

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 632**

21 Número de solicitud: 202130055

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C01B 33/18 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

25.01.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.04.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

04.02.2022

Fecha de concesión:

28.04.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.05.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(60.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,
Innovación y Transferencia - i2T Camí de Vera, s/n
Edificio 8G - Acceso A - Planta 3
46022 Valencia (Valencia) ES y
THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION
SCHOLARS, AND THE OTHER MEMBERS OF
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY AND
UNDIVIDED TRINITY OF QUEEN ELIZABETH,
NEAR DUBLIN (40.0%)**

72 Inventor/es:

**RUÍZ HERNÁNDEZ, Eduardo;
COLL MERINO, M^a Carmen;
DE LA TORRE PAREDES, Cristina;
SANCENÓN GALARZA, Félix y
MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **HIDROGELES CARGADOS CON NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA (NMS)
FUNCIONALIZADAS CON POLIETILENGLICOL (PEG) PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA
DE FÁRMACOS**

57 Resumen:

Hidrogeles cargados con nanopartículas de sílice mesoporosa (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) para la liberación controlada de fármacos.

La presente invención se refiere a un material cargado con uno o más fármacos que comprende nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) y un hidrogel formado in situ, particularmente de ácido hialurónico (HA) o quitosano (CS). Asimismo, la invención se refiere al uso de dicho material para la liberación controlada de fármacos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 816 632 B2

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles cargados con nanopartículas de sílice mesoporosa (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) para la liberación controlada de fármacos

La presente invención se refiere a un material cargado con uno o más fármacos que comprende nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) y un hidrogel formado in situ, particularmente de ácido hialurónico (HA) o quitosano (CS). Asimismo, la invención se refiere al uso de dicho material para la liberación controlada de fármacos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En general, los sistemas de liberación de fármacos permiten una distribución más favorable del fármaco cargado. Dado que dichos sistemas tienen tamaños en el rango submicrométrico y además pueden estar modificados en su superficie por polímeros hidrofílicos, como el polietilenglicol (PEG), pueden evitar el aclaramiento renal y su eliminación por parte del sistema inmunitario. De este modo, se alarga el tiempo de permanencia de dichos sistemas en el torrente sanguíneo. Las nanopartículas comerciales, por ejemplo Doxil o Depocyte, son capaces de reducir la toxicidad sistémica y dirigirse pasivamente a los tumores. Si bien esto es una mejora con respecto al suministro de los fármacos en forma libre sin encapsular, estos sistemas representan, en el mejor de los casos, un método no específico para administrar medicamentos quimioterapéuticos en un tumor sin tener en cuenta la dosificación posterior.

Un desafío importante en la administración local de medicamentos está asociado con el hecho de que la retención del fármaco dentro del portador debe ser lo suficientemente fuerte como para evitar fugas prematuras, pero, por otro lado, el fármaco o agente de diagnóstico debe liberarse del portador una vez el sistema ha alcanzado su diana. Los materiales mesoporosos de sílice son candidatos adecuados para emplearse como sistemas de liberación debido a una serie de propiedades. Entre ellas, su porosidad permite un alto grado de encapsulación de fármacos, y su superficie puede funcionalizarse con moléculas conmutables (puertas moleculares) capaces de controlar la liberación de fármacos desde el interior de los poros exclusivamente en presencia de un estímulo concreto. La cuestión clave en dichos materiales es la posible toxicidad que

pueden inducir si se administran por vía sistémica.

Hasta la fecha se han descrito algunos estudios sobre la incorporación de sílice mesoporosa (con y sin funcionalización) en una matriz polimérica. Por ejemplo, la
5 incorporación de NMS en un polímero de quitosano (CS) para formar un hidrogel compuesto fue descrito por Zhu y colaboradores (ver M. Zhu, Y. Zhu, L. Zhang, J. Shi, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2013, 14, 045005). Se estudió el efecto de la presencia de NMS en la matriz del gel y el comportamiento de liberación del fármaco. Atendiendo a los perfiles de liberación, la presencia de NMS en el gel favoreció la liberación sostenida
10 de un antibiótico, concretamente gentamicina, que no sucedía cuando la gentamicina se cargó directamente en el gel. Sin embargo, se han descrito sólo unos pocos ejemplos basados en hidrogeles con respuesta a estímulos externos para la liberación controlada de moléculas. Zuñiga y sus colaboradores (ver E. Zuñiga, L. Belmar, L. Toledo, C. Torres. B. L. Rivas, S. A. Sanchez, B. F. Urbano, *Eur. Polym. J.* 2017, 95, 8358) han
15 descrito la incorporación de NMS cargadas de rodamina B (RhB) en un hidrogel de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) que responde a la temperatura. Llegaron a la conclusión de que a temperaturas más altas que la temperatura de solución crítica, las cadenas de polímero colapsaron y bloquearon los poros de los materiales de NMS, mientras que a bajas temperaturas las NMS evitaron la liberación descontrolada que se
20 produce cuando la RhB se cargó directamente en la matriz del polímero. Otro ejemplo fue desarrollado por Zhao y colaboradores (ver P. Zhao, H. Liu, H. Deng, L. Xiao, C. Qin, Y. Du, X. Shi, *Colloids Surf., B.* 2014, 123, 657), quienes describieron un sistema basado en NMS cargado con ibuprofeno (IB) incrustado en un hidrogel CS para ser utilizado en implantes de titanio. La mezcla de NMS y CS se depositó en una placa de titanio y se
25 encontró que el perfil de liberación de IB respondía al cambio de pH y a la aplicación de un campo eléctrico. Estudios similares fueron realizados por Hu y colaboradores, que incorporaron NMS cargado con BSA en un gel de alginato/hialurónico/quitosano, y probaron el gel final en medios gastrointestinales simulados (ver Y. Hu, X. Dong, L. Kei, S. Zhang, D. Zhao, H. Chen, X. Xiao, *J. Mater. Sci.* 2017, 52, 3095).

30

Por tanto, sería deseable disponer de un material que permita la incorporación de fármacos en la matriz de un hidrogel formado in situ para permitir su liberación local.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta invención tiene como objetivo demostrar que las valiosas propiedades de las nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) con función de puerta molecular permanecen inalteradas después de su integración en la matriz de un hidrogel.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un material cargado con uno o más fármacos que comprende:

- un hidrogel de formación in situ; y
- nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG).

En otra realización, la invención se refiere al material definido anteriormente, donde el fármaco se selecciona de Daunorubicina, Camptotecina, 5 fluorouracilo, Cisplatino, Carboplatino, Temozolomida, Carmustina, Docetaxel y Doxorrubicina (DOX), y preferiblemente donde el fármaco es Doxorrubicina (DOX).

En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde el hidrogel está basado en ácido hialurónico (HA) o en quitosano (CS).

En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde donde las nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) son de tipo MCM-41 caracterizadas por tener un tamaño de partícula de entre 100 nm y 200 nm y un diámetro de poro de entre 2 nm y 50 nm.

En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde las nanopartículas mesoporsas de sílice (NMS) son de tipo MCM-41 con un tamaño de partícula de 100 nm y un diámetro de poro de 2,5 nm.

El efecto del polietilenglicol (PEG) de las NMS funcionalizadas es el de modular la liberación del fármaco en la célula diana. La liberación del fármaco se produce en respuesta a una alta concentración de glutatión (GSH).

Se usa un enlace disulfuro para unir el PEG a la superficie de las partículas y en presencia de dicha molécula se rompe ese enlace y se permite la liberación del fármaco.

El glutatión se encuentra presente dentro de las células humanas, en valores de 5-10 mM, de ahí el interés de usarlo como estímulo. El sistema también puede responder a otras moléculas con propiedades redox como por ejemplo tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP).

5

En el caso de tratarse de otro sistema de puerta molecular, la liberación del fármaco se produciría en respuesta a un estímulo distinto. Existen puertas moleculares que responden a cambios de pH y a la presencia de enzimas entre otros.

10 Así, teniendo en cuenta la mejora en la biocompatibilidad de nanopartículas y las múltiples ventajas que la incorporación de NMS funcionalizadas puede proporcionar en términos de control de la liberación de fármacos desde sistemas locales, la presente invención describe el primer sistema que combina materiales de NMS con función de puerta molecular e hidrogeles formados in situ.

15

Después de demostrar la viabilidad de preparar compuestos de hidrogel que incorporan las nanopartículas con función de puerta molecular, mediante la presente invención se confirma que las características de liberación controlada de dichos materiales se mantienen intactas en el sistema final.

20

Específicamente, la estrategia de la invención se basa en la combinación por un lado de NMS funcionalizadas con cadenas de PEG que actúan como puertas moleculares para la liberación controlada y por otro con hidrogeles de formación in situ basados en quitosano o ácido hialurónico. Estos sistemas podrían usarse potencialmente para
25 combatir enfermedades tales como el cáncer en dos aplicaciones principales: su implantación en el entorno del tumor con el objetivo de reducir la lesión en lugares de difícil acceso, o después de la resección quirúrgica del tumor para prevenir metástasis o recurrencia.

30 Por tanto, el material de la presente invención sería útil para la administración de fármacos para el tratamiento del glioblastoma multiforme, que es la forma más agresiva de cáncer cerebral. El material de la invención comprende una combinación única de un gel inyectable cargado de fármacos y nanopartículas que incluyen puertas moleculares para liberación controlada que proporciona una liberación dual de quimioterapia para el
35 tratamiento local del cáncer residual después de la resección. Por tanto, este material

permite la quimioterapia selectiva para GBM, superando la penetración limitada de la barrera hematoencefálica mediante fármacos anticancerígenos administrados por vía sistémica, que es la causa principal del éxito limitado de las terapias actuales.

- 5 El estándar actual de atención para GBM (protocolo Stupp) es la resección quirúrgica máxima y segura seguida, 4-6 semanas más tarde, de la fase adyuvante que consiste en radioterapia y quimioterapia concomitante administrada por vía sistémica. La resección quirúrgica brinda la oportunidad de administrar localmente agentes quimioterapéuticos, evitando así la barrera hematoencefálica. El uso de quimioterapia
- 10 local en forma de obleas de carmustina (Gliadel) ha demostrado ser prometedor en combinación con la resección, especialmente con temozolomida sistémica concomitante. Sin embargo, el efecto citotóxico de la carmustina se ve obstaculizado por el contacto superficial deficiente con el tumor y las grandes distancias de difusión a través del tejido cerebral. Dado que la invención se basa en un hidrogel formado in situ,
- 15 el material de la invención estaría en contacto directo con la barrera tumoral sanguínea, a partir de la cual se produciría la recurrencia del tumor, y proporcionará una liberación sostenida de ambos quimioterapéuticos, lo que probablemente conducirá a una mayor eficacia y baja toxicidad.
- 20 El uso del material de la invención permite la aplicación de quimioterapia adyuvante inmediatamente después de la resección del tumor. Además, para evitar la necesidad de una extracción quirúrgica complicada de la matriz, el hidrogel se degradará de manera adecuada en productos finales no tóxicos que pueden eliminarse fácilmente del cuerpo. Las opciones de tratamiento para una amplia gama de enfermedades del
- 25 sistema nervioso central podrían beneficiarse del desarrollo del material de la invención a largo plazo, como un sistema de liberación continua contra, por ejemplo, la fluctuación de la concentración del fármaco en pacientes con Parkinson o con esclerosis múltiple, o la localización inespecífica del fármaco en el Alzheimer.
- 30 Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso del material definido anteriormente para la liberación controlada de fármacos, y preferiblemente para la liberación controlada de Daunorubicina, Camptotecina, 5 fluorouracilo, Cisplatino, Carboplatino, Temozolomida, Carmustina, Docetaxel y Doxorubicina (DOX).
- 35 En otra realización, la invención se refiere al uso del material definido anteriormente

para la liberación controlada de doxorrubicina (DOX).

A lo largo de la invención el término “hidrogel de formación in situ” se refiere a un material polimérico con capacidad de absorber agua que se pueda formar in situ al alcanzar la temperatura corporal o por la presencia de agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, polímeros basados en polimetacrilatos, poliacrilamidas, metilcelulosas, y preferiblemente donde el hidrogel es quitosano (CS) y gel de ácido hialurónico (HA). Los hidrogeles a los que se refiere la invención se obtienen por polimerización o entrecruzamiento de uno o varios monómeros. Las características de los monómeros (presencia de grupos funcionales) y el grado de entrecruzamiento determinan sus propiedades y su aplicabilidad. Los hidrogeles de formación in situ son polímeros que tienen la capacidad de gelificar ante cambios de temperatura o por la presencia de agentes de entrecruzamiento. El hidrogel CS cambia sus propiedades en función de la temperatura, de manera que sufre una transformación rápida de estado líquido a estado gel a la temperatura corporal. De esta manera, es posible la aplicación de este hidrogel de forma líquida con una técnica invasiva antes de gelificar en el sitio diana. El hidrogel de HA se forma al mezclar sus monómeros con agentes de entrecruzamiento, lo que permite la obtención in situ del hidrogel en el sitio diana.

El término “nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG)” se refiere a un material silíceo, particularmente de la familia de las MCM-41 de tamaño de partícula nanométrico (100-200 nm) que presenta unos poros de tamaño meso (2-50 nm), y que presenta una funcionalización orgánica en su superficie externa que actúa como puerta molecular frente a un estímulo externo impidiendo la salida de la carga del interior de los poros. Ejemplos de puertas moleculares incluyen entre otros, péptidos, azúcares, ciclodextrinas, cumarinas, azobencenos, pseudorotaxanos, poliaminas, complejos metálicos, nanopartículas de oro o cadmio y preferiblemente cadenas de PEG.

Las “nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) de tipo MCM-41” a las que se refiere la invención son un material mesoporoso con una estructura jerárquica de una familia de sólidos de silicato y aluminosilicato y que están caracterizadas por presentar un tamaño de partícula de entre 100 nm y 200 nm y un diámetro de poro de entre 2 nm y 50 nm.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes

no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende
5 que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Describe el perfil de liberación de NMS desde geles de HA (b) y quitosano- β -GP
10 (a) en PBS.

Fig. 2. Describe el perfil de liberación de Safranina O desde el gel de HA con 6 mg/mL de S2 en ausencia (b) o presencia de GSH (a).

Fig. 3. Describe la viabilidad celular medida por el ensayo WST-1 a las 24 h (negro), 48 h (gris) y 72 h (barra blanca). Se realizaron tres experimentos independientes que contienen triplicados. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con HA-S3 o HA-NMS calcinada en comparación con las células tratadas con el gel de HA control (prueba t de Student, $P < 0,05$).
15

Fig. 4. Muestra las imágenes de microscopia confocal correspondientes a células U271 tratadas durante 24 h con gel de HA (**2a**), gel HA-NMS calcinadas (**2b**), gel HA-S2 (**2c**) y gel HA-S3 (**2d**) de concentración 6 mg de nanopartículas/mL de gel.
20

EJEMPLOS

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

Para demostrar la posibilidad de introducir nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) funcionalizadas con puertas moleculares para la liberación controlada de fármacos en una matriz de gel, se han realizado los siguientes experimentos:
30

Síntesis de nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS)

Las nanopartículas mesoporosas de sílice se sintetizan como se describe en la
35

bibliografía. Primero, se disuelve el bromuro de n-cetiltrimetilamonio (CTAB) (1,00 g, 2,74 mmol) en 480 mL de agua desionizada. Después de eso, se añade 3,5 mL de NaOH 2M sobre la solución de CTAB anterior y se aumenta la temperatura hasta los 80 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se añaden gota a gota 5 ml de tetraetilortosilicato (TEOS, $2,57 \times 10^{-2}$ mol) en la disolución anterior. La mezcla se agita durante 2 h produciéndose la aparición de un precipitado blanco. Finalmente, el producto sólido obtenido se centrifuga, se lava con agua desionizada y etanol y se deja secar a 60 °C. Para preparar el producto final (NMSs), el material se calcina a 550°C usando una atmosfera oxidante durante 5h para eliminar la fase que actúa de plantilla.

Síntesis del material S2

Se suspenden 500 mg de NMSs y el colorante safranina O (140,34 mg, 0,40 mmol) en acetonitrilo (15 mL) en un matraz de fondo redondo. La mezcla se somete a un baño de ultrasonidos durante 10 min y se deja en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Este sólido **S0** se filtra y se seca a vacío. Posteriormente, el sólido **S0** (150 mg) se suspende en acetonitrilo (8,5 mL) en presencia de un exceso de safranina O, y se añade sobre la suspensión el (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (464,4 µL, 2,5 mmol). La suspensión se agita durante 5,5 h a temperatura ambiente y pasado ese tiempo se añade el 2,2'-dipyridyl disulfide (550,8 mg, 2,5 mmol) sobre la mezcla de reacción. Después de agitar durante 12 h a temperatura ambiente, el material obtenido se filtra y se seca a vacío obteniendo el material **S1**. Finalmente, se suspende el material preparado (**S1**, 100 mg) y el poli(etilenglicol)metil éter tiol (0,5 mmol) en acetonitrilo en presencia de un exceso de Safranina O. La mezcla se agita durante 12h, y el material final obtenido **S2** se aísla por centrifugación, se lava con abundante agua y se seca a vacío.

Síntesis de S3.

El material **S3** se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el material **S2**, pero las NMSs son cargadas con el fármaco doxorubicina (DOX) en lugar de Safranina O. En este caso, se suspenden 200 mg de NMSs calcinada y la DOX (100 mg, 0,17 mmol) en agua destilada (7 mL). Al igual que en el caso de **S2**, el material **S3** se aísla por centrifugación, se lava con abundante agua y se seca a vacío.

Síntesis de geles formados in situ.

Para la preparación de los geles de ácido hialurónico (gel HA, se prepara inicialmente

una solución precursora con un derivado de tiramina de ácido hialurónico en PBS al 2% p/v en agitación toda la noche a temperatura ambiente. Por otra parte, se prepara una disolución madre de H₂O₂ añadiendo 33 µL H₂O₂ of 30% en 10 mL en PBS y una disolución de peroxidasas de rábano picante (HRP) disolviendo 0,856 mg de HRP en 10 mL de PBS. Dos viales se usan para preparar un volumen final de 4 mL. En el vial A se añaden 2 ml de la disolución de HA y 120 µL of H₂O₂. En el vial B se añaden 2 ml de HA y 120 µL de una disolución de HRP (60 µL/mL gel). Después de agitar durante 2 min, se suspenden las nanopartículas en el vial B mezclando suavemente con una pipeta. Finalmente, se usa una jeringa de dos vías para mezclar rápidamente las soluciones del vial A y B en un molde. Los geles se formaron mediante el acoplamiento oxidativo enzimático de los restos de tiramina en el HA (K. Xu, K. Narayanan, F. Lee, K. Hyun Bae, S. Gao, M. Kurisawa, *Acta Biomater* **2015**,24,159). Unos minutos más tarde, los geles de AH de 0,5 mL que contienen las partículas se retiran del molde.

Los geles de quitosano se preparan como se describió previamente (A. López-Noriega, C.L. Hastings, B. Ozbakir, K.E. O'Donnell, F.J. O'Brien, G. Storm, W.E. Hennink, G.P. Duffy, E. Ruiz-Hernández, *Adv. Healthcare Mater* **2014**, 3, 854). Brevemente, el quitosano extra puro (80 mg) se disuelve en agua destilada fría a pH 8-9. A continuación, se añadieron gota a gota sobre la disolución anterior, 280 mg de β-glicerofosfato (β - GP) disueltos en agua destilada al mismo pH. Luego se añadieron las nanopartículas y la suspensión se mezcló suavemente. Los geles de volumen final 0,5 mL se formaron al calentarlos a 37 °C.

Estudios de liberación.

Los experimentos de liberación se llevan a cabo utilizando los materiales **S2** y **S3** en presencia y ausencia de glutatión (GSH) como agente reductor. En un experimento típico, 0,5 mg de cada material suspendido en 1,5 mL de agua destilada a pH 7,5 con y sin glutatión a una concentración final 10 mM. Se agita la suspensión y cada cierto tiempo se separa una alícuota y se centrifuga. La liberación se controla a través de la banda de emisión de la Safranina O o Doxorubicina centrada en 585 nm ($\lambda_{exc} = 520$ nm) or 557 nm ($\lambda_{exc} = 495$ nm), respectivamente.

Para los estudios de liberación en el caso de los geles, se colocaron en un pocillo en una placa de 12 pocillos 500 µL de gel de HA con 6 mg/mL de **S2** or **S3** (3 mg de nanopartículas/gel). A continuación, se añaden 2 mL de PBS con GSH a una concentración final 10 mM. Como control, se realiza el mismo experimento en ausencia de GSH. La placa se deja en un incubador a 37 °C bajo agitación moderada. Se toman

alícuotas de 250 μL y se reemplaza el mismo volumen con disolución fresca según corresponda. Después de centrifugar la alícuota, se mide la fluorescencia de los sobrenadantes de Safranina O o DOX en una cubeta de 200 μL .

5 Estudios de liberación de nanopartículas

Se hizo un seguimiento de la concentración de nanopartículas liberadas de los geles utilizando un equipo Nanosight NS300. "Nanoparticle tracking análisis" (NTA) se utiliza para visualizar y analizar el tamaño de las dispersiones de nanopartículas atendiendo a su velocidad de movimiento browniano. La velocidad de movimiento de las partículas está relacionada con la viscosidad del líquido, la temperatura y el tamaño de la partícula, y no está influenciada por la densidad de partículas o el índice de refracción. Las partículas contenidas en la muestra se visualizan en virtud de la luz que dispersan cuando son iluminadas por un láser de 488 nm. La luz dispersada se captura con una cámara digital y el movimiento de cada partícula es rastreado de fotograma a fotograma por el software NTA 3.2. Además, el sistema permite medir las concentraciones de partículas en el rango de diámetro de 10 nm-2000 nm en líquidos. Se realizaron capturas de video de 60 s por triplicado

Cada alícuota tomada en los estudios de liberación de gel se diluye usando H_2O destilada y se mide en el rango de concentración recomendado (106-109 partículas/ml). Esta operación se repitió tres veces.

Ensayos de viabilidad celular WST-1

Las células se cultivan en placas de microtitulación estériles de 24 pocillos a una densidad de siembra de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo y se dejan depositar durante 24 h. Se colocan los geles de HA de 0,5 ml en insertos de cultivo celular con membrana de tereftalato de polietileno (PET) de tamaño de poro de 8,0 μm , lo que permite el paso de las nanopartículas (según lo verificado por NTA). Después de 24, 48 o 72 h, se eliminan los insertos y las células se lavan dos veces con PBS. Luego, se añade el reactivo WST-1 (30 μl de una solución de 50 mg/ml) a cada pocillo. Las células se incuban adicionalmente durante 1 h y se mide la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas. Como control positivo de muerte celular, se añade doxorubicina en agua estéril a ciertos pocillos.

Microscopia confocal en vivo de células tratadas con geles cargados con partículas.

Las células se siembran en cubreobjetos de vidrio de 24 mm en placas de microtitulación de 24 pocillos a una densidad de siembra de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo. Después de
 5 incubar durante la noche, las células se tratan con 0,5 ml de gel HA que contiene 3 mg de las nanopartículas correspondientes (es decir, **S2** o **S3**) usando insertos de cultivo celular como se mencionó anteriormente. Después de 24 h, se retira el inserto y el medio, y las células se lavan con PBS. Luego, las células se fijaron usando paraformaldehído al 4% y se visualizaron bajo un microscopio confocal. La señal
 10 fluorescente del colorante de tinción nuclear 4', 6-diamidino-2-fenilindol y DOX o safranina O dentro de las células se examina mediante un microscopio confocal de barrido láser invertido DMI8. Todas las imágenes confocales se obtienen utilizando la misma configuración. Se realizan experimentos idénticos por triplicado para verificar la reproducibilidad.

15

Cuantificación de las NMS liberadas desde la matriz de un hidrogel

En primer lugar, con el fin de estudiar la capacidad de los geles formados in situ para encapsular y liberar NMS, se introdujeron NMS en geles con distinta composición y se compararon los resultados obtenidos atendiendo al perfil de liberación en función del
 20 tiempo. Específicamente, se prepararon geles basados en ácido hialurónico (HA) y en quitosano/ β -glicerofosfato (GP) en los cuales se encapsularon cantidades iguales de NMS, concretamente 6 mg NMS por ml gel. Ambos geles se incubaron en PBS a 37 ° C mientras se agitaban a 100 rpm. Se sacaron alícuotas a ciertos tiempos y el volumen extraído se reemplazó con nuevo PBS recién precalentado. Todas las alícuotas del
 25 estudio de liberación fueron analizadas con el equipo Nanosight NS300 mediante la técnica de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). De este modo se cuantificó la cantidad de NMS liberada de los geles en función del tiempo. Como se muestra en la Figura 1, se observa una liberación de NMS sostenida en el tiempo para los geles basados en HA (b) en comparación con los geles de quitosano/ β -GP (a) que sufren una
 30 liberación muy rápida. Debido a dicho perfil de liberación controlada de NMS, los geles de HA fueron seleccionados para nuestra invención.

Estudios de liberación de NMS con función de puerta molecular desde la matriz de un hidrogel

35 Como moléculas conmutables que bloquean los poros en la superficie de las NMS, se

seleccionaron cadenas de polietilenglicol (PEG) de peso molecular 800 g/mol. Las cadenas de PEG fueron ancladas sobre la superficie alrededor de los poros de las NMS a través de la formación de un enlace disulfuro para obtener el material PEG-NMS. Para comprobar la estabilidad del material tras su encapsulación en el gel, se prepararon 500 μ l de gel de HA que contiene nanopartículas PEG-NMS cargados con colorante safranina O (HA-S2, 6 mg nanopartículas/mL gel). Se usó el colorante Safranina O como modelo de fármaco. La Figura 2 muestra los perfiles de liberación de safranina O hasta pasadas 48 h, en presencia (a) y ausencia (b) de glutatión (GSH) usado como estímulo para la rotura del enlace disulfuro y el correspondiente desbloqueo de los poros. Como se ha observado, los perfiles de liberación son similares a los datos publicados previamente solo para PEG-MSN cargados con Safranina O (S2) (C. Giménez et al. Langmuir 2015, 31, 3753), lo que demuestra que los materiales preparados mantienen su respuesta al estímulo para el que han sido diseñados después de ser encapsulados en el gel.

Bioactividad del material HA-S3

Para evaluar la bioactividad de las formulaciones de gel de HA con los materiales con función de puerta molecular, se preparó el material HA-S3 que consiste en el material PEG-NMS cargado con un fármaco quimioterapéutico, específicamente doxorrubicina (DOX). Geles de HA sin nanopartículas, geles con 6 mg NMS calcinadas/mL de gel y 6 mg de HA-S3/mL de gel se probaron en diferentes insertos para cultivos celulares y se midió la viabilidad celular después de 24, 48 y 72 h usando el reactivo WST-1 (Figura 3). Para dichos experimentos, células de glioma maligno U271 se cultivaron en placas adherentes de 24 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en medio de cultivo suplementado MEM, en condiciones normales de cultivo. Después de 24 h, se reemplazaron 900 μ l de medio celular por medio fresco en cada pocillo, y se colocó suavemente un inserto de cultivo Falcon con una membrana de PET de 8,0 μ m de tamaño de poro en cada pocillo. Luego, se añadieron 350 μ L de medio precalentado al inserto antes de colocar en los mismos los distintos geles de HA preparados con y sin nanopartículas. Los geles fueron previamente esterilizados bajo una lámpara UV durante 20 minutos. Como control positivo, se utilizó el fármaco DOX libre en el medio celular en la misma concentración que la cantidad máxima de DOX liberada de HA-S3 medidos por espectrofluorimetría en presencia del estímulo GSH.

La Figura 3 muestra el efecto citotóxico del gel HA-S3 a lo largo del tiempo, lo que

demuestra la liberación sostenida de DOX del gel cargado con nanopartículas con función de puerta molecular. A modo de comparación, se muestra la viabilidad de las células tratadas con DOX libre en las mismas concentraciones que las liberadas por HA-S3 en PBS en presencia de GSH a concentración 10 mM (3,79, 3,93 y 5,71 µg de DOX por gel después de 24, 48 y 72 h, respectivamente). Se realizó un ensayo de microscopía confocal utilizando insertos de cultivo celular con sólo gel de HA, geles HA-NMS que incorpora solo nanopartículas calcinadas, geles HA-S2 y geles HA-S3 para verificar la internalización de las nanopartículas liberadas desde los geles y la posterior liberación del fármaco o colorante modelo dentro de las células U217 (Figura 3) cuando el medio reductor, como estímulo, está presente. Como se esperaba, la única señal fluorescente en los controles, HA y HA-MSN, proviene de la tinción de los núcleos, mientras que se observa una señal perinuclear en las imágenes correspondientes a HA-S2 (c) y HA-S3 (d). Las imágenes de microscopía demuestran la localización intracelular de nanopartículas y la posterior liberación de safranina O y DOX.

REIVINDICACIONES

1. Material cargado con uno o más fármacos que comprende:
 - un hidrogel de formación in situ; y
 - 5 - nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) con función de puerta molecular.
2. El material según la reivindicación 1, donde el fármaco es doxorubicina (DOX).
3. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el hidrogel está basado en ácido hialurónico (HA) o quitosano (CS).
- 10 4. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) son de tipo MCM-41 caracterizadas por tener un tamaño de partícula de entre 100 nm y 200 nm y un diámetro de poro de entre 2 nm y 50 nm.
5. El material según la reivindicación 4, donde las nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) son de tipo MCM-41 con un tamaño de partícula de 100 nm y un diámetro de poro de 2,5 nm.
- 15 6. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la liberación controlada de fármacos.
7. El material para el uso según la reivindicación 6, donde el fármaco se selecciona de
- 20 Daunorubicina, Camptotecina, 5 fluorouracilo, Cisplatino, Carboplatino, Temozolomida, Carmustina, Docetaxel y Doxorubicina (DOX).
8. El material para el uso según la reivindicación 7, donde el fármaco es Doxorubicina (DOX).

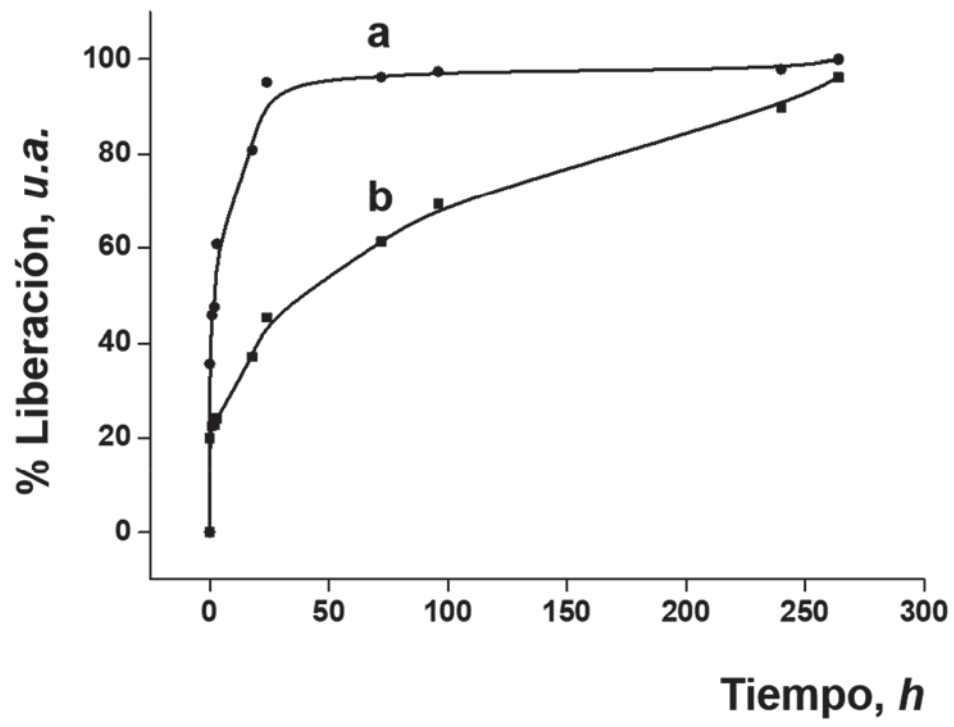


Fig. 1

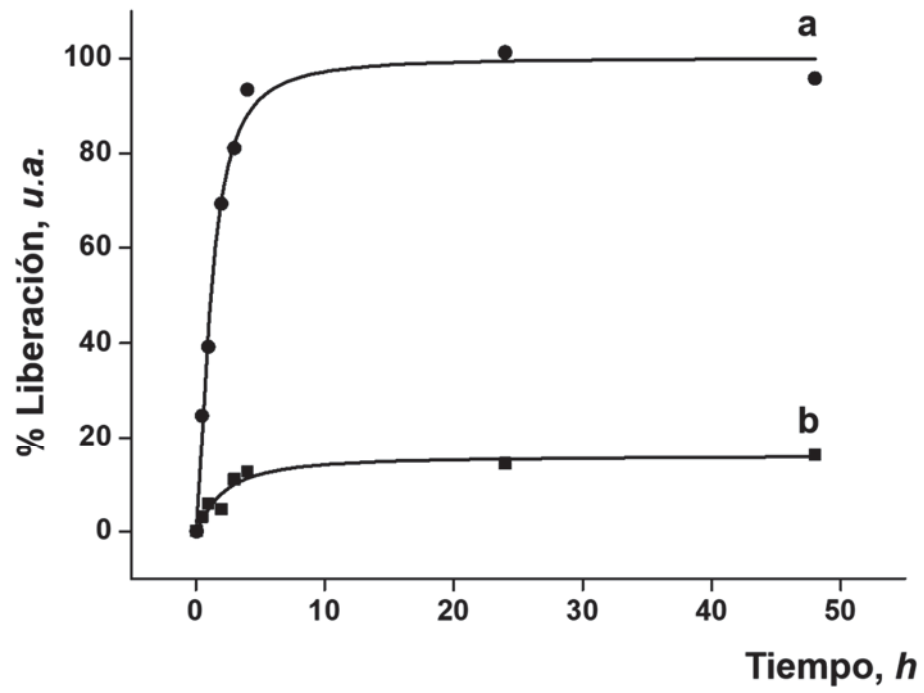


Fig. 2

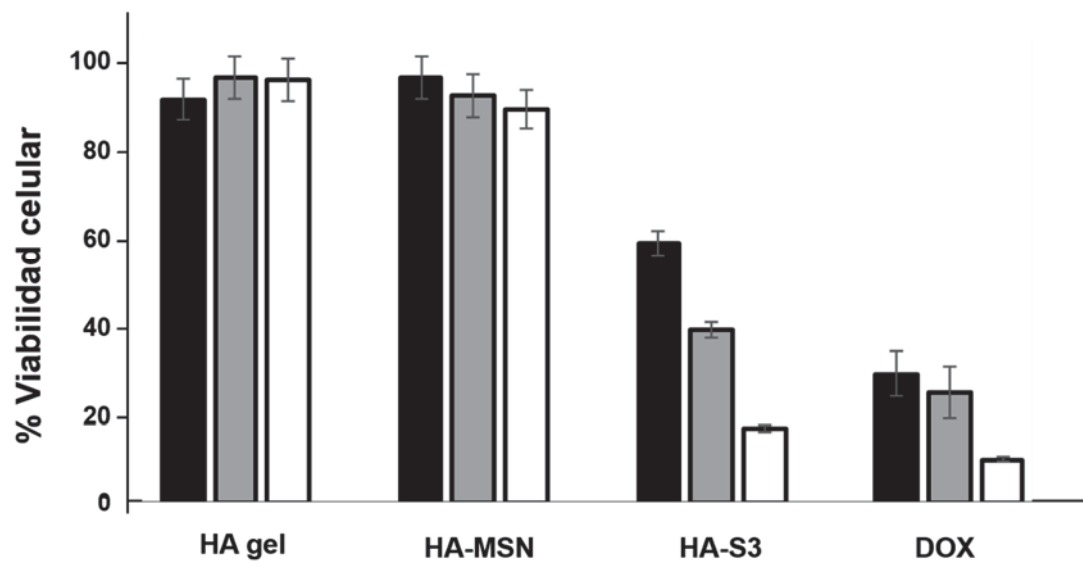


Fig. 3

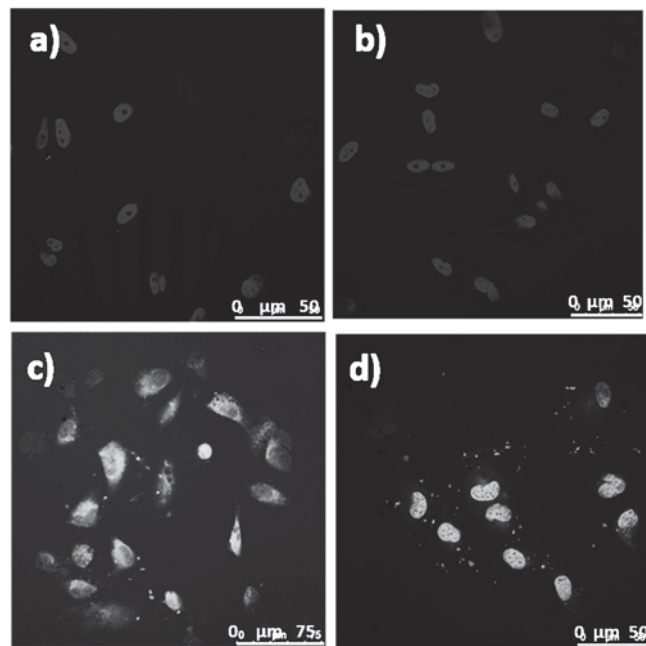


Fig. 4