

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 075**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

C07F 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2016 PCT/EP2016/066215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2016 E 16736458 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021 EP 3320342**

54 Título: **Nuevos hidrogeles de estructura sililada y procedimiento de obtención**

30 Prioridad:

10.07.2015 FR 1556628

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

04.11.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (50.0%)
163, rue Auguste Broussonnet
34090 Montpellier, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ, JEAN;
MEHDI, AHMAD;
SUBRA, GILLES;
JEBORS, SAID y
ECHALIER, CÉCILE**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 874 075 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

Nuevos hidrogeles de estructura sililada y procedimiento de obtención

- 5 El objeto de la presente invención se refiere a unos hidrogeles preparados por medio de moléculas orgánicas sililadas (tales como unas biomoléculas sililadas), a su procedimiento de obtención y a sus utilidades.

Introducción

- 10 Existe una investigación constante con el fin de encontrar nuevos hidrogeles, que puedan ser funcionalizados, que presentan unas propiedades fisicoquímicas o biológicas precisas, en particular para la medicina humana.

Sin embargo, existen actualmente numerosas limitaciones técnicas con estos materiales. Por ejemplo, para obtener unos materiales que tienen unas propiedades biológicas, se introducen a menudo unas biomoléculas (péptidos, proteínas, sacáridos, oligonucleótidos, etc.) en estos materiales de manera no covalente. Esta forma de actuar es ciertamente una técnica de introducción segura de las moléculas activas en los hidrogeles que presentan así *ab initio* las propiedades biológicas y reológicas deseadas. Sin embargo, adolece de la desventaja de que los hidrogeles así obtenidos no pueden ser considerados para ser utilizados *in vivo*, por ejemplo, colocados en un paciente, sin liberación de la/las moléculas activas incorporadas en el seno de su matriz. Además, como los hidrogeles ya están formados y son muy viscosos (en el mejor de los casos), su administración por inyección es muy dolorosa para el paciente.

Así, si se desea que el hidrogel conserve una actividad biológica sin liberación inoportuna, el enlace entre el agente activo y la matriz del hidrogel debe ser covalente. Sin embargo, unir de manera covalente unas biomoléculas en estos hidrogeles sin alterar fundamentalmente sus propiedades fisicoquímicas sigue siendo difícil por varias razones: como las biomoléculas son generalmente unas moléculas cuya química (de síntesis) es a menudo particular (por ejemplo, unas moléculas que tienen a menudo numerosas funciones químicas reactivas), es difícil no implicar unas reacciones secundarias cuando tiene lugar la formación del hidrogel funcionalizado. Además, es difícil unir de manera covalente estas biomoléculas (a menudo voluminosas) hasta el núcleo de la matriz sin alterar sus propiedades fisicoquímicas y/o su integridad cuando se realiza una funcionalización directa del hidrogel.

El documento de patente WO2011089267 se refiere, entre otros, a la fabricación de hidrogeles a los que están unidas de manera covalente unas biomoléculas activas. Para ello, es la química del silicio la que se ha seleccionado de manera complementaria a las biomoléculas elegidas. Así, se sintetizan dos tipos de biomoléculas sililadas, teniendo una por función la matriz estructural del hidrogel (en particular HPMC sililado en el documento WO2011089267), y teniendo la otra la función de funcionalización biológica activa del hidrogel. La invención descrita en el documento WO2011089267 parece por lo tanto atractiva. Sin embargo, la invención divulgada no resuelve todos los problemas técnicos mencionados anteriormente.

Por un lado, las propiedades reológicas de los hidrogeles son difíciles de controlar mediante la técnica del documento WO2011089267. En efecto, el documento WO2011089267 divulga unos hidrogeles formados a partir de una "biomolécula" que tiene un único grupo sililado, cuyas propiedades dependerán esencialmente de la naturaleza del fragmento "biomolécula". Esto es una desventaja ya que es importante poder controlar con precisión la naturaleza química de la matriz del hidrogel independientemente de sus propiedades reológicas. Es fundamental además que el hidrogel asegure por ejemplo una biocompatibilidad según el modelo estudiado y/o presente unas funciones biológicas y/o fisicoquímicas particulares deseadas según el campo en cuestión. Uno de los aspectos según la presente invención ha sido por lo tanto facilitar el control de la reología de los hidrogeles.

Además, solo se proporciona un procedimiento de fabricación de los intermedios de síntesis (biomoléculas sililadas) en el documento WO2011089267 (ejemplo 1 de dicho documento) e implica la suspensión en un disolvente como acetonitrilo anhidro de la biomolécula de interés a sililar. Esto no permite obtener por lo tanto todas las biomoléculas sililadas deseadas. Por lo tanto, la purificación parece ser un problema real casi no abordado en el documento WO2011089267. En efecto, la purificación descrita implica unos lavados sucesivos del sólido suspendido en acetonitrilo con el fin de retirarle todas sus impurezas. Ahora bien, dicha purificación no permite la obtención de un producto (principio activo) con una pureza necesaria para una utilización médica, y necesita por otro lado que el producto obtenido sea insoluble asimismo en el disolvente de lavado (acetonitrilo anhidro en el documento WO2011089267). Las técnicas de purificación habituales tales como la cromatografía en fase inversa (técnica que permite una purificación óptima para la mayoría de las biomoléculas) parecen estar excluidas de la tecnología del documento WO2011089267 ya que las moléculas sililadas descritas son muy reactivas en medio acuoso, resultando así en una polimerización una vez introducidas en una columna HPLC en presencia de agua.

Las enseñanzas del documento WO2011089267, atractivas como primer enfoque, no permiten así trabajar con precisión con los constituyentes de los hidrogeles con el fin de proponer unos hidrogeles funcionalizados de calidad médica o de una calidad suficiente para unos campos vecinos (investigación biomédica en particular).

Sin embargo, aunque existen otros ejemplos de moléculas orgánicas sililadas en la bibliografía, tales como las

encontradas en el documento WO2013190148 en el que se divulgan unos conjugados peptídicos sililados, no se divulga por el contrario su utilización para la fabricación de hidrogeles, o un procedimiento de purificación óptimo que implique por ejemplo la HPLC en fase inversa. Además, en esta ocasión se divulgan solo unos "xerogeles", formas no hidratadas de geles. Ahora bien, el control de la reología de los hidrogeles depende asimismo de su tasa de hidratación. Los documentos Seongbong *et al.*, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, vol. 14, noviembre de 1999, páginas 457-473, Babak *et al.*, Macromolecules, vol. 43, nº 23, 2010, páginas 9957-9963 y Babak *et al.*, Soft Matter, vol. 9, nº 12, 2013, páginas 3262-3271 describen todos unos procedimientos de fabricación de hidrogeles bi-sililados en medio ácido.

En resumen, los hidrogeles tienen un potencial de utilización considerable, en particular en el campo médico. Sin embargo, este potencial está actualmente limitado por un mal control de la fabricación de estos hidrogeles, un desconocimiento de los medios de control de las propiedades reológicas de estos hidrogeles o simplemente la imposibilidad de realizar unos hidrogeles biocompatibles activos cuya actividad perdura en el tiempo.

Así, el objeto de la presente solicitud de patente es proponer por lo menos una solución técnica para paliar los procedimientos incompletos de la técnica anterior con el fin de llegar a obtener unos hidrogeles fácilmente modulables, que pueden ser utilizados en particular en el campo médico y los campos parecidos.

Con el fin de superar los problemas reológicos de los hidrogeles, permitiendo al mismo tiempo integrar las (bio)moléculas deseadas en su estructura, se ha descubierto de manera sorprendente que trabajando con unas (bio)moléculas por lo menos bi-sililadas, era posible modificar las propiedades reológicas de los geles casi independientemente de la naturaleza de las (bio)moléculas denominadas de estructura. Así, un modelo simple de polietilenglicol (PEG) integrado en un hidrogel permitió, según la longitud del PEG, obtener un hidrogel biocompatible con las propiedades reológicas deseadas. En efecto, es el tamaño de la malla formada por la matriz lo que permite que esta, en el caso particular de los hidrogeles, absorba más o menos agua y le confiera las propiedades reológicas deseadas. Además, modificando el número de grupos sililados introducidos en las (bio)moléculas de estructura, es posible hacer que varíen con precisión las propiedades reológicas del hidrogel casi independientemente de la naturaleza de estas (bio)moléculas de estructura.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a las técnicas de purificación de los precursores de hidrogeles eventualmente funcionalizados. La primera de estas técnicas implica una serie de precipitaciones, en particular en un disolvente inerte tal como el éter dietílico. En efecto, esta técnica presenta el interés de que la mayoría de los precursores sintéticos funcionalizados de hidrogeles son insolubles en el éter y no son reactivos en este disolvente. Mediante una sucesión de lavados con éter y eventualmente de disoluciones en un disolvente adecuado, es posible proponer unos precursores sintéticos funcionalizados de hidrogeles con una pureza suficiente para unas moléculas simples (poco costosas).

La presente invención propone además un procedimiento de purificación por HPLC en fase inversa que implica una elección particular de sustituyentes del átomo de Si. En efecto, la utilización de un solo grupo reactivo, tal como un halógeno o un grupo hidroxilo, o un precursor de hidroxilo, en el átomo de Si permite la purificación en columna de HPLC inversa de la biomolécula sililada sintetizada, mientras que las técnicas según la técnica anterior permanecen en silencio sobre este asunto. El interés de poder utilizar la HPLC en fase inversa es que permite la obtención de moléculas activas, tales como unas biomoléculas, con un grado de pureza óptimo, necesario en el marco de una utilización médica.

La elección de los grupos llevados en el átomo de Si permite poder evitar en la mayoría de los casos unas reacciones secundarias no deseadas. El potencial de la presente invención reside asimismo por lo tanto en el hecho de que parecería que cualquier biomolécula de interés biológico (en particular una secuencia peptídica), pueda ser introducida de manera controlada en los hidrogeles según la presente invención para conferirles unas propiedades biológicas.

Se han encontrado además de manera totalmente oportuna unas características fisicoquímicas originales de un hidrogel de polietilenglicol bi-sililado que permiten muy fácilmente el injerto de biomoléculas sililadas. El hidrogel de polietilenglicol bi-sililado así formado es biocompatible, biodegradable, totalmente sintético y fácilmente modulable en términos de tasa de hidratación (impregnable más o menos fácilmente por unos líquidos acuosos por ejemplo). Además se ha descubierto que la matriz del hidrogel PEG (bi-sililado) se puede formar con o sin la presencia de agua, lo cual permite una flexibilidad significativa en cuanto a la utilización de este polímero (hidrogeles deshidratados que pueden ser hidratados a continuación). Sin embargo, con el fin de obtener un hidrogel homogéneo en términos estructurales (homogeneidad de estructura y de hidratación), es preferible formar el hidrogel en un medio predominantemente acuoso. Además, la posibilidad de modificar la reactividad del grupo sililo disminuyendo o aumentando el número de sustituyentes reactivos sobre este (1, 2 o 3 sustituyentes reactivos), permite controlar con precisión el grado de reticulación del hidrogel y poder así controlar con precisión su reología.

Otro aspecto según la presente invención se refiere a la inserción de hidrogeles líquidos en el organismo con polimerización de estos hidrogeles *in situ*. En efecto, un problema recurrente de los hidrogeles líquidos preparados previamente es que son difíciles de inyectar a causa de su viscosidad, provocando al paciente unos dolores más

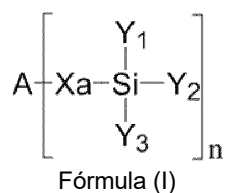
o menos agudos cuando tiene lugar su administración (local). La técnica del documento WO2011089267, incluso si esto se ha mencionado en este documento, no se puede utilizar como tal ya que la pureza de las biomoléculas sililadas no es suficiente para una aplicación médica con una inyección en forma líquida y tomada *in situ*. Los procedimientos de purificación mencionados anteriormente permiten superar este problema técnico.

En efecto, los hidrogeles se pueden preparar por simple disolución de los bloques híbridos en un tampón fosfato y después incubación de la solución a 37°C, lo cual permite considerar su inyección *in vivo* con toma *in situ*.

Resumen de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un hidrogel que comprende las etapas siguientes:

- a) polimerización sol-gel de por lo menos una molécula de fórmula (I):

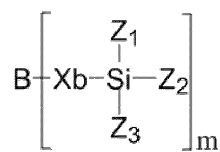


en la que:

- n es un número entero superior o igual a 2;
- A es un polímero orgánico seleccionado de entre las proteínas, los péptidos tales como unos derivados del colágeno, en particular las secuencias que comprenden unas repeticiones de tripéptidos Pro-Hyp-Gly o Pro-Pro-Gly o Asp-Pro-Gly o Pro-Lys- Gly, unas secuencias peptídicas de autoensamblaje como Arg-Ala-Asp-Ala, unas oligoprolinas, unas oligoalaninas, los polisacáridos, tales como el ácido hialurónico y sus derivados, los oligonucleótidos, unos polímeros de C₁-C₆-alquilenglicoles o de polivinilpirrolidona;
- Xa es un enlace químico o un grupo espaciador representado por un radical divalente derivado de una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 10 átomos de carbono, en la que están intercalados eventualmente uno o varios eslabones estructurales seleccionados de entre el grupo arileno, o los fragmentos la -O-, -S-, -C(=O)-, -SO₂- o -N(R₁)-, estando dicha cadena no sustituida o sustituida por uno o varios radicales seleccionados de entre los átomos de halógeno, los grupos hidroxilo, C₁-C₄ alquilo, bencilo y/o fenetilo;
- R₁ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarbonado alifático que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, un bencilo o un fenetilo;
- Y₁, Y₂, Y₃, idénticos o diferentes, representan cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno, de halógeno, un grupo -OR₂, un arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono eventualmente sustituidos por un átomo halógeno, un grupo arilo o hidroxilo;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno, un grupo arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono;
- por lo menos dos grupos Xa tales como los definidos anteriormente unidos a unos puntos de enganche diferentes en A;
- b) puesta en presencia de agua, opcionalmente junto con la etapa a); siendo preferentemente la calidad del agua de calidad médica, y
- c) recuperación del hidrogel,

caracterizado por que el procedimiento de polimerización sol-gel se realiza a pH fisiológico.

El procedimiento de fabricación de un hidrogel tal como el definido anteriormente puede comprender además la adición conjunta o sucesivamente a la etapa a) por lo menos de un tipo de molécula de fórmula (II):



Fórmula (II)

en la que:

- m es un número entero superior o igual a 1; preferentemente m es inferior a 10, más preferentemente inferior a 5 o 4, aún más preferentemente igual a 1;
- B es un principio activo seleccionado de entre un péptido, un oligopéptido, una proteína, tal como el colágeno, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, un polisacárido, tal como una pectina, un quitosano, un ácido hialurónico, un polisacárido poliarabinosa y poligalactosa, y un glicolípido;
- Xb es un enlace químico o un grupo espaciador representado por un radical divalente derivado de una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 10 átomos de carbono, en la que están intercalados eventualmente uno o varios eslabones estructurales seleccionados de entre el grupo arileno, o los fragmentos -O-, -S-, -C(=O)-, -SO₂- o -N(R₃)-, estando dicha cadena no sustituida o sustituida por uno o varios radicales seleccionados de entre los átomos de halógeno, los grupos hidroxilo, C₁-C₄ alquilo, bencilo y/o fenetilo;
- R₃ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo alifático que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, un bencilo o un fenetilo;
- Z₁, Z₂, Z₃, idénticos o diferentes, representan cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno, de halógeno, un grupo -OR₄, un arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono eventualmente sustituidos por un átomo de halógeno, un grupo arilo o hidroxilo;
- R₄ representa un átomo de hidrógeno, un grupo arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono; y
- preferentemente con uno solo de los grupos Z₁, Z₂, o Z₃ como átomo de halógeno o grupo OR₄.

El objeto de la presente invención se refiere por lo tanto a un hidrogel susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento tal como el definido en la presente memoria.

El objeto de la presente invención se refiere además a un hidrogel según la presente invención para su utilización con fines terapéuticos y/o quirúrgicos, caracterizado preferentemente por que dicho hidrogel permite el suministro y/o el transporte de moléculas activas, o para su utilización *in vivo* en ingeniería tisular.

La presente invención se refiere así a un hidrogel susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la presente invención para su utilización tal como la definida anteriormente, caracterizado por que la polimerización de dicho hidrogel se realiza *in situ* en un organismo vivo, es decir un animal tal como un mamífero como el ser humano, tras el vertido o la inyección, preferentemente indolora o poco dolorosa, de las moléculas de fórmula (I) y eventualmente (II) tales como las definidas anteriormente.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización *in vitro* de un hidrogel según la presente invención en ingeniería tisular.

Además, la presente descripción se refiere a un procedimiento de purificación de un producto de fórmula (I) o (II) tal como el definido en la presente memoria, caracterizado por que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a1) eventual solubilización del producto de fórmula (I) o (II) a purificar en un disolvente;
- b1) precipitación del producto de fórmula (I) o (II) a purificar, eventualmente en solución según la etapa a1), en un líquido de suspensión, es decir en el que los productos (I) o (II) no son solubles;
- c1) filtración del sólido obtenido en la etapa (b1);
- d1) repetición por lo menos una vez de las etapas a1) llegado el caso, b1) y c1); y

- e1) recuperación del producto de fórmula (I) o (II) purificado.

El objeto de la presente descripción se refiere además a un procedimiento de purificación de un producto de fórmula (II) tal como el definido en la presente memoria en el que uno solo de los grupos Z_1 , Z_2 , Z_3 es un átomo de halógeno o un grupo $-OR_3$, caracterizado por que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a2) paso del producto de fórmula (II) a purificar por una columna de cromatografía en fase líquida, es decir en un disolvente de elución, preferentemente en fase inversa;
- b2) evaporación del disolvente de elución de la etapa a2), eventualmente por liofilización; y
- c2) recuperación del producto de fórmula (II) purificado.

La presente descripción se refiere así también a un producto de fórmula (I) o (II) tal como el definido en la presente memoria, susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento de purificación de la invención, caracterizado por que dicho producto presenta una pureza de por lo menos el 98% en peso con respecto al peso total del producto, preferentemente superior al 99% en peso.

Definiciones

"Hidrogel"

Un "hidrogel" es un tipo de material que comprende un componente líquido acuoso y un componente sólido. Estructuralmente, está compuesto por una matriz de cadenas poliméricas, hinchado por un fluido que comprende agua, estando este líquido, preferentemente constituido esencialmente por agua, preferentemente en una proporción igual o superior al 40% en peso de dicho hidrogel, comprendida más preferentemente entre el 40 y el 99% en peso, entre el 50 y el 98%, entre el 60 y el 97%, entre el 70 y el 96% o también entre el 80% y el 95%. Preferentemente, este fluido comprende por lo menos el 95% de agua en peso, incluso el 100% de agua. Este fluido puede ser además un líquido de origen biológico. El contenido en agua de un hidrogel determina asimismo en gran parte sus características fisicoquímicas. Es posible encontrar estos hidrogeles asimismo para diversas aplicaciones biomédicas, en particular en la liberación de medicamentos y en el tratamiento de quemaduras cutáneas.

"Polímero que puede ser reticulado" o "polímero reticulable"

Los hidrogeles según la invención están constituidos por cadenas de polímeros unidas entre sí por unos enlaces covalentes. Un polímero reticulado comprende unos nodos con por lo menos 3 enlaces químicos, preferentemente covalentes. Esta reticulación permite que los hidrogeles según la presente invención proporcionen un carácter denominado "permanente" a los nodos de reticulación, ya que el átomo de silicio tetravalente genera 4 enlaces covalentes. Sin embargo, debido a la doble naturaleza de los hidrogeles según la presente invención (orgánica e inorgánica), es posible obtener unas propiedades notables: una rigidez parcial y una capacidad para dar una respuesta elástica a un estrés mecánico. La naturaleza orgánica permite una elevada biocompatibilidad y una no toxicidad de los hidrogeles producidos. Además, los hidrogeles según la presente invención tienen un grado de flexibilidad muy similar al de los tejidos naturales (inducido por su elevado contenido en agua). El término "reticulable" hace referencia preferentemente por lo tanto en este caso a la capacidad de los átomos de silicio para generar como máximo 3 enlaces covalentes con como máximo 3 grupos que comprenden un átomo de Si (tal como Si-OH).

"Polimerización sol-gel"

El procedimiento sol-gel permite fabricar un polímero inorgánico mediante unas reacciones químicas simples a una temperatura próxima a la temperatura ambiente (aplicable en realidad a unos intervalos de temperaturas de entre 0°C y 150°C, preferentemente entre 20°C y 70°C, más preferentemente entre 35°C y 40°C). Normalmente, la síntesis se efectúa a partir de alcoxisilanos o de silanoles de fórmula $Si(OR)_n$ en la que R es un grupo alquilo orgánico C_nH_{2n+1} o un hidrógeno.

Uno de los intereses de este procedimiento es que estos precursores son o bien líquidos, o bien sólidos, en este caso son, en su mayor parte, solubles en unos disolventes habituales. Por lo tanto, es posible preparar unas mezclas homogéneas de monómeros (precursores) u oligómeros.

Las reacciones químicas simples en la base del procedimiento se desencadenan cuando los precursores son puestos en presencia de agua: la hidrólisis de los grupos normalmente alcoxi (o halógeno llegado el caso) ocurre en primer lugar, y después la condensación de los productos hidrolizados conduce a la gelificación del sistema, formando así el hidrogel.

"Polímero orgánico de estructura"

Por "polímero orgánico de estructura", se entiende según la presente invención un polímero de naturaleza orgánica, por lo tanto hidrocarbonado, que permite estructurar el hidrogel en forma de matriz polimérica. Esto se realiza fácilmente a partir del momento en el que los monómeros que componen dicho polímero orgánico de estructura están controlados en términos de estructura química y de pureza; es decir, mediante las técnicas habituales de química de síntesis o de purificación. En efecto, controlando la naturaleza de los monómeros implicados en la polimerización del hidrogel, es posible hacer que varíen las características fisicoquímicas y reológicas del polímero obtenido *in fine*.

"Origen sintético"

Las materias primas utilizadas para la producción de los materiales sintéticos proceden por supuesto de la naturaleza, como el petróleo. Sin embargo, los materiales sintéticos creados por el hombre a partir de procedimientos químicos los diferencian de los demás materiales. Según la presente invención, la expresión "origen sintético" implica que el producto considerado ha sido modificado por lo menos una vez por un procedimiento químico desarrollado por el hombre.

"Enlace químico"

Se denomina "enlace químico" cualquier interacción atractiva que mantiene por lo menos a dos átomos a corta distancia uno del otro. Esta interacción puede ser direccional como el enlace entre dos átomos en el seno de una molécula, o no direccional como la interacción electrostática que mantiene en contacto los iones de un cristal iónico. Puede ser fuerte como los dos ejemplos anteriores, o débil como las interacciones de van der Waals que son de naturaleza dipolar.

"Grupo espaciador"

Se denomina "grupo espaciador" según la presente invención, un fragmento que comprende por lo menos un átomo. Preferentemente, el grupo espaciador contiene por lo menos un átomo de carbono. Ventajosamente, el grupo espaciador permite alejar en el seno de una misma molécula, dos grupos químicos, disminuir el obstáculo estérico entre el grupo A (o B) y el átomo de Si. Más ventajosamente, el grupo espaciador permite que el grupo sililado reaccione con un obstáculo limitado del fragmento A (o B) o que el grupo A (o B) interactúe y conserve sus propiedades biológicas, con un obstáculo limitado del fragmento que contiene el Si. Además, el grupo espaciador permite un enlace estable entre fragmento A (o B) y Si, permitiendo al mismo tiempo que reaccione el fragmento silicato. Por lo tanto, resulta evidente que el grupo espaciador no puede ser considerado como un elemento constitutivo del fragmento A (o B), como por ejemplo un residuo de aminoácido si A (o B) es un fragmento peptídico.

Ventajosamente, el grupo espaciador comprende, o consiste en, una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada, comprendida preferentemente entre 1 y 10 átomos de carbono, más preferentemente entre 2 y 5 átomos de carbono. Preferentemente, el grupo espaciador es una cadena hidrocarbonada alifática saturada.

El grupo espaciador (en particular cuando se trata de una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada tal como la descrita anteriormente) puede incluir además unos heteroátomos, seleccionados en particular de entre N, O, S, o también P, y puede además estar sustituida, en particular por unos átomos de halógeno, o por unos grupos hidroxilos, arilos o alquilos de C₁-C₄, sulfatos, aminas o también fosfatos. Sin embargo, si están presentes unos heteroátomos en el grupo espaciador, preferentemente estos heteroátomos no están unidos directamente a Si.

Preferentemente, el grupo espaciador es un fragmento alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado. Más preferentemente, el grupo espaciador comprende un fragmento -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-. De manera aún más preferida, el grupo espaciador comprende el fragmento -(CH₂)₃-.

"Radical divalente derivado"

Según la presente invención, la expresión "radical divalente derivado" se refiere a un elemento que tiene una valencia de dos. La valencia es el número de enlaces químicos formados, que pueden ser unos enlaces covalentes, polares o iónicos. El término "derivado" se refiere simplemente a los enlaces químicos formados para incorporar dicho radical en la estructura.

"Cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada"

Por "cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada", se entiende unos fragmentos de tipo alquilo de C₁-C₁₀, alqueno de C₂-C₁₀ o alquino en C₂-C₁₀, preferentemente estas cadenas son lineales o ramificadas.

"Alquilo de C₁-C₁₀"

En la presente invención, se entiende por "alquilo de C₁-C₁₀", o también "alquilo de 1 a 10 átomos de carbono", un grupo alifático saturado, lineal, ramificado, incluso cíclico, que comprende de 1 a 10 átomos de carbono, como por ejemplo un grupo metilo, etilo, isopropilo, tercio-butilo, n-pentilo, ciclopropilo, ciclohexilo, etc.

"Alqueno de C₂-C₁₀"

Por grupo "alqueno de C₂-C₁₀", o "alqueno de 2 a 10 átomos de carbono", se entiende en el sentido de la presente invención, un grupo alifático mono o poliinsaturado, lineal, ramificado o cíclico que comprende de 2 a 10 átomos de carbono. Un grupo alqueno según la invención comprende, preferentemente, una o varias insaturaciones etilénicas. A título de ejemplo, se pueden citar los grupos etileno, propileno, propil-2-eno o propil-3-eno, butileno, ciclobuteno, etc.

"Alquino de C₂-C₁₀"

Por grupo "alquino de C₂-C₁₀" o "alquino de 2 a 10 átomos de carbono" se entiende en el sentido de la presente invención, un grupo alifático, lineal, ramificado o cíclico que comprende de 2 a 10 átomos de carbono y por lo menos una doble insaturación, es decir un triple enlace entre dos átomos de carbono. Un grupo alquino según la invención comprende, preferentemente, una o varias dobles insaturaciones. A título de ejemplo, se pueden citar los grupos acetileno, propino, butino, etc.

"Ariilo"

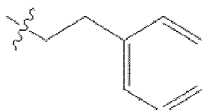
Por grupo "ariilo" se entiende un grupo aromático, que comprende preferentemente de 5 a 10 átomos de carbono, que comprende uno o varios ciclos y que comprende eventualmente uno o varios heteroátomos, en particular un oxígeno, un nitrógeno o un azufre, como por ejemplo un grupo fenilo, furano, indol, piridina, naftaleno, etc.

"Arileno"

Un grupo "arileno" representa un sustituyente de un compuesto orgánico derivado de un fragmento ariilo en el que por lo menos un átomo de hidrógeno ha sido retirado de dos carbonos incluidos en el ariilo. Preferentemente, se trata de un grupo fenetilo.

"Fenetilo"

El término fenetilo representa el fragmento:

*"Halógeno"*

El término halógeno designa los elementos químicos de la 17ª columna de la tabla periódica, antiguamente denominada grupo VII o VIIA. Estos elementos químicos son preferentemente: el flúor, el cloro, el bromo y el yodo.

"Hidroxilo"

El término hidroxilo según la presente invención se refiere al fragmento -OH, y eventualmente a sus sales, por ejemplo de sodio o de potasio.

"Xa unidos a unos puntos de enganche diferentes en A"

Por la expresión "Xa unidos a unos puntos de enganche diferentes en A", se entiende según la presente invención que los grupos Xa no están unidos al mismo átomo que pertenece al polímero A. Preferentemente, los puntos de enganche (es decir, los átomos de enganche) están posicionados de la manera más alejada posible en el polímero A. Una manera de evaluar este alejamiento puede ser simplemente contar el número de átomos entre los dos puntos de enganche en el polímero A. En efecto, las propiedades fisicoquímicas y reológicas son controlables más fácilmente cuando disminuye la entropía de los polímeros A, lo cual se realiza en principio fijando los extremos de las cadenas de polímero.

"Recuperación"

Por "recuperación", se entiende según la presente invención que los productos obtenidos se extraen según las

técnicas habituales de la técnica, es decir por medio de un lavado bifásico que comprende por ejemplo un disolvente orgánico y agua; alternatively, es posible recuperar los productos por suspensión en el líquido que los contiene, y después filtrarlos. Otra forma de recuperar los productos puede ser simplemente evaporar o liofilizar el disolvente que los contiene. Esta fase de recuperación puede contener además una purificación por lavado o paso por columna cromatográfica, llegado el caso.

"Agua de calidad médica"

Por "agua de calidad médica", se entiende según la presente invención que el agua es de calidad ultrapura utilizada habitualmente en el medio médico, eventualmente con unos adyuvantes que permiten encontrar las condiciones fisiológicas del organismo humano, tales como unas sales como NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, etc.; tampón pH como unos tampones fosfato pH 7,4, etc.; o también unos azúcares tales como glucosa, manitol.

"Principio activo"

La definición general de un principio activo es: el principio activo es la molécula que en un medicamento tiene un efecto terapéutico. En el contexto de la presente invención, que se refiere a los hidrogeles, el principio activo es la molécula que presenta unas características fisicoquímicas o biológicas distintivas del polímero que la lleva. Por ejemplo, el principio activo puede ser un medicamento conocido, una molécula biológica tal como una secuencia peptídica que permite el enganche de células biológicas, o un colorante o cualquier otra molécula que presenta una o unas actividades biológicas o fisicoquímicas. El principio activo puede ser de origen natural o sintético.

Ventajosamente, el hidrogel según la presente invención comprende un principio activo con actividad antimicrobiana, antibiótica y/o antifúngica.

Preferentemente, el principio activo es una biomolécula, seleccionada por ejemplo de entre un péptido, una proteína, un glicopéptido, una glicoproteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, una pectina, un quitosano, un ácido hialurónico, un sacárido, un oligosacárido, un lípido, un glicolípido o sus derivados.

Ventajosamente, el principio activo se selecciona de entre unas moléculas que favorecen la adhesión celular, tales como unos péptidos que contienen o que consisten en la secuencia ArgGlyAsp, en particular, el péptido H-GlyArgGlyAspSerPro-OH (SEC ID 1), unas moléculas que favorecen la cicatrización, tales como unos péptidos que contienen o que consisten en la secuencia H-GluGlyLeuGluProGly-OH (SEC ID 2), unas moléculas que favorecen la producción de matriz extracelular tales como unos péptidos que contienen o que consisten en H-ValGlyValAlaProGly-OH (SEC ID 3) o unas moléculas antibacterianas, tales como unos péptidos que contienen o que consisten en H-AhxArgArg-NH₂, unas moléculas (por ejemplo péptidos) analgésicas, unas moléculas (por ejemplo péptidos) que favorecen la coagulación de la sangre, unas moléculas (por ejemplo péptidos) anticoagulantes, unas moléculas (por ejemplo péptidos) antiproliferativas, o una mezcla de varias de estas (bio)moléculas.

Ventajosamente, el principio activo puede ser un colorante, un fluoróforo o un marcador seleccionado de entre los compuestos siguientes: fluoresceína, sal sódica de fluoresceína, 4',5'-Bis[*N,N*-bis(carboximetil)-aminometil]fluoresceína, ácido 6-[fluoresceína-5(6)-carboxamido]hexanoico, ácido 6-[fluoresceína-5(6)-carboxamido]hexanoico, éster *N*-hidroxisuccinimida de fluoresceína-5(6)-isotiocianato, fluoresceína- α -D-*N*-acetilneuraminida-poliacril-amida, amidita de fluoresceína, fluoresceína-di(β -D-galactopiranosido), fluoresceína-di-(β -D-glucopiranosido), diacetato de fluoresceína, diacetato de fluoresceína-5(6)-isotiocianato, diacetato de fluoresceína-5-maleimida, diacetato de fluoresceína-6-isotiocianato, dibutirato de fluoresceína, fluoresceína dilaurato, sal de difosfato de fluoresceína triamonio, ácido fluoresceína hialurónico, isotiocianato de fluoresceína-Dextrano 500000- conjugado, isómero I del isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína-dextrano, acetato de mercurio-fluoresceína, clorhidrato de mono-*p*-guanidinobenzoato-fluoresceína, O,O'-diacrilato de fluoresceína, fluoresceína O,O'-dimetacrilato, fluoresceína *o*-acrilato, fluoresceína O-metacrilato, éster *N*-hidroxisuccinimida de fluoresceína, fluoresceína-5-tiosemicarbazida, fluoresceína- α -D-galactosamina poliacrilamida, fluoresceína- α -D-manopiranosido-poliacrilamida, 4(5)-(yodoacetamido)-fluoresceína, 5-(bromometil)fluoresceína, 5-(yodoacetamido)fluoresceína, diacetato del éster *N*-succinimidil-5-carboxi-fluoresceína, diacetato del éster *N*-succinimidil-6-carboxi-fluoresceína, aminofenil-fluoresceína, biotina-4-fluoresceína, hidroxifenil-fluoresceína, MTS-4-fluoresceína, clorhidrato de poli(fluoresceína-isotiocianato alilamina), poli(fluoresceína-O-acrilato), poli(fluoresceína-O-metacrilato), acetato de PPHT-fluoresceína, clorhidrato de 5-([4,6-diclorotriazin-2-il]amino) fluoresceína, clorhidrato de 6-([4,6-diclorotriazin-2-il]amino)fluoresceína, poli[(metilmetacrilato)-co-(fluoresceína-O-metacrilato)], poli[metilmetacrilato-co-(fluoresceína O-acrilato)], 5(6)-(biotinamidohexanoilamido)pentiltioureidilfluoresceína, N-(5-fluoresceinil)maleimida, sal disódica de mercurio-dibromo-fluoresceína, fluoresceína-di-[metileno-*N*-metilglicina], sal disódica de 4',5',7'-tetrakis-(acetoximercurio)-fluoresceína, la eritrosina B, la etil eosina, 5-carboxi fluoresceína, éster *N*-succinimidil de 5-carboxi fluoresceína, rodamina B octadecilo, éster *N*-hidroxisuccinimida de 6-carboxi-fluoresceína, dibencil fluoresceína, rodol, 6-amino fluoresceína, rodamina 6G, la rodamina B o también la rodamina 123. Estos colorantes, fluoróforos y/o marcadores, pueden ser incorporados en el hidrogel con una biomolécula o una mezcla de varias biomoléculas.

El término "biomolécula" según la presente invención se refiere a una molécula susceptible de ser encontrada en el medio biológico, es decir, sintetizada por un organismo vivo. Esta definición comprende asimismo los análogos funcionales de estas moléculas (que se convierten por lo tanto en unas moléculas de síntesis). En efecto, es habitual en la técnica modificar por ejemplo la estructura de las biomoléculas con el fin de conservar únicamente la zona activa o el sitio activo, o añadir unos grupos protectores de las funciones reactivas, impidiendo así las reacciones secundarias, por ejemplo.

Estos grupos protectores y su utilización se describen en unos trabajos tales como por ejemplo Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, Nueva York, 2007, 4ª edición; Harrison *et al.* "Compendium of Synthetic Organic Methods", Vol. 1 a 8 (J. Wiley e hijos, 1971 a 1996).

"Actividad antimicrobiana"

Una "actividad antimicrobiana" según la presente invención es la definición genérica tal como la entiende el experto en la materia, es decir, un efecto relativo a un agente antimicrobiano. Un (agente) antimicrobiano es una sustancia que mata, ralentiza el crecimiento o bloquea el crecimiento de uno o de varios microbios. Por "crecimiento" se entiende en el marco de la presente invención cualquier operación celular que permite un incremento volumétrico de la célula, una división celular o una reproducción celular. Un microbio en el marco de la presente invención se refiere a cualquier organismo unicelular o pluricelular patógeno o parásito de otros organismos vivos como los seres humanos.

Por ejemplo, los agentes antimicrobianos se pueden seleccionar generalmente de entre las diferentes familias siguientes: las betalactaminas, las cefalosporinas, la fosfomicina, los glicopéptidos, las polimixinas, las gramicinas, la tyrocidina, los aminósidos, los macrólidos, las lincosamidas, las sinergistinas, los fenicolados, las tetraciclinas, el ácido fusídico, las oxazolidinonas, las rifamicinas, las quinolonas, las fluoroquinolonas, los productos nitrados, las sulfamidas, la trimetoprima y sus mezclas. Más específicamente, los antimicrobianos se pueden seleccionar de entre la nistatina, el nitrato de miconazol, el ácido lauril-oxipropil-β-aminobutírico, la anfotericina B, el ácido undecilénico, el cloroquinaldol, el nitrato de econazol, la natamicina, el cloprotiazol, el clotrimazol, el tolnaftato, la lucensomicina, la tetraciclina, la eritromicina, las penicilinas, la oxacilina, la cloxacilina, la ampicilina, la amoxicilina, la bacampicilina, la metampicilina, la pivampicilina, la azlocilina, la mezlocilina, la piperacilina, la ticarcilina, el pivmecilinam, el sulbactam, el tazobactam, el imipenemo, la cefalexina, el cefadroxilo, el cefaclor, la cefatrizina, la cefalotina, la cefapirina, la cefazolina, la cefoxitina, el cefamandol, el cefotetano, la cefuroxima, la cefotaxima, la cefsulodina, la cefoperazona, el cefotiam, la ceftazidima, la ceftriaxona, la cefixima, la cefpodoxima, la cefepima, el latamoxef, el aztreonam, la vancomicina, la vancocina, la teicoplanina, la polimixina B, la colistina, la bacitracina, la tirotricina, la estreptomina, la kanamicina, la tobramicina, la amikacina, la sisomicina, la dibekacina, la netilmicina, la espectinomicina, la espiramicina, la eritromicina, la josamicina, la roxitromicina, la claritromicina, la azitromicina, la lincomicina, la clindamicina, la virginiamicina, la pristinamicina, la dalfopristina-quinupristina, el cloranfenicol, el tiamfenicol, la tetraciclina, la doxiciclina, la minociclina, el ácido fusídico, la linezolidina, la rifamicina, la rifampicina, el ácido nalidíxico, el ácido oxolínico, el ácido pipemídico, la flumequina, la pefloxacin, la norfloxacin, la ofloxacin, la ciprofloxacina, la enoxacin, la esparfloxacina, la levofloxacina, la moxifloxacina, la nitroxolina, el tilboquinol, la nitrofurantoína, la nifuroxazida, el metronidazol, el ornidazol, la sulfadiazina, el sulfametisol, la trimetoprima, la isoniazida y sus derivados y mezclas.

Preferentemente, los antimicrobianos injertados tienen un modo de acción de contacto.

Además, todas estas moléculas antimicrobianas presentan unas funciones químicas más o menos reactivas. Así, el experto en la materia es muy capaz de adaptar el objeto de la presente invención con el fin de utilizar una de estas funciones como punto de enganche al fragmento Xb.

"Actividad antibiótica"

Una "actividad antibiótica" (equivalente al término "antibacteriano") según la presente invención es la definición genérica tal como la entiende el experto en la materia, es decir, un efecto relativo a un agente antibiótico. Un (agente) antibiótico es una sustancia que mata, ralentiza el crecimiento o bloquea el crecimiento de una o de varias bacterias. Por "crecimiento" se entiende en el marco de la presente invención cualquier operación celular que permite un incremento volumétrico de la célula (bacteria), una división celular (de la bacteria) o una reproducción celular (de la bacteria).

Por ejemplo, los antibióticos se pueden seleccionar generalmente de entre las diferentes familias siguientes: las beta-lactamas, las monobactamas, las penicilinas, los inhibidores de beta-lactamasas, los aminoglicósidos, las gliciliclinas, las tetraciclinas, las quinolonas, los glicopéptidos, los lipopéptidos, los macrólidos, los cetólidos, las lincosamidas, las estreptograminas, las oxazolidinonas, las polimixinas.

De manera más específica, los antibióticos se pueden seleccionar de entre la amikacina, la gentamicina, la tobramicina, el imipenem, el meropenem, el ertapenem, el compuesto conocido con la denominación PZ-601, la cefazolina, la cefepima, la cefotaxima, la cefoxitina, la ceftarolina, la ceftazidima, el ceftobiprol, la ceftriaxona, la

cefuroxima, la cefalexina, el aztreonam, la amoxicilina, el clavulanato, la ampicilina, el sulbactam, la oxacilina, la piperacilina, el tazobactam, la ticarcilina, la penicilina, la doxiciclina, la minociclina, la tetraciclina, la tigeciclina, la ciprofloxacina, la gatifloxacina, la grepafloxacina, la levofloxacina, la moxifloxacina, la ofloxacina, la azitromicina, la claritromicina, la roxitromicina, la telitromicina, la colistina, la polimixina B, la fosfomicina, la trimetoprima y el sulfametoxazol.

Se pueden citar también como ejemplos de agentes antibióticos, los alcoholes, los polioles de C2-C8, el acetato, benzoato y diacetato de aluminio, conservantes tales como el cloruro de benzalconio, el cloruro de cetrimonio, la clorhexidina, el climbazol, citratos, el óxido y el sulfato de plata, ácidos tales como el ácido bórico, el ácido úsnico, el ácido piroglutámico y derivados, el acetato, borato, salicilato y sulfato de zinc, péptidos antimicrobianos tales como las beta-defensinas, y sus mezclas.

Preferentemente, los antibióticos injertados tienen un modo de acción de contacto.

Todas estas moléculas antibióticas presentan unas funciones químicas más o menos reactivas. Así, el experto en la materia es capaz de adaptar el objeto de la presente invención con el fin de utilizar una de estas funciones como punto de enganche al fragmento Xb.

"Actividad antifúngica"

Una "actividad antifúngica" según la presente invención es la definición genérica tal como la entiende un experto en la materia, es decir, un efecto relativo a un agente antifúngico. Un (agente) antifúngico es una sustancia que mata, ralentiza el crecimiento o bloquea el crecimiento de uno o de varios hongos. Por "crecimiento" se entiende en el marco de la presente invención cualquier operación celular que permite un incremento volumétrico de la célula (hongo), una división celular (del hongo) o una reproducción celular (del hongo).

Unos ejemplos de antifúngicos se pueden seleccionar además de entre las diferentes familias siguientes: los polienos, los imidazoles, los triazolados, los análogos nucleosídicos, las alilaminas, las equinocandinas, las sordarinas, las morfolinas, la griseofulvina, la ciclopiroxolamina, el sulfuro de selenio, y sus mezclas.

Más preferentemente, el agente antifúngico se selecciona de entre la nistatina, la anfotericina B, el ketoconazol, el econazol, el miconazol, el clotrimazol, el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol, el posaconazol, la 5-fluorocitosina, la naftalina, la terbinafina, la caspofungina, la amorolfina, y sus derivados y mezclas.

Preferentemente, los antifúngicos injertados tienen un modo de acción de contacto.

Todas estas moléculas antifúngicas presentan unas funciones químicas más o menos reactivas. Así, el experto en la materia es muy capaz de adaptar el objeto de la presente invención con el fin de utilizar una de estas funciones como punto de enganche al fragmento Xb.

"Principio activo natural"

Un principio activo natural, tal como una biomolécula natural, es un principio activo encontrado en el medioambiente sin intervención humana directa (excepto su extracción/aislamiento).

"Principio activo sintético"

Un principio activo sintético es un principio activo que no se encuentra en el medioambiente sin intervención humana directa (excepto su extracción/aislamiento). Por ejemplo, un principio activo tal como un péptido sintético puede ser una secuencia de un péptido natural en la que por lo menos un aminoácido natural ha sido reemplazado por otro, natural o sintético.

"Péptido" y "proteína"

Los términos "péptido" (equivalente al término "oligopéptido") y "proteína" se deben entender como unos polímeros de aminoácidos, estando dichos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico y/o pseudopeptídico. Un péptido contiene generalmente entre 2 y 80 a 100 aminoácidos, no estando el límite superior claramente definido. Más allá de este límite superior, se hablará más bien de proteínas. Preferentemente, el principio activo peptídico según la presente invención contiene entre 2 y 80 aminoácidos, más preferentemente entre 3 y 40, e incluso más preferentemente entre 4 y 20.

Los péptidos o proteínas pueden ser extraídos de un medio biológico o fabricados de manera sintética. Las técnicas de síntesis peptídica se describen en Paul Lloyd-Williams, Fernando Albericio, Ernest Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", CRC Press, 1997 o Houben-Weyl, "Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics", Vol E 22a, Vol E 22b, Vol E 22c, Vol E 22d., M. Goodmann Ed., Georg Thieme Verlag, 2002.

"Aminoácido"

- 5 La expresión "aminoácido" se debe entender como cualquier molécula que presenta por lo menos un ácido carboxílico, por lo menos una amina y por lo menos un carbono que une esta amina y este ácido carboxílico. Preferentemente, los aminoácidos que se pueden utilizar en el marco de la presente invención son los aminoácidos denominados "naturales" y/o los aminoácidos sintéticos tales como los definidos a continuación. Preferentemente, los aminoácidos de la presente invención son de configuración L.

10 *"Aminoácido natural"*

- 15 La expresión "aminoácido natural" representa, entre otros, los aminoácidos siguientes: la glicina (Gly), la alanina (Ala), la valina (Val), la leucina (Leu), la isoleucina (Ile), la serina (Ser), la treonina (Thr), la fenilalanina (Phe), la tirosina (Tyr), el triptófano (Trp), la cisteína (Cys), la metionina (Met), la prolina (Pro), el ácido aspártico (Asp), la asparagina (Asn), la glutamina (Gln), el ácido glutámico (Glu), la histidina (His), la arginina (Arg) y la lisina (Lys). Los aminoácidos naturales preferidos según la presente invención son los aminoácidos de la serie L.

"Aminoácido sintético"

- 20 Por aminoácido sintético, se entienden todos los aminoácidos no "codificados" y no naturales tales como los definidos anteriormente.

"Glúcido"

- 25 El término "glúcido" comprende los monosacáridos y polisacáridos.

- 30 Un monosacárido, u osa, es un polímero de carbonos hidratado, estando dichos carbonos unidos entre ellos por un enlace C-C. Existen dos tipos de osas: las aldosas y las cetosas. Los monosacáridos son además "ciclizables" por medio de una función hemiacetal. Los monosacáridos preferidos según la presente invención son los monosacáridos de la serie D. Los monosacáridos se clasifican por número de carbonos. Por ejemplo, los monosacáridos de 6 carbonos son las hexosas de fórmula $C_6H_{12}O_6$ y pueden ser la alosa, la altrosa, la glucosa, la manosa, la gulosa, la idosa, la galactosa o la talosa. Los monosacáridos de 5 carbonos son las pentosas de fórmula $C_5H_{10}O_5$ y pueden ser la ribosa, la arabinosa, la xilosa o la lixosa.

- 35 Un polisacárido se refiere a un polímero formado por monosacáridos (preferentemente de la serie D) unidos por unos enlaces glicosídicos. Unos ejemplos de polisacáridos son la celulosa y sus derivados, la pectina, el quitosano o también el ácido hialurónico. Los derivados de celulosa comprenden la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la hidroxietilcelulosa (HEC), la hidroxipropilcelulosa (HPC), la carboximetilcelulosa (CMC).

- 40 Los glúcidos naturales o sintéticos están comprendidos en esta definición.

"Glicopéptido"

- 45 Un glicopéptido es un péptido unido a un glúcido por medio de por lo menos un enlace químico.

"Glicoproteína"

Una glicoproteína es una proteína unida a un glúcido por medio de por lo menos un enlace químico.

50 *"Ácido desoxirribonucleico"*

- El ácido desoxirribonucleico, o ADN, es una macromolécula biológica presente en todas las células, así como en numerosos virus. El ADN contiene toda la información genética, denominada genotipo, que permite el desarrollo y el funcionamiento de los seres vivos.

55 *"Ácido ribonucleico"*

- 60 El ácido ribonucleico (ARN) es una molécula biológica presente en prácticamente todos los seres vivos, y también en algunos virus. El ARN es una molécula muy cercana químicamente al ADN y además está sintetizada generalmente en las células a partir de una matriz de ADN de la cual es una copia. Las células vivas utilizan en particular el ARN como un soporte intermedio de los genes para sintetizar las proteínas que necesitan.

"Pectina"

- 65 Las pectinas son unos polisacáridos caracterizados por un esqueleto de ácido α -D-galacturónico y de pequeñas cantidades de α -L-ramnosa más o menos ramificadas.

"Quitosano"

5 El quitosano o chitosán es un poliósido compuesto por la distribución aleatoria de D-glucosamina unida en β -(1-4) (unidad desacetilada) y de N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada).

"Ácido hialurónico"

10 Los ácidos hialurónicos son unos polímeros de disacáridos que están formados a su vez por ácido D-glucurónico y por D-N-acetilglucosamina, unidos entre sí por unos enlaces glicosídicos alternados α 1,4 y α 1,3. Los polímeros de esta unidad recurrente pueden tener un tamaño medio entre 400 y 10^7 Da *in vivo*. En el marco de la presente invención, los polímeros de esta unidad recurrente pueden tener un tamaño medio comprendido entre 1000 y $7 \cdot 10^6$ Da, preferentemente entre 1500 y $5 \cdot 10^6$ Da, por ejemplo entre 2000 y 9000 Da o entre 10^4 y $4 \cdot 10^6$, tal como
15 entre 150000 y 500000 o también entre $2 \cdot 10^6$ y $3 \cdot 10^6$. Por ejemplo, en el marco de la presente invención, los polímeros de esta unidad recurrente pueden tener un tamaño medio de aproximadamente 6400 Da, $2 \cdot 10^5$ Da o $2,6 \cdot 10^6$ Da.

"Lípido"

20 Los lípidos comprenden varias clases de moléculas que comprenden los ácidos grasos, los glicéridos, los fosfoglicéridos, los esfingolípidos, los esteroides, los prenoides.

25 Los ácidos grasos son unos ácidos carboxílicos con cadena alifática. Los glicéridos están constituidos por un residuo de glicerol esterificado por uno, dos o tres ácidos grasos, lo que se denomina respectivamente monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. Los fosfoglicéridos son unos fosfolípidos constituidos por dos residuos de ácidos grasos que esterifican un residuo de glicerol esterificado a su vez por un residuo fosfato. Los esfingolípidos están constituidos por un alcohol alifático aminado, producido *de novo* a partir de la serina y de una acil-coenzima A de cadena larga, y convertida, entre otros, en ceramidas, fosfoesfingolípidos, glicosfingolípidos.

"Glicolípido"

30 Un glicolípido es un sacárido unido, preferentemente por un grupo fosfato, a un lípido.

"Polimerización *in situ*"

35 Por la expresión "polimerización *in situ*", se entiende según la presente invención que la polimerización se realiza después de la inyección en un organismo vivo, tal como un ser humano.

40 Esto se puede realizar cuando las condiciones de la polimerización son las del medio fisiológico del organismo vivo en cuestión (pH, temperatura, agua, tampón, etc.). La introducción del precursor no polimerizado en el organismo vivo se puede efectuar simplemente haciendo pasar este precursor en o dentro del organismo vivo, si éste se ha abierto previamente con la ayuda de instrumentos quirúrgicos. Alternativamente, el precursor del hidrogel se puede introducir en el organismo vivo inyectándolo con la ayuda de una jeringa y de una aguja hueca adaptadas. El precursor del hidrogel polimeriza entonces una vez en contacto con dicho organismo vivo. Ventajosamente según
45 la presente invención, la inyección es poco dolorosa, ya que el precursor puede ser seleccionado para ser muy fluido y por lo tanto, el medio de inyección (jeringa y sobre todo, diámetro de la aguja) puede ser de tamaño reducido que favorece su introducción en el organismo vivo de manera poco dolorosa. Además, como el líquido a inyectar es menos viscoso que si el hidrogel ya se hubiera formado previamente, el líquido una vez inyectado ocupa su lugar mucho más fácilmente, sin distorsionar los tejidos circundantes, dando como resultado una
50 inyección menos dolorosa.

Descripción detallada

55 Las características fisicoquímicas excepcionales de los hidrogeles según la presente invención permiten unas aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, en particular en la administración de medicamentos (en unas nanoesferas o nanocápsulas, por vía oral o transdérmica, etc.). Los hidrogeles según la presente invención se pueden utilizar asimismo en la lucha contra las quemaduras cutáneas. Se pueden utilizar también para una amplia gama de aplicaciones en los ensayos clínicos de la medicina experimental que comprende: la ingeniería tisular y la medicina de regeneración, el diagnóstico, la inmovilización celular, la separación de biomoléculas o de células, la utilización de materiales de "barrera" para regular las adherencias biológicas.

60 Así, el objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de hidrogeles tal como se ha definido en la presente memoria, caracterizado por que el grupo A de la fórmula (I) del hidrogel tal como se ha definido se selecciona de entre las proteínas, los péptidos tales como unas secuencias peptídicas procedentes de los colágenos, por ejemplo las secuencias que comprenden unas repeticiones de tripéptidos Pro-Hyp-Gly o Pro-Pro-Gly o Asp-Pro-Gly o Pro-Lys-Gly, unas secuencias peptídicas de autoensamblaje como Arg-Ala-Asp-Ala (Sec

ID 4), unas oligoprolinas, unas oligoalaninas, unos polisacáridos, tales como el ácido hialurónico* y sus derivados, unos oligonucleótidos, unos polímeros de C₁-C₆-alquilenglicoles o polivinilpirrolidona.

* El ácido hialurónico se puede utilizar por sus propiedades estructurantes y/o por sus actividades biológicas.

El objeto de la presente invención se refiere además a un procedimiento de fabricación de un hidrogel tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que el grupo B de la fórmula (II) del hidrogel tal como se ha definido en la presente memoria es una biomolécula seleccionada de entre un péptido, un oligopéptido, una proteína, tal como el colágeno, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, un polisacárido, tal como una pectina, un quitosano, un ácido hialurónico, un polisacárido poliarabinosa y poligalactosa y un glicolípido.

Preferentemente, el fragmento B de la fórmula (II) es un agente antimicrobiano, antibiótico y/o antifúngico enumerados anteriormente. Más preferentemente, el fragmento B de la fórmula (II) es más particularmente un péptido antimicrobiano seleccionado de entre los anfipáticos, los catiónicos, la daptomicina, la polimixina, la taquiplesina, la magainina, las defensinas, las catelicidinas, las histatinas, las cecropinas, la melitina, las temporinas, las bombininas.

El objeto de la presente invención se refiere además a un procedimiento de fabricación de un hidrogel tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que el procedimiento de polimerización sol-gel se efectúa a pH fisiológico, es decir a un pH comprendido entre pH 6 y 9, preferentemente entre pH 7 y 8, y aún más preferentemente a pH $7,4 \pm 0,1$, o por que el hidrogel está formado en presencia de una cantidad suficiente de agua para que el contenido en agua del hidrogel sea de por lo menos el 50% en peso con respecto al peso total del hidrogel formado.

El objeto de la presente invención se refiere además a un procedimiento de fabricación de un hidrogel tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que el hidrogel está formado en presencia de una cantidad suficiente de agua para que el contenido en agua del hidrogel sea por lo menos el 50% en peso con respecto al peso total del hidrogel formado. Ventajosamente, el hidrogel según la presente invención puede contener entre el 60 y el 99% en peso de agua con respecto al peso total del hidrogel formado según la presente invención, más ventajosamente el hidrogel según la presente invención puede contener entre el 70 y el 98% en peso de agua y aún más ventajosamente el hidrogel según la presente invención puede contener entre el 75 y el 97%, incluso entre el 80 y el 95% en peso de agua con respecto al peso total del hidrogel formado.

El objeto de la presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de fabricación de un hidrogel tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicho hidrogel se polimeriza sobre o en por lo menos un primer hidrogel como soporte, que resulta así en un hidrogel multicapa. En este caso cualquier técnica conocida por el experto en la materia es aplicable con el fin de obtener una multicapa. De manera sencilla, se puede verter un primer hidrogel en un fondo de molde, y después verter un segundo hidrogel sobre este primer hidrogel y así sucesivamente. Además, como los hidrogeles según la presente invención se pueden recortar y conformar a voluntad, este recorte puede tener lugar antes del vertido de un hidrogel suplementario sobre un primer hidrogel o multicapa recortado/conformado.

El objeto de la presente invención se refiere además a un hidrogel para su utilización con fines terapéuticos y/o quirúrgicos, tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado en que permite el suministro y/o el transporte de moléculas activas, o para su utilización *in vivo* en ingeniería tisular.

Figuras

Figura 1: esta figura se refiere a unos ensayos de citotoxicidad en unos fibroblastos L929. El control "TC-PS" (columna "controles bajos" en la figura) representa la viabilidad celular en TC-PS (es decir, sin hidrogel). El control "células lisadas" (columna "controles altos" en la figura) corresponde a la lisis completa de las células y por lo tanto a un máximo de toxicidad. El control "PLA-50" permite verificar la viabilidad celular en presencia de poli (ácido láctico). La muestra "hidrogel PEG sililado 2,5% NaF" se refiere a las células incubadas 24 h en presencia de un hidrogel que contiene el 10% en masa de PEG sililado obtenido con el 2,5% en peso de NaF. La muestra "hidrogel de PEG sililado 0,3% NaF" se refiere a las células incubadas 24 h en presencia de un hidrogel que contiene el 10% en masa de PEG sililado obtenido con el 0,3% en peso de NaF.

Figura 2: esta figura se refiere a unos ensayos para cuantificar la liberación de fluoresceína a partir de varios hidrogeles según la invención. Los hidrogeles injertados por fluoresceína por enlace covalente muestran unas tasas de liberación mucho menores que el hidrogel que contiene fluoresceína simplemente atrapada sin enlace covalente.

Figura 3: esta figura se refiere a unos ensayos de adhesión celular sobre los hidrogeles según la presente invención. Se eligieron dos controles para la comparación: uno indica los valores medidos de fluorescencia del medio de cultivo en ausencia de células y el otro es la fluorescencia medida para las células depositadas directamente sobre TC-PS. Sobre esta base comparativa, se realizaron tres series de ensayos con unos hidrogeles

de PEG sililado según la invención al 10% en peso de PEG sililado desnudo, y después con el 7,5% molar o el 15% molar (con respecto al número de moles de PEG sililado) de un péptido que permite la adhesión celular ("RGD") unido por un enlace covalente a dicho hidrogel.

5 Leyenda de la figura 3:

- Columnas (del histograma) en blanco (es decir, las 1^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): medio de cultivo en ausencia de células;
- 10 • Columnas en gris claro (es decir, las 2^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): células depositadas sobre hidrogel de PEG desnudo;
- Columnas en gris medio (es decir, las 3^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): células depositadas sobre hidrogel de PEG que contiene el 7.5% de péptido híbrido RGD;
- 15 • Columnas en gris oscuro (es decir, las 4^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): células depositadas sobre hidrogel de PEG que contiene el 15% de péptido híbrido RGD;
- 20 • Columnas en negro (es decir, las 5^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): celdas depositadas sobre TCPS.

Figura 4: Esta figura se refiere a unos ensayos antibacterianos con unos hidrogeles según la presente invención. Las bacterias que han constituido el objeto de la prueba son *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se realizaron dos ensayos de control: siendo uno una evaluación del número de colonias bacterianas sobre gel sencillo, el otro sobre el hidrogel PEG sililado desnudo según la presente invención (es decir, un hidrogel PEG sililado al 10% en peso de PEG sililado). Se injertó un péptido antibacteriano sobre este mismo gel (es decir hidrogel PEG desnudo) por enlaces covalentes a diferentes tasas (al 7,5% en moles de péptido antibacteriano y al 15% en moles de péptido antibacteriano con respecto al número de moles de PEG sililado). Las colonias bacterianas que se formaron en contacto con los geles se contaron tras 24 h de incubación a 37°C.

30 Leyenda de la figura 4:

- Columnas (del histograma) en negro (es decir, las 1^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): colonias inoculadas sobre Agar;
- 35 • Columnas en blanco (es decir, las 2^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): colonias inoculadas sobre hidrogel PEG desnudo;
- Columnas en gris claro (es decir, las 3^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): colonias inoculadas sobre hidrogel PEG con el 7.5% de péptido híbrido antibacteriano;
- 40 • Columnas en gris oscuro (es decir, las 4^{as} columnas a partir de la izquierda del histograma): colonias inoculadas sobre hidrogel PEG con el 15% de péptido híbrido antibacteriano.

45 Figura 5: ilustra una vista Cryo-MEB del hidrogel que contiene el péptido bi-sililado preparado.

Figura 6: ilustra la adhesión de las células mMSC (células madre mesenquimatosas murinas) sobre el hidrogel según la invención, sobre unas espumas de colágeno y de TC-PS. Los histogramas de color gris oscuro representan el soporte TC-PS. Los histogramas con unos puntos negros representan el soporte hidrogel según la invención. Los histogramas con trazos oblicuos negros representan el soporte comercial de tipo colágeno.

Figura 7: ilustra en efecto la proliferación de mMSC sobre el hidrogel según la invención, sobre espuma de colágeno y TC-PS. La leyenda referente a los histogramas es la misma que la para la figura 6.

55 Ejemplos

Los ejemplos siguientes no limitan de ningún modo el alcance de la protección pretendida y están incluidos a título de ilustración según la presente invención.

60 Abreviaturas

ACN, acetonitrilo; Ahx, ácido ε-aminohexanoico; Boc, t-butiloxycarbonilo; DCM, diclorometano; DIEA, diisopropiletilamina; DMF, N,N'-dimetilformamida; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline; ESI-MS, espectrometría de masas con ionización electrospray; Fmoc, fluorenilmetoxycarbonilo; HBTU, hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio; HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento; HRMS, espectrometría de masas de alta resolución; LC/MS, espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida;

Pbf, 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo; PEG, polietilenglicol; pip, piperidina; PS, poliestireno; RMN, resonancia magnética nuclear; TA, temperatura ambiente, es decir comprendida entre 20 y 25°C; TFA, ácido trifluoroacético; THF, tetrahidrofurano; TIS, triisopropilsilano.

5 Material y procedimientos

Las HPLC analíticas se realizaron en un aparato Agilent Infinity 1260 equipado con una barra de diodos y con una columna Kinetex C18 fase inversa, 2,6 µm, 50 x 4.6 mm con un gradiente del 0% al 90% (% en volumen) de B en 5 min con eluyente A: agua/TFA al 0.1% y eluyente B: ACN/TFA al 0.1% a un caudal de 2,5 ml/min.

Las purificaciones por HPLC preparativa se realizaron en un aparato Waters HPLC 4000, equipado con un detector UV 486 y con una columna en fase inversa C₁₈ Waters Delta-Pack 40 x 100 mm, 100 Å, 15 µm, a un caudal de 50 ml/min. Los disolventes utilizados son H₂O/TFA al 0.1% y ACN/TFA al 0.1%.

Las muestras para los análisis de LC/MS se prepararon en una mezcla de agua/ACN (50:50, v/v) que contenía TFA al 0.1%. El aparellaje LC/MS está constituido por una HPLC Waters Alliance 2695, acoplada a un espectrómetro Water Micromass ZQ (ionización por electrospray, modo positivo). Los análisis se realizaron con una columna de fase inversa Phenomenex Onyx, 25 x 4.6 mm a un caudal de 3 ml/min con un gradiente del 0 al 100% (% en volumen) de B en 2,5 min con eluyente: agua/HCO₂H al 0.1%; eluyente B: ACN/HCO₂H al 0.1%. La detección UV se realizó a 214 nm. Los espectros de masa se adquirieron con un caudal de disolvente de 200 µl/min. El nitrógeno se utiliza como gas nebulizante y secante. Los datos se obtienen escaneando los m/z de 100 a 1000 en 0,75 segundos o de 200 a 1600 en 0,9 segundos. Los análisis de espectrometría de masa de alta resolución se realizaron en modo positivo en un espectrómetro tiempo de vuelo (TOF) equipado con una fuente de ionización por electrospray.

Los espectros RMN ¹H ¹³C y ²⁹Si se registraron a temperatura ambiente (TA) en unos disolventes deuterados en un espectrómetro a 400, 101 y 79 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en partes por millón utilizando los disolventes no deuterados residuales como referencias (CHCl₃ en CDCl₃, δH = 7.26 ppm; DMSO-d₆, δH = 2.50 ppm). Las señales se indican: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), dt (doblete triplete), m (multiplete), etc. Las constantes de acoplamiento se miden en hercios.

Enganche de un aminoácido sobre la resina 2-cloroclorotritilo:

La resina 2-cloroclorotritilo (1,44 mmol de Cl/g, 1 eq) se coloca en un reactor de síntesis peptídica en fase sólida equipado con una frita. El aminoácido protegido Fmoc-AA-OH (3 eq) se acopla sobre la resina en presencia de DIEA (5 eq) en la DMF durante una noche. Después de los lavados estándares (3 x DMF, 1 x MeOH y 1 x DCM), la resina de Fmoc-AA-Cltrilito se seca al vacío durante 12 h. La carga de la resina se determina por detección a 299 nm del aducto piperidina-dibenzofulveno que se forma en la solución de desprotección pip/DMF (20/80 v/v).

Desprotección del Fmoc:

La resina Fmoc-Rink Amide AM PS o resina Fmoc-peptidil se coloca en un reactor de fase sólida equipado con una frita. El grupo Fmoc se elimina mediante dos tratamientos sucesivos con una solución de DMF-piperidina (80:20; v/v, 2 x 20 min). Entre los dos tratamientos, la solución se filtra y se sustituye por una solución nueva. Las etapas clásicas de lavado se realizan al final de la desprotección (3 x DMF, 1 x MeOH y 1 x DCM).

Acoplamiento de un aminoácido:

El aminoácido protegido en N-ter por un grupo Fmoc (3 eq) se disuelve en la DMF (10 ml por g de resina) en presencia de HBTU (3 eq) y de DIEA (3 eq) durante 10 min. Esta solución se añade a la peptidil-resina, cuyo N-ter está libre. La resina se agita a TA durante 1 h 30 y después se lava (3 x DMF, 1 x MeOH y 1 x DCM).

Ejemplo 1: sililación de PEG

Se seca al vacío a 80°C durante una noche polietilenglicol de masa molecular media de 2000 g/mol (2,00 g, 1,00 mmol) y después se disuelve en THF anhidro (12 ml) bajo argón. Se añade trietilamina (1,66 ml, 12 mmol, 12 eq) y el isocianatopropil-trietoxisilano (744 µl, 3 mmol, 3 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 h, y después se concentra a presión reducida. Se precipita entonces el PEG bi-sililado en el hexano. Después de la centrifugación, se lava 3 veces con el hexano y se seca al vacío. Se obtiene en forma de un polvo blanco almacenado a 4°C bajo argón. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.00 (sl, 2H, NH), 4.18 (t, J = 4.7 Hz, 4H, H-6), 3.79 (q, J = 7.0 Hz, 12H, H-2), 3.62 (s, 177H, CH₂ PEG), 3.14 (dd, J = 13.2, 6.7 Hz, 4H, H-5), 1.58 (qu, J = 7.7 Hz, 4H, H-4), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 18H, H-1), 0.64 - 0.54 (m, 4H, H-3). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 156.72 (C), 70.55 (CH₂), 63.76 (CH₂), 58.26 (CH₂), 43.29 (CH₂), 23.12 (CH₂), 18.38 (CH₃), 9.12 (CH₂). ²⁹Si RMN (79 MHz, CDCl₃) δ -45.73 (s).

Ejemplo 2: Síntesis de un péptido derivado del colágeno y bi-sililadoPreparación del tripeptido: Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBzlAcoplamiento de Boc-Hyp-OH:

En un matraz de una boca de 5000 ml se introducen H-Gly-OBzl.HCl (11,42 g, 56,6 mmol, 1 eq) disueltos en AcN y DIEA (37,44 ml, 226,5 mmol, 4 eq). En un vaso de precipitados, se disuelve Boc-Hyp-OH (13,3 g, 56,6 mmol) en AcN. Se añaden a esta solución la DIEA así como el pyBOP (29,3 g, 56,63 mmol, 1 eq). Los dos aminoácidos son puestos en contacto y se agitan a TA durante 4 h. El seguimiento de la reacción se efectúa por HPLC analítica.

Una vez terminada la reacción, se evapora el AcN y el aceite anaranjado obtenido se solubiliza en acetato de etilo. Esta solución se lava mediante unas soluciones acuosas de KHSO_4 , NaHCO_3 y NaCl. La fase orgánica se seca a continuación con MgSO_4 y el disolvente se evapora a presión reducida.

Desprotección N-ter del dipéptido:

El producto es puesto a continuación en solución en 150 ml de TFA durante 40 min hasta la desaparición completa de la liberación gaseosa. Se evapora entonces el TFA a presión reducida y el dipéptido es precipitado en el éter dietílico y después liofilizado.

Acoplamiento de Fmoc-Pro-OH:

Se acopla Fmoc-Pro-OH sobre H-Hyp-Gly-OBzl según el mismo protocolo que el acoplamiento de Boc-Hyp-OH descrito anteriormente. La reacción dura 2 horas. Al final de los lavados, el tripeptido se purifica sobre gel de sílice (aparato Biotage, columna SNAP 340 g, gradiente del 0% de MeOH en el DCM al 10% de MeOH en el DCM, salida del producto al 50% del gradiente, rendimiento del 71%).

Desprotección C-ter:

En un matraz de una boca de 250 ml se introduce Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBzl (20,4 g, 40,2 mmol) disuelto en EtOH y 200 mg de Pd/C. El conjunto se coloca bajo burbujeo de hidrógeno durante 6 h a 60°C. El seguimiento de la reacción se efectúa mediante HPLC analítica. Una vez terminada la reacción, la solución se filtra sobre celita y después se concentra a presión reducida. El sólido es recuperado en $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$ 50/50 V/V y liofilizado (rendimiento: 86%).

Síntesis del péptido Ac-Lys- (Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (Sec ID 5) sobre soporte a partir del bloque tripeptídico

La síntesis se efectúa en una jeringa provista de una frita sobre una resina Rink Amide PS cuya carga es de 0,94 mmol/g con una escala de síntesis de 1 mmol. La resina se hincha en el DCM y después se lava con la DMF. Se desprotege gracias a dos tratamientos con la solución de desprotección pip/DMF (15 ml durante 5 min, 3 lavados con DMF, 15 ml durante 20 min y después lavados (3 x DMF, 3 x DCM, 1 x DMF)). Las condiciones de acoplamiento habituales están ligeramente modificadas. Los acoplamientos se alargan a 2 h y se realizan con 1,5 eq de Fmoc-Lys(Boc)-OH o Fmoc-(Pro-Hyp-Gly)₃-OH, 5 eq de DIEA y 1,5 eq de HATU que sustituye al HBTU. Al final del acoplamiento, la resina se lava con los disolventes siguientes: (3 x DMF, 3 x DCM, 1 x DMF). El último acoplamiento está seguido también por una desprotección del grupo Fmoc. Después, la peptidil-resina es acetilada con ácido acético (2 eq) en el DCM (10 ml) en presencia de BOP (2 eq) y de DIEA (4 eq) durante 1 h 30. La resina se lava y después se escinde en una mezcla TFA/TIS/ H_2O (95/2,5/2,5 v/v/v, 50 ml). La solución de "escisión" se concentra a presión reducida y el péptido se precipita con el éter. Tras la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, se recoge el péptido crudo en una mezcla agua/ACN y se liofiliza. Por último, se purifica por HPLC preparativa sobre una columna Luna C₁₈ en fase inversa (15 μm , 250 x 50 mm) a un caudal de 120 ml/min con un gradiente del 0 al 6% de B en 6 min, del 6% al 10% de B en 8 min y del 10% al 18% en 24 min con eluyente A: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ al 0,1% y eluyente B: ACN/TFA al 0,1%. Rendimiento: 49%; pureza > 99%. LC/MS (ESI⁺): t_R = 0.73 min, 1118 ([M + H]⁺, 5%), 559 ([M + 2H]²⁺, 100).

Sililación

Se disuelve Ac-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (20 mg, 14,9 μmol) en la dimetilformamida anhidra (300 μl) bajo argón. Se añaden la diisopropiletilamina (12,4 μl , 71,3 μmol , 4,8 eq) y después el 3-isocianatopropiltietoxisilano (9,7 μl , 39,3 μmol , 2,6 eq) a la solución de nonapéptido. La mezcla de reacción se deja durante 50 min bajo agitación. El final de la reacción se controla mediante LC/MS. Se evapora el disolvente a presión reducida. Después, el nonapéptido sililado se precipita con el éter dietílico. Después de la centrifugación, el péptido híbrido se lava 3 veces con el éter dietílico y después el polvo obtenido se seca al vacío. LC/MS (ESI⁺): t_R = 0.82 min, 704 ([M + 2H-2H₂O]²⁺, 100%), 695 ([M + 2H-3H₂O]²⁺, 80) y t_R = 0.87 min (confórmero), 704 ([M + 2H-2H₂O]²⁺, 70%), 695 ([M + 2H-3H₂O]²⁺, 100).

Ejemplo 3: preparación de un hidrogel constituido por una molécula de fórmula (I)

Una molécula de fórmula (I), por ejemplo el PEG bi-sililado preparado en el ejemplo 1 o el péptido bi-sililado derivado del colágeno sintetizado en el ejemplo 2, se disuelve en tampón fosfato a pH 7,4 (DPBS Dulbecco's phosphate buffered saline), preferentemente a una concentración del 10% en masa, en presencia de fluoruro de sodio (3 mg de NaF por ml de DPBS). La solución no viscosa se incuba a 37°C, y entonces se forma un gel. El tiempo de gelificación depende de la naturaleza de la molécula de fórmula (I) y de su concentración.

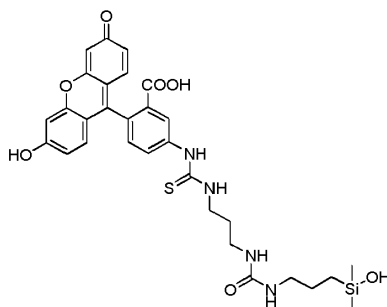
Ejemplo 4: síntesis del péptido sililado (EtO)₃Si-(CH₂)₃-NHCO-(βAla)₄-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH (Sec ID 6)

Se sintetiza H-(βAla)₄-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH (Sec ID 6) en una resina 2-cloroclorotritilo (carga: 1,44 mmol/g, escala de síntesis: 0,5 mmol) en estrategia Fmoc/tBu. Los aminoácidos utilizados son sucesivamente Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-βAla-OH cuatro veces. Cada acoplamiento de aminoácidos está seguido por una desprotección del grupo Fmoc en N-ter. La "escisión" del péptido y la desprotección de las cadenas laterales se efectúan en una mezcla TFA/TIS/H₂O 95/2.5/2.5 V/V/V durante 4 h. Después de la precipitación, el péptido se purifica mediante HPLC preparativa sobre una columna C₁₈. Se obtiene tras liofilización con un rendimiento del 63%. Después es sililado por reacción con 3-isocianatopropiltietoxisilano (1,1 eq) en la DMF a una concentración de 30 mM en presencia de DIEA (3 eq). La reacción es seguida por HPLC analítica. A continuación, la DMF se evapora a presión reducida y el péptido sililado se precipita en éter dietílico. Se recupera por centrifugación al final de 3 lavados en el éter dietílico.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.61 - 8.40 (m, 2H, NH Asp y Gly), 8.21 - 8.04 (m, 2H, NH Gly N-ter y Arg), 7.99 - 7.78 (m, 3H, NH βAla), 7.58 - 7.42 (m, 1H, NH Ser), 7.34 - 6.98 (m, 3H, OH Ser, COOH Asp y C-ter), 5.97 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH urea), 5.78 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH urea βAla), 4.56 (q, J = 6.9 Hz, 1H, H_α Ser), 4.49 - 4.38 (m, 1H, H_α Asp), 4.38 - 4.26 (m, 1H, H_α Arg), 4.22 (dd, J = 8.7, 4.1 Hz, 1H, H_α Pro), 4.02 - 3.75 (m, 4H, H_α Gly), 3.73 (q, J = 6.9 Hz, 6H, CH₂ etoxi), 3.67 - 3.46 (m, 4H, H_δ Pro y H_β Ser), 3.46 - 3.28 (m, 2H, H_δ Arg), 3.28 - 3.11 (m, 8H, H_β βAla), 2.92 (q, J = 6.1 Hz, 2H, H-3), 2.60 - 2.48 (m, 2H, H_β Asp), 2.29 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H_α βAla), 2.26 - 2.09 (m, 6H, H_α βAla), 1.87 (dd, J = 13.3, 6.5 Hz, 2H, H_γ Pro), 1.60 - 1.56 (m, 2H, H_β Arg), 1.55 - 1.42 (m, 2H, H_δ Arg), 1.38 (m, 2H, H-2), 1.19 - 1.09 (t, J = 7.2 Hz, 9H, CH₃ etoxi), 0.55 - 0.42 (m, 2H, H-1). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 174.27 (C), 172.82 (C), 171.38 (C), 171.27 (C), 171.14 (C), 170.86 (C), 170.80 (C), 169.58 (C), 169.43 (C), 169.02 (C), 168.77 (C), 158.41 (C), 157.52 (C), 62.14 (CH₂), 59.54 (CH), 58.14 (CH₂), 53.51 (CH), 52.60 (CH), 49.78 (CH), 47.02 (CH₂), 42.46 (CH₂), 42.36 (CH₂), 40.89 (CH₂), 36.68 (CH₂), 36.30 (CH₂), 35.88 (CH₂), 35.76 (CH₂), 30.10 (CH₂), 29.13 (CH₂), 25.39 (CH₂), 24.91 (CH₂), 24.01 (CH₂), 18.68 (CH₃), 7.72 (CH₂). ²⁹Si RMN (79 MHz, DMSO-d₆) δ -45.10. LC/MS (ESI⁺): solo se detectan los productos de hidrólisis de los grupos etoxisilanos en silanoles. t_R = 0.62 min, 1035 ([M+H]⁺, 50%), 509 ([M+H-OH]²⁺, 60), 500 ([M-2OH]²⁺, 100). HRMS: 1119.5481. C₄₅H₇₄N₁₈O₁₄Si implica [M+H]⁺, 1119.5479.

Ejemplo 5: síntesis del péptido sililado HO(CH₂)₂Si-(CH₂)₃-NHCO-Ahx-Arg-NH₂

El péptido antibacteriano H-Ahx-Arg-Arg-NH₂ se sintetiza en una resina Rink Amide (carga 0,94 mmol/g, escala de síntesis: 3 mmol) en estrategia Fmoc/tBu. Los aminoácidos utilizados son sucesivamente Fmoc-Arg (Pbf)-OH dos veces y el ácido Fmoc-ε-aminohecanoico. Cada acoplamiento está seguido por una desprotección del grupo Fmoc en N-ter. A continuación, el tripéptido es sililado sobre soporte en la DMF (10 ml/g de resina) utilizando 3-isocianatopropildimetilclorosilano (3 eq) en presencia de DIEA (3 eq). La reacción de sililación se deja bajo agitación durante una noche y después se lava la resina (3 x DMF, 1 x MeOH y 1 x DCM) y se escinde en el TFA durante 5 h. La solución de "escisión" se concentra a presión reducida y después el péptido antibacteriano sililado se precipita en el éter dietílico y por último se purifica mediante HPLC preparativa sobre una columna C₁₈ (Eluyente A: H₂O/TFA al 0,1%, eluyente B: ACN/TFA al 0,1%, gradiente: del 0 al 7% de B en 2 min y después del 7% al 30% de B en 23 min, salida de producto al 16% de B). Después de la liofilización, se obtiene el péptido antibacteriano sililado en forma de un polvo blanco (rendimiento: 68%, pureza > 98%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 4.19 (ddd, J = 14.4, 8.6, 5.7 Hz, 2H, H_α Arg), 3.09 (t, J = 6.9 Hz, 4H, H_δ Arg), 2.96 (td, J = 6.8, 1.9 Hz, 4H, H-3 y H-4), 2.17 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-8), 1.82 - 1.59 (m, 4H, H_β Arg), 1.59 - 1.44 (m, 6H, H-7 y H_γ Arg), 1.41 - 1.31 (m, 4H, H-2 y H-5), 1.24 - 1.12 (m, 2H, H-6), 0.53 - 0.41 (m, 2H, H-1), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.40 (C), 171.76 (C), 170.69 (C), 157.38 (C), 156.00 (C), 51.38 (CH), 51.02 (CH), 41.54 (CH₂), 34.28 (CH₂), 29.01 (CH₂), 28.34 (CH₂), 28.08 (CH₂), 25.24 (CH₂), 24.24 (CH₂), 23.16 (CH₂), 14.24 (CH₂), -0.51 (CH₃). ²⁹Si RMN (79 MHz, DMSO-d₆) δ 7.97 (dímero). LC/MS (ESI⁺): t_R = 0.71 min, 602 ([M+H]⁺, 10%), 302 ([M+2H]²⁺, 100), 293 ([M+2H-NH₃]²⁺, 30). HRMS: 602.3926. C₂₄H₅₁N₁₁O₅Si implica [M+H]⁺, 602.3922.

Ejemplo 6: síntesis de una hidroxidimetilsilil fluoresceína

- 5 Se añade la N-Boc-1,3-propanodiamina (56,4 mg, 0,324 mmol, 1,05 eq) a una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC, 120 mg, 0,308 mmol) en la DMF anhidra (3 ml) en presencia de DIEA (100 µl). La mezcla de reacción se agita durante 1 h a TA bajo argón. La DMF se evapora después a presión reducida. La boc-amino fluoresceína se precipita y se lava en el éter dietílico y después se seca. Se solubiliza a continuación en el TFA (4 ml) y esta solución se agita durante 1 h. La mezcla de reacción se concentra y se precipita en el éter dietílico.
- 10 Después de la centrifugación, se retira el sobrenadante. La fluoresceína amina se purifica mediante HPLC preparativa sobre una columna C₁₈ (Eluyente A: H₂O/TFA al 0,1%, eluyente B: ACN/TFA al 0,1%, gradiente: del 0 al 15% de eluyente B en 3 min y después, del 15% al 40% de eluyente B en 25 min, salida de producto al 22% del eluyente B) y se obtiene en forma de sal de TFA (180 mg, 100%, pureza = 95%).
- 15 El 3-isocianatopropilclorodimetilsilano (16,2 µl, 0,0910 mmol, 1,05 eq) se añade a una solución de fluoresceína amina purificada anteriormente (50,0 mg, 0,0867 mmol) en la DMF anhidra (2 ml) en presencia de DIEA (45,2 µl, 0,260 mmol, 3 eq). La mezcla de reacción se agita bajo argón durante 1 h. Se evapora el disolvente a presión reducida y se obtiene el producto crudo por precipitación en el éter dietílico. La hidroxidimetilsilil fluoresceína se purifica mediante HPLC preparativa sobre una columna C₁₈ (Eluyente A: H₂O/TFA al 0,1%, eluyente B: ACN/TFA al 0,1%, gradiente: del 0 al 20% de eluyente B en 4 min, del 20 al 26% del eluyente B en 6 min y después, del 26% al 46% de eluyente B en 30 min, salida del producto al 32% del eluyente B, rendimiento: 42%, pureza: 97%)
- 20 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.01 (sl, 1H, COOH), 9.97 (s, 1H, NH tiourea procedente de la FITC), 8.20 (s, 1H, H-4), 8.12 (s, 1H, NH tiourea), 7.71 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-6), 7.14 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5), 6.65 (d, J = 2.2 Hz, 2H, H-9 y H-10), 6.59 - 6.51 (m, 4H, H-7, H-8, H-11 y H-12), 5.88 (s br, 2H, NH urea), 3.43 - 3.38 (m, 2H, H-3), 3.03 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H-1), 2.92 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H-3'), 1.62 (qu, J = 6.5 Hz, 2H, H-2), 1.37 - 1.29 (m, 2H, H-2'), 0.47 - 0.36 (m, 2H, H-1'), 0.00 y -0.04 (2 s, 6H, H-4' del dímero y del monómero respectivamente).
- 25 ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 179.51 (C), 167.65 (C), 158.62 (C), 157.51 (C), 151.02 (C), 140.47 (C), 128.75 (CH), 128.19 (CH), 125.68 (C), 123.18 (CH), 116.66 (C), 115.79 (CH), 114.24 (C), 111.71 (CH), 108.87 (C), 101.36 (CH), 41.55 (CH₂), 40.52 (CH₂), 35.85 (CH₂), 28.80 (CH₂), 23.13 (CH₂), 14.20 (CH₂), -0.51 (CH₃), -0.75 (CH₃).
- 30 ²⁹Si RMN (79 MHz, DMSO-d₆) δ 11.24 (monómero), 7.99 (dímero). LC/MS (ESI⁺): t_R = 1.33 min, 623 ([M+H]⁺, 60%), 390 ([M+H-NH₂(CH₂)₃NH-CONH(CH₂)₃Si(CH₃)₂OH]⁺, 15), 312 ([M+2H]²⁺, 60), 303 ([M+2H-H₂O]²⁺, 100). HRMS: 623.1996. C₃₀H₃₄N₄O₇SSi implica [M+H]⁺, 623,1996.

Ejemplo 7: preparación de hidrogeles que comprenden una molécula de fórmula (I) y una molécula de fórmula (II)

- Una molécula de fórmula (I), por ejemplo el PEG bi-sililado preparado en el ejemplo 1 o el péptido bi-sililado derivado del colágeno sintetizado en el ejemplo 2, se disuelve en tampón fosfato a pH 7,4 (DPBS Dulbecco's phosphate buffered saline), preferentemente a una concentración del 10% en masa, en presencia de fluoruro de sodio (3 mg de NaF por ml de DPBS). Una molécula de fórmula (II), por ejemplo el péptido sililado que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp sintetizado en el ejemplo 4 o el péptido sililado antibacteriano preparado en el ejemplo 5 o la fluoresceína sililada descrita en el ejemplo 6, se añade a la solución de la molécula de fórmula (I) a una concentración comprendida entre el 1% y el 15% molar con respecto a la molécula de fórmula (I). La solución no viscosa se incuba a 37°C, y entonces se forma un gel. El tiempo de gelificación depende de la naturaleza de las moléculas elegidas y de su concentración.

Ejemplo 8: ejemplos de aplicaciones de un hidrogel según la invención

- Optimización de la síntesis

- La unidad bifuncional (EtO)₃-Si-(CH₂)₃-NHCO-(PEG2000)-OCONH-(CH₂)₃-Si-(OEt)₃ (es decir, "bloque PEG híbrido bi-sililado") se sintetizó haciendo reaccionar el polietilenglicol (PM = 2000 Da) con 3-isocianatopropiltrietoxisilano. A continuación, el bloque PEG híbrido bi-sililado se acopló en el procedimiento sol-gel, que consiste en la hidrólisis de los etoxisililos en silanoles y su condensación para formar unos enlaces siloxanos. Este procedimiento se realizó a 37°C, a pH 7,2-7,4 en un tampón fosfato (DPBS). El fluoruro de sodio (NaF) se utilizó como catalizador nucleofílico para acelerar las reacciones de condensación. Se probaron diferentes concentraciones de PEG híbrido

bi-sililado y de fluoruro de sodio, demostrando así su influencia en el tiempo de gelificación (tabla 1):

Tabla 1: tiempo de gelificación de soluciones de PEG híbrido bi-sililado en el DPBS a 37°C y módulos viscoelásticos de los hidrogeles obtenidos

Composición del gel		Tiempo de gelificación (min)	G' (Pa)	G'' (Pa)
Bloque PEG híbrido bi-sililado (% másico)	NaF (% másico)			
20	5.0	10	n.d.	n.d.
20	2.5	15	77750	204
10	5.0	20	n.d.	n.d.
10	2.5	35	18960	49
10	0.3	120	9947	61
5	5.0	50	n.d.	n.d.
5	2.5	220	5413	39

Se estudió asimismo el efecto de la relación PEG/agua y de la concentración en NaF sobre las propiedades mecánicas de los hidrogeles. La respuesta viscoelástica de los hidrogeles se midió en oscilación en un reómetro AR 2000 (TA Instruments, Inc.) con una geometría paralela de 20 mm de diámetro (fuerza normal = 2 N). La evolución de los módulos de conservación (G') y de pérdida (G'') se siguió en función de la frecuencia de oscilación en el campo lineal viscoelástico (0,1% de deformación, de 0,01 Hz a 10 Hz) para unos geles de composiciones diferentes. Los valores de los módulos para una frecuencia de 10 Hz se presentan en la tabla 1. Todas las muestras presentan las propiedades de un sólido con G' superior a G''. Los módulos de almacenamiento se utilizaron como medida de la elasticidad de los hidrogeles. Se mantuvieron estables durante una semana. Como se extienden de 5000 a 80000 Pa según la composición del gel, cubren un amplio intervalo de rigidez. Se observaron muy pocas variaciones en los módulos de pérdida para el conjunto de las muestras. Así, según la aplicación prevista, la rigidez de los geles puede ser ajustada haciendo que varíen las concentraciones en PEG híbrido bi-sililado y/o en NaF.

• Pruebas de citotoxicidad del hidrogel desnudo

Se efectuaron unos ensayos de citotoxicidad en dos de los hidrogeles presentados anteriormente, conteniendo cada uno el 10% másico de PEG híbrido bi-sililado con respecto a la masa de disolvente y el 0,3% o el 2,5% másico de NaF, respectivamente.

Se inocularon unos fibroblastos murinos de la línea L929 en unos pocillos de poliestireno tratados para el cultivo de tejidos. Tras 24 h de proliferación, estas células se incubaron con los hidrogeles durante 24 h suplementarias. A continuación, se midió la citotoxicidad con la ayuda de una prueba que demuestra la liberación de lactato deshidrogenasa por las células. Como estaba previsto, los hidrogeles que contenían la mayor concentración en NaF resultaron ser tóxicos. Sin embargo, se observó más del 80% de la viabilidad celular para una concentración en NaF de 3 mg/ml, lo cual significa que este último hidrogel no es tóxico para las células (figura 1).

Estos resultados fueron confirmados por unas observaciones microscópicas que mostraron unas células sanas fusiformes.

• Verificación de la funcionalización del hidrogel

Con el fin de mostrar la incorporación covalente de una (bio)molécula en el gel y la ausencia de liberación en el tiempo de las moléculas injertadas, se eligieron unos derivados de fluoresceína para ser unidos químicamente a los hidrogeles de acuerdo con la presente invención (véase la figura 2 para las fórmulas exactas). Así, si tuviera que haber una liberación de las moléculas injertadas, la utilización de fluoresceína permitiría detectarla fácilmente.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se utilizó para preparar dos tipos de derivados de fluoresceína que dan unos enlaces covalentes (trietoxisilano y dimetilhidroxisilano), así como una molécula no sililada que sirve de testigo/control. Cada derivado de la fluoresceína se disolvió a una concentración de 5,2 mM en una solución de PEG híbrido bi-sililado a su vez a una concentración del 10% en peso con respecto a la masa de DPBS que sirve de disolvente. Se añadió el fluoruro de sodio y se homogeneizaron las soluciones. Se obtuvieron unos hidrogeles híbridos fluorescentes a 37°C en 30 minutos. Los diferentes hidrogeles se colocaron en tampón fosfato (10 ml) y se controló la liberación de fluoresceína mediante HPLC. En el caso del acoplamiento no covalente, se observó una liberación completa de fluoresceína en 72 horas. Como se esperaba, la liberación de fluoresceína es limitada (con respecto al control) en el caso de los derivados covalentes y alcanza una meseta tras 72 horas. Esto indica la estabilidad de los enlaces covalentes híbridos. Se observó un máximo de 9% y 20% (con respecto a la cantidad total de fluoresceína introducida) de liberación para los hidrogeles obtenidos con la "trietoxisililfluoresceína" y la "dimetilhidroxilfluoresceína", respectivamente (figura 2). Esta liberación se podría atribuir a unas moléculas híbridas atrapadas de manera no covalente que no habrían podido reaccionar durante el proceso de gelificación. Esto es coherente con el hecho de que el derivado de trietoxisililo debería ser más reactivo que el dimetilhidroxisililo cuando

tiene lugar la reacción de condensación.

• Prueba de adhesión celular

- 5 Se eligió un péptido que contenía la secuencia RGD para favorecer la adherencia celular. Se trata de la secuencia GRGDSP (SEC ID 7).

10 El péptido desprotegido H-GRGDSP-OH (Sec ID 7) se preparó en primer lugar mediante síntesis peptídica sobre soporte sólido en estrategia Fmoc/tBu y se funcionalizó mediante un grupo trietoxisililo usando el ICPTES (3-isocianatopropiltrietoxisilano). Se preparó una solución de PEG híbrido bi-sililado al 10% másico con respecto al peso de DPBS) que contenía el 0,3% másico de NaF y se añadió el péptido híbrido GRGDSP sililado a esta solución. La concentración relativa en GRGDSP sililado en la mezcla antes de la reacción se fijó al 7,5% (1ª solución) y al 15% (2ª solución) molar con respecto al número de moles de PEG híbrido bi-sililo. Estas dos soluciones se colocaron a 37°C durante una noche, para proporcionar dos hidrogeles "PEG/RGD-sililados".

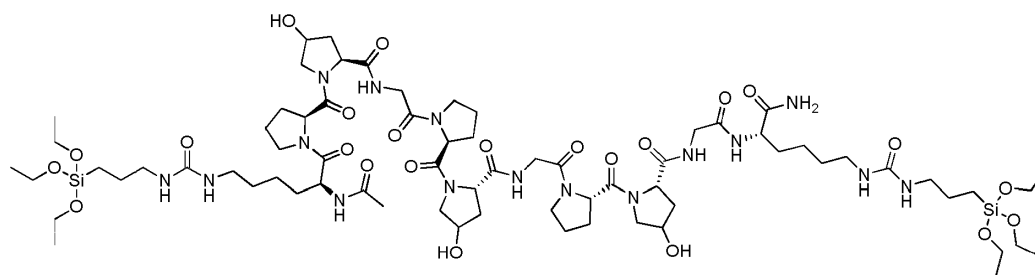
15 Se inocularon unos fibroblastos L929 en la superficie de los hidrogeles de PEG/RGD-sililados y en un hidrogel híbrido de PEG no funcionalizado ("hidrogel desnudo"). Las células adherentes tras 30 min, 1 h y 2 h de incubación se demostraron y dosificaron con la ayuda de un reactivo de viabilidad "PrestoBlue Cell Viability Reagent®" (figura 3). No se constató ninguna adhesión celular sobre el hidrogel desnudo. Por el contrario, la adhesión celular fue muy eficaz en el caso del hidrogel que contenía el 15% molar en RGD sililado (solución 2). En efecto, la adhesión sobre este último tras 30 min de incubación es mejor que sobre el poliestireno tratado para el cultivo de tejidos (TC-PS), y para unas superficies de adhesión de tamaño idéntico.

• Pruebas antibacterianas

25 Asimismo, se prepararon unos hidrogeles con unas propiedades antibacterianas utilizando la secuencia peptídica H-Ahx-Arg-Arg-NH₂ sililada convenientemente por el lado N-terminal. Para ello, se funcionalizó el péptido H-Ahx-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-NH- sobre resina rinkamida en el extremo N-terminal por un grupo dimetilhidroxisililo antes de la escisión de la resina y la desprotección de las cadenas laterales. El péptido híbrido resultante se añadió a unas soluciones de PEG híbrido bi-sililado según el protocolo descrito anteriormente para el hidrogel "PEG-RGD sililado". Se evaluó la actividad antibacteriana de los hidrogeles contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los hidrogeles se inocularon en la superficie con unas bacterias y se recubrieron con gelosa tripticasa de soja. Tras 24 h de incubación a 37°C, se contaron las colonias bacterianas (figura 4). Los hidrogeles de PEG "desnudos" parecen inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* incluso en ausencia de péptido. Para *E. coli* y *S. aureus*, el efecto antibacteriano lo aportó el péptido injertado. En efecto, el 15% molar de péptido antibacteriano indujo una inhibición completa del crecimiento de *S. aureus* y redujo el crecimiento de *E. coli* en el 80%.

• Prueba de adhesión y de proliferación celular

40 Se preparó un hidrogel tal como el obtenido en el ejemplo 3 anterior, que contenía un péptido híbrido bi-sililado ilustrado a continuación:



45 Se ha podido demostrar que este hidrogel posee una estructura interior alveolar que puede ser propicia para la proliferación celular. Unos análisis de crio-microscopía de barrido (MEB) muestran un sistema alveolar multimicrométrico.

50 En efecto, esto es claramente visible en la figura 5 que ilustra una vista Cryo-MEB del hidrogel que contiene el péptido bi-sililado preparado.

Adhesión de las células

55 Se ha demostrado también que el hidrogel obtenido permite la adhesión de las células mMSC (células madre mesenquimatosas murinas) más eficazmente que el poliestireno tratado para el cultivo de tejidos y tras 4 h tan eficazmente como una espuma de colágeno comercial.

Se depositaron 50 µl de una suspensión de células a 60000 células por ml sobre diferentes materiales, incluido el hidrogel según la invención tal como se describe en esta parte. Se utilizaron como controles el poliestireno tratado para el cultivo celular (TC-PS) y una espuma comercial de colágeno bovino de tipo I purificado y reticulado.

Se estudiaron diferentes tiempos de adhesión a 37°C antes de retirar el medio, de enjuagar con DPBS y después de contar las células mediante una prueba de viabilidad Cell Titer Glo. Los resultados se muestran en la figura 6.

Esta figura 6 ilustra la adhesión de las células mMSC sobre el hidrogel según la invención, sobre unas espumas de colágeno y TC-PS.

Proliferación celular

El hidrogel es un soporte tan bueno como las espumas de colágeno para la proliferación celular.

Se depositaron 1000 células mMSC sobre diferentes materiales, incluido el hidrogel según la invención. Se utilizaron como controles el poliestireno tratado para el cultivo celular (TC-PS) y una espuma comercial de colágeno bovino de tipo I purificado y reticulado.

Cada día durante 3 días, el medio de cultivo de una serie de muestras se sustituyó y las células se contaron mediante una prueba de viabilidad Cell Titer Glo. Los resultados se muestran en la figura 7.

En efecto, la figura 7 ilustra la proliferación de mMSC (células madre mesenquimatosas murinas) sobre el hidrogel según la invención, sobre espuma de colágeno y TC-PS.

Supervivencia celular

El hidrogel permite una buena supervivencia de células atrapadas en el interior durante por lo menos 25 horas.

Una ventaja principal del procedimiento descrito en la presente patente es la posibilidad de añadir unas células a la mezcla todavía líquida de los precursores sililados. Así, el gel se forma sin adición de reactivo químico suplementario, atrapando las células. Se encapsularon así unas células madre mesenquimatosas murinas durante 25 horas con una excelente viabilidad, comparable al control positivo de células cultivadas en 2D sobre una superficie TC-PS.

El protocolo de encapsulación es el siguiente. Una solución de hidrogel híbrido se prepara por solubilización de 30 mg del péptido híbrido del ejemplo 3 cuya estructura se ha recordado anteriormente, en 250 µl de medio de cultivo DMEM que contiene 4,5 g/l de glucosa y 0,12 mg/ml de NaF. La solución se incuba a 37°C durante 17 h 15. En este momento, la solución todavía es líquida, pero su viscosidad ha aumentado. Se añaden 50 µl de una suspensión de células mMSC que contiene 500000 células por ml en medio DMEM. La concentración en péptido híbrido bi-sililado es entonces del 10% másico. La solución híbrida se homogeneiza y se depositan 30 µl de esta solución en los pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos. El gel se forma progresivamente a 37°C. Se añade a los geles, 25 horas más tarde, una solución de Calceína-AM y de etidio homodímero III en el DPBS y estos últimos se analizan por microscopía confocal.

Se constata que la mayoría de las células atrapadas en el hidrogel según la invención han sido marcadas mediante calceína y por lo tanto están vivas. La viabilidad de las células atrapadas en el gel es comparable a la viabilidad de las células depositadas en TC-PS.

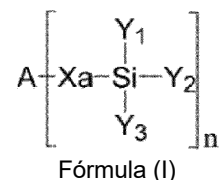
• Conclusión

Se ha demostrado la facilidad de síntesis y de utilización de los hidrogeles según la presente invención. Estos hidrogeles se han utilizado válidamente con unas moléculas de estructuras químicas diversas que prueban la flexibilidad del procedimiento según la presente invención. Se han podido preparar así unos hidrogeles que presentan unas propiedades reológicas, biológicas y/o fisicoquímicas satisfactorias con muy poca variación (incluso ninguna variación) de las condiciones de funcionamiento, excepto la naturaleza de las moléculas injertadas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de un hidrogel que comprende las etapas siguientes:

- 5 - a) polimerización sol-gel de por lo menos una molécula de fórmula (I):

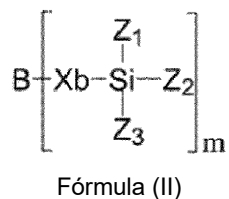


10 en la que:

- n es un número entero superior o igual a 2;
- A es un polímero orgánico seleccionado de entre las proteínas, los péptidos tales como unos derivados del colágeno, en particular las secuencias que comprenden unas repeticiones de tripéptidos Pro-Hyp-Gly o Pro-Pro-Gly o Asp-Pro-Gly o Pro-Lys-Gly, unas secuencias peptídicas de autoensamblaje como Arg-Ala-Asp-Ala (SEC ID 4), unas oligoprolinas, unas oligoalaninas, los polisacáridos, tales como el ácido hialurónico y sus derivados, los oligonucleótidos, unos polímeros de C₁-C₆-alquilenglicoles o de polivinilpirrolidona;
- Xa es un enlace químico o un grupo espaciador representado por un radical divalente derivado de una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 10 átomos de carbono, en la que están intercalados eventualmente uno o varios eslabones estructurales seleccionados de entre el grupo arileno, o los fragmentos -O-, -S-, -C(=O)-, -SO₂- o -N(R₁)-, estando dicha cadena no sustituida o sustituida por uno o varios radicales seleccionados de entre los átomos de halógeno, los grupos hidroxilo, C₁-C₄ alquilo, bencilo y/o fenetilo;
- R₁ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarbonado alifático que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, un bencilo o un fenetilo;
- Y₁, Y₂, Y₃, idénticos o diferentes, representan cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno, de halógeno, un grupo -OR₂, un arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono eventualmente sustituidos por un átomo halógeno, un grupo arilo o hidroxilo;
- R₂ representa un átomo de hidrógeno, un grupo arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono;
- por lo menos dos grupos Xa tales como los definidos anteriormente unidos a unos puntos de enganche diferentes en A;
- b) puesta en presencia de agua, opcionalmente junto con la etapa a); y
- c) recuperación del hidrogel,

45 caracterizado por que el procedimiento de polimerización sol-gel se realiza a pH fisiológico.

2. Procedimiento de fabricación de un hidrogel según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho procedimiento comprende la adición conjunta o sucesivamente a la etapa a) de por lo menos un tipo de molécula de fórmula (II):



55 en la que:

- m es un número entero superior o igual a 1, preferentemente igual a 1;
 - B es un principio activo seleccionado de entre un péptido, un oligopéptido, una proteína, tal como el colágeno, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, un polisacárido, tal como una pectina, un quitosano, un ácido hialurónico, un polisacárido poliarabinosa y poligalactosa, y un glicolípido;
 - Xb es un enlace químico o un grupo espaciador representado por un radical divalente derivado de una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 10 átomos de carbono, en la que están intercalados eventualmente uno o varios eslabones estructurales seleccionados de entre el grupo arileno, o los fragmentos -O-, -S-, -C(=O)-, SO₂- o -N(R₃)-, estando dicha cadena no sustituida o sustituida por uno o varios radicales seleccionados de entre los átomos de halógeno, los grupos hidroxilo, C₁-C₄ alquilo, bencilo y/o fenetilo;
 - R₃ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo alifático que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, un bencilo o un fenetilo;
 - Z₁, Z₂, Z₃, idénticos o diferentes, representan cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno, de halógeno, un grupo -OR₄, un arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono eventualmente sustituidos por un átomo de halógeno, un grupo arilo o hidroxilo;
 - R₄ representa un átomo de hidrógeno, un grupo arilo o una cadena hidrocarbonada alifática saturada o insaturada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono; y
 - preferentemente con uno solo de los grupos Z₁, Z₂ o Z₃ como átomo de halógeno o grupo OR₄.
3. Procedimiento de fabricación de un hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho hidrogel se polimeriza sobre o en por lo menos un primer hidrogel como soporte, resultando así en un hidrogel multicapa.
4. Hidrogel obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Hidrogel según la reivindicación 4, para su utilización con fines terapéuticos y/o quirúrgicos, caracterizado preferentemente por que dicho hidrogel permite el suministro y/o el transporte de moléculas activas, o para su utilización *in vivo* en ingeniería tisular.
6. Utilización *in vitro* de un hidrogel según la reivindicación 4, en ingeniería tisular.

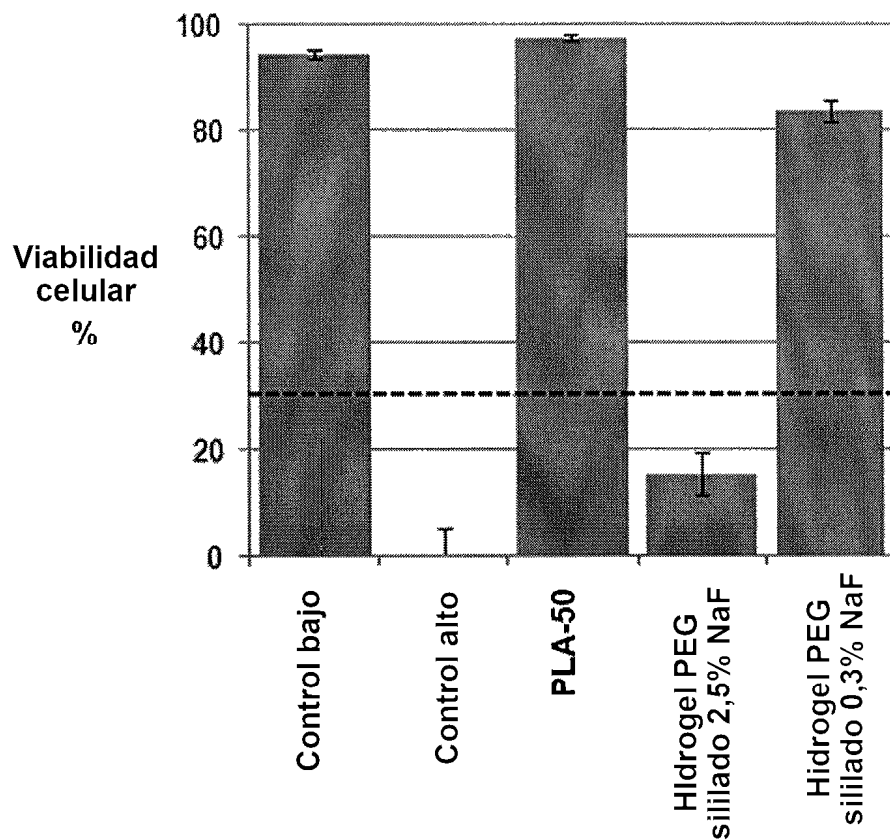


Figura 1

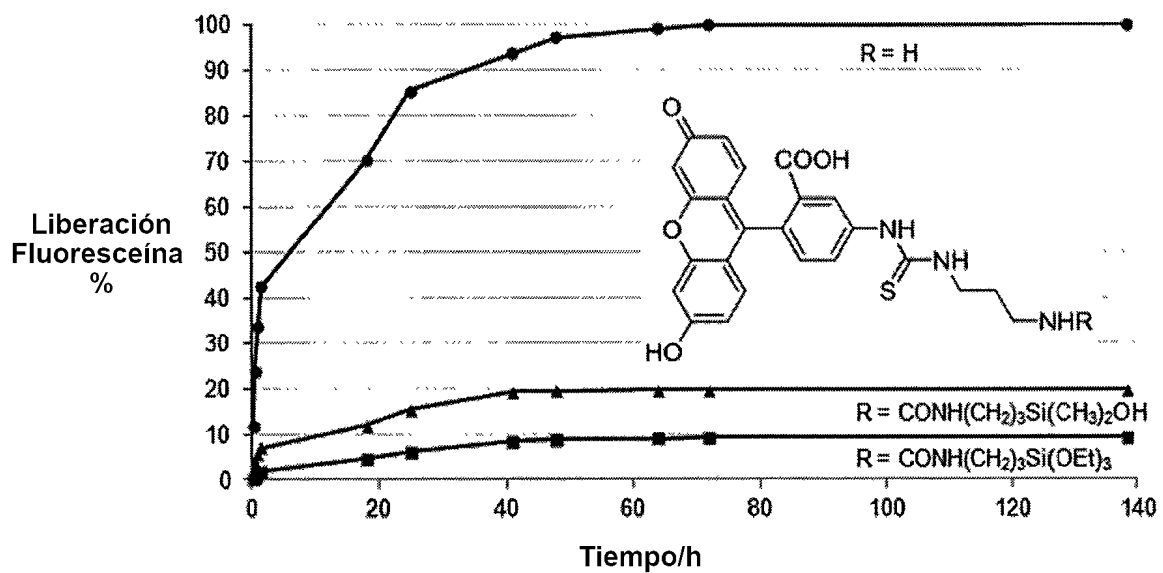


Figura 2

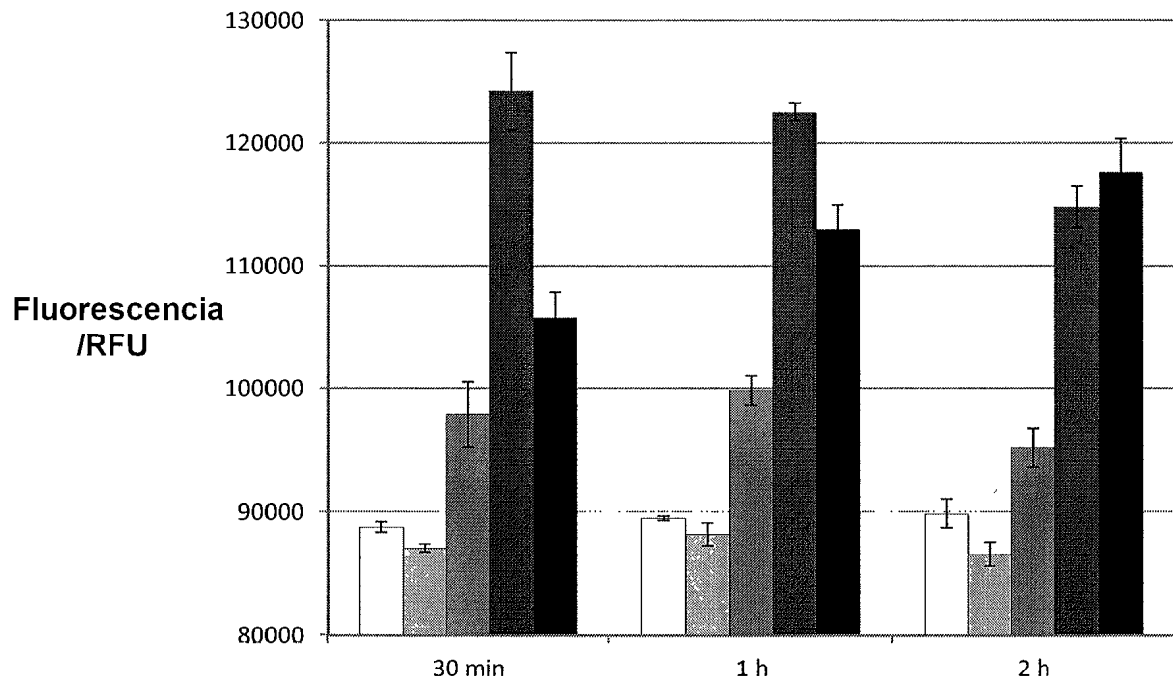


Figura 3

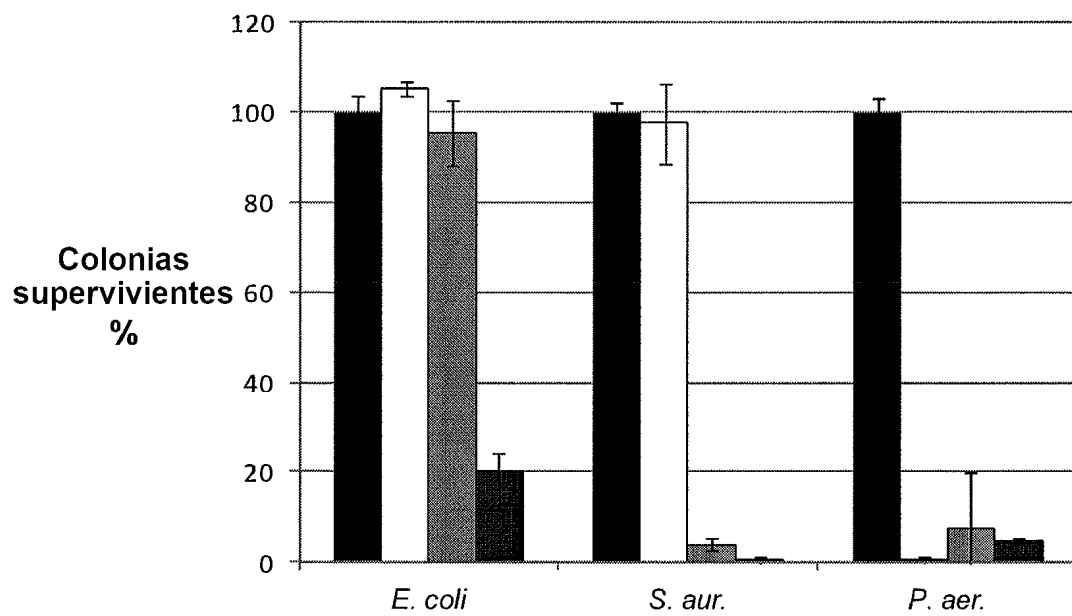


Figura 4

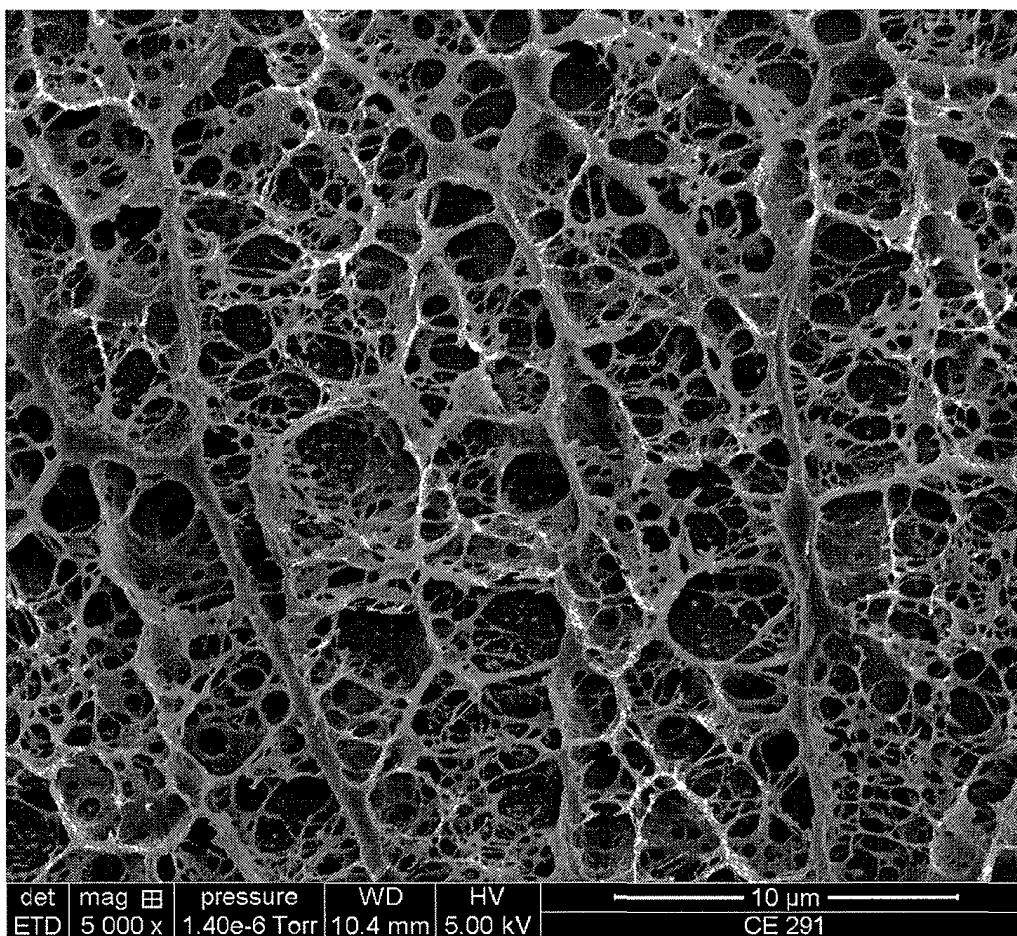


Figura 5

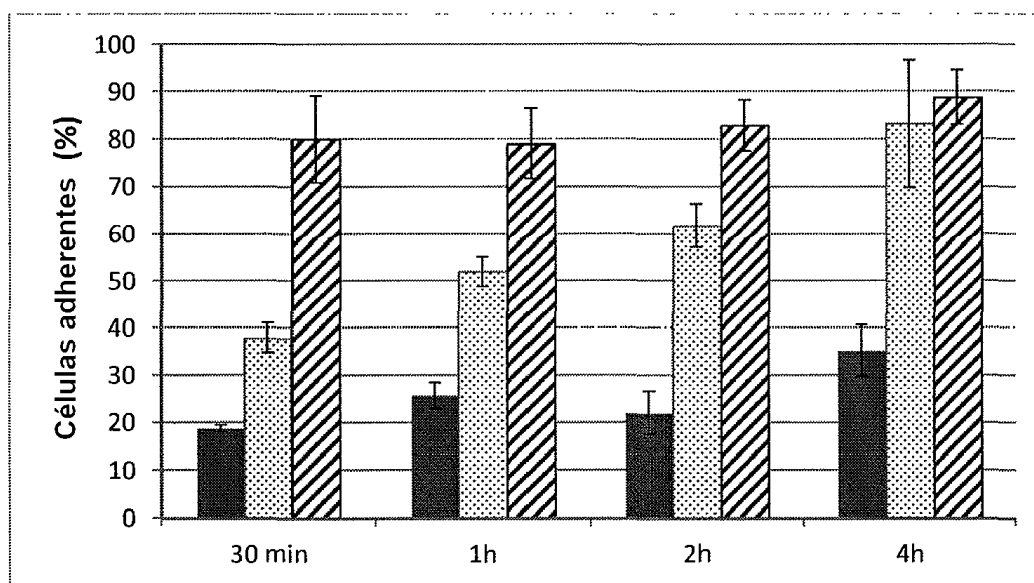


Figura 6

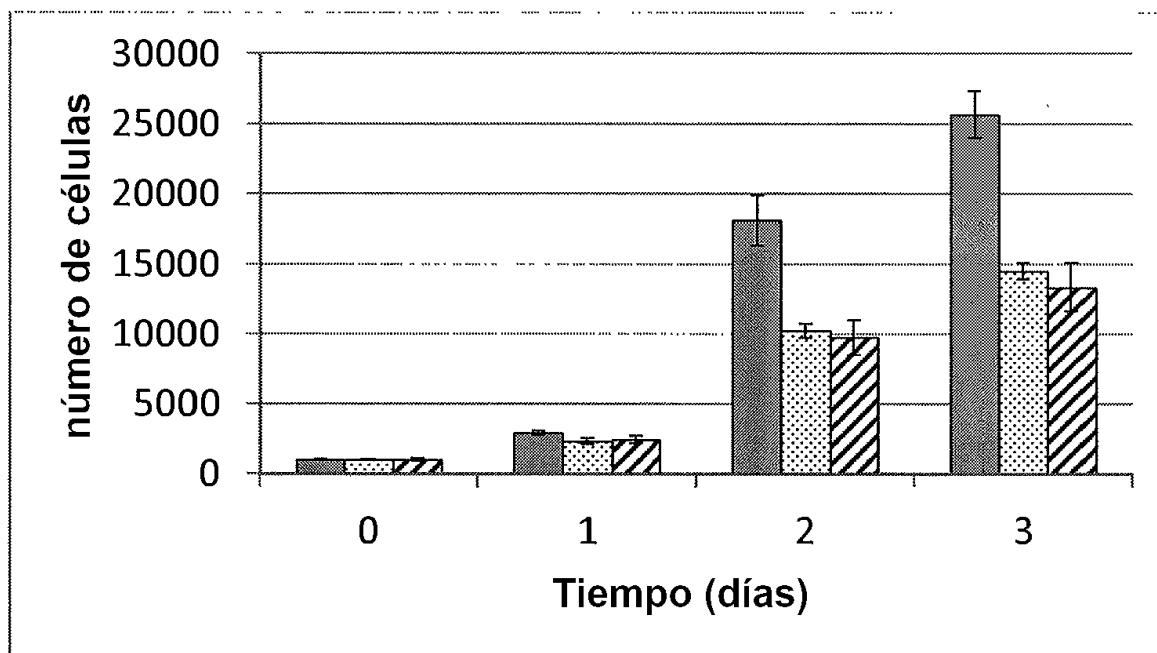


Figura 7