



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 258**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05760579 .2**
86 Fecha de presentación : **23.06.2005**
87 Número de publicación de la solicitud: **1773399**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Hidrogeles de ácido hialurónico y alfa,beta-poliaspartilhidracida y sus utilizaciones biomédicas y farmacéuticas.**

30 Prioridad: **28.06.2004 IT RM04A0318**

73 Titular/es: **Novagenit S.R.L.**
Via Trento 115/117
38017 Mezzolombardo, TN, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

72 Inventor/es: **Giammona, Gaetano;**
Pitarresi, Giovanna y
Palumbo, Fabio, Salvatore

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles de ácido hialurónico y alfa,beta-poliaspartilhidracida y sus utilizaciones biomédicas y farmacéuticas.

5 La presente invención se refiere a nuevos hidrogeles de ácido hialurónico y alfa,beta-poliaspartilhidracida y sus aplicaciones en el sector biomédico y farmacéutico. En particular, la presente invención se refiere a productos y composiciones basados en la reticulación química del ácido hialurónico con un polímero biocompatible multifuncional, con una estructura similar a la de las proteínas, que contiene grupos hidrácido que penden a lo largo de la cadena polimérica. Mediante esta reticulación es posible obtener materiales caracterizados por una fuerte resistencia a la degradación química y enzimática, a diferencia del ácido hialurónico de partida, que se pueden utilizar para preparar sistemas para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

15 Tal como es sabido, los hidrogeles comprenden polímeros naturales o sus derivados, polímeros sintéticos o combinaciones de polímeros naturales y sintéticos, cuyas moléculas, que interaccionan mediante fuerzas electrostáticas o enlaces químicos, forman polímeros reticulados hidrofílicos, capaces de absorber agua en una cantidad que oscila desde el 10-20% hasta varios cientos de veces su peso en seco. Debido a sus propiedades hidrofílicas, junto con su biocompatibilidad potencial, los hidrogeles atraen un interés creciente en el sector farmacéutico y biomédico.

20 En particular, los hidrogeles son candidatos ideales en la preparación de matrices para la ingeniería de tejidos, con el objetivo de curar o reconstruir de nuevo los tejidos u órganos humanos dañados, enfermos o deteriorados. De hecho, la ingeniería de tejidos es una nueva ciencia que trata del desarrollo de tecnologías útiles para obtener la regeneración de tejidos humanos dañados o su completa reproducción. Para permitir el cultivo y la diferenciación de las células de tejido de reparación (por ejemplo, fibroblastos para el tejido cutáneo, condrocitos para el tejido cartilaginoso, osteoblastos para el tejido óseo, etc.) y el posterior depósito de matriz extracelular (ECM, que es el componente principal de todos los tejidos), se necesitan estructuras tridimensionales, específicamente sistemas porosos, en los que las células pueden encontrar un ambiente tan similar como sea posible al natural y se pueden adherir, multiplicar y depositar nuevas ECM. Habitualmente se hace referencia a estas estructuras tridimensionales como "armazones" ("scaffolds"), y ya es sabido que los hidrogeles son particularmente adecuados para constituir matrices similares para la ingeniería de tejidos, teniendo en cuenta sus diversas ventajas, por ejemplo, en comparación con las mencionadas estructuras hidrofóbicas. En particular, entre estas ventajas se incluyen la capacidad de los hidrogeles de permitir un buen flujo de nutrientes a las células y el reflujo de productos fuera de las células, su habitual biocompatibilidad y biorreabsorción progresiva y su capacidad para incorporar fácilmente ligandos peptídicos para la adherencia celular mediante enlaces covalentes o físicos, a efectos de estimular la adherencia, proliferación y crecimiento de las células dentro de la matriz del hidrogel. Esta última ventaja hace que los hidrogeles sean diferentes, por ejemplo, de los polímeros hidrofóbicos aplicados para el mismo objetivo, tal como el PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico). Por otra parte, los hidrogeles pueden sufrir la desventaja de una resistencia mecánica baja que puede reducir la manipulación, o pueden ser también difíciles de esterilizar.

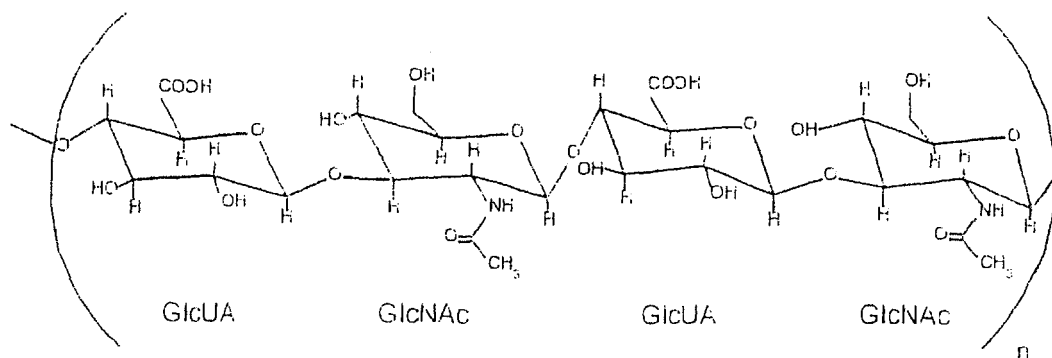
40 Las aplicaciones de ingeniería de tejidos incluyen la oportunidad de utilizar esponjas biodegradables o películas biodegradables para la regeneración del cartilago articular, o para proteger y ayudar a la curación de las heridas provocadas por un traumatismo (es decir, quemaduras) o enfermedades (diabetes, SIDA). En este caso, la aplicación sobre heridas puede ayudar a una actividad regenerativa más rápida de los fibroblastos, que, al adherirse a los armazones, sintetizarán más rápidamente nuevas ECM y curarán la herida. Como alternativa, el armazón se puede utilizar, en primer lugar, *in vitro* para crear una dermis artificial real que se puede utilizar posteriormente para cubrir la herida y para desarrollar su función. Otros sustitutos de la piel similares desarrollan una cobertura temporal capaz de reducir la pérdida de exudados de la herida y el riesgo de infección. El armazón, cuando se carga de forma oportuna con un fármaco, también puede desarrollar una función de administración de fármacos, ayudando, por ejemplo, a la administración prolongada de antibióticos o de factores de crecimiento, dependiendo del tipo de herida. Como ejemplo, se han comercializado diversos productos obtenidos a partir de armazones basados en colágeno como sustitutos de la piel (en particular, una bicapa celular obtenida mediante el crecimiento de fibroblastos y queratinocitos sobre armazones de colágeno, comercializados con el nombre comercial de ApligrafTM).

55 Otra aplicación biomédica de los hidrogeles, que tiene un gran interés por su potencialidad, es la utilización en la prevención de la adherencia posquirúrgica. Tal como es sabido, las adherencias posquirúrgicas consisten en la formación de suturas fibrosas entre dos superficies de tejido opuestas, que son resultado del traumatismo que los tejidos sufren durante las actividades quirúrgicas. Estas adherencias posquirúrgicas son un problema importante, no sólo en la cirugía cardiovascular sino también en la cirugía gastrointestinal y ginecológica, en la que pueden producir obstrucción intestinal, infertilidad y dolor pélvico. El método más utilizado para evitar este molesto problema es la colocación de materiales biocompatibles como barreras físicas entre tejidos en contacto, adecuados para favorecer su separación completa y capaces de permanecer en su lugar durante el crítico periodo posquirúrgico completo.

60 Entre las barreras ya comercializadas para esta utilización, la barrera realizada utilizando politetrafluoroetileno expandido (PrecludeTM, W.L. Gore, Flagstaff, AZ), propuesta como sustituto pericárdico, tiene una eficiencia clínica buena pero no es completamente biorreabsorbible y, por lo tanto, se necesita una segunda operación quirúrgica para su eliminación. También se utilizan barreras basadas en celulosa regenerada (IntercedeTM, Johnson & Johnson Medical Inc., Arlington, TX), pero han mostrado una buena eficacia sólo si se utilizan evitando el contacto con la sangre. Sin embargo, en la actualidad la barrera antiadherencia más ampliamente comercializada es Seprafilm[®] (Genzyme, Cambridge, MA); es un material basado en ácido hialurónico modificado con carboximetilcelulosa. A pesar de sus

características favorables, este material muestra una facilidad de manipulación reducida, es quebradizo y no muy elástico, y se caracteriza por tiempos de reabsorción bastante rápidos a pesar de la modificación química producida sobre el ácido hialurónico.

Tal como es sabido, un candidato excelente para esta y otras aplicaciones biomédicas y farmacéuticas presentadas anteriormente es el ácido hialurónico, un polisacárido lineal con un peso molecular alto compuesto de unidades alternas de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), cuya estructura se puede representar mediante la siguiente fórmula:



en la que se muestran dos unidades consecutivas de disacárido y en la que el número n de pares de unidades de repetición es tal, que el peso molecular del polisacárido se encuentra entre 50.000 y millones de daltons.

El ácido hialurónico (HA) se difunde considerablemente en tejidos animales, siendo un componente fundamental de la matriz extracelular, en la que actúa regulando la proliferación y diferenciación celular. Forma parte de varios procesos biológicos importantes, tales como la movilidad celular y la curación de tejidos; regula la respuesta inflamatoria y actúa como "barredor" ("scavenger") de radicales libres. Se ha demostrado que el HA está implicado en el crecimiento de tumores mediante la interacción con receptores específicos situados en la superficie celular: esto puede explicar el reciente interés que este polímero ha provocado para una posible aplicación como transportador soluble en la producción de nuevos profármacos macromoleculares con una actividad antitumoral.

Generalmente, el ácido hialurónico se aplica en viscosuplementación - tanto como agente farmacéutico como coadyuvante quirúrgico - en el sector oftálmico y se ensaya ampliamente en la viscosuplementación para aliviar dolores articulares provocados por osteoartritis de diferente naturaleza, como agente lubricante administrado mediante inyecciones intraarticulares, se aplica como "sistema de administración o liberación de fármacos", es decir, como transportador para la liberación prolongada o controlada de fármacos, y entre otras, como agente cosmético. Además, en vista de sus funciones biológicas, tal como se ha mencionado anteriormente, se ha dado a conocer que el HA facilita, mediante inyección, la regeneración de nervios, y cuando se coloca sobre heridas, facilita la regeneración de tejidos. Además, sus características de permeabilidad cutánea rápida y retención epidérmica pueden alargar la vida media de los fármacos administrados junto con él, por ejemplo, en dispositivos farmacéuticos aplicados como administración transdérmica.

A partir de lo anterior, es evidente que los biomateriales basados en ácido hialurónico, debido a su propiedad de biocompatibilidad, son altamente adecuados como materiales de apoyo para la ingeniería de tejidos, útiles para facilitar los procesos de crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro*, así como barreras en la prevención de adhesiones posquirúrgicas. Sin embargo, la utilización de HA solo muestra una desventaja, en el sentido que da como resultado armazones no muy elásticos y quebradizos. Además, dichos armazones están dotados de superficies demasiado hidrofílicas para favorecer la adherencia y la diferenciación celular. Especialmente por este motivo se ha propuesto varias veces modificar el HA mediante el mezclado o reticulado con polímeros biocompatibles, tales como colágeno o gelatina, o con polímeros sintéticos, tales como polilisina, o mediante la modificación química del HA con grupos hidrofóbicos.

La modificación química de la molécula de polisacárido del HA mediante la introducción de grupos funcionales que penden tiene un objetivo adicional, es decir, obtener sistemas farmacéuticos de liberación prolongada (sistemas de administración de fármacos) en los que el fármaco se puede transportar hasta el lugar de acción mientras se está enlazando químicamente a la cadena del transportador de polisacárido, y se puede liberar de él de una forma y con tiempos capaces de incrementar su biodisponibilidad.

Otra desventaja grave del ácido hialurónico utilizado tal como se ha considerado en la presente invención es su corto tiempo de permanencia *in vivo*, debido a su rápida degradación química y enzimática. De hecho, se degrada mediante las hialuronidasas (HAasa), enzimas ubicuos distribuidos en las células y suero humanos, y también experimenta una hidrólisis química incluso en ausencia de actividad enzimática. Por este motivo, si por una parte, para

algunas de las aplicaciones que se han presentado en la presente invención, el hecho de que este material pueda reabsorberse después de llevar a cabo su función es una característica necesaria y favorable, por otra parte, es importante que la degradación no sea tan rápida como para reducir excesivamente la vida media del producto o la permanencia en el sitio de acción.

Por lo tanto, existe un claro interés por el desarrollo de materiales basados en ácido hialurónico, capaces de explotar las características ventajosas de este material biocompatible, específicamente para las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas explicadas en lo anterior, pero que, al mismo tiempo, tengan propiedades mecánicas y elásticas mejores y, sobre todo, una mejor resistencia a la hidrólisis química y enzimática *in vitro* e *in vivo*, llevando a cabo, de este modo, una acción prolongada en el lugar de la aplicación. Además, del mismo modo que los hidrogeles considerados hasta el momento, los materiales estudiados deben tener la capacidad de atrapar agua y de hincharse en contacto con un medio acuoso.

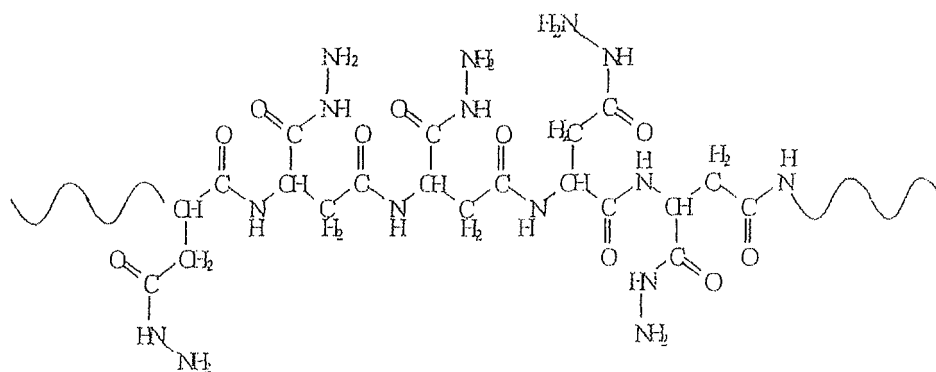
A efectos de satisfacer esta demanda, se ha considerado, según la presente invención, la oportunidad de modificar químicamente el HA haciéndolo reaccionar con un agente de reticulación adecuado, con una estructura de poliaminoácido, que es sustancialmente lineal y con una estructura similar a la de una proteína, cuyas características de biocompatibilidad ya hayan sido, determinadas. En particular, el agente de reticulación propuesto, según la presente invención, tiene una estructura de polihidracida, ya que muestra, para cada unidad de repetición, un grupo hidrácido que pende ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$), potencialmente disponible para unir covalentemente el grupo carboxi de la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico.

La modificación química del ácido hialurónico mediante la funcionalización con grupos bis-hidrácido ya se ha descrito, por ejemplo, en las patentes U.S.A. 5616568 y U.S.A. 5652347, ambas de Pouyani y otros (concedida a La Fundación de Investigación de la Universidad del Estado de Nueva York, ("The Research Foundation of State University of New York")) y en el artículo científico correspondiente (T. Pouyani, G. D. Prestwich, Derivados Funcionalizados de Oligosacáridos de Ácido Hialurónico: Transportadores de Fármacos y Biomateriales Nuevos, ("Functionalized Derivatives of Hyaluronic Acid Oligosaccharides: Drug Carriers and Novel Biomaterials"), Bioconjugate Chem., 1994, 5, 339-347), así como en Prestwich G D y otros: Journal of Controlled Release, vol. 53, no. 1-3, (1998), páginas 93-103, y en la patente U.S.A. 5 874 417 A, que da a conocer derivados hidrácido y polihidracida del HA. Sin embargo, en este caso no es una reticulación, más bien una funcionalización del HA, en la que los grupos carboxílicos del polisacárido que han reaccionado con grupos bifuncionales de fórmula general $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-\text{A}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$, en la que A representa un grupo espaciador genérico, para producir un ácido hialurónico funcionalizado con grupos hidrácido que penden: $\text{HA}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{A}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$.

Los documentos mencionados también describen, en lo concerniente a la reacción, la utilización conocida de una carbodiimida (que tiene una estructura general $\text{R}^1-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}^2$) como agente activador de la reacción. Para la posible reticulación posterior del HA funcionalizado, de tal manera que el producto resultante pudiera formar hidrogeles, los documentos proponen reacciones adicionales con una gama amplia de agentes conocidos de reticulación.

En el marco de la misma línea de investigación, Vercruysse y otros también han propuesto (Vercruysse y otros, "Síntesis y Degradación *In Vitro* de Nuevos Hidrogeles de Ácido Hialurónico Reticulados con Hidrácido Polivalente" ("Synthesis and *in Vitro* Degradation of New Polyvalent Hydrazide Cross-Linked Hydrogels of Hyaluronic Acid"), Bioconjugate Chem., 1997, 8, 686-694) para modificar el HA utilizando agentes que, con más de dos grupos hidrácido terminales, podrían dar como resultado una reticulación real del polisacárido de partida, para producir materiales similares a los hidrogeles. A pesar de que el título del trabajo se refiere a "hidrácidos polivalentes", los reactivos considerados en el estudio son compuestos sintéticos que contienen de una a seis funciones hidrácido, y no son cadenas poliméricas. A parte de la ausencia de cualquier consideración sobre la biocompatibilidad de las bis-, tri-, tetra-, penta- o hexahidracidas utilizadas en el estudio, el documento describe la producción de materiales con características y estructuras diferentes de las consideradas en la presente invención, en primer lugar, porque no obtiene la reticulación del HA mediante enlace químico con otro polímero lineal que tiene una naturaleza diferente, sino utilizando reactivos multifuncionales con un tamaño molecular relativamente pequeño.

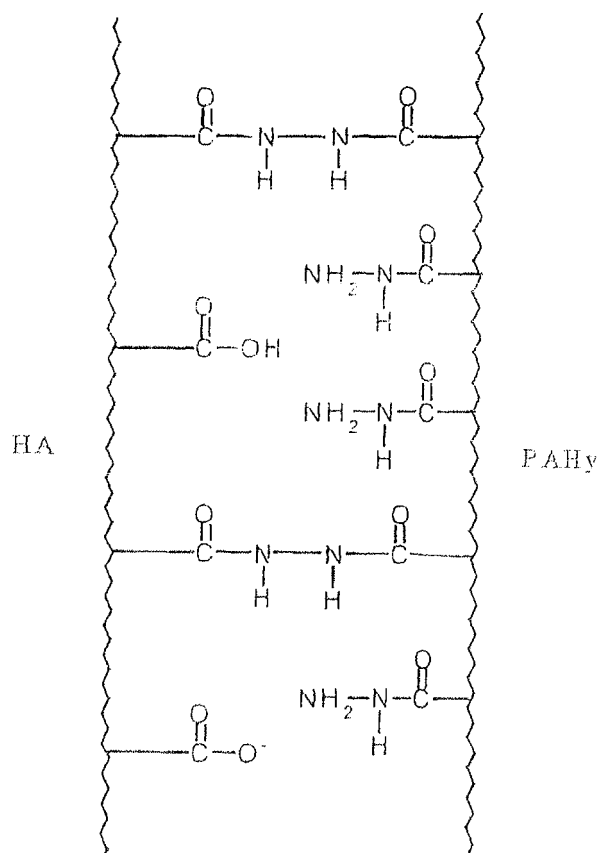
Teniendo en cuenta lo anterior, la presente invención propone utilizar como agente de reticulación para el HA, un polímero de polidracida que tiene un esqueleto de polipéptido, en el que la unidad de repetición contiene un grupo hidrácido que pende. En particular, el polímero preferente del tipo descrito es alfa,beta-poliaspartilhidracida (PAHy), un material polimérico soluble en agua y biocompatible, ya sintetizado y estudiado por el grupo de investigación que propone la presente invención (G. Giammona, B. Carlisi, G. Cavallaro, G. Pitarresi, S. Spampinato, "Un nuevo polímero sintético soluble en agua, α,β -poliaspartidracida" ("A new water-soluble synthetic polymer, α,β -pol-yasparthydrazide"), J. Control. Rel., 1994, 29, 63-72). Este material se ha obtenido, tal como se da a conocer en la literatura mencionada, mediante aminólisis de una polisuccinimida de peso molecular alto con hidracina. En particular, la polisuccinimida (PSI) se ha obtenido mediante policondensación de ácido D,L-aspártico, y se ha hecho reaccionar posteriormente con hidracina ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$), para obtener un polímero representado por la fórmula química siguiente:



Tal como resulta evidente de la fórmula anterior, debido a la estructura cíclica de la polisuccinimida de partida, puede tener lugar el acoplamiento de la hidracina de tal modo que se deje un grupo metileno en el esqueleto polimérico o bien en el grupo funcional que pende. Por lo tanto, la unidad de repetición (la fórmula anterior muestra cinco unidades de repetición) puede tener una estructura ligeramente diferente en el primer o segundo caso, pero su peso molecular es el mismo.

En la literatura mencionada, se da a conocer la síntesis y caracterización de la PHAy así como la propuesta de utilización de este polímero con estructura similar a la de una proteína como sustituto del plasma. Para este objetivo, se ha informado sobre estudios de toxicidad, de capacidad inmunogénica y ensayos de agregación plaquetaria que han demostrado la biocompatibilidad total de este polímero de polihidrácido.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer específicamente un compuesto que comprende ácido hialurónico reticulado químicamente con un polímero de polihidracida en la que uno o más grupos carboxi de las unidades de disacárido del ácido hialurónico están enlazados químicamente, a uno o más grupos hidrácido del polímero de polihidracida, respectivamente. Preferentemente, tal como se ha indicado anteriormente, dicho polímero de polihidracida es alfa,beta-poliaspartilhidracida



(PAHy), que se ha investigado exhaustivamente en lo concerniente a su solubilidad en agua, biocompatibilidad y propiedades no inmunogénicas. Sin embargo, para reticular el ácido hialurónico podrían utilizarse de la misma forma otros polímeros con una estructura de poliaminoácido con una cadena esencialmente lineal, con grupos hidrácido

ES 2 303 258 T3

que penden a lo largo de la cadena, de modo que se den composiciones y materiales con propiedades adecuadas de procesabilidad, resistencia mecánica y resistencia a la degradación.

En particular, en el compuesto según la presente invención, el ácido hialurónico tiene un peso molecular desde 50.000 hasta 1.500.000 dalton, mientras que cuando el polímero de polihidracida es PAHy, éste tiene un peso molecular desde 2.000 hasta 40.000 dalton.

Según algunas realizaciones preferentes de la misma, la presente invención da a conocer un hidrogel compuesto de ácido hialurónico reticulado químicamente con un polímero de polihidracida, tal como se ha definido anteriormente. También en este caso el polímero de polihidracida es alfa,beta-poliaspartilhidracida y, preferentemente, el ácido hialurónico utilizado para la producción del hidrogel tiene un peso molecular desde 50.000 hasta 1.500.000 dalton, y la alfa,beta-poliaspartilhidracida tiene un peso molecular desde 2.000 hasta 40.000 dalton, siendo el intervalo más preferente desde 10.000 hasta 30.000 dalton.

Preferentemente, en la producción del material polimérico reticulado la proporción entre los moles de la unidad de repetición de alfa,beta-poliaspartilhidracida y moles de la unidad de repetición de ácido hialurónico es desde 0,01 hasta 5, siendo el intervalo más preferente desde 0,5 hasta 3.

En vista de la estructura química de los dos polímeros que componen el hidrogel según la presente invención, es posible plantear la hipótesis de que el producto resultante de la reacción de reticulación tenga la siguiente estructura:

Según algunas realizaciones preferentes de la presente invención, los hidrogeles propuestos se pueden obtener mediante la reacción del ácido hialurónico con el polímero de polihidracida en presencia de carbodiimida (con la estructura general $R^1-N=C=N-R^2$) como agente de activación. El producto de activación preferente es N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), pero se podrían utilizar otros agentes similares en su lugar, tales como, por ejemplo, N,N'-dicicloexilcarbodiimida, ciclohexil- β -(N-metilmorfolina)etil carbodiimida p-toluensulfonato (CMC) o N-alil-N'-(β -hidroxietil)carbodiimida. Preferentemente, cuando se utiliza EDC la proporción entre los moles de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida y los moles de la unidad de repetición de ácido hialurónico es desde 0,01 hasta 10.

Para activar la reacción de reticulación, puede ser ventajoso añadir al medio de reacción otro agente de activación, tal como una N-hidroxisuccinimida (NHS), específicamente N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS). En este caso la NHSS se encuentra presente, preferentemente, en la misma cantidad molar que la mencionada N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

Según otro aspecto específico de la misma, la presente invención da a conocer un proceso de fabricación para la producción de un hidrogel compuesto de ácido hialurónico reticulado químicamente con un polímero de polihidracida, en el que el ácido hialurónico, obtenido de fuentes animales o vegetales o mediante procesos biotecnológicos y que tiene el peso molecular mencionado anteriormente, y el polímero de polihidracida, preferentemente PAHy, con el peso molecular que se ha indicado anteriormente, se disuelven en agua bidestilada en una proporción molar prefijada y se añade a los mismos una cantidad fijada de carbodiimida, preferentemente EDC. La mezcla de reacción se mantiene desde 0°C hasta 60°C durante un tiempo que oscila entre 1 hora y 5 días, y posteriormente el producto se recupera como un hidrogel. En este caso, durante la reacción el pH se mantiene en el intervalo entre 3 y 8, en particular, mediante la utilización de una solución de HCl 0,1 N o una solución de clorhidrato de bis (2-hidroxietil) aminotris (hidroximetil) metano con una concentración que oscila desde 1 hasta 500 mM.

Según otro aspecto de la misma, el proceso según la presente invención puede incluir la adición, además de dicha carbodiimida, de una cantidad prefijada de N-hidroxisuccinimida, preferentemente NHSS, como agente adicional de activación de la reacción. En este caso, durante la reacción el pH se mantiene en el intervalo entre 4 y 10.

Después del tiempo de reacción, cada producto se purifica mediante diversos lavados con agua bidestilada y, a continuación, se seca mediante liofilización (para obtener nanopartículas, micropartículas o esponjas) o se seca durante varios días a 25°C a una presión de 1 atm dentro de moldes adecuados, para obtener películas, membranas o barras. Tal como será más evidente a continuación, con referencia a los datos experimentales presentados, los sistemas preparados tienen una versatilidad de aplicación amplia en el sector biomédico y farmacéutico, y son adecuados, por ejemplo, para curar heridas, para evitar la adherencia posquirúrgica, para lubricar articulaciones, para permitir el crecimiento celular *in vitro* e *in vivo*, para realizar sistemas de administración de fármacos.

También se debe considerar que las soluciones tanto de HA como de polímero de polihidracida se podrían esterilizar individualmente. Después de su mezclado, el tiempo de gelificación, que siempre es superior a 10 minutos, podría permitir la aplicación de la solución formadora de gel *in situ*, de modo que se obtuviera, después de varios minutos, la formación de un gel directamente sobre el tejido. En este sector, ya existen en el mercado productos propuestos para la misma aplicación, por ejemplo, productos que consisten en una doble jeringa que contiene reactivos adecuados basados en derivados de PEG (polietilenglicol), capaces de reticular *in situ* después de su mezclado. Las soluciones se pulverizan sobre tejidos para evitar la adherencia posquirúrgica.

De este modo, la presente invención, además, da a conocer específicamente un equipo para la producción *in situ* de un hidrogel compuesto de ácido hialurónico químicamente reticulado con un polímero de polihidracida, preferen-

temente alfa,beta-poliaspartilhidracida, que comprende un envase con un primer componente basado en ácido hialurónico y un envase con un segundo componente basado en polímero de polihidracida, siendo dichos dos componentes capaces de formar el hidrogel después de su contacto mutuo, directamente sobre el lugar de aplicación.

5 Todos los productos obtenidos según la presente invención se han caracterizado mediante técnicas espectrofotométricas y medidas de hinchamiento en agua bidestilada y en medios que simulan algunos fluidos biológicos (fluido extracelular, fluido gástrico, fluido intestinal, fluido sinovial, humor acuoso o humor vítreo) en un intervalo de temperaturas desde 20°C hasta 40°C. Los valores de hinchamiento, tal como se ha indicado anteriormente, han mostrado una elevada afinidad de los hidrogeles preparados según la presente invención hacia un medio acuoso. El alcance de esta
10 afinidad resultó ser dependiente del grado de reticulación, y del compuesto y pH del medio de hinchamiento (intervalo de pH investigado desde 1 hasta 9).

15 Todos los productos de la presente invención se han sometido también a estudios de hidrólisis química a 37°C, utilizando medios con diversas composiciones salinas y valores de pH imitando algunos fluidos biológicos (intervalo de pH investigado desde 1 hasta 8) con tiempos de incubación desde 1 hasta 30 días. Los resultados obtenidos, mostrados parcialmente a continuación, han demostrado que los productos propuestos son resistentes a la hidrólisis química en función del medio de hidrólisis (compuesto y pH), del tiempo de incubación y del grado de reticulación del hidrogel.

20 Finalmente, los productos según la presente invención se han sometido a estudios de hidrólisis enzimática mediante la utilización de soluciones acuosas que contienen HAasa a diferentes concentraciones (que oscilan de 1 a 1000 U/ml), a 37°C y para tiempos de incubación que oscilan desde 30 minutos hasta 30 días. En este caso, tal como se ha indicado anteriormente, los resultados obtenidos han demostrado que los productos de la presente invención también son resistentes a la hidrólisis mediante hialuronidasa, en función de la concentración de enzima, del tiempo de incubación y del grado de reticulación del hidrogel.

25 Las características específicas de la presente invención, así como sus ventajas y las correspondientes condiciones de funcionamiento serán más evidentes en la descripción detallada mostrada a continuación, sólo a modo de ejemplo, junto con los resultados de los experimentos llevados a cabo sobre la presente invención y los datos para la comparación con la técnica anterior. También se dan a conocer algunos resultados experimentales en las figuras anexas en las que:

30 La figura 1 muestra el comportamiento de hinchamiento, en solución acuosa con tampón citrato pH 6,3, de una serie de esponjas basadas en hidrogeles de HA-PAHy según la presente invención;

35 La figura 2 muestra el comportamiento de hinchamiento, en solución acuosa con solución tampón fosfato de Dulbecco (DPBS) pH 7,4, de una serie de esponjas similares a las de la figura 1;

La figura 3 muestra los resultados de estudios de degradación, en ausencia de HAasa, de una serie de esponjas basadas en hidrogeles de HA-PAHy según la presente invención;

40 La figura 4 muestra los resultados de los estudios de degradación mediante hidrólisis enzimática, de una serie similar de esponjas, en las que la concentración del enzima HAasa utilizado es de 75 U/ml; y

La figura 5 muestra los resultados de los estudios de degradación mediante hidrólisis enzimática de una serie similar de esponjas, en las que la concentración del enzima HAasa utilizado es de 150 U/ml.

45 Ejemplo 1

Se añadió una solución acuosa que contiene ácido hialurónico (0,5% peso/volumen) a una cantidad de alfa,beta-poliaspartilhidracida (PAHy), tal como para obtener una proporción entre los moles de unidad de repetición de PAHy
50 y los moles de unidad de repetición de ácido hialurónico (proporción indicada como "X") igual a 2.

Para activar la reacción entre el ácido hialurónico y la PAHy, se utilizó N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) sola, en una cantidad tal como para obtener una proporción entre moles de EDC y moles de unidad de repetición de ácido hialurónico (proporción indicada como "Y") igual a 1,8.

55 La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 4 horas. Durante la reacción, el valor de pH se mantuvo a un valor constante de 4,75 mediante la utilización de una solución de clorhidrato de bis (2-hidroxiethyl)aminotris(hidroxiethyl)metano con una concentración de 300 mM.

60 Después del tiempo de reacción, el producto obtenido se purificó mediante varios lavados en agua bidestilada y, a continuación, se secó por liofilización para obtener micropartículas.

El producto obtenido se ha pesado (rendimiento del 94%±1,9) y caracterizado mediante técnicas espectrofotométricas.

65 Mediante la utilización del mismo procedimiento también es posible obtener nanopartículas, películas, barras, esponjas y geles.

Ejemplo 2

Se repitió el mismo procedimiento que se ha dado a conocer en el Ejemplo 1 con la única diferencia de que la reacción de reticulación se llevó a cabo en presencia de EDC como activador y en presencia de la misma cantidad molar de N-hidroxisulfosuccinimida (NHSS).

En este caso el valor del pH se mantuvo a 7,5.

Llevando a cabo la reacción del mismo modo que en el Ejemplo 1 se obtuvieron rendimientos similares para el producto purificado, que se caracterizó mediante técnicas espectrofotométricas.

Estudios de hinchamiento

El producto obtenido en varios tamaños y formas, tales como nanopartículas, micropartículas, películas, barras, esponjas y geles, tiene un grado de hinchamiento elevado en agua bidestilada. Tal como se ha indicado anteriormente, esta propiedad confiere a los hidrogeles de la presente invención una biocompatibilidad potencial que, además, está confirmada por la biocompatibilidad de los dos polímeros de partida, dando, de este modo, amplias posibilidades para la utilización de estos productos en el sector biomédico y farmacéutico.

Se llevaron a cabo ensayos de hinchamiento en tampón DPBS pH 7,4 y tampón citrato pH 6,3, utilizando una serie de esponjas de HA-PAHy obtenidas según los esquemas de los ejemplos anteriores, variando la proporción molar X e Y definidas anteriormente. Utilizando procedimientos adecuados, el comportamiento de hinchamiento se expresó mediante la proporción (Q) entre el peso en equilibrio de la esponja hinchada y el peso de la misma esponja seca.

En las figuras 1 y 2 se muestran algunos resultados de estos experimentos, llevados a cabo utilizando dos soluciones de tampón diferentes como medio acuoso. Es evidente, examinando estas figuras, que los valores de hinchamiento en tampón fosfato son dos veces los correspondientes valores Q en tampón citrato. Además, en los dos medios se observa que, incrementando la cantidad de PAHy en las esponjas (proporción X entre 1 y 2), tiene lugar un ligero incremento en la capacidad de hinchamiento, siendo esto más evidente para valores de Y más pequeños.

Estudios de degradación química y enzimática

El producto obtenido según los esquemas de los Ejemplos 1 y 2 anteriores se sometió a estudios de hidrólisis química a 37°C durante 10 días en solución tampón fosfato pH 7,4 (que simula el fluido extracelular) y pH 5,5 (que simula el pH de la piel). Después de 10 días, el producto se recogió, se purificó mediante lavado con agua bidestilada, se liofilizó y se pesó para determinar el porcentaje de degradación, que resultó ser inferior al 4%.

Para otro grupo de experimentos, la serie de hidrogeles que se ha dado a conocer anteriormente, obtenidos con diferentes proporciones molares X e Y, se han lavado a fondo y se han liofilizado, a continuación, se han mantenido en tampón citrato pH 6,3 en presencia o ausencia de hialuronidasa. La anterior se utilizó en dos ensayos diferentes a una concentración de 75 y 150 U/ml, respectivamente. Después de incubación a 37°C con agitación durante tiempos fijados, se calculó la extensión de la degradación del hidrogel utilizando procedimientos analíticos adecuados.

En las figuras 3, 4 y 5, respectivamente, se muestran los resultados de algunos ensayos de degradación química (en ausencia de HAasa) y degradación enzimática con dos concentraciones diferentes de enzimas responsables. En este caso, los ensayos también se agrupan en series en función de las proporciones molares X e Y utilizadas en la preparación del hidrogel. Examinando estas figuras, es evidente que para cada medio escogido para este experimento, tiene lugar una degradación progresiva de las esponjas. Para cada serie, con un valor igual de X, la degradación disminuye incrementando el valor de Y. Esto significa, tal como se esperaba, que la eficacia de la reticulación aumenta incrementando las cantidades de EDC y NHSS.

Además, con un valor igual de Y se observa una disminución evidente del porcentaje de degradación incrementando la cantidad de agente de reticulación (PAHy), es decir, el valor de X, demostrando así que la velocidad de degradación aumenta disminuyendo el grado de reticulación. Finalmente, se puede observar que la esponja que muestra la mejor resistencia a la degradación es la obtenida con X=1 e Y=1; en realidad, después de 2 semanas, muestra sólo una degradación del 10% en ausencia de HAasa.

Tomando en consideración los resultados anteriores, es evidente que los hidrogeles según la presente invención tienen la ventaja de experimentar una degradación hidrolítica o enzimática dependiente del tiempo y que se puede fijar con antelación, en función de la aplicación deseada, cambiando las condiciones de preparación del producto de la presente invención. Los materiales preparados, además de tener una excelente compacidad y elasticidad, son resistentes a la hidrólisis química y enzimática durante varios días, pero son totalmente degradables y reabsorbibles después de largos periodos de tiempo.

Estas ventajas se obtienen, según la presente invención, sin perjudicar los costes y la facilidad de producción. La última, por el contrario, es muy simple, barata y fácilmente reproducible con rendimientos elevados. Finalmente, se debe manifestar que los biomateriales propuestos según la presente invención representan una combinación excelente entre las ventajas debidas a la biocompatibilidad del ácido hialurónico y las propiedades peculiares de un polímero sintético (artificial), tal como la versatilidad química, la fácil procesabilidad y el bajo coste de producción.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende ácido hialurónico reticulado químicamente con un polímero de polihidracida, en el que uno o más grupos carboxi de las unidades de disacárido del ácido hialurónico están enlazadas químicamente, respectivamente, a uno o más grupos hidrácido del polímero de polihidracida.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que dicho polímero de polihidracida es alfa,beta-poliaspartilhidracida.

3. Compuesto, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular desde 50.000 hasta 1.500.000 dalton.

4. Compuesto, según las reivindicaciones 2 ó 3, en el que la alfa,beta-poliaspartilhidracida tiene un peso molecular desde 2.000 hasta 40.000 dalton.

5. Hidrogel compuesto de ácido hialurónico reticulado químicamente con un polímero de polihidracida, en la que uno o más grupos carboxi de las unidades de disacárido del ácido hialurónico están enlazadas químicamente, respectivamente, a uno o más grupos hidrácido del polímero de polihidracida.

6. Hidrogel, según la reivindicación 5, en el que dicho polímero de polihidracida es alfa,beta-poliaspartilhidracida.

7. Hidrogel, según la reivindicación 6, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular desde 50.000 hasta 1.500.000 dalton y la alfa,beta-poliaspartilhidracida tiene un peso molecular desde 2.000 hasta 40.000 dalton.

8. Hidrogel, según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la proporción entre los moles de la unidad de repetición de alfa,beta-poliaspartilhidracida y los moles de la unidad de repetición del ácido hialurónico es desde 0,01 hasta 5.

9. Hidrogel, según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que se puede obtener haciendo reaccionar ácido hialurónico y un polímero de polihidracida en presencia de una carbodiimida como agente de activación.

10. Hidrogel, según la reivindicación 9, en el que dicha carbodiimida es N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

11. Hidrogel, según la reivindicación 10, en el que la proporción entre los moles de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida y los moles de unidad de repetición del ácido hialurónico es desde 0,01 hasta 10.

12. Hidrogel, según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, que se puede obtener adicionalmente en presencia de una N-hidroxisuccinimida como agente de activación adicional.

13. Hidrogel, según la reivindicación 12, en el que dicha N-hidroxisuccinimida es N-hidroxisulfosuccinimida.

14. Hidrogel, según la reivindicación 13, en el que dicha N-hidroxisulfosuccinimida está presente en la misma cantidad molar que dicha N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

15. Proceso de fabricación para la producción de un hidrogel, tal como se ha definido en las reivindicaciones 5 ó 6, en el que dicho ácido hialurónico y dicho polímero de polihidracida se disuelven en agua bidestilada en una proporción molar prefijada y una cantidad fijada de carbodiimida se añade a los mismos, la mezcla de reacción resultante se mantiene a temperaturas desde 0°C hasta 60°C durante un periodo de tiempo de 1 hora hasta 5 días, y posteriormente el producto se recupera en forma de hidrogel.

16. Proceso, según la reivindicación 15, en el que dicho polímero de polihidracida es alfa,beta-poliaspartilhidracida y dicha carbodiimida es N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

17. Proceso, según las reivindicaciones 15 ó 16, en el que durante la reacción el pH se mantiene en el intervalo de 3 a 8.

18. Proceso, según las reivindicaciones 15 ó 16, en el que además de dicha carbodiimida, se añade una cantidad de N-hidroxisuccinimida prefijada con antelación.

19. Proceso, según la reivindicación 18, en el que dicha N-hidroxisuccinimida es N-hidroxisulfosuccinimida.

20. Proceso, según las reivindicaciones 18 ó 19, en el que durante la reacción, el pH se mantiene en el intervalo de 4 a 10.

21. Composiciones e hidrogeles, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de nanopartículas, micropartículas, películas, membranas, barras, esponjas o geles.

ES 2 303 258 T3

22. Equipo para la preparación *in situ* de un hidrogel compuesto de ácido hialurónico reticulado químicamente con un polímero de polihidracida, que comprende un envase con un primer componente basado en ácido hialurónico y un envase con un segundo componente basado en polímero de polihidracido, siendo dichos dos componentes capaces de formar el hidrogel después de su contacto mutuo, directamente sobre el lugar de aplicación.

5 23. Equipo, según la reivindicación 22, en el que dicho polímero de polihidracida es alfa,beta-poliaspartilhidracida.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

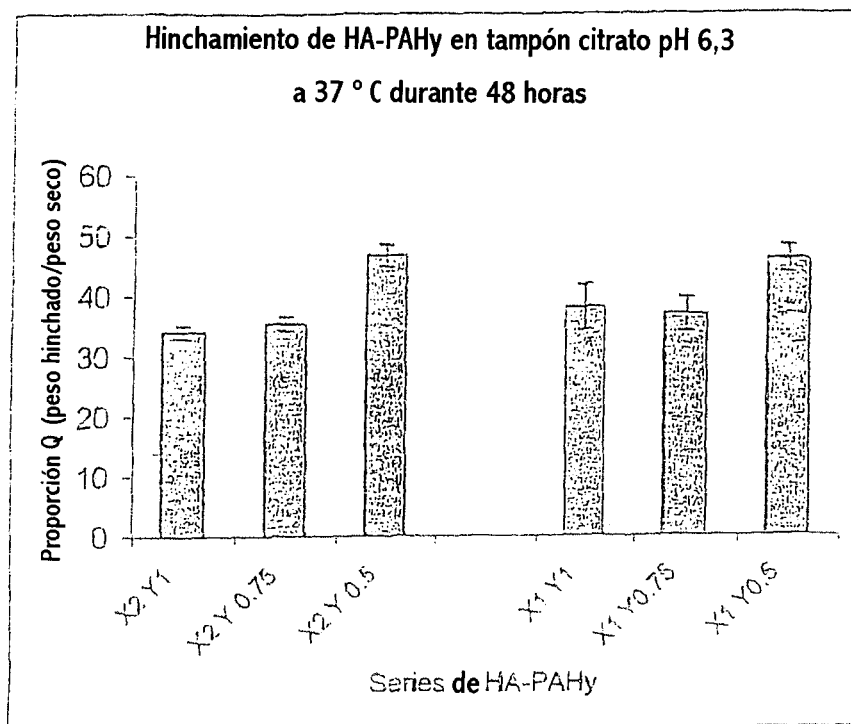


FIG. 1

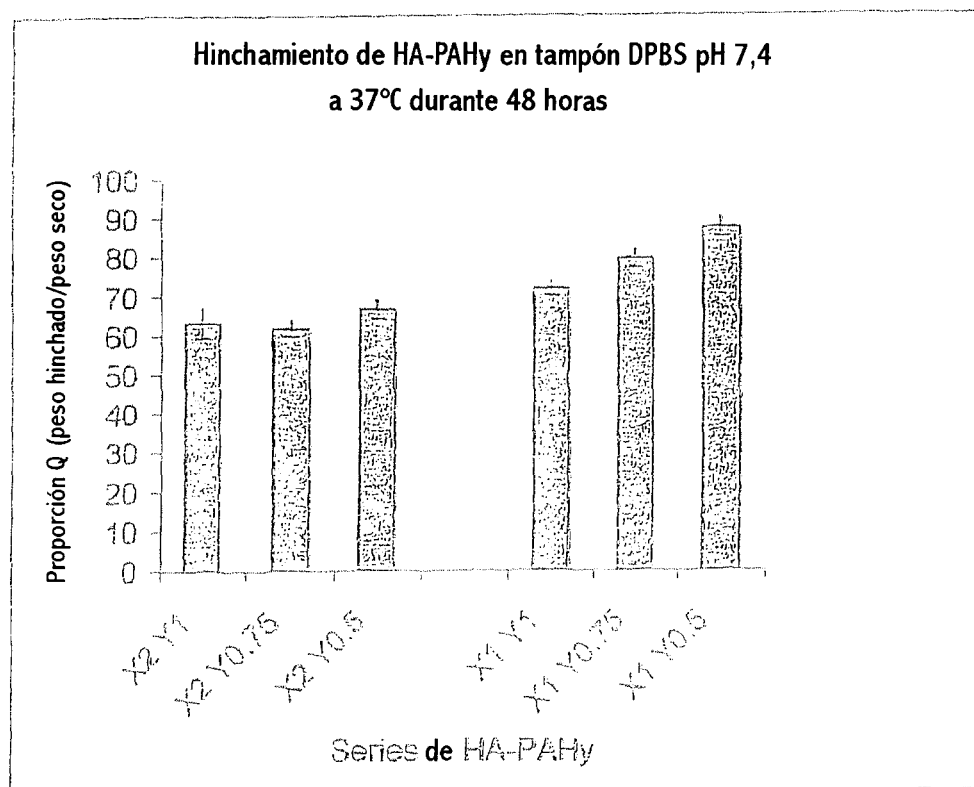


FIG. 2

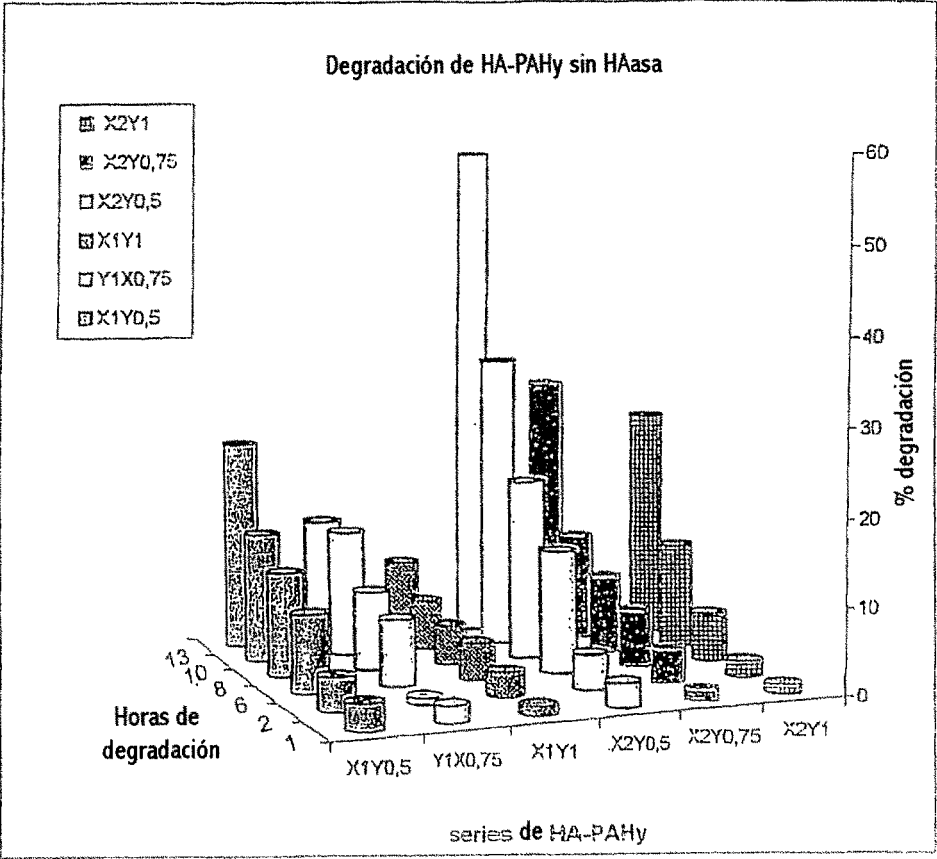


FIG. 3

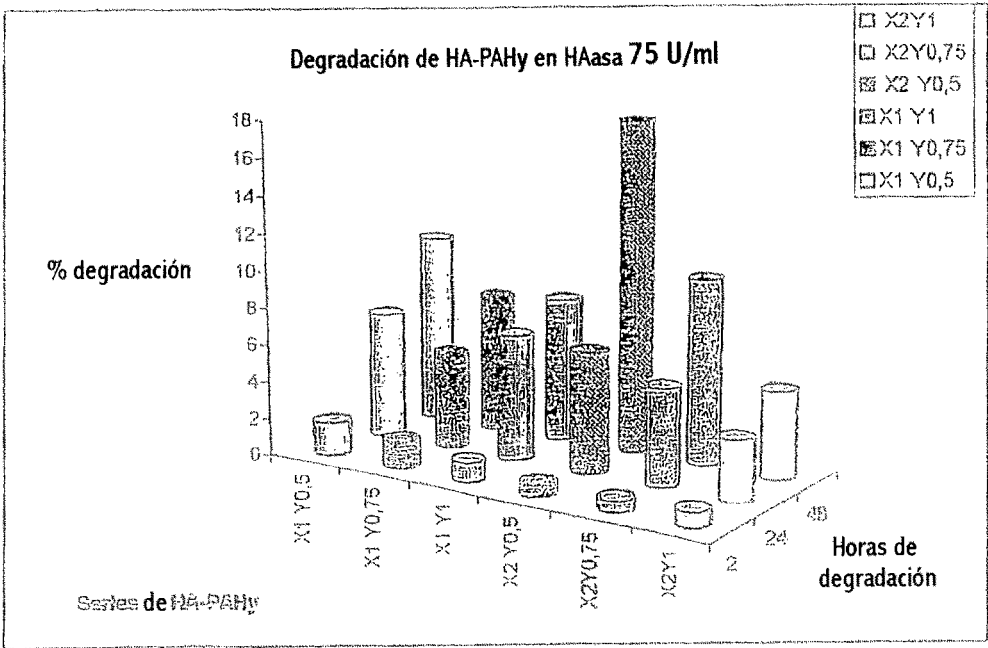


FIG. 4

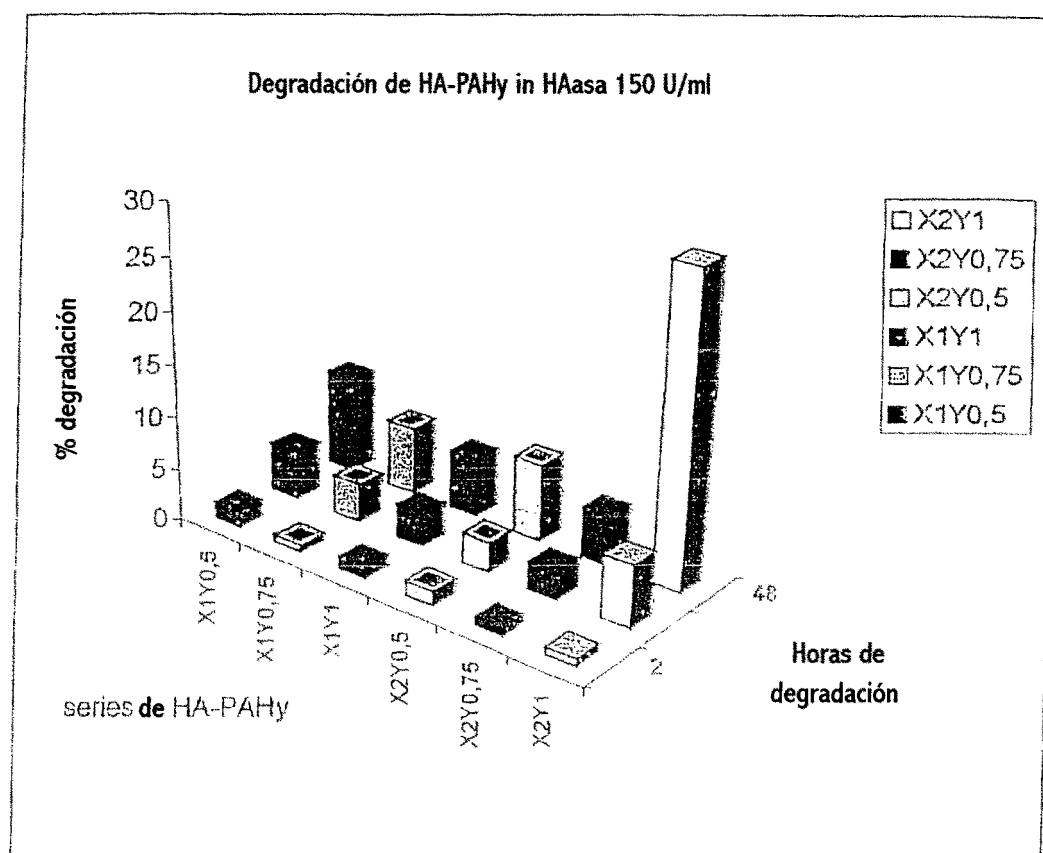


FIG. 5