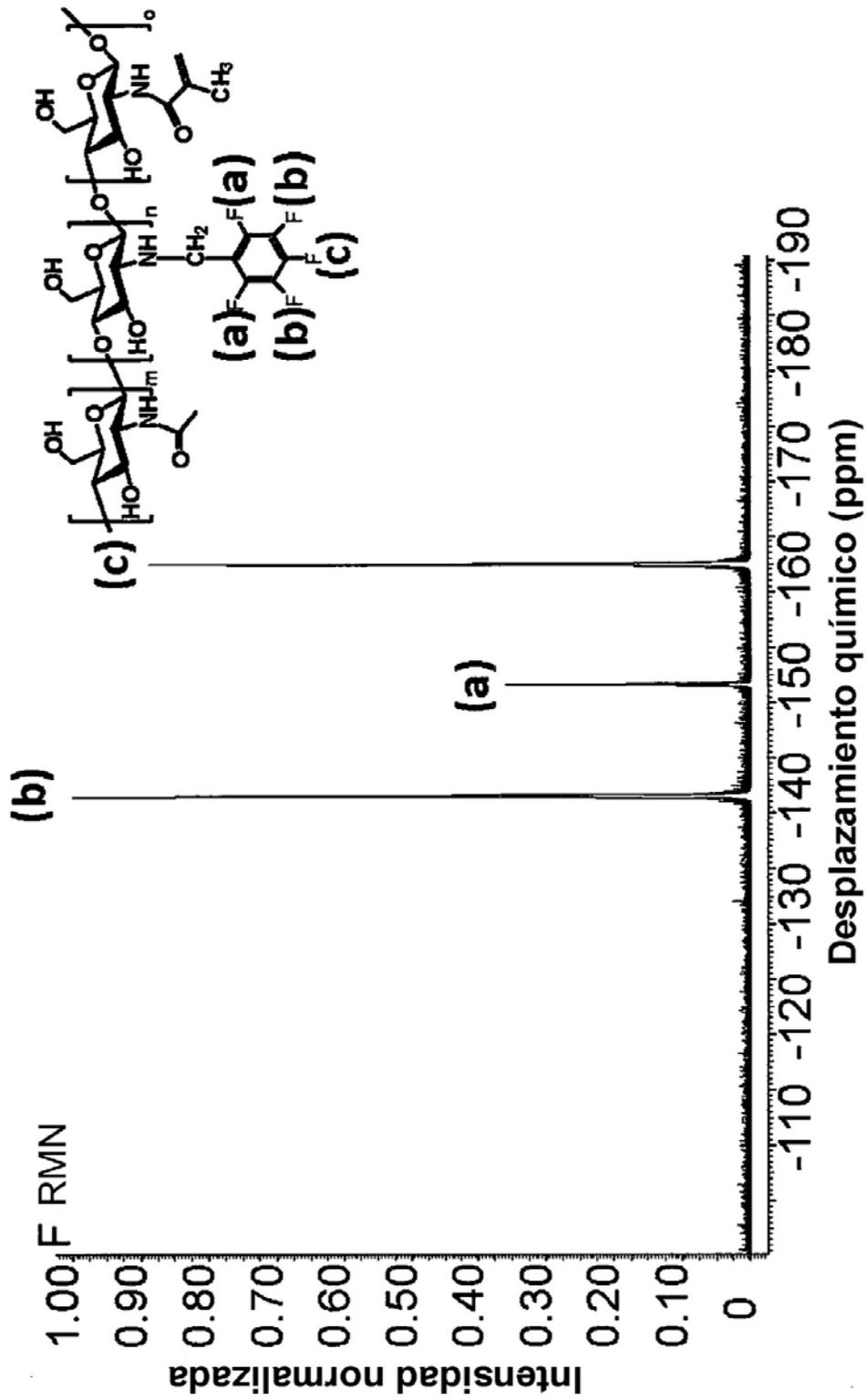


Figura 5

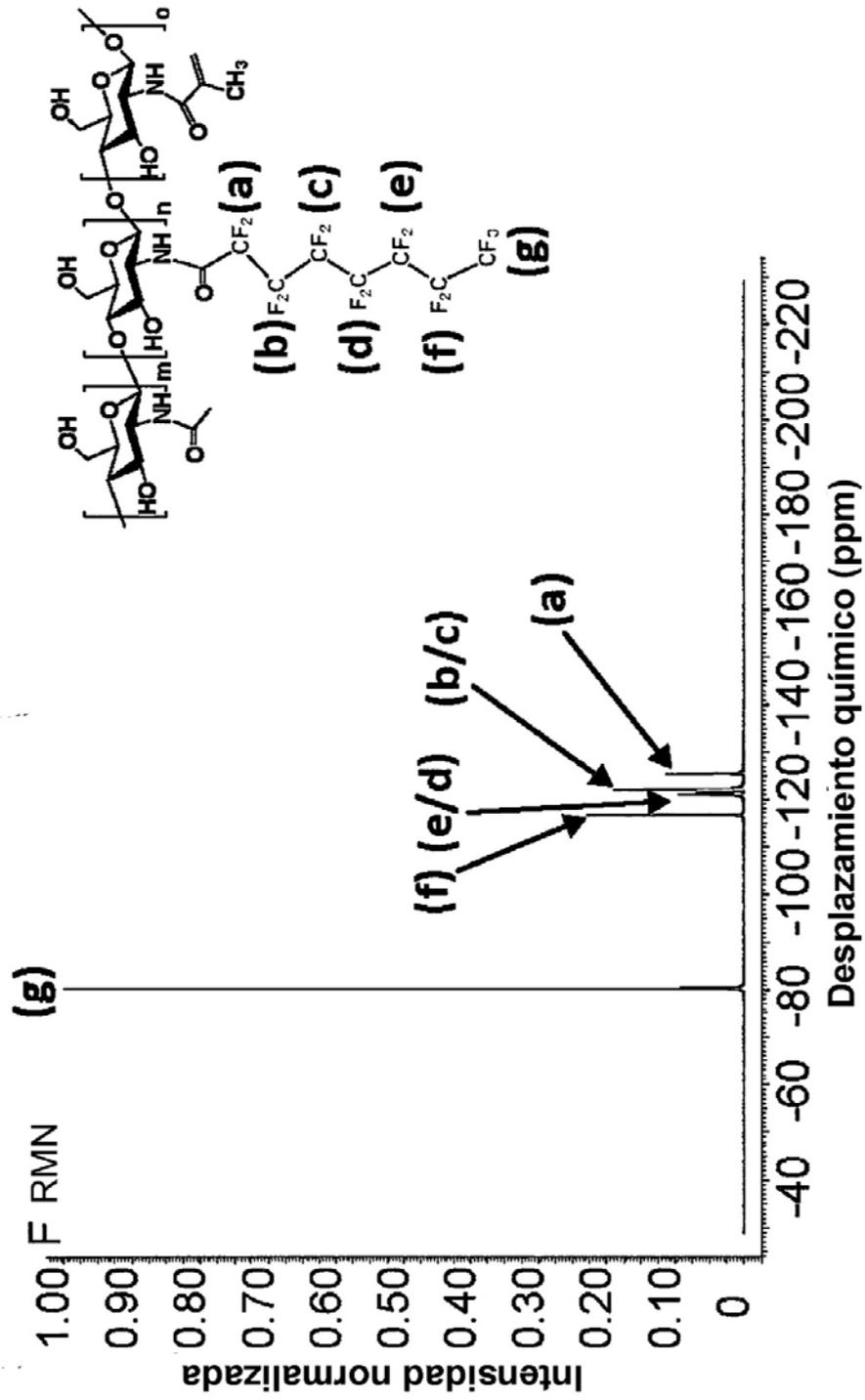


Figura 6

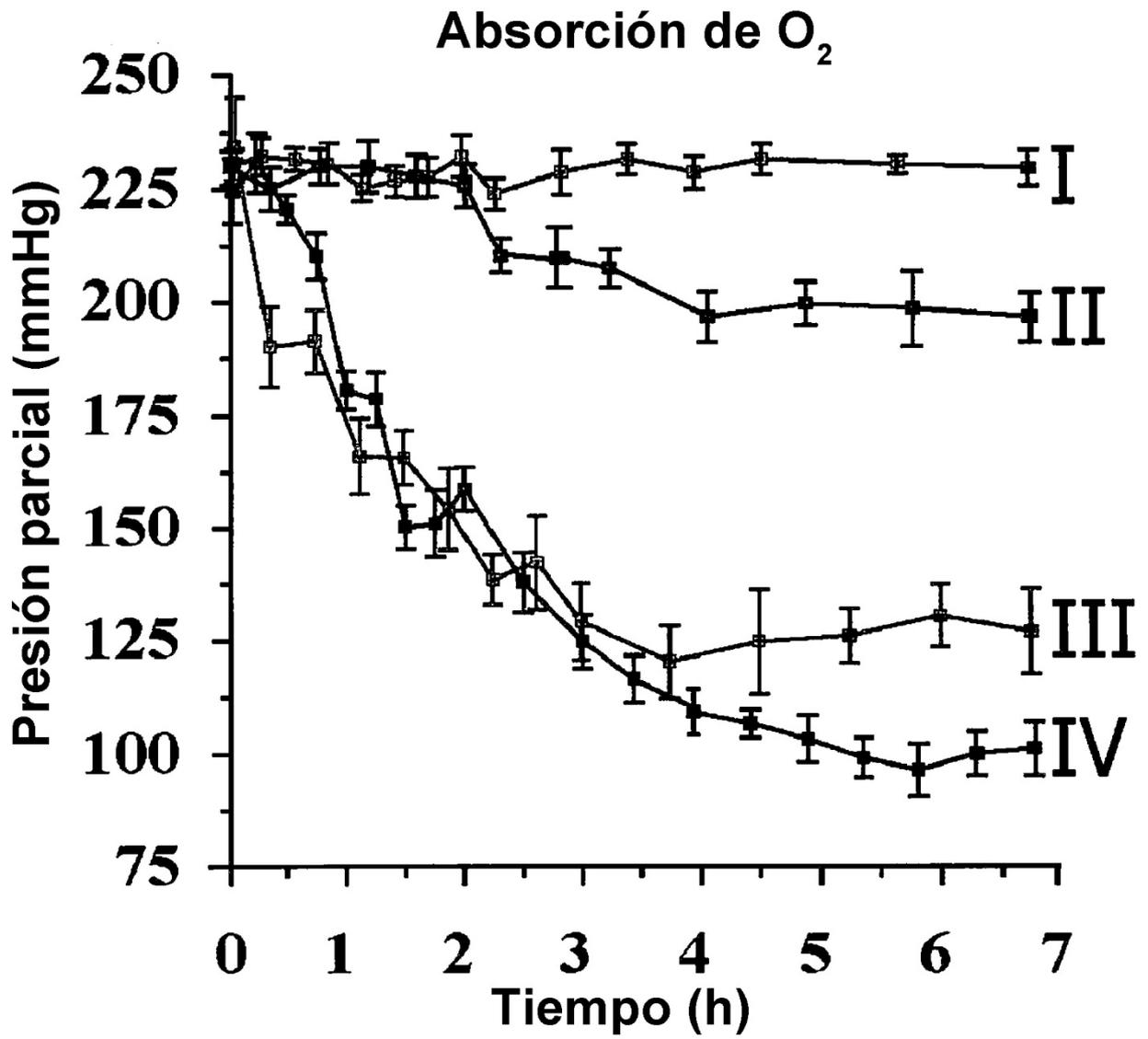


Figura 7

Absorción de O₂

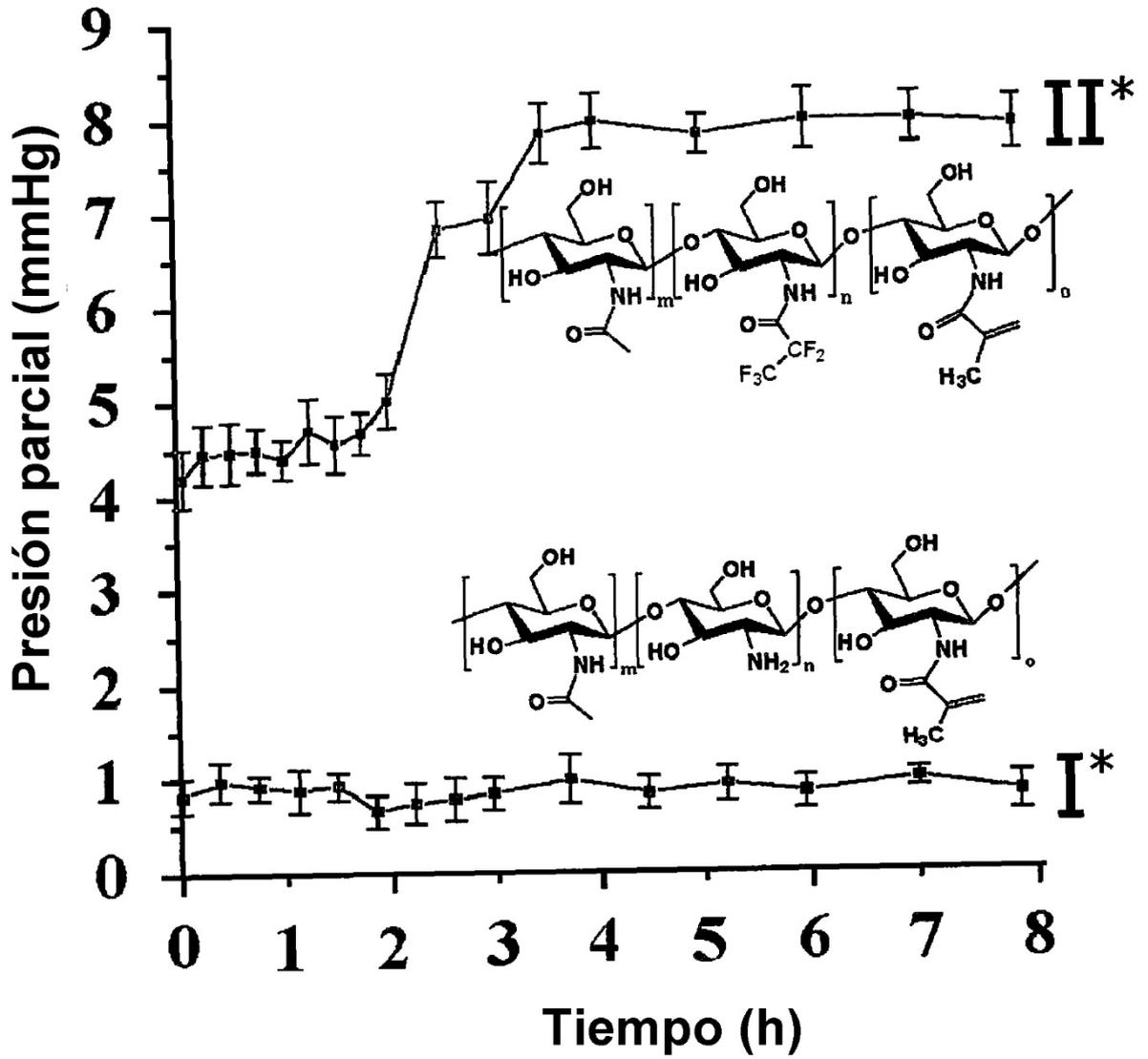


Figura 8

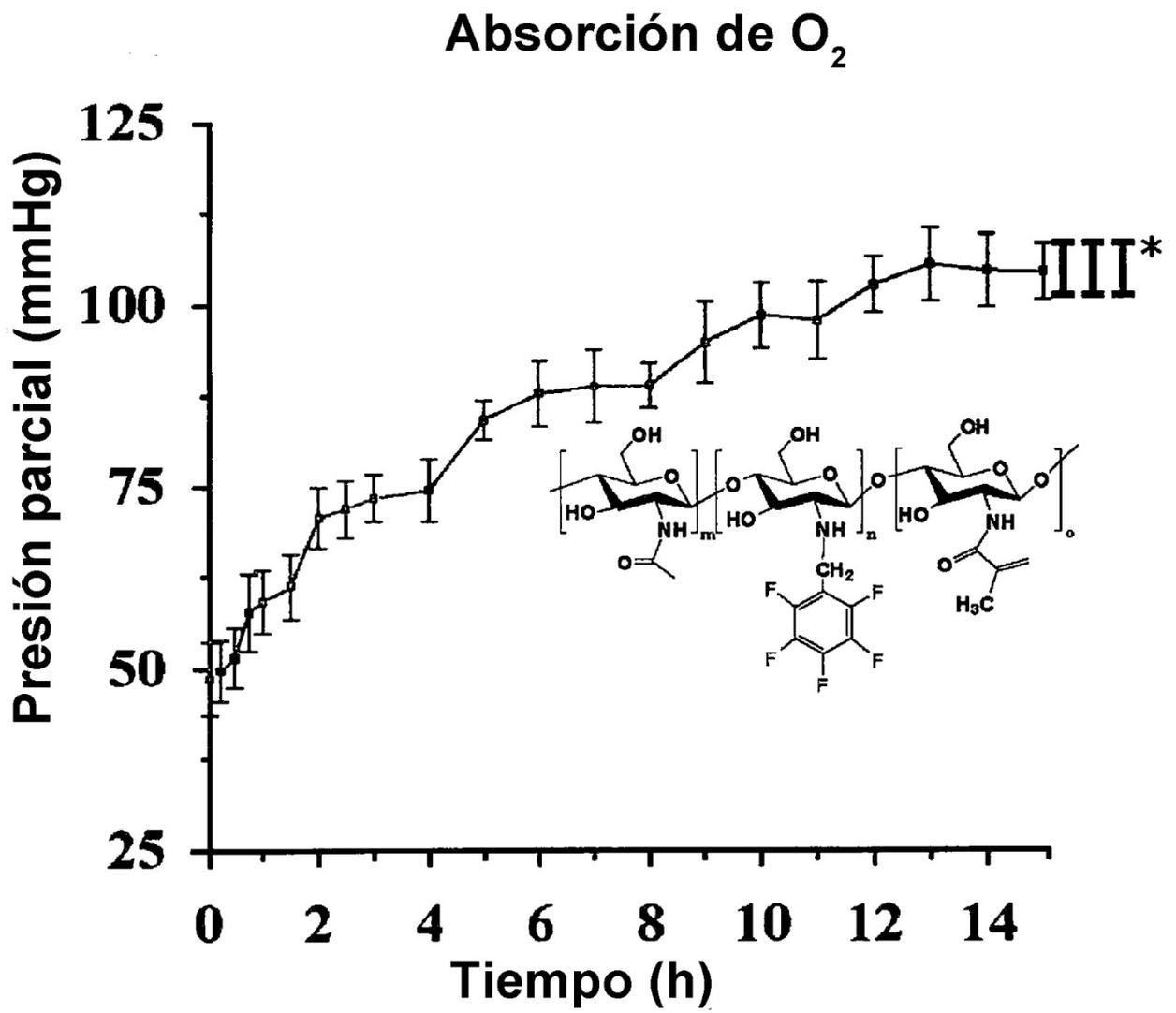


Figura 9

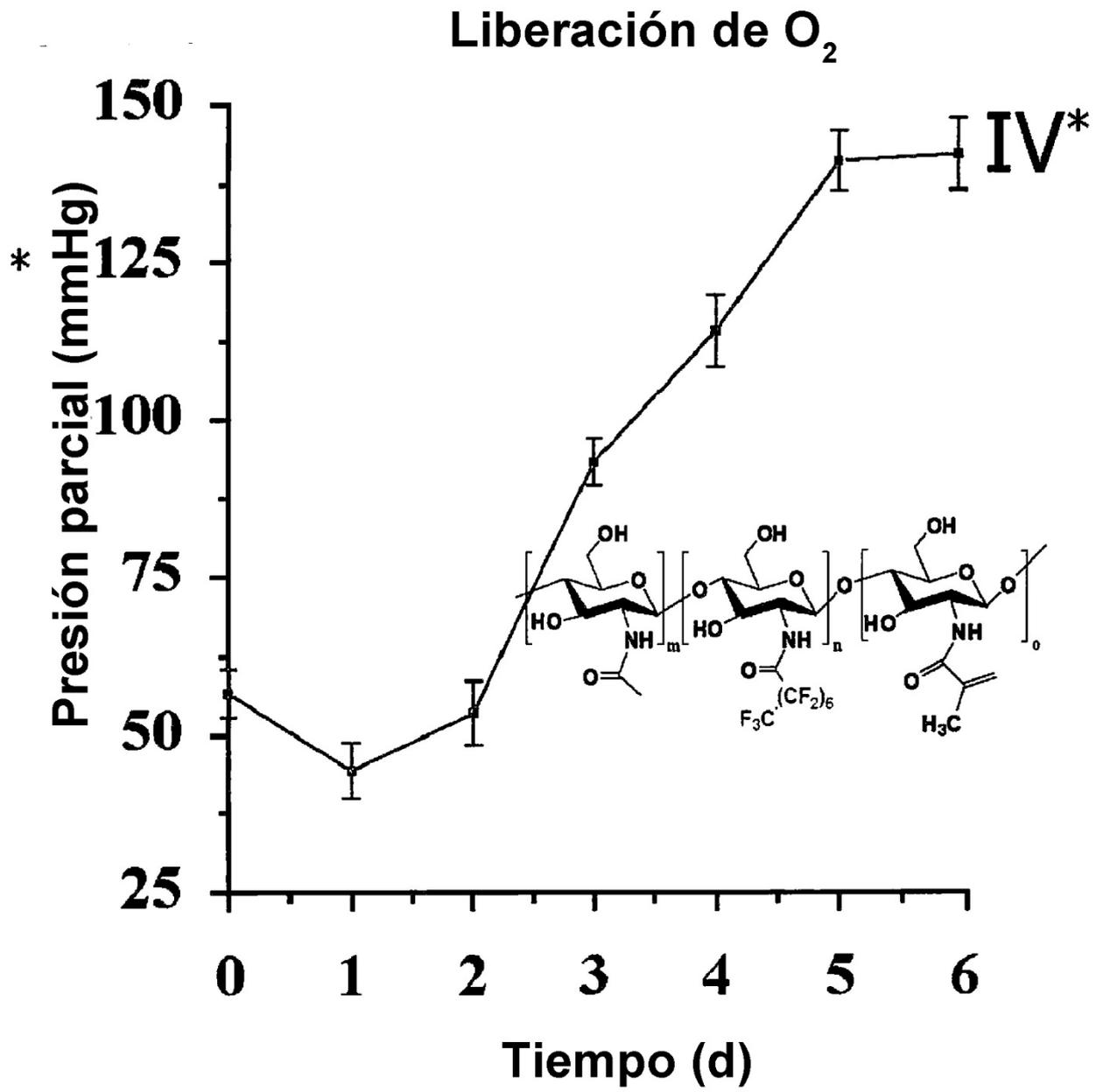


Figura 10

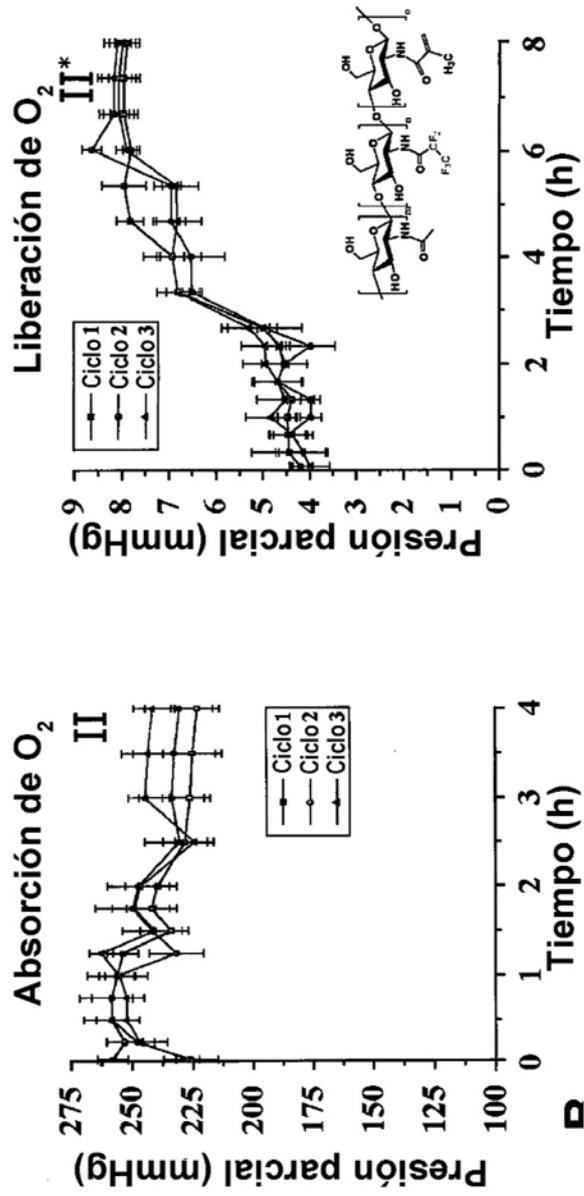


Figura 11

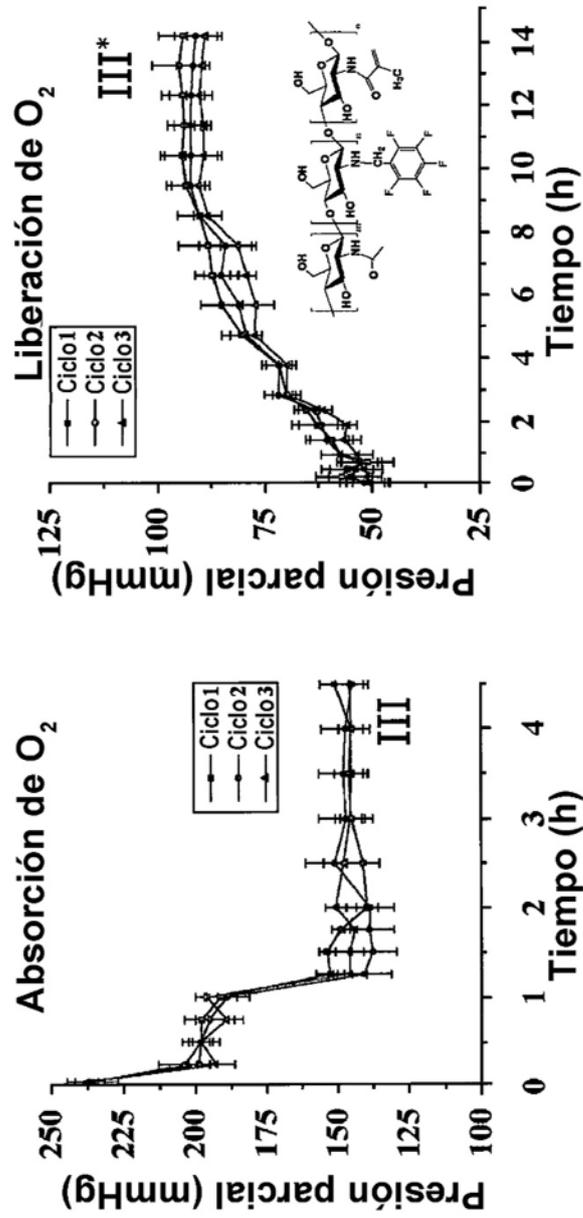


Figura 12

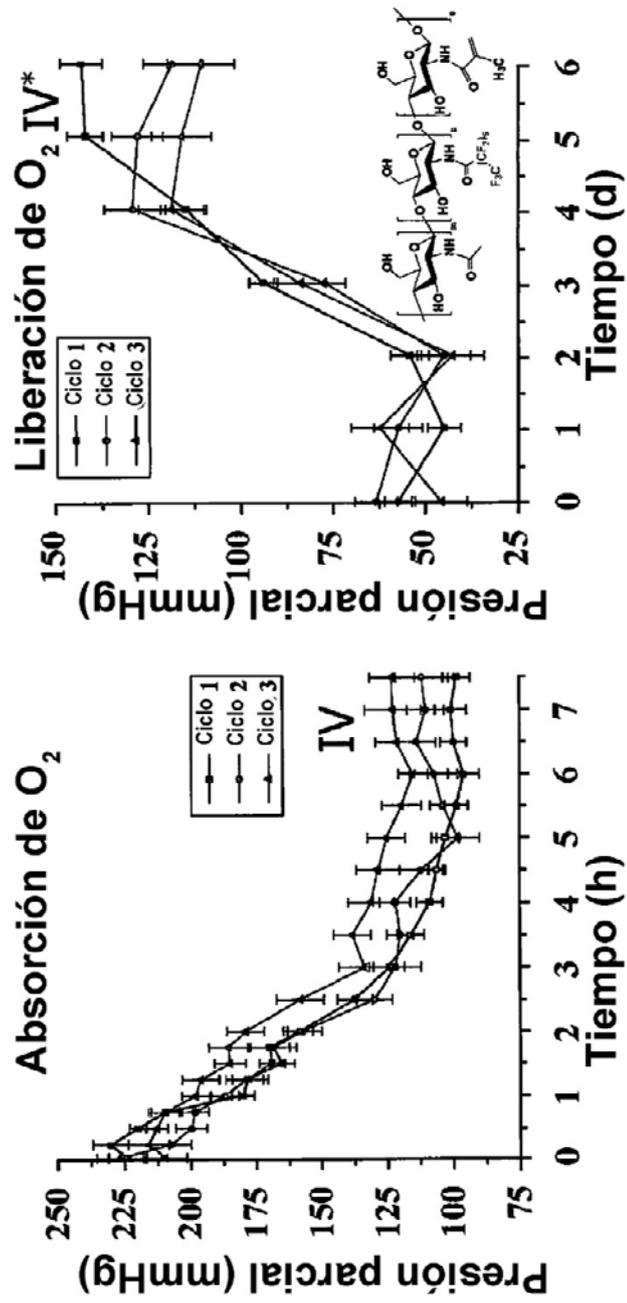


Figura 13

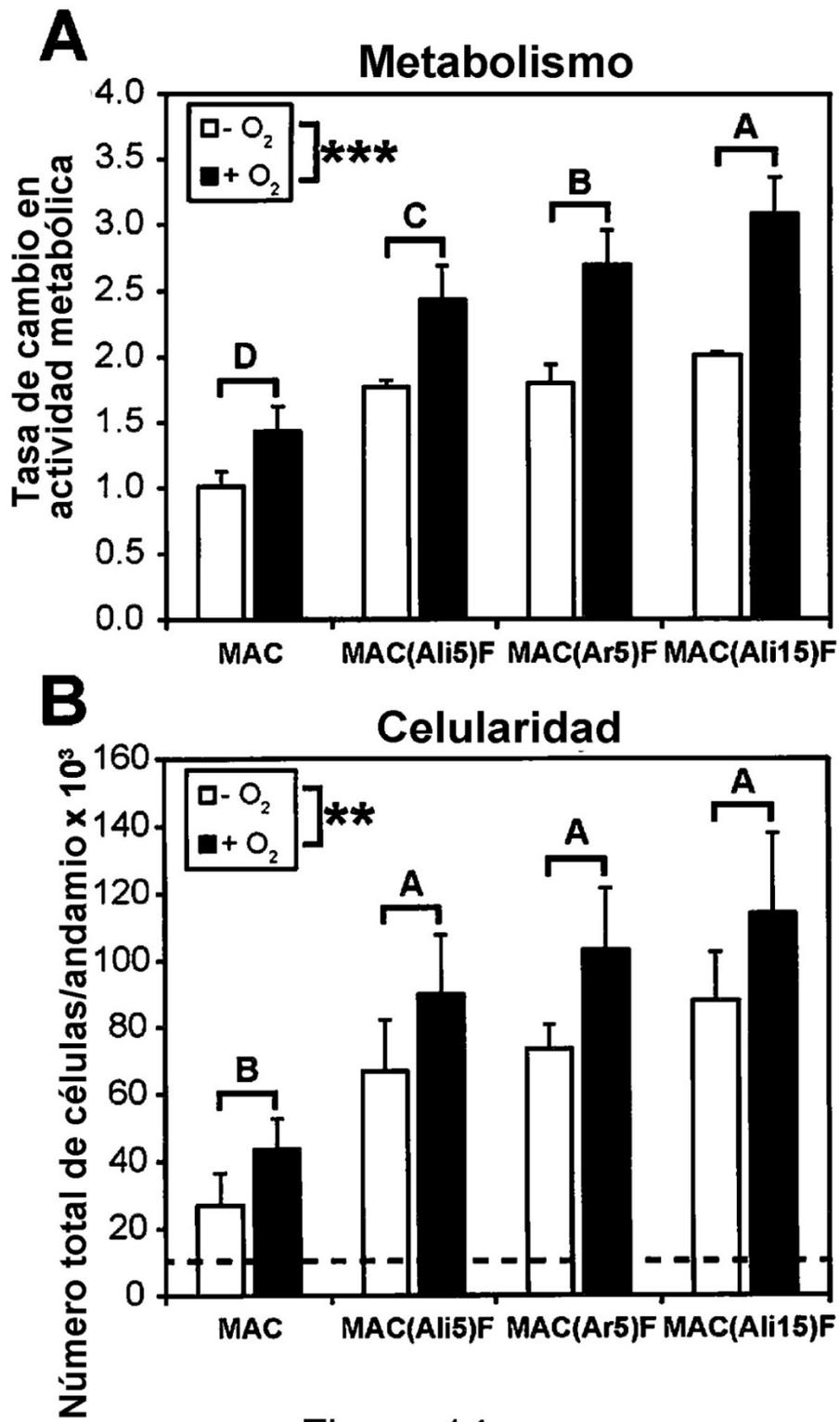


Figura 14

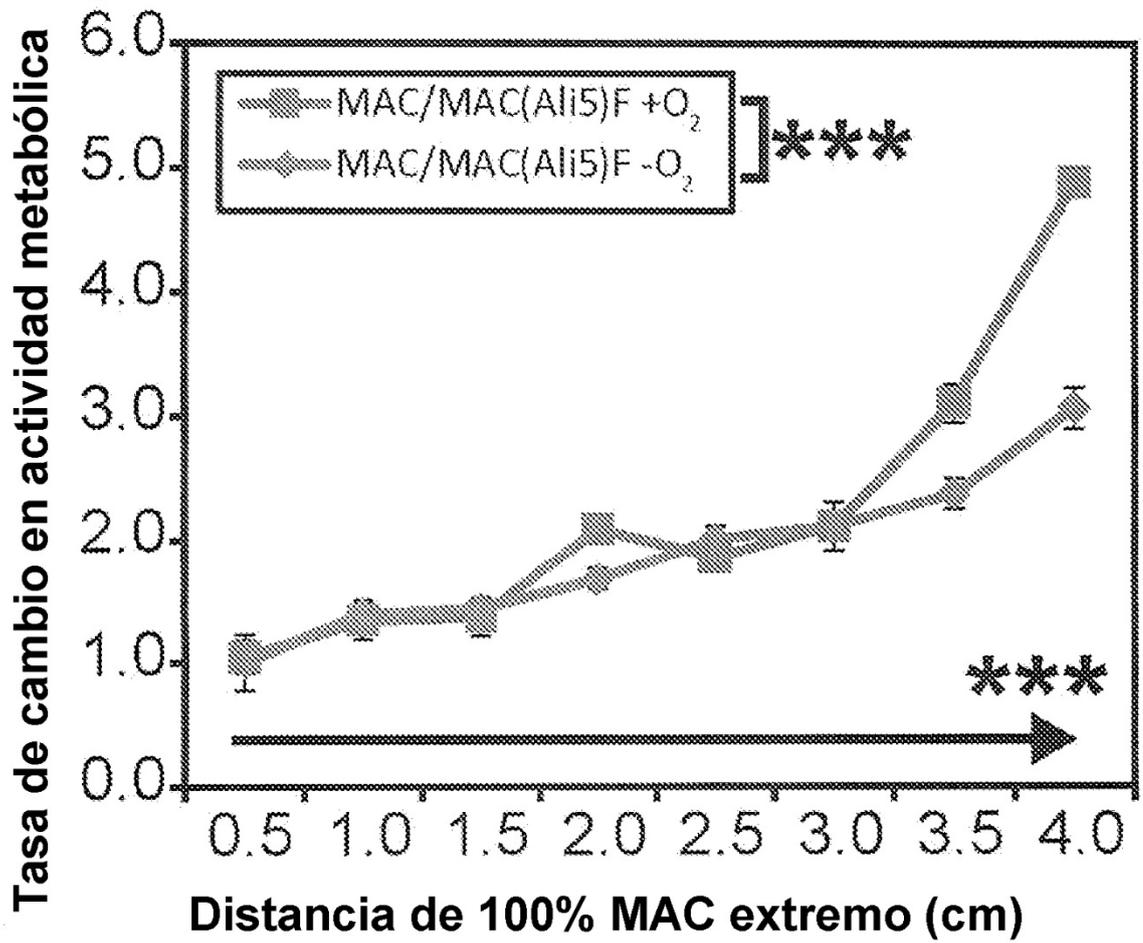


Figura 15

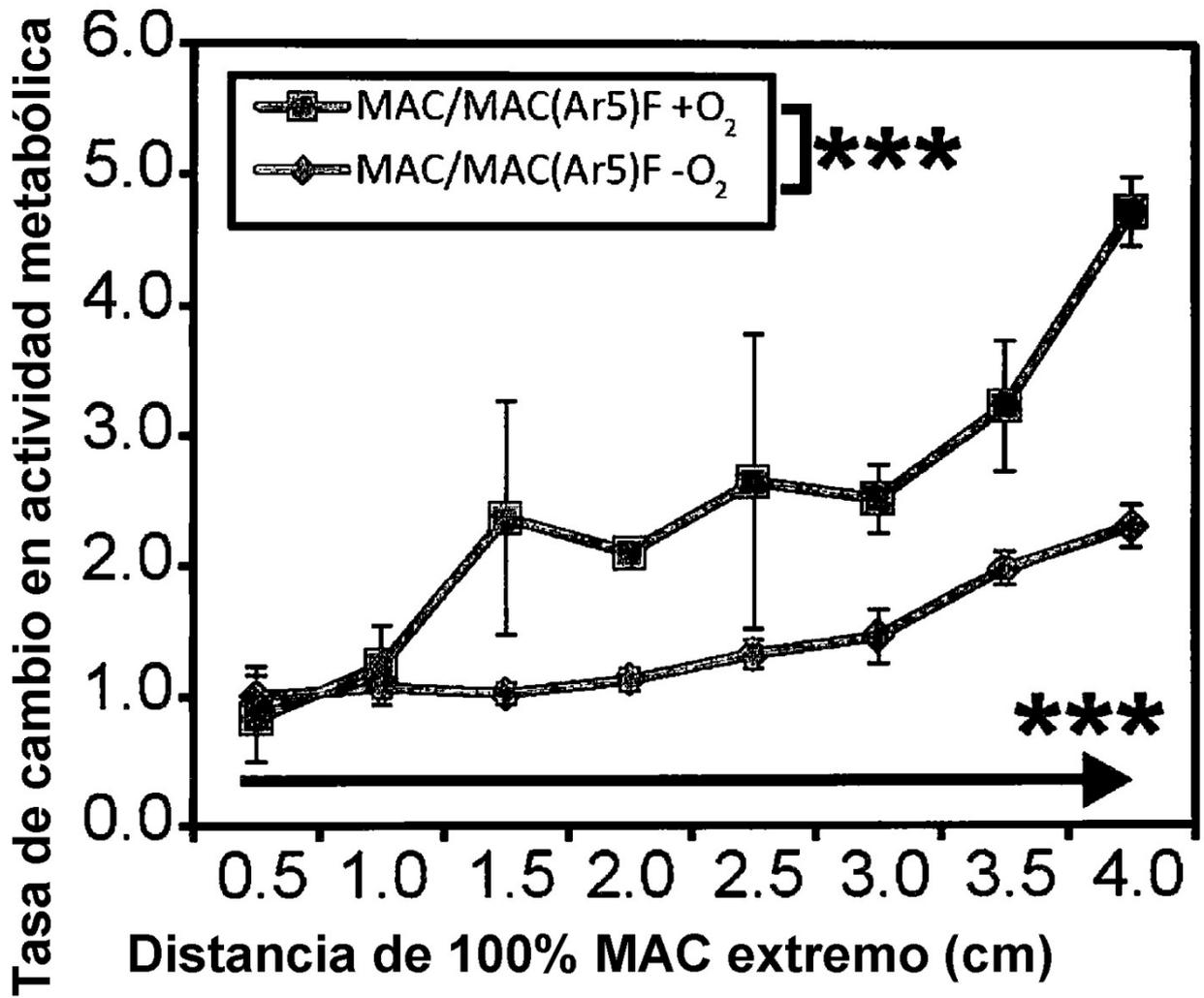


Figura 16

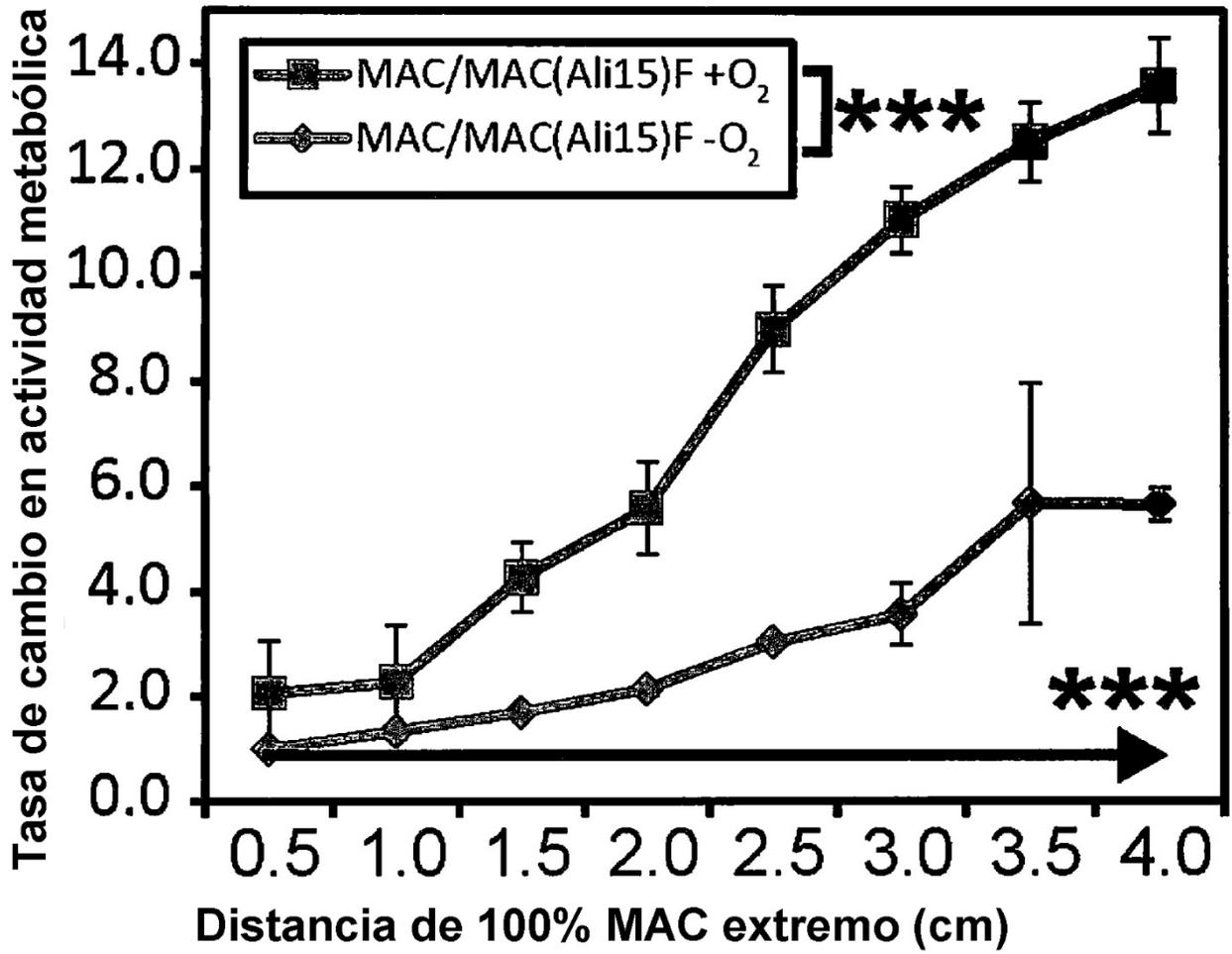


Figura 17