

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 400**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2007 PCT/EP2007/007758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2008 WO08031525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2007 E 07802163 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2061816**

54 Título: **Derivados de ácido hialurónico obtenidos a través de entrecruzamiento de "química clic"**

30 Prioridad:

11.09.2006 IT MI20061726

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
 VIA PONTE DELLA FABBRICA 3/A
 35031 ABANO TERME (PD), IT**

72 Inventor/es:

**CRESCENZI, VITTORIO;
 DI MEO, CHIARA y
 GALESSO, DEVIS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 620 400 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

Derivados de ácido hialurónico obtenidos a través de entrecruzamiento de "química clic"

La presente invención se relaciona con derivados de ácido hialurónico obtenidos a través de entrecruzamiento de "química clic".

- 5 En particular, la presente invención se relaciona con derivados entrecruzados de ácido hialurónico y otros polisacáridos con varios grupos carboxilo, entrecruzados por medio de una o más reacciones del tipo de "química clic", en particular cicloadiciones 1,3- dipolares entre alquinos y derivados de azida, los hidrogeles biocompatibles obtenidos de los derivados anteriores, que tienen características fisicoquímicas y reológicas que pueden ser moduladas a través del grado de entrecruzamiento, el proceso para la preparación de los hidrogeles anteriores
- 10 mediante la formación de enlaces covalentes entre dos bloques adecuados de polisacáridos transformados en derivados, y su uso en el campo de viscosuplementación, cirugía plástica, y también en el campo médico como soportes y/o matrices celulares para sistemas de liberación controlada de moléculas y/o macromoléculas biológica o farmacológicamente activas y para geles medicados en cirugía oncológica reconstructiva. También se relaciona con un proceso en el que estas moléculas y/o macromoléculas bioactivas, es decir biológica o farmacológicamente
- 15 activas, son incorporadas físicamente dentro de los hidrogeles directamente durante el entrecruzamiento anterior de los polisacáridos y la consecuente formación de los hidrogeles en sí mismos.

Campo de la invención

- El ácido hialurónico (HA) es un heteropolisacárido lineal natural que consiste en ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina, con un peso molecular que puede variar de 50,000 a 13,000,000 Da dependiendo de su origen, prácticamente presente en cada compartimiento de nuestro organismo. Hay numerosos roles ejercidos fisiológicamente por HA: el soporte mecánico de las células de muchos tejidos, por ejemplo, lubricación de articulaciones, modulación de numerosos procesos biológicos y fisiológicos (entre los cuales proliferación, migración y diferenciación celular, mediada por la interacción con su receptor de membrana CD44). El efecto de protección es también conocido en HA respecto a la degeneración de los cartílagos de una articulación dañada por una patología o un trauma: en esta situación están presentes citoquinas proinflamatorias, en particular interleuquina-1 (IL-1), en una fuerte concentración en la cavidad en la articulación. Ellas promueven la desintegración del cartílago en sí mismo e inhiben la proliferación de condrocitos (van Beuningen H.M. et al., Arthritis Rheum, 1991, 34:606-615). Diferentes experimentos científicos muestran que el ácido hialurónico es capaz de resistir la acción de IL-1, reducir drásticamente sus efectos negativos y ejercer un efecto de reparación en el tejido del cartílago de la articulación dentro del cual es inyectado (Stove J. et al., J Orthop Res, 2002, 20:551-555). A un nivel de articulación, además, el ácido hialurónico contenido en el fluido sinovial actúa como un lubricante viscoso durante los movimientos lentos, mientras como un resultado de sus propiedades elásticas, absorbe posibles traumas o microtraumas que pueden afectar la articulación durante los movimientos rápidos.

- Las funciones de hidratación de tejidos y cicatrizante de HA son también ampliamente conocidas y explotadas en la preparación de medicaciones usadas por largo tiempo en el tratamiento de heridas, úlceras y varios tipos de lesiones de la piel (por ejemplo, Balasz A. et al., Cosmetics & Toiletries, 1984, 5:8-17).

El ácido hialurónico usado en la presente invención puede derivarse de cualquier fuente; puede ser obtenido por ejemplo mediante extracción de crestas de pollo (EP 138572 B1), o por fermentación (EP 716688 B1), y puede tener un peso molecular que varía 50,000 a 3,000,000 Da.

- 40 El término "ácido hialurónico", como se usa en el alcance del presente documento, se refiere a un polisacárido en su forma de ácido policarboxílico y sus sales, tales como sales de sodio, potasio, magnesio y calcio.

También son conocidas en la técnica numerosas modificaciones químicas a las cuales puede someterse la molécula de HA, y son sustancialmente:

- formación de sales con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 138572 B1);
- 45 - esterificación de HA con alcoholes de las series alifática, aralifática, ciclo-alifática, aromática, cíclica y heterocíclica (HYAFF®), con un porcentaje de esterificación que puede variar de acuerdo con el tipo de alcohol usado (EP 216453 B1);
- introducción de grupo amido en HA con aminas de las series alifática, aralifática, ciclo-alifática, aromática, cíclica y heterocíclica (HYADD®), con un porcentaje de introducción de grupo amido variando de 0.1 a 50% (EP 1095064 B1);
- 50 - O-sulfatación de HA hasta el 4º grado de sulfatación (EP 702699 B1);

- desacetilación de HA: la fracción de N-acetil-glucosamina es desacetilada en un porcentaje de desacetilación que varía preferiblemente de 0.1 a 30% (EP 1313772 B1);

- percarboxilación de HA obtenida a partir de la oxidación de hidroxilo primario de la fracción de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación que varía de 0.1 a 100% (HYOXX®; documento EP 1339753).

5 Aun manteniendo la biocompatibilidad, manejabilidad y facilidad de uso de polisacárido de partida, los polímeros obtenidos a través de estos procesos pueden tener una rata de degradación diferente en un ambiente fisiológico, una diferente solubilidad en agua, un diferente perfil mecánico, dependiendo de la modificación química aplicada a él.

10 Una modificación química adicional de HA consiste en el entrecruzamiento de las cadenas de polisacárido vía esterificación interna (EP 341745 B1) para formar una red (ACP®) con un mayor peso molecular, cuya densidad depende del grado de entrecruzamiento alcanzado; este proceso es útil para obtener un biomaterial caracterizado por una menor rata de biodegradación, y con mayores propiedades de viscoelasticidad y mucoadhesión, respecto al sustrato de partida.

15 Con objeto de obtener características poliméricas similares, una aproximación similar es representada por el entrecruzamiento químico de polisacárido mediante la introducción de agentes bifuncionales de unión, como en el caso de epóxidos (De Belder et al., WO 86/00912), divinilsulfonas en solución alcalina (E.A. Balazs et al., US 4,582,865), bis-carbodiimidias (J.W. Kuo et al., US 6,537,979) y otros reactivos diferentes tales como formaldehído, dimetilurea, óxido de etileno, poliisocianatos (E.A. Balazs et al., UK 8420560).

20 Otros ejemplos específicos de la preparación de hidrogeles mediante el entrecruzamiento de derivados químicos de ácido hialurónico son descritos por D. Renier et al. (WO 02/18450), donde se usa HA parcialmente N-desacetilado y el entrecruzamiento es obtenido por medio de una reacción de varios componentes, y por D. Bellini et al. US 2005/0119219A1), donde el enlace covalente entre las cadenas de polisacárido y la consiguiente formación de un gel son obtenidos siguiendo tratamiento fotoquímico de derivados fotoreactivos de ésteres.

25 En la mayoría de los documentos anteriores del estado en la técnica, se describe el uso de geles obtenidos como agentes dérmicos de relleno en cirugía plástica, como fluidos para viscosuplementación en el tratamiento de patologías intra-articulares, como materiales sustitutivos de humor vítreo en cirugía oftálmica, como materiales mucoadhesivos en la prevención de adherencias después de operaciones, como biomateriales para la preparación de andamios en la ingeniería de tejidos y/o como matrices para sistemas de liberación de moléculas bioactivas.

30 Un objetivo de la presente invención es en consecuencia también identificar un proceso alternativo a los descritos y usados en el estado de la técnica, para la preparación de derivados entrecruzados de ácido hialurónico, un proceso alternativo que tenga ventajas significativas.

35 Por ello, un objeto de la presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de derivados entrecruzados de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, en el que por lo menos una de las cadenas de polisacárido consiste en ácido hialurónico o un derivado de él, entrecruzada por medio de reacciones del tipo "química clic", donde dichos procesos comprenden las siguientes fases:

i) Síntesis de derivados parciales (ésteres, amidas, tioésteres, anhídridos) de ácido hialurónico, y opcionalmente otro polisacárido que tiene varios grupos carboxilo o las respectivas sales o derivados;

ii) reacción de cicloadición entre el derivado obtenido en la fase i), con la formación de enlaces covalentes entre las cadenas.

40 Un objetivo adicional de la presente invención se relaciona con los mismos derivados entrecruzados de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, obtenidos en el proceso anterior en los que por lo menos una de las cadenas de polisacárido consiste en ácido hialurónico o un derivado del mismo, entrecruzado por medio de reacciones de equipo de "química clic".

45 El término "química clic" comprende e identifica diferentes grupos de reacciones químicas caracterizadas por propiedades particulares, tales como rapidez, selectividad espacial y elevado rendimiento y teniendo una elevada fuerza conductora termodinámica, generalmente mayor o igual a 20 kcal/mol.

50 Entre las reacciones "clic", las reacciones de cicloadición tales como reacciones de Diels-Alder, y sobre todo cicloadiciones 1,3 dipolares de Huisgen, son particularmente significativas en la presente invención. Un ejemplo de una cicloadición consiste en una reacción en la cual dos moléculas insaturadas reaccionan para formar un compuesto cíclico con la formación de dos nuevos enlaces σ usando electrones n .

Las reacciones de Diels-Alder (O. Diels, K. Alder, Ann. 1928, 460, 98; O. Diels, K. Alder, Ann. 1929, 470, 62; O.

Diels, K. Alder, Ber. 1929, 62, 2081-2087) son cicloadiciones [4+2] en la medida en que implican sistema de 4 electrones π (dieno) y un sistema de 2 electrones π (dienofílico). Los productos de reacción son ciclohexanos sustituidos. Los dienófilos pueden contener también dobles enlaces entre un carbón y otro átomo (por ejemplo un oxígeno), con la formación de anillos heterocíclicos.

5 El mecanismo es casi ciertamente concertado y en un solo paso: los dos nuevos enlaces carbono-carbono son formados parcialmente en el mismo estado de transición, incluso no necesariamente en la misma extensión. La reacción de Diels-Alder es útil no sólo debido a que forma un compuesto cíclico, sino sobre todo porque tiene lugar con gran facilidad sobre un amplio espectro de reactivos. La reacción es favorecida por los sustituyentes en el dienófilo que atraen electrones, pero simples alquenos pueden reaccionar también; la reacción tiene lugar
10 frecuentemente con la producción de calor por la simple mezcla de los reactivos.

Las cicloadiciones 1,3 dipolares son cicloadiciones que son permitidas termodinámicamente entre un 1,3-dipolo y un dipoloarófilo para formar anillos heterocíclicos aromáticos de 5 átomos, parcial o totalmente saturados. Los 1,3-dipolos son compuestos que pueden ser descritos por formas zwitteriónicas de sexteto u octeto y pueden ser del tipo alilo (estructura angulada) o del tipo propargilaleno. Los 1,3-dipolos pueden tener un átomo N, O o S, como
15 átomo central. Los 1,3-dipolos con un nitrógeno como átomo central son los más importantes. Ejemplos de 1,3-dipolos con nitrógeno, del tipo de propargilo (lineales) son azida, nitrilida, nitrilimina, óxido de nitrilo, diazoalcano y subóxido de nitrógeno. La aplicación de reacciones de cicloadición 1,3 dipolar en la construcción de anillos isoxazoles y pirazoles es particularmente importante debido a su selectividad espacial (generalmente total) y estereoespecificidad (G.A. Pagani, A. Abboto, "Chimica Eterociclica", Ed. Piccin).

20 Entre estos tipos de reacciones, las reacciones de cicloadición [3+2] 1,3 dipolar de Huisgen son de particular interés (R. Huisgen et al., Chem. Ber. 1967, 100, 2494-2507): éstas son reacciones de condensación entre azidas orgánicas y especies que tienen grupos alquino terminales que conducen a la formación de un derivado simple, rápidamente y con un elevado rendimiento, caracterizado por un anillo 1,2,3-triazol disustituido (R. Huisgen, Pure Appl. Chem. 1989, 61, 613-628). La anterior reacción genera una mezcla de anillos triazol disustituidos en 1,4 y
25 1,5 (véase figura 1).

Se hicieron varios intentos para controlar la selectividad espacial, hasta el descubrimiento, en 2002, de la posibilidad de usar cobre (I) como catalizador de reacción, el cual conduce exclusivamente a la formación del anillo 1,2,3-triazol disustituido en 1,4 (fig. 2) (V. Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41, 2596-2599; C.W. Torøe et al., J. Org. Chem., 2002, 67, 3057-3064; B.K. Sharples et al., WO 03/101972).

30 En este tipo de reacción, se usan las azidas primarias, secundarias y terciarias sustituidas y también las azidas aromáticas. En dicha reacción pueden usarse numerosos compuestos que tienen grupos alquino terminales, lo cual no es perjudicado por la presencia de diferentes grupos funcionales, tales como ésteres, ácidos, alquenos, alcoholes y aminas.

El mismo tipo de reacción entre azidas y alquenos tiene lugar bajo condiciones suaves en un ambiente acuoso también en ausencia de un catalizador, cuando el alquino tiene sustituyentes que atraen electrones (Z. Li et al., Tetrahedron Letters, 2004, 45, 3143-3146).

La importancia práctica de esta reacción, que es particularmente relevante dentro del campo de la denominada "química clic", se deriva de la fácil inserción de los grupos azida terminales y grupos alquino en una amplia variedad de moléculas orgánicas. Estos grupos reaccionan a continuación uno con otro también en la presencia de
40 otras especies con diferentes funcionalidades posibles. Esta prerrogativa ha probado ser particularmente ventajosa en numerosos sectores, desde el descubrimiento de fármacos hasta la ciencia de la superficie, en los cuales la formación de nuevos enlaces, y por ello nuevos productos, tiene que tener selectividad espacial, ser rápida y tiene que ocurrir con elevados rendimientos.

La reacción de Huisgen, por ejemplo, ha sido usada en efecto en los últimos años para la conjugación rápida y efectiva de mono- y disacáridos por medio de puentes que contienen anillos 1,2,3-triazol (S. Chittaboina et al., Tetrahedron Letters, 2005, 46, 2331-2336), para unir grupos funcionales que de otro modo serían de difícil introducción, a β -glucanos lineales con el mismo método, (T. Hasegawa et al., Carbohydrate Research, 2006, 341, 35-40), para la síntesis espacialmente selectiva con elevados rendimientos, de un amplio espectro de dendrímeros (V. Fokin et al., WO 2006/005046), para el acoplamiento de macromoléculas tales como oligonucleótidos y
50 proteínas con otras entidades moleculares (W. Pieken et al., WO 98/30575), para el entrecruzamiento de polivinilalcoholes por medio de agentes de unión que contienen grupos triazol (J. Ossipov et al., Macromolecules, 2006, 39(5), 1709-1718).

Aunque se conoce que las reacciones de cicloadición son procedimientos comunes de síntesis para obtener diferentes tipos de derivados químicos, el procedimiento de acuerdo con la presente invención prevé el entrecruzamiento por medio de reacciones de "química clic" de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, en
55

los cuales por lo menos una de las cadenas de polisacárido consiste en cadenas con grupos funcionales adecuados de ácido hialurónico o derivados de él -como también otros uronanos y policarboxilatos genéricos - con la producción de hidrogeles con un grado conocido de entrecruzamiento que puede ser bien modulado.

5 Un aspecto particularmente ventajoso del procedimiento de acuerdo con la presente invención radica en el hecho según el cual las reacciones de entrecruzamiento pueden ser llevadas a cabo en la presencia de diferentes moléculas, sin la formación de productos secundarios no deseados facilitando así, entre otras cosas, la producción de nuevos tipos de materiales biocompatibles y la incorporación, directamente en la fase de formación del hidrogel, de diferentes tipos de moléculas bioactivas, así como material celular, en matrices para sistemas de liberación y en geles medicados para la cirugía reconstructiva o para terapia de genes.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de derivados entrecruzados de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, en el que por lo menos una de las cadenas de polisacáridos consiste en ácido hialurónico o un derivado de él, entrecruzado por medio de reacciones del tipo de "química clic", donde dicho procedimiento comprende las siguientes fases:

15 i) síntesis de derivados parciales (ésteres, amidas, tioésteres, anhídridos) de ácido hialurónico, y opcionalmente otro polisacárido que tiene varios grupos carboxilo o las respectivas sales o derivados;

ii) reacción de cicloadición entre los derivados obtenidos en la fase i) con la formación de enlaces covalentes entre las cadenas.

20 Un objeto de la presente invención se relaciona también con derivados entrecruzados de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, en el que por lo menos una de las cadenas de polisacárido consiste en ácido hialurónico o un derivado del mismo, entrecruzado por medio de reacciones del tipo de "química clic".

Las reacciones de "química clic" son reacciones de cicloadición rápida y efectiva, entre las mismas cadenas de polisacáridos modificadas previamente para introducir grupos funcionales terminales, involucrados adicionalmente en dicha reacción.

25 Un objetivo de la presente invención se relaciona también con dichos polisacáridos entrecruzados, en la forma de hidrogeles y su uso en el campo médico, en particular en viscosuplementación, cirugía plástica, oncológica y reconstructiva, como matrices en la terapia de genes y como matrices para sistemas de liberación controlada de moléculas y/o macromoléculas con una actividad biológica o farmacológica, y también como biomateriales y soportes para material celular para el uso en ingeniería o regeneración de tejidos.

30 Un objeto de la presente invención se relaciona también con sistemas de liberación controlada de moléculas y/o macromoléculas con una actividad biológica o farmacológica, que comprende como matriz los derivados entrecruzados, en la forma de hidrogeles. En particular un objeto de la presente invención se relaciona también con un sistema de liberación controlada de oligo- y poli-nucleótidos para uso en terapia de genes, que comprende como matriz los derivados entrecruzados en la forma de hidrogeles.

35 Los derivados entrecruzados, objeto de la presente invención - y los hidrogeles obtenidos de ellos -pueden ser preparados en un solvente acuoso por medio de reacciones simples, rápidas con elevados rendimientos, que pertenecen al dominio de la denominada "química clic", gracias a la fácil formación de derivados de ácido hialurónico (y derivados de él) y/u otros polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, con moléculas que tienen grupos terminales reactivos en una de las reacciones "clic", tales como azidas, alquinos, dienos, alquenos, óxidos de nitrilo, diazoalcanos. Se ha hallado sorprendentemente también que durante la reacción de formación de estos derivados de polisacáridos e hidrogeles, en la mezcla de reacción pueden estar presentes otras moléculas que tienen diferentes tipos de grupos funcionales distintos de los mencionados anteriormente, sin formar productos secundarios indeseados y sin influir en la velocidad, rendimiento y posible selectividad espacial de la reacción de cicloadición. Esto indica que un amplio intervalo de moléculas bioactivas simples, péptidos, proteínas, oligo- y poli-nucleótidos, y otros polímeros, puede ser incorporado físicamente en los hidrogeles que son objeto de la presente invención, directamente durante su procedimiento de preparación.

40 En particular, los materiales así obtenidos se caracterizan por una buena biocompatibilidad, en la medida en que se derivan de polisacáridos que son biocompatibles y degradables en el organismo, con la restauración de los mismos polisacáridos y moléculas que tienen una baja toxicidad o incluso, como en el caso de triazoles, una actividad antibacteriana. El ácido hialurónico que puede ser usado en la presente invención pueden derivarse de cualquier fuente, por ejemplo mediante extracción de crestas de pollo (EP 138572), o por fermentación (EP 0716688), y pueden tener un peso molecular que varía de 400 a 3,000,000 Da, en particular, de 50,000 a 1,000,000 Da. Los derivados de ácido hialurónico que pueden ser usados en la preparación de los productos

intermedios necesarios para la preparación de los derivados entrecruzados, objeto de la presente invención, son los siguientes:

1) sales con bases orgánicas y/o inorgánicas, también las biológicamente activas (EP 138572 B1);

5 2) HYAFF®: ésteres de ácido hialurónico con alcoholes de las series alifática, aralifática, ciclo-alifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación que puede variar de acuerdo con el tipo de alcohol y longitud del alcohol usado, pero no mayor a 90%, en la medida en que el polímero tiene que ser todavía hidrosoluble y tiene que incluir grupos carboxílicos libres (EP 0216453 B1);

10 3) HYADD®: amidas de ácido hialurónico con aminas de series alifática, aralifática, ciclo-alifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de formación de amida no mayor a 50%, en la medida que el polímero tiene que ser todavía hidrosoluble (EP 1095064 B1);

4) productos bioconjugados obtenidos mediante síntesis directa o indirecta (mediante un espaciador molecular) entre ácido hialurónico o sus derivados y fármacos con una actividad antitumoral, que pertenecen a diferentes familias (documento italiano PD2005A000242);

5) derivados sulfatados en O (EP0702699 B1) y sulfatados en N de ácido hialurónico (EP 0971961 A1);

15 6) ACP®: ésteres internos de ácido hialurónico con un porcentaje de esterificación no mayor a 20%, en la medida en que el polímero tiene que ser todavía hidrosoluble (EP 0341745 B1);

7) productos desacilados de HA: la fracción de N-acetil-glucosamina es desacetilada con un porcentaje de desacetilación que varía preferiblemente de 0.1 a 30% (EP 1313772 B1);

20 8) productos percarboxilados de HA obtenidos de la oxidación del hidroxilo primario de la fracción de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación que varía de 0.1 a 100% (HYOXX® EP 1339753 A1)).

25 Los grupos carboxílicos libres de ácido hialurónico y sus derivados descritos anteriormente, que pueden ser usados en el proceso de entrecruzamiento de acuerdo con la presente invención, pueden estar presentes en la forma de ácidos carboxílicos, sales carboxiladas de cationes de elementos que pertenecen al grupo de metales alcalinos o alcalinotérreos, preferiblemente sodio, potasio, magnesio y calcio o sales carboxiladas de iones tetraalquilamonio, preferiblemente tetrabutilamonio, benzalconio, 2-cloro-1-metilpiridina y cetilpiridina.

30 Otros polisacáridos sintéticos o naturales que tienen varios grupos carboxilo que pueden ser usados para la preparación de los derivados entrecruzados que son objeto de la presente invención, son por ejemplo aquellos pertenecientes al grupo de glicosaminoglicanos, y preferiblemente condroitinas, dermatanos sulfatados, heparanos sulfatados y heparinas (y sus respectivas sales), así como otros polisacáridos naturales tales como ácido algínico y sales del mismo, y polisacáridos sintéticos tales como carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y sus sales.

35 Por ello, la presente invención se relaciona con derivados que tienen estructuras de polisacáridos entrecruzados como se describe en general en la figura 3, en la que como se ilustra, por lo menos una de las dos cadenas involucradas en el entrecruzamiento es ácido hialurónico, o uno de sus derivados descritos previamente (en este caso se indica hialuronato para propósitos puramente ilustrativos), y la segunda cadena puede ser la misma o cualquier otro polisacárido que tiene varios grupos carboxilo, y en el que en orden:

- X^1 y X^2 pueden ser independientemente grupos O, NH, OC(O), S (o el derivado de ácido carboxílico puede ser un éster, una amida, un anhídrido, un tioéster);

40 - R^1 y R^2 pueden ser independientemente cadenas alifáticas sustituidas o no sustituidas con un número de átomos de carbono que varía de 1 a 20, que posiblemente contienen heteroátomos, o grupos de las series aromáticas, arilalifáticas, ciclo-alifáticas, heterocíclicas, en particular otros grupos triazol, y pueden contener también o ser derivados de moléculas bioactivas;

45 - Cyc puede ser un residuo de las series ciclo-alifáticas, aromáticas o no aromáticas, saturadas o insaturadas, sustituidas o no sustituidas, con un número de átomos de C en el ciclo, que varía de 3 a 8, preferiblemente ciclohexeno sustituido o ciclohexano sustituido; o un residuo de las series heterocíclicas, aromáticas o no aromáticas, saturadas o insaturadas, sustituidas o no sustituidas, con un número de átomos de C en el ciclo, que varía de 2 a 7 y un número de heteroátomos en el ciclo que varía de 1 a 7, preferiblemente triazoles sustituidos.

50 El grupo Cyc puede tener posiblemente su propia actividad biológica; el grupo Cyc tiene que en cualquier caso ser el producto de una reacción de cicloadición que pertenece al espectro de la "química clic", como se define en el presente documento.

Los productos entrecruzados descritos anteriormente son obtenidos por medio de una o más reacciones de cicloadición con la formación de uno o más enlaces químicos covalentes entre dos o más bloques de polisacáridos modificados, para tener respectivamente la estructura química (véase la figura 4).

5 Para propósitos puramente ilustrativos, en la figura 4, ambos bloques de polisacárido consisten en hialuronato, funcionalizados de manera adecuada al nivel de algunos de sus grupos carboxílicos, pero uno de los dos bloques podría también ser representado por un polisacárido diferente, que tiene varios grupos carboxilo definido de manera análoga.

En las estructuras de la figura 4, los grupos X^1 , R^1 y Y^1 son así definidos:

10 - X^1 y X^2 pueden ser independientemente grupos O, NH, OC(O), S (es decir el derivado de ácido carboxílico puede ser un éster, una amida, un anhídrido, un tioéster, respectivamente);

- R^1 y R^2 pueden ser independientemente cadenas alifáticas sustituidas o no sustituidas con un número de átomos de carbono que varía de 1 a 20, que contienen posiblemente heteroátomos, o grupos de las series aromáticas, arilalifáticas, ciclo-alifáticas, heterocíclicas, en particular otros grupos triazol, y pueden contener también o ser derivados de moléculas bioactivas;

15 - Y^1 y Y^2 son residuos que contienen grupos capaces de reaccionar uno con otro en una reacción de cicloadición que pertenece al espectro de la "química clic", como se define de acuerdo con el presente documento, y preferiblemente residuos que contienen grupos capaces de reaccionar uno con otro en una cicloadición o una cicloadición 1,3 dipolar Diels Alder. Más específicamente, el par (Y^1 , Y^2) es un par del tipo (insaturado en 1,3, dienófilo), o (1,3-dipole, dipolarófilo), en el que:

20 - el compuesto insaturado en 1,3 es seleccionado de derivados de 1,3-dienos (también llamados dienos conjugados), y preferiblemente de 1,3-butadieno, 1-metoxi-3-trimetilsililoxi-1,3-butadieno, ciclopentadieno, ciclohexadieno, furano;

25 - el compuesto dienofílico es seleccionado de alquenos, alquinos o derivados de alquenos o alquinos con uno o más grupos que atraen electrones, unidos al enlace doble o triple, y preferiblemente de acrilatos, acrilamidas, fumaratos, vinilcetonas, nitro-alquenos, nitro-alquinos, anhídrido maleico y quinonas;

- el compuesto de 1,3-dipolo es seleccionado de derivados de óxidos de nitrilo, azidas, diazo-alcanos, alenos y nitronas, y preferiblemente de derivados de azidas;

30 - el compuesto dipolarofílico es seleccionado de alquenos, alquinos o de derivados de alquenos o alquinos con uno o más grupos que atraen electrones, unidos al enlace doble o triple, y preferiblemente de acrilatos, acrilamidas, fumaratos, vinilcetonas, nitro-alquenos, nitro-alquinos, anhídrido maleico, metilacetileno y quinonas.

35 Los derivados de polisacáridos mostrados en la figura 4, que pueden ser usados como bloques que forman los productos entrecruzados de acuerdo con la presente invención, pueden ser preparados fácilmente partiendo de ácido hialurónico - o una sal o derivado del mismo - o de otro polisacárido que tiene varios grupos carboxilo - o una sal o derivado del mismo - por medio de una reacción de esterificación, formación de amida, tioesterificación o la formación de un anhídrido al nivel de carboxilo, después de activación del carboxilo en sí mismo o, en el caso de esterificación, del alcohol que forma el éster, de acuerdo con los procedimientos y expedientes ya conocidos en el estado de la técnica.

Por ello, el procedimiento para la preparación de los derivados entrecruzados de acuerdo con la presente invención, comprende las siguientes dos fases:

40 i) síntesis de derivados parciales (ésteres, amidas, tioésteres, anhídridos) de ácido hialurónico y posiblemente otro polisacárido que tiene varios grupos carboxilo o sus respectivas sales o derivados;

ii) reacción de cicloadición entre los derivados sintetizados con la formación de enlaces covalentes entre las cadenas.

45 Las reacciones de cicloadición usadas en la presente invención pertenecen al espectro de la denominada "química clic" y en consecuencia tienen como característica ser rápidas, simples, eficientes, y, si se seleccionan de manera adecuada los grupos involucrados, también espacialmente selectivas, adicionalmente a la característica de no dar lugar a productos secundarios indeseados. Las condiciones ideales de las reacciones "clic" usadas en el alcance del presente documento prevén el uso de un solvente acuoso, pero no excluyen la posibilidad de adoptar de manera alterna un solvente orgánico, y preferiblemente un solvente orgánico polar aprótico, si las especies involucradas en la síntesis (sales o derivados de polisacáridos) son solubles en él o en un solvente mixto. Las concentraciones de los derivados individuales de polisacáridos en la mezcla de reacción varían normalmente de 1

a 500 mg/ml dependiendo del tipo de polisacárido y el tipo de derivado, y preferiblemente de 5 a 100 mg/ml. La temperatura de reacción varía en ambos casos normalmente de 4 a 60°C, en particular de 15 a 40°C, mientras la formación de los productos entrecruzados y en consecuencia los hidrogeles tiene lugar después de un tiempo de agitación que varía desde algunos segundos a 30 minutos, en particular desde unos pocos segundos a 10 minutos.

5 La reacción de cicloadición puede tener lugar con catálisis sobre la parte de una sal de Cu(I), presente en la mezcla acuosa de reacción a una concentración final que varía de 1 a 50 mg/ml, y preferiblemente de 1 a 5 mg/ml, o con catálisis de un sistema que genera Cu(I) in situ, y preferiblemente un sistema que consiste en una sal de Cu(II) (por ejemplo CuSO₄) y ácido ascórbico en concentraciones catalíticas, o sin catalizador, si los sustituyentes sobre los grupos reactivos descritos anteriormente hacen la misma reacción rápida y eficiente también bajo estas
10 condiciones.

Los hidrogeles, objeto de la presente invención y obtenidos por medio de la reacción descrita anteriormente, tienen la capacidad de absorber más agua o solvente e hincharse, y una de sus características radica en las propiedades viscoelásticas que pueden ser moduladas de acuerdo con el grado de entrecruzamiento alcanzado. En particular, estos hidrogeles pueden estar presentes en la forma de un fluido más o menos viscoso y mucoadhesivo, o en una
15 estructura compacta tridimensional del tipo pared-pared, y en consecuencia tener una mayor resistencia mecánica (véase figura 5).

Brevemente, los hidrogeles, objeto de la presente invención, pueden ser obtenidos y modulados considerando los siguientes parámetros:

- i. el peso molecular de los polisacáridos de partida o sus derivados;
- 20 ii. el grado de formación de derivados de los polisacáridos de partida o sus derivados, en relación a los grupos usados a continuación en la formación de entrecruzamiento;
- iii. para derivados de los polisacáridos de partida, el tipo de molécula unida a los grupos carboxílicos no comprometidos en el entrecruzamiento y su grado de formación de derivados;
- iv. la concentración de los materiales de partida para obtener el gel;
- 25 v. el tipo de grupos R¹ que actúan como posibles espaciadores entre los polisacáridos y los grupos Y¹;
- vi. el tipo de solución en la cual se prepara el gel.

Dado que los geles así sintetizados se derivan de una matriz de polisacáridos, son ampliamente aplicados en el campo médico, en particular en el campo de la viscosuplementación y cirugía plástica, oncológica y reconstructiva.

Los derivados entrecruzados en la forma de hidrogeles son usados preferiblemente en cirugía plástica como agentes de relleno dérmico, en cirugía oncológica y reconstructiva, agentes de relleno en terapia de genes, matrices para la liberación de polinucleótidos, en ingeniería de tejidos como soportes que contienen material celular en regeneración de tejidos.
30

En particular, en el campo osteoarticular, donde uno de los tipos de tratamiento más ampliamente usado y efectivo para enfermedades degenerativas del cartílago y tejido sinovial es la inyección intra-articular de compuestos que tienen marcadas propiedades viscoelásticas, la capacidad de modular las características reológicas de los hidrogeles descritos aquí, mediante la variación de uno o más parámetros especificados anteriormente, ha probado ser un instrumento poderoso para el desarrollo de dispositivos médicos innovadores.
35

Además, aprovechando una aproximación diferente, el método de entrecruzamiento descrito en la presente invención es usado para la formación de un hidrogel que consiste en ácido hialurónico (y/o es un derivado del mismo) directamente en la cavidad sinovial, mediante administración intra-articular de una inyección, primero un componente y luego el segundo con o sin un catalizador a base de Cu(I), con dos inyecciones menos dolorosas, dado que consisten en soluciones que tenía inicialmente una baja viscosidad.
40

Otra ventaja del uso de los derivados entrecruzados de acuerdo con la presente invención en el campo osteoarticular, radica en el hecho de que el ácido hialurónico entrecruzado en la forma de un hidrogel, especialmente si se ha formado derivado al nivel de carboxilo por medio de un enlace más estable, tal como por ejemplo el enlace amida, tiene tiempos de degradación más largos respecto a aquellos de un compuesto de viscosuplementación inyectado en forma fluida y a base del polisacárido de partida o el polisacárido entrecruzado de acuerdo con métodos diferentes al del objeto de la presente invención, permitiendo mayores tiempos de residencia en el sitio de administración.
45

Esta última característica sorprendente puede ser demostrada mediante los resultados de estudios in vitro a 37°C
50

de degradación de un derivado entrecruzado de HA (obtenido en la forma de un hidrogel, como se describe en el Ejemplo 3 del presente documento), tanto en PBS 0,2 M como en artificial plasma.

5 Observe en la siguiente tabla, en efecto, los datos comparativos entre ACP® 5% (polímero auto entrecruzado, éster interno a aproximadamente 5% de HA) y el derivado descrito como producto del Ejemplo 3, en relación con la prueba de degradación en PBS 0.2M a 37°C, donde los parámetros de evaluación de la estabilidad química y reológica son el grado de sustitución del derivado a nivel de carboxilo y la viscosidad dinámica, respectivamente. La prueba fue realizada mediante el hinchamiento de una cantidad conocida de los respectivos derivados en un volumen conocido de H₂O y diluyendo con PBS el hidrogel formado, hasta que se obtiene una concentración de las especies de 10 mg/ml. Durante la incubación a 37°C, el descenso en el grado de sustitución de los derivados y la pérdida de viscosidad de los hidrogeles obtenidos, fueron vigilados durante los diferentes tiempos de observación.

Derivado	Parámetro	t=0	t=1g	T=2gg	t=3gg	t=4gg	t=5gg	t=7gg	t=10gg
ACP® 5%	Grado de sustitución (% mol/mol)	6.9	6.7	6.3	5.9	5.8	5.4	4.5	3.2
	Viscosidad dinámica (Pa.s)	12.5	10.4	7.1	4.6	3.1	2.0	1.2	0.7
Entrecruzado a través de química-clíc	Grado de sustitución (% mol/mol)	11.2	11.1	11.4	11.1	10.8	10.9	10.8	10.7
	Viscosidad dinámica (Pa.s)	36.1	35.5	34.0	34.6	33.8	32.8	31.1	29,9

En adición a una evidente estabilidad química bajo condiciones fisiológicas, se observa también un mantenimiento mucho más prolongado del desempeño reológico.

15 Por ello, las mismas características de versatilidad, viscoelasticidad, biocompatibilidad y baja biodegradabilidad permiten a los derivados entrecruzados de acuerdo con la presente invención ser usados como agentes dérmicos de relleno en el campo de la cirugía plástica.

20 Una característica importante de los hidrogeles de acuerdo con la presente invención consiste en el hecho de que un amplio espectro de moléculas biológicas o farmacológicamente activas puede ser incorporado allí durante el entrecruzamiento de los polisacáridos, sin influir de manera significativa en la velocidad de reacción y el rendimiento cuantitativo, y sin involucrarse en el proceso, causando la formación de productos secundarios indeseados. Los grupos funcionales involucrados en las reacciones de cicloadición usadas en el proceso de acuerdo con la presente invención, se caracterizan en efecto por una reactividad altamente específica o pueden en cualquier caso ser seleccionados de modo que las funciones presentes en la molécula que va a ser incorporada son inertes a este respecto.

25 Por ello, un objeto de la presente invención se relaciona con un método para la preparación de sistemas de liberación controlada de moléculas farmacológicamente activas, en la forma de geles, obtenidos con el proceso descrito previamente, cargados con una o más moléculas biológica o farmacológicamente activas, en el que estas moléculas se disuelven en el solvente de reacción (sea este acuoso u orgánico) antes de la formación del gel junto con los derivados parciales de polisacáridos que van a ser entrecruzados, y entonces permanece físicamente y homogéneamente incorporadas en la matriz de polímero formada siguiendo el entrecruzamiento.

30 En los sistemas de liberación controlada de moléculas y/o macromoléculas biológica y/o farmacológicamente activas, de acuerdo con la presente invención, las moléculas y/o macromoléculas que tienen una actividad biológica o farmacológica, son seleccionadas de entre principios activos tales como proteínas, factores de crecimiento, enzimas, medicamentos antitumorales, citoestáticos, fármacos antiinflamatorios esteroides y no esteroides, antibióticos, fármacos antimicrobianos, fármacos antivirales, fármacos antifúngicos, anestésicos, analgésicos, narcóticos, colinérgicos y agonistas y antagonistas adrenérgicos, fármacos antitrombóticos, anticoagulantes, fármacos hemostáticos, fármacos fibrinolíticos y trombolíticos para uso tópico, subcutáneo, intramuscular o intra-articular.

40 Las curvas de liberación de un fármaco antineoplásico (doxorubicina) y un fármaco antiinflamatorio (bencidamina) incorporados en matrices en la forma de hidrogeles obtenidos después de entrecruzamiento a través de la reacción de Huisgen de derivados adecuados de azida y alquino de ácido hialurónico, se muestran abajo para propósitos

ilustrativos (para descripciones adicionales y más detalladas, véase también la sección relacionada con los ejemplos, en particular Ejemplo 13).

En el primer caso se observa que la cantidad máxima de clorhidrato de doxorubicina es liberada en aproximadamente 50 h y es igual a 50% de la cantidad incorporada inicialmente en el gel (véase figura 6).

- 5 En el segundo diagrama, la cantidad máxima de clorhidrato de bencidamina es liberada en aproximadamente 6 h y es igual a 80% de la cantidad de fármaco incorporado inicialmente en el gel (véase figura 7).

Estos sistemas de fármacos de liberación controlada en la forma de geles pueden tener numerosos campos de aplicación, pero en particular en los campos dermatológico, oncológico, neumológico y osteo-articular.

- 10 En particular, en el caso de uso intra-articular, el gel anterior puede contener principios activos tales como sustancias antiinflamatorias, inhibidores de metal-proteasa, inhibidores de sintetasa NO u otras moléculas biológicamente activas para el tratamiento de patologías artrósicas y/o artríticas, obteniendo así una baja liberación del(los) principio(s) activo(s), asociada con la acción de viscosuplementación principalmente mecánica ofrecida por el gel.

- 15 En particular, un objeto de la presente invención se relaciona con el uso de sistemas de liberación controlada en cirugía oncológica reconstructiva o en neurocirugía oncológica, seguimiento del retiro de masas de cáncer, en el que el hidrogel contiene fármacos antineoplásicos y/o citostáticos y/o sus precursores como moléculas farmacológicamente activas.

- 20 Sobre la base de las ventajas específicas suministradas por la buena biocompatibilidad, baja biodegradación y significativa mucoadhesión, la administración loco-regional de estos sistemas de liberación controlada, cargados con fármacos antineoplásicos y/o citostáticos prueba ser particularmente efectiva y ventajosa, en el caso por ejemplo de cirugía facial.

En estas formas de aplicación, en efecto la función de "agente de relleno" de la matriz de polisacárido entrecruzado en sí misma, está asociada con la actividad del fármaco que es liberado lentamente por dicha matriz, con objeto de prevenir la formación de neoplasma recurrente.

- 25 Los posibles sitios de administración de los sistemas de liberación controlada descritos previamente, comprenden todas aquellas cavidades o espacios de tejido que se derivan de intervenciones quirúrgicas, para el retiro de masas tumorales, donde es apropiado introducir un producto biocompatible, en la forma de un hidrogel medicado que tiene una función estructural y de relleno y una actividad farmacológica. En particular, las administraciones intratecales son de particular interés, el seguimiento del retiro de neoplasma cerebral (por ejemplo glioblastomas),
30 administración intraperitoneal para seguimiento del retiro de tumores cólicos, vesicales, hepáticos y pancreáticos, y en el caso de administraciones reconstructivas masto-plásticas, después del retiro de tumores de mama.

- 35 Ejemplos de moléculas farmacológicamente activas que pueden ser usadas en esta forma de aplicación de los sistemas de liberación controlada de acuerdo con la presente invención, son todos aquellos que tienen una actividad antitumoral o citostática conocida y/o posibles precursores de los mismos, en particular moléculas farmacológicamente efectivas en el tratamiento del neoplasma listado anteriormente, y preferiblemente paclitaxel, doxorubicina, irinotecan, 5-fluorouracil, gemcitabin, vincristine y metotrexate.

Se suministran los siguientes ejemplos para una mejor ilustración de la presente invención.

Ejemplo 1

- 40 Introducción de grupo amido en HANa con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

- 45 Se disolvieron 2 g de sal de sodio de HA de 700 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se añadieron entonces los siguientes reactivos en secuencia: 1.43 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3,dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y 0.86 g de NHS (N-hidroxisuccinimida), y a continuación 3.30 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó entonces la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se le realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. Se recuperó el producto 1 (véase la figura 8) como un polvo blanco.

Reacción de producto 1 con propargilamina

- 50 Se disolvieron 500 mg de producto 1 en 20 ml de agua destilada. Se añadieron entonces 2 ml de propargilamina y

se añadió entonces 2 ml de una solución acuosa 2% p/v de CuCl preparada previamente. Se agitó entonces la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente, se realizó diálisis por 24 horas a la solución (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando el producto como un polvo blanco (véase la figura 9).

Ejemplo 2

Introducción de grupo amido en HANA con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHSS

Se añadieron 1.43 g de EDC•HCl, 1.62 g de NHSS y luego 1.04 ml de propargilamina a 2 g de sal de sodio de HA de 200 kDa disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirió entonces a tubos de diálisis (MWCO=12 kDa) y se realizó diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó para la recuperación del producto 2 (véase la figura 10) como un polvo blanco.

15 Reacción de producto 2 con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina

Se disolvieron 500 mg de producto 2 en 20 ml de agua destilada. Se añadieron entonces 3 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina y 2 ml de una solución acuosa 2% p/v de CuCl preparada previamente. Se agitó entonces la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente, se realizó diálisis por 24 horas a la solución (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó recuperando el producto como un polvo blanco (véase la figura 11).

Ejemplo 3

Introducción de grupo amido en HANA con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

25 Se disolvieron 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se añadieron en secuencia 1.43 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3,dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y 0.86 g de NHS (N-hidroxisuccinimida), y a continuación 3.30 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se le realizó diálisis por 24 horas (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 3 (que tiene la misma estructura química que la figura 8) como un polvo blanco.

Introducción de grupo amido en HANA con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

35 Se añadieron 1.43 g de EDC•HCl, 0.86 g de NHS y luego 1.04 ml de propargilamina a 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirieron entonces 12 kDa a tubos de diálisis y se realizó diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó para la recuperación de producto 4 (que tiene la misma estructura química que la figura 10) como un polvo blanco.

40 Formación del hidrogel de ácido hialurónico en un solvente acuoso

Se disolvieron separadamente 400 mg de producto 3 y 400 g de producto 4 en 8 ml de agua destilada hasta completa disolución. Se disolvieron entonces 30 mg de CuCl aparte en 1.50 ml de agua destilada. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, añadiendo a continuación la solución de CuCl y agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (véase la figura 12). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada para remover el exceso de CuCl hasta un peso constante del gel.

Ejemplo 4

Introducción de grupo amido en HANA con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=6 en la presencia de EDC•HCl y NHSS

50 Se disolvió 1 g de sal de sodio de HA de 200 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=6. Se añadieron entonces 478 mg de EDC•HCl y 540 mg de NHSS (N-hidroxisulfosuccinimida), y a continuación 1.65 ml de 11-

5 azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se agitó entonces la solución a temperatura ambiente por 8 horas, y luego se realizó diálisis en tubos de corte de 12 kDa contra una solución saturada de NaCl, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. Se recuperó el producto 5 (que tiene la misma estructura química que la figura 8) como un polvo blanco.

Introducción de grupo amido en HANa con propargilamina en un solvente acuoso a pH=6 en la presencia de EDC•HCl y NHSS

10 Se disolvió 1 g de sal de sodio de HA de 200 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=6. Se añadieron entonces 478 mg de EDC•HCl y 540 mg de NHSS, seguidos de 0.520 ml de propargilamina. Se dejó el sistema bajo agitación a temperatura ambiente por 8 horas, se le realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. La solución transferida a un matraz fue congelada a continuación y se liofilizó para la recuperación de producto 2 como un polvo blanco.

Formación del hidrogel de ácido hialurónico en un solvente acuoso en la presencia de BSA

15 Se prepararon 20 ml de una solución acuosa 1% p/v de albúmina de suero bovino (BSA); se disolvieron entonces completamente 300 mg de producto 5 en 6 ml de la solución anterior y se siguió entonces un procedimiento análogo para el producto 2. Se preparó aparte una solución acuosa 2% p/v de CuCl. Se mezclaron las soluciones de los polímeros, añadiendo continuación 1 ml de una solución de CuCl y agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel de la figura 12. Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada hasta
20 que se alcanzó un peso constante.

Ejemplo 5

Introducción de grupo amido en HANa con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

25 Se disolvieron 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se agregaron en secuencia 1.43 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3,dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 0.86 g de NHS (N-hidroxisuccinimida) y a continuación 3.30 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 3 (que tiene la misma estructura química que la figura 8) como un polvo blanco.
30

Introducción de grupo amido en HANa con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

35 Se añadieron 1.43 g de EDC•HCl, 0.86 g de NHS y luego 1.04 ml de propargilamina a 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirió entonces la solución a tubos de diálisis de corte de 12 kDa y se realizó diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó para la recuperación de producto 4 (que tiene la misma estructura química que la figura 10) como un polvo blanco.

Formación del hidrogel de ácido hialurónico en un solvente acuoso en la presencia de BSA

40 Se prepararon 25 ml de una solución acuosa 2% p/v de albúmina de suero bovino (BSA); se disolvieron entonces completamente 400 mg de producto 3 y 400 mg de producto 4 en 8 ml de la solución anterior. Se disolvieron aparte 30 mg de CuCl en 1.50 ml de agua destilada. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, añadiendo continuación la solución de CuCl y agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel de la figura 12. Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada para retirar el exceso de CuCl.

45 Ejemplo 6

Introducción de grupo amido en HANa con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

50 Se disolvieron 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se agregaron en secuencia 1.43 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3,dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 0.86 mg de NHS (N-hidroxisuccinimida) y a continuación 3.30 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra

una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 3 (que tiene la misma estructura química que la figura 8) como un polvo blanco.

5 Introducción de grupo amido en HANa con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

Se añadieron 1.43 g de EDC•HCl, 0.86 g de NHS y luego 1.04 ml de propargilamina a 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirió entonces la solución a tubos de diálisis de corte de 12 kDa contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó para la recuperación de producto 4 (que tiene la misma estructura química que la figura 10) como un polvo blanco.

Formación del hidrogel de ácido hialurónico en un solvente acuoso en la presencia de IL-2

15 Se disolvieron separadamente 400 mg de producto 3 y 400 mg de producto 4 en 8 ml de agua destilada hasta completa disolución. Se disolvieron también 0.5 mg de interleuquina 2 (IL 2) en 0.5 ml de agua. Se disolvieron aparte 30 mg de CuCl en 1.50 ml de agua destilada. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, se añadió a continuación la solución de interleuquina 2 y se dejó la mezcla bajo agitación suave. Se añadió finalmente la solución de CuCl, agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (véase la figura 12). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada para retirar el exceso CuCl.

Formación del hidrogel de ácido hialurónico en un solvente acuoso en la presencia de clorhidrato de doxorubicina

20 Se disolvieron separadamente 400 mg de producto 3 y 400 mg de producto 4 en 8 ml de agua destilada hasta completa disolución. Se disolvieron también 15 mg de clorhidrato de doxorubicina en 1 ml de agua. Se disolvieron aparte 30 mg de CuCl en 1.50 ml de agua destilada. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, a continuación se añadió la solución de clorhidrato de doxorubicina y se dejó la mezcla bajo agitación suave. Finalmente se añadió la solución de CuCl, agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (véase la figura 12). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada para retirar el exceso CuCl.

Ejemplo 7

Introducción de grupo amido en CMC con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

30 Se disolvieron 2 g de CMC (carboximetilcelulosa) en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se añadieron 1.57 g de EDC•HCl, 0.94 g de NHS, y a continuación 2.71 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó la solución bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 6 como un polvo blanco.

35 Introducción de grupo amido en HANa con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

40 Se añadieron 2.87 g de EDC•HCl, 1.72 g de NHS y luego 1.73 ml de propargilamina a 2 g de sal de sodio de HA de 69 kDa disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirió entonces la solución a tubos de diálisis (MWCO=12 kDa) y se realizó diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 4 (véase la figura 10) como un polvo blanco.

Formación del hidrogel mixto de ácido hialurónico y carboximetilcelulosa en un solvente acuoso

45 Se disolvieron 500 mg de producto 6 (derivado de CMC) en 10 ml de agua destilada, y de manera análoga para producto 4. Se preparó aparte una solución acuosa de 2% p/v CuCl. Se mezclaron las soluciones de los dos diferentes polímeros y se añadió entonces 1.50 ml de la solución de CuCl, agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (figura 13). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada hasta que se alcanzó un peso constante.

Ejemplo 8

50 Introducción de grupo amido en HANa con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4

en la presencia de EDC•HCl y NHS

Se disolvieron 2 g de sal de sodio de HA de 200 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se agregaron entonces en secuencia 1.43 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3,dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 0.86 g de NHS (N-hidroxisuccinimida) y a continuación 5.50 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%.

5 Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se colocó en diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 5 (que tiene la misma estructura química que la figura 8) como un polvo blanco.

10 Introducción de grupo amido en CMC con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

Se añadieron 2.36 g de EDC•HCl, 1.41 g de NHS y luego 5.42 ml de propargilamina a 2 g de CMC disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirió entonces la solución a tubos de diálisis (MWCO=12 kDa) y se realizó diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 7 como un polvo blanco.

15 un polvo blanco.

Formación del hidrogel mixto de ácido hialurónico y CMC en un solvente acuoso/orgánico

Se disolvieron separadamente 500 mg de producto 5 y 500 mg de producto 7 (derivado de CMC) en 5 ml de agua destilada y 5 ml de NMP. Se disolvieron aparte 30 mg de CuCl en 1.50 ml de agua destilada. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, se añadió entonces la solución de CuCl, agitando con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel mixto de ácido hialurónico/carboximetilcelulosa. Se realizó entonces diálisis al gel hacia agua destilada para retirar el CuCl y solvente orgánico, donde dicha diálisis fue llevada a cabo hasta que se alcanzó un peso constante del gel.

20 hasta que se alcanzó un peso constante del gel.

Ejemplo 9

25 Introducción de grupo amido en Hyaffllp50 con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

Se disolvieron 2 g de Hyaffllp50 en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se añadieron entonces en secuencia 1.32 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3,dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 0.79 g de NHS (N-hidroxisuccinimida) y a continuación 3.04 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó la mezcla bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 8 como un polvo blanco.

30 bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, y luego se realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 8 como un polvo blanco.

35 Introducción de grupo amido en Hyaffllp50 con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS

Se agregaron 1.32 g de EDC•HCl, 0.79 g de NHS y luego 0.95 ml de propargilamina a 2 g de Hyaffllp50 disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=4. Se dejó la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 24 horas, se transfirió entonces a solución a tubos de diálisis (MWCO=12 kDa) y se realizó diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se congeló la solución en nitrógeno líquido y se liofilizó, recuperando producto 9 como un polvo blanco.

40 un polvo blanco.

Formación del hidrogel de Hyaffllp50 en un solvente acuoso/orgánico

Se disolvieron separadamente 400 mg de cada uno de los dos derivados 8 y 9 descritos anteriormente, en 4 ml de agua destilada y 4 ml de NMP. Se disolvieron aparte 30 mg de CuCl en 1.50 ml de agua destilada. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, se añadió entonces la solución de CuCl y se agitó la mezcla con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (véase la figura 14). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada para retirar el exceso CuCl hasta que se alcanzó un peso constante del gel.

45 entonces las soluciones de los polímeros, se añadió entonces la solución de CuCl y se agitó la mezcla con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (véase la figura 14). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada para retirar el exceso CuCl hasta que se alcanzó un peso constante del gel.

Ejemplo 10

50 Introducción de grupo amido en Hyaff9p10 con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=6 en la presencia de EDC•HCl y NHSS

ES 2 620 400 T3

- 5 Se disolvió 1 g de Hyaff9p10 en 80 ml de amortiguador de MES 100 mM, pH=6. Se añadieron entonces 470 mg de EDC•HCl, 530 mg de NHSS (N-hidroxisulfosuccinimida) y a continuación 1.60 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se dejó la solución bajo agitación a temperatura ambiente por 8 horas, y luego se realizó diálisis en tubos (corte 12 kDa) contra una solución saturada de NaCl, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. A continuación se transfirió la solución a un matraz, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. Se recuperó producto 10 como un polvo blanco.
- Introducción de grupo amido en Hyaff9p10 con propargilamina en un solvente acuoso a pH=6 en la presencia de EDC•HCl y NHSS
- 10 Se disolvió 1 g de Hyaff9p10 en 80 ml de MES buffer 100 mM, pH=6. Se añadieron entonces a la solución 470 mg de EDC•HCl, 540 mg de NHSS y luego 530 ml (3x) de propargilamina. Se dejó el sistema bajo agitación a temperatura ambiente por 8 horas y se realizó diálisis (MWCO=12 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 horas, y luego contra agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad constante. Se transfirió la solución a un matraz y a continuación se congeló y se liofilizó para la recuperación de producto 11 como un polvo blanco.
- Formación del hidrogel de Hyaff9p10 en un solvente acuoso
- 15 Se disolvieron completamente y separadamente 300 mg de producto 10 y 300 mg de producto 11 en 6 ml de agua destilada. Se preparó aparte una solución acuosa 2% p/v de CuCl. Se mezclaron entonces las soluciones de los polímeros, añadiendo 1 ml de la solución de CuCl y se agitó la mezcla con vórtice por unos pocos minutos hasta la formación del gel (véase la figura 15). Se realizó entonces diálisis al gel contra agua destilada hasta que se alcanzó un peso constante del gel.
- 20 Ejemplo 11
- Introducción de grupo amido en HANA con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS
- 25 Se disuelven 2 g de sal de sodio de HA de 200 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 50 mM, pH=4. Se agregan entonces de secuencia 2,90 g de EDC•HCl (clorhidrato de N-(3, dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 1,77 g de NHS (N-hidroxisuccinimida), y 5,50 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se deja la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 48 h y se realiza diálisis entonces (MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 h, y contra agua destilada hasta que se alcanza una conductividad constante. A continuación se transfiere la solución un matraz, se congela en nitrógeno líquido y luego se liofiliza. Se recupera producto 1 (véase la figura 16) como un polvo blanco.
- 30 Introducción de grupo amido en HANA con propargilamina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDC•HCl y NHS
- 35 Se añaden 2,90 g de EDC•HCl, 1,77 g de NHS y luego 1,73 ml de propargilamina a 2 g de sal de sodio de HA de 200 kDa disueltos en 80 ml de amortiguador de MES 50 mM, pH=4. Se deja la reacción por 48 h bajo agitación a temperatura ambiente, se transfiere entonces la solución a tubos de diálisis (MWCO=14 kDa) y se realiza diálisis contra una solución saturada de NaCl por 24 h, y luego contra agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. A continuación se congela la solución en nitrógeno líquido y se liofiliza para la recuperación de producto 2 (véase la figura 17) como un polvo blanco.
- Formación del hidrogel de ácido hialurónico con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico en un solvente acuoso en el presente de BSA
- 40 Se preparan 25 ml de una solución acuosa 2% p/v de albúmina de suero bovino (BSA); se disuelven entonces 500 mg de producto 1 y 500 mg de producto 2 en 14 ml la solución anterior. A continuación se añaden 2 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 4 ml de una solución acuosa de 40 mg de ácido ascórbico, agitando con formación de vórtice por algunos minutos. El gel formado rápidamente (véase la figura 18) incorpora la proteína de BSA.
- 45 Formación del hidrogel de ácido hialurónico entrecruzado con CuCl catalítico en un solvente acuoso en la presencia de clorhidrato de doxorubicina.
- 50 Se disuelven 29 mg de clorhidrato de doxorubicina en 2 ml de agua y se añaden entonces 50 mg de producto 1 y 50 mg de producto 2 sintetizado como se describió anteriormente. A continuación se añaden 830 mL de una solución 1% p/v de CuCl a la solución y se forma el gel después de algunos minutos, incorporando directamente el fármaco presente en la solución.
- Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de doxorubicina a partir de hidrogeles a base de ácido hialurónico

entrecruzado obtenido con CuCl catalítico

Se determina la cantidad de clorhidrato de doxorubicina liberada a partir del hidrogel en 100 ml de agua destilada, mediante mediciones espectrofotométricas de U.V. a $\lambda=486$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco a concentración conocida.

5 Las mediciones de liberación del fármaco son ejecutadas sobre el hidrogel descrito anteriormente.

La cantidad máxima de clorhidrato de doxorubicina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 160 h y es igual a 25% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 19).

Formación del hidrogel de ácido hialurónico entrecruzado con CuCl catalítico en un solvente acuoso en la presencia de clorhidrato de bencidamina

10 Se disuelven 69 mg de clorhidrato de bencidamina en 2 ml de agua y se añaden entonces 50 mg de producto 1 y 50 mg de producto 2 sintetizado como se describió anteriormente.

A continuación se añaden a la solución 830 μ L de una solución 1% p/v de CuCl y se forma el gel después de unos pocos minutos, incorporando directamente el fármaco.

15 Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de bencidamina a partir de hidrogeles a base de ácido hialurónico entrecruzado obtenido con CuCl catalítico

Se determina la cantidad de clorhidrato de bencidamina liberada a partir del hidrogel, en 100 ml de una solución amortiguadora de fosfato pH=7.4, por medio de mediciones espectrofotométricas U.V. a $\lambda=308$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco, a una concentración conocida.

20 Las mediciones de liberación del fármaco son ejecutadas sobre el hidrogel descrito anteriormente.

La cantidad máxima de clorhidrato de bencidamina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 3.5 h y es igual a 88% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 20).

Formación del hidrogel de ácido hialurónico entrecruzado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico en un solvente acuoso en la presencia de clorhidrato de bencidamina

25 Se disuelven 50 mg de producto 1 y 50 mg de producto 2 en 1,3 ml de agua destilada y se disuelven separadamente 13,8 mg de clorhidrato de bencidamina en 0,5 ml de agua destilada. Se mezcla la solución de ácido hialurónico con la de clorhidrato de bencidamina; se añaden entonces 0,1 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 ml de H_2O y 0,1 ml de una solución acuosa de 20 mg de ácido ascórbico.

30 Se agita la mezcla por unos minutos con formación de vórtice. El gel formado rápidamente incorpora dentro el clorhidrato de bencidamina.

Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de bencidamina desde hidrogeles a base de ácido hialurónico entrecruzado, obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico

35 Se determina la cantidad de clorhidrato de bencidamina liberada del hidrogel, en 100 ml de agua destilada, por medio de mediciones espectrofotométricas U.V. a $\lambda=308$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco a concentración conocida.

Las mediciones de liberación del fármaco son ejecutadas sobre el hidrogel descrito anteriormente.

La cantidad máxima de clorhidrato de bencidamina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 5 h y es igual a 70% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 21).

40 Ejemplo 12

Introducción de grupo amido en HANA con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDCdHCl y NHS

45 Se disuelven 2 g de sal de sodio de HA de 200 kDa en 80 mL de amortiguador de MES 50 mM, pH=4. A continuación se añaden en secuencia 2,90 g de EDCdHCl (clorhidrato de N-(3, dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 1,77 g de NHS (N-hidroxisuccinimida), y 5,50 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se deja la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 48 h, y se realiza entonces diálisis

(MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 h, y contra agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. Se transfiere entonces la solución a un matraz, se congela en nitrógeno líquido y luego se liofiliza. Se recupera producto 1 como un polvo blanco.

5 Reacción de producto 1 con 1,4-Dietinilbenceno en un solvente acuoso/orgánico con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico

10 Se disuelven 500 mg de producto 1 en 45 ml de agua destilada y 150 mg de 1,4-dietinilbenceno en 1,5 ml de DMSO. Se mezclan las soluciones, se añaden entonces 1,5 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 3 ml de H_2O y 2 ml de una solución acuosa de 88 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por 4 h a temperatura ambiente, se realiza entonces diálisis a la solución (MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de EDTA por 24 h, y luego contra agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. A continuación se transfiere la solución a un matraz, se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza, recuperando el producto (véase la figura 22) como un polvo blanco.

Reacción de producto 1 con 1,6-heptadiina en un solvente acuoso/orgánico con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico

15 Se disuelven 500 mg de producto 1 en 45 ml de agua destilada y se disuelven 0,13 ml de 1,6-heptadiina en 1,5 ml de DMSO. Se mezclan las soluciones, se añaden entonces 1,5 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 3 ml de H_2O y 2 ml de una solución acuosa de 88 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por 4 h a temperatura ambiente, se realiza entonces diálisis a la solución (MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de EDTA por 24 h, y luego contra agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. A continuación se transfiere la solución a un matraz, se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza, recuperando el producto (véase la figura 23) como un polvo blanco.

Reacción de producto 1 con 1,8-nonadiina en un solvente acuoso/orgánico con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico

25 Se disuelven 500 mg de producto 1 en 45 ml de agua destilada y se disuelven 0,18 ml de 1,8-nonadiina en 1,5 ml de DMSO. Se mezclan las soluciones, se añaden a continuación 1,5 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 3 ml de H_2O y 2 ml de una solución acuosa de 88 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por 4 h a temperatura ambiente, se realiza entonces diálisis a la solución (MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de EDTA por 24 h, y luego frente a agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. Se transfiere entonces la solución a un matraz, se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza, recuperando el producto (véase la figura 24) como un polvo blanco.

Reacción de producto 1 con propargiléter en un solvente acuoso/orgánico con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico

35 Se disuelven 500 mg de producto 1 en 45 ml de agua destilada y se disuelven 0,12 ml de propargiléter en 1,5 ml de DMSO. Se mezclan las soluciones, se añaden a continuación 1,5 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 3 ml de H_2O y 2 ml de una solución acuosa de 88 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por 4 h a temperatura ambiente, se realiza entonces diálisis a la solución (MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de EDTA por 24 h, y luego contra agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. Se transfiere entonces la solución a un matraz, se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza, recuperando el producto (véase la figura 25) como un polvo blanco.

40 Ejemplo 13

Introducción de grupo amido en HANA con 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina en un solvente acuoso a pH=4 en la presencia de EDCdHCl y NHS

45 Se disuelven 2 g de sal de sodio de HA de 200 kDa en 80 ml de amortiguador de MES 50 mM, pH=4. Se añaden a continuación en secuencia 2,90 g de EDCdHCl (clorhidrato de N-(3, dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), 1,77 g de NHS (N-hidroxisuccinimida), y luego 5,50 ml de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina a 90%. Se deja la reacción bajo agitación a temperatura ambiente por 48 h, y luego se realiza diálisis (MWCO=14 kDa) contra una solución saturada de NaCl por 24 h, y contra agua destilada hasta que se ha alcanzado una conductividad constante. Se transfiere entonces la solución a un matraz, se congela en nitrógeno líquido y luego se liofiliza. Se recupera producto 1 como un polvo blanco.

50 Formación del hidrogel de ácido hialurónico con 1,4-dietinilbenceno obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico en un solvente acuoso/orgánico en la presencia de clorhidrato de doxorubicina

Se disuelven separadamente 100 mg de producto 1 en 1,1 ml de agua destilada y se disuelven 3 mg de 1,4-

- 5 dietinilbenceno en 0,2 ml de DMSO, mientras se disuelven 23,2 mg de clorhidrato de doxorubicina en 0,5 ml de agua destilada. Se mezclan las tres soluciones, se añaden entonces 0,1 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 ml de H_2O y 0,1 ml de una solución acuosa de 20 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por unos pocos minutos con formación de vórtice. El gel formado rápidamente (véase la figura 26) incorpora dentro el clorhidrato de doxorubicina.
- Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de doxorubicina desde un hidrogel a base de ácido hialurónico con 1,4dietinilbenceno obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico en un solvente acuoso/orgánico, entrelazado de acuerdo con la estructura indicada anteriormente.
- 10 La cantidad de clorhidrato de doxorubicina liberada del hidrogel, en 100 ml de agua destilada, es determinada por medio de mediciones espectrofotométricas U.V. a $\lambda=486$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco, a concentración conocida.
- Las mediciones de liberación del fármaco son realizadas sobre el hidrogel descrito anteriormente.
- La cantidad máxima de clorhidrato de doxorubicina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 50 h y es igual a 50% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 27).
- 15 Formación del hidrogel de ácido hialurónico con 1,6-heptadiina obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico en un solvente acuoso/orgánico en la presencia de clorhidrato de doxorubicina
- Se disuelven 100 mg de producto 1 en 1,1 ml de agua destilada; se prepara separadamente una solución de 140 ml de 1,6-heptadiina en 9.86 ml de DMSO, mientras se disuelven 23,2 mg de clorhidrato de doxorubicina en 0,5 ml de agua destilada. Se mezcla la solución de ácido hialurónico con la de doxorubicina y con 0.2 ml de la de 1,6-heptadiina; se añaden entonces 0,1 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 ml de H_2O y 0,1 ml de una solución acuosa de 20 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por unos pocos minutos con formación de vórtice. El gel formado rápidamente (véase la figura 28) incorpora dentro el clorhidrato de doxorubicina.
- 20
- Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de doxorubicina desde un hidrogel a base de ácido hialurónico con 1,6-heptadiina obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico
- 25
- La cantidad de clorhidrato de doxorubicina liberada del hidrogel, en 100 ml de agua destilada, es determinada por medio de mediciones espectrofotométricas U.V. a $\lambda=486$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco a concentración conocida.
- La cantidad máxima de clorhidrato de doxorubicina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 250 h y es igual a 23% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 29).
- 30
- Formación del hidrogel de ácido hialurónico con 1,6-heptadiina obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico en un solvente acuoso/orgánico en la presencia de clorhidrato de bencidamina
- Se disuelven 100 mg de producto 1 en 1,1 ml de agua destilada; se prepara separadamente una solución de 140 ml de 1,6-heptadiina en 9.86 ml de DMSO, mientras se disuelven 13,8 mg de clorhidrato de bencidamina en 0,5 ml de agua destilada. Se mezcla la solución de ácido hialurónico con la de bencidamina y con 0.2 ml de la de 1,6-heptadiina; se añaden entonces 0,1 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 ml de H_2O y 0,1 mL de una solución acuosa de 20 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por unos minutos formando vórtice. El gel formado rápidamente incorpora dentro el clorhidrato de bencidamina.
- 35
- Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de bencidamina desde un hidrogel a base de ácido hialurónico con 1,6-heptadiina obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico, entrecruzado de acuerdo con la estructura indicada anteriormente.
- 40
- La cantidad de clorhidrato de bencidamina liberada del hidrogel, en 100 ml de agua destilada, es determinada por medio de mediciones espectrofotométricas U.V. a $\lambda=308$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco a concentración conocida.
- 45
- La cantidad máxima de clorhidrato de bencidamina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 6 h y es igual a 80% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 30).
- Formación del hidrogel de ácido hialurónico con 1,8-nonadiina obtenido con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico y ácido ascórbico en un solvente acuoso/orgánico en la presencia de clorhidrato de doxorubicina
- Se disuelven 100 mg de producto 1 en 1,1 ml de agua destilada; se prepara separadamente una solución de 200

ES 2 620 400 T3

5 ml de 1,8-nonadiina en 11.23 ml de DMSO, mientras se disuelven 23,2 mg de clorhidrato de doxorubicina en 0,5 ml de agua destilada. Se mezcla la solución de ácido hialurónico con la de doxorubicina y con 0.2 ml de la de 1,8-nonadiina; se agregan entonces 0,1 ml de una solución acuosa obtenida con 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 ml de H_2O y 0,1 ml de una solución acuosa de 20 mg de ácido ascórbico. Se agita la mezcla por algunos minutos formando vórtice. El gel formado rápidamente (véase la figura 31) incorpora dentro el clorhidrato de doxorubicina.

Mediciones de liberación del fármaco clorhidrato de doxorubicina desde un hidrogel a base de ácido hialurónico con 1,8-nonadiina obtenida con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ catalítico

10 La cantidad de clorhidrato de doxorubicina liberada del hidrogel, en 100 ml de agua destilada, es determinada por medio de mediciones espectrofotométricas U.V. a $\lambda=486$ nm mediante interpolación de los valores de absorbancia sobre una línea de calibración construida usando soluciones del fármaco a concentración conocida.

Las mediciones de liberación del fármaco son ejecutadas sobre el hidrogel descrito anteriormente.

La cantidad máxima de clorhidrato de doxorubicina es liberada sobre un periodo de aproximadamente 100 h y es igual a 14% de la cantidad de fármaco incorporada inicialmente en el gel (véase la figura 32).

Reivindicaciones

1. Un procedimiento para la preparación de derivados entrecruzados de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, en el que por lo menos una de las cadenas de polisacáridos consiste en ácido hialurónico o un derivado del mismo, entrecruzado por medio de reacción de cicloadición 1,3 dipolar, donde dicho proceso comprende los siguientes pasos:

5 i) síntesis de derivados parciales seleccionados de entre ésteres, amidas, tioésteres o anhídridos de ácido hialurónico, y opcionalmente síntesis de otro polisacárido que tiene varios grupos carboxilo o las respectivas sales o derivados;

10 ii) reacción de cicloadición entre los derivados obtenidos en el paso i) con la formación de enlaces covalentes entre las cadenas,

en el que los derivados parciales obtenidos en el paso i) tienen pares de residuos que contienen grupos capaces de reaccionar uno con otro en el siguiente paso ii) y en el que los pares de residuos son un par del tipo 1,3-dipolo y dipolarófilo, en el que:

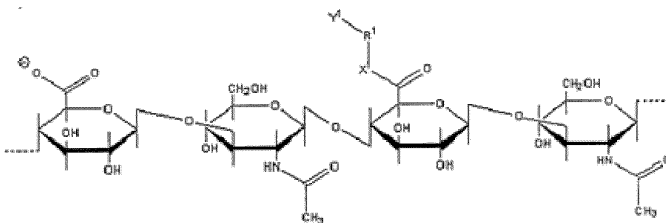
- el compuesto 1,3-dipolo es seleccionado del grupo que consiste en derivados de azidas;

15 - el compuesto dipolarófilico es seleccionado del grupo que consiste en alquenos, alquinos o derivados de alquenos o alquinos con uno o más grupos que atraen electrones unidos al doble o triple enlace, y preferiblemente 63 de acrilatos, acrilamidas, fumaratos, vinilcetonas, nitro-alquenos, nitro-alquinos, anhídrido maleico, metilacetileno y quinonas.

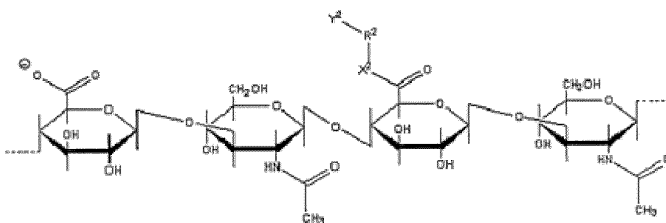
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto 1,3-dipolo es 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el derivado parcial obtenido en el paso i) son dos o más bloques modificados de polisacárido que tienen respectivamente la siguiente estructura química:

a)



25 b)



en el que los grupos X^i , R^i y Y^i son definidos así:

- X^1 y X^2 son independientemente grupos O, NH, OC(O), S;

30 - R^1 y R^2 son independientemente cadenas alifáticas sustituidas o no sustituidas con un número de átomos de carbono que varía de 1 a 20, que contiene heteroátomos o grupos de las series aromáticas, arilalifáticas, cicloalifáticas, heterocíclicas, en particular grupos triazol;

- Y^1 y Y^2 son un par de residuos que contienen grupos capaces de reaccionar uno con otro en una cicloadición 1,3 dipolar, donde preferiblemente el par (Y^1 , Y^2) es un par de residuos como se definió en la reivindicación 1.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el paso ii) es llevado a cabo en un solvente acuoso o solvente aprótico polar orgánico o en un solvente mixto.

35

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el paso ii) es llevado a cabo en la presencia de concentraciones de derivados parciales de polisacárido obtenido en el paso i) en la mezcla de reacción, variando de 1 a 500 mg/ml, preferiblemente de 5 a 100 mg/ml.
- 5 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque ambos pasos son llevados a cabo a una temperatura de reacción que varía de 4 a 60°C, preferiblemente de 15 a 40°C.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el paso ii) para la formación de los productos entrecruzados y en consecuencia los hidrogeles, tiene un tiempo de agitación que varía desde unos pocos segundos a 30 minutos, preferiblemente desde unos pocos segundos a 10 minutos.
- 10 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el paso ii) es llevado a cabo con catálisis sobre la parte de una sal de Cu(I), presente en la mezcla acuosa de reacción a una concentración final que varía de 1 a 50 mg/ml, preferiblemente de 1 a 5 mg/ml, o con catálisis de un sistema que genera Cu(I) in situ, y preferiblemente un sistema que consiste en una sal de Cu(II) (por ejemplo CuSO₄) y ácido ascórbico, en concentraciones catalíticas.
- 15 9. Derivados entrecruzados de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo, en los que por lo menos una de las cadenas de polisacáridos consiste en ácido hialurónico o un derivado del mismo, entrecruzado por medio de reacciones de cicloadición 1,3 dipolar, obtenido en el proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8.
- 20 10. Los derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizados porque los grupos carboxílicos libres de ácido hialurónico y sus derivados están presentes en la forma de ácidos carboxílicos o sales carboxiladas de tetraalquilamonio o de cationes de elementos que pertenecen al grupo de metales alcalinos o alcalinotérreos, y preferiblemente como sales de sodio, potasio, magnesio y calcio.
- 25 11. Los derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizados porque una cadena adicional de polisacáridos que tienen varios grupos carboxilo es seleccionada del grupo que consiste en glicosaminoglicanos, y preferiblemente condroitinas, dermatanos sulfatados, heparanos y heparinas sulfatados y sus respectivas sales, así como otros polisacáridos naturales seleccionados de ácido algínico y sales del mismo, y polisacáridos seleccionados de carboximetilcelulosa (CMC), o hidroxipropilmetil-celulosa (HPMC) y sales de las mismas.
- 30 12. Los derivados entrecruzados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 9 a 11, caracterizados porque ellos están en la forma de hidrogeles.
- 35 13. Los derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizados porque el hidrogel tiene propiedades viscoelásticas que pueden ser moduladas y puede estar presente en forma de un fluido mucoadhesivo, o de una estructura compacta tridimensional.
14. Los derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizados porque durante la formación del hidrogel, incorporan físicamente péptidos o proteínas, oligo- y poli-nucleótidos, otros polímeros y material celular.
- 40 15. Derivados entrecruzados de acuerdo con las reivindicaciones 12, 13 o 14, para uso en viscosuplementación, cirugía plástica, oncológica y reconstructiva, como matrices para terapia de genes o para sistemas de liberación controlada de moléculas y/o macromoléculas que tienen una actividad biológica o farmacológica y como biomateriales que contienen material celular para la ingeniería de tejidos.
- 45 16. Derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en viscosuplementación en el campo osteoarticular.
17. Derivados entrecruzados para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la formación de un hidrogel que consiste en ácido hialurónico (y/o un derivado del mismo) es realizada directamente en la cavidad sinovial, mediante administración intra-articular primero de un derivado parcial de polisacárido y a continuación del segundo, con o sin un catalizador a base de Cu (I).
18. Derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en cirugía plástica como agentes dérmicos de relleno.
19. Derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en cirugía oncológica y reconstructiva, como agentes quirúrgicos de relleno.
- 50 20. Sistemas de liberación controlada de moléculas y/o macromoléculas que tienen una actividad biológica o

farmacológica que comprenden, como matriz, los derivados entrecruzados en la forma de un hidrogel de acuerdo con la reivindicación 12.

21. Sistemas de liberación controlada de oligo- y polinucleótidos para uso en terapia de genes que comprenden, como matriz, los derivados entrecruzados en la forma de hidrogeles de acuerdo con la reivindicación 12.

5 22. Matrices en la forma de hidrogeles, que consisten en los derivados entrecruzados de acuerdo con la reivindicación 12, que contienen material celular para uso en ingeniería o regeneración de tejidos.

10 23. Los sistemas de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizados porque las moléculas y/o macromoléculas que tienen una actividad biológica o farmacológica son seleccionadas de principios activos tales como proteínas, factores de crecimiento, enzimas, fármacos antitumorales, citoestáticos, fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, antibióticos, fármacos antimicrobianos, fármacos antivirales, fármacos antifúngicos, anestésicos, analgésicos, narcóticos, colinérgicos y agonistas y antagonistas adrenérgicos, fármacos antitrombóticos, anticoagulantes, fármacos hemostáticos, fármacos fibrinolíticos y trombolíticos adecuados para uso tópico, subcutáneo, intramuscular o intra-articular.

15 24. Sistemas de liberación controlada en la forma de geles de acuerdo con las reivindicaciones 20, 21 o 23, para uso en el campo dermatológico, oncológico, neumológico, y osteoarticular y para ingeniería de tejidos.

25. Sistemas de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 24, para uso mediante administración intra-articular, en los que el gel contiene principios activos tales como sustancias antiinflamatorias, inhibidores de metal-proteasa, inhibidores de NO sintetasa, u otras moléculas biológica o farmacéuticamente activas para el tratamiento de patologías artrósicas y/o artríticas.

20 26. Sistemas de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 24, para uso en cirugía oncológica reconstructiva o en neurocirugía oncológica, en los que el hidrogel contiene fármacos antineoplásicos y/o citoestáticos y/o precursores de los mismos, como moléculas farmacológicamente activas.

25 27. Sistemas de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizados porque las moléculas farmacológicamente activas son seleccionadas de paclitaxel, doxorubicina, irinotecan, 5-fluorouracil, gemcitabin, vincristine y metotrexate.

28. Un método para la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos en la forma de geles, como se define en las reivindicación 20, caracterizado porque se disuelven una o más moléculas biológica o farmacológicamente activas en el solvente de reacción, junto con los derivados parciales de polisacáridos que van a ser entrecruzados.

30

Formación de 1,2,3 - triazol vía Huisgen cicloadición 1,3 - dipolar

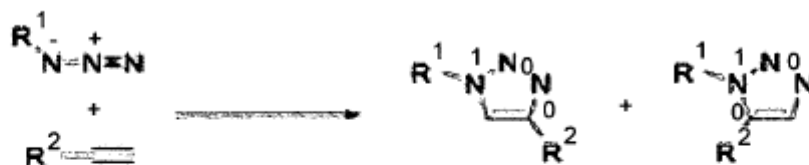
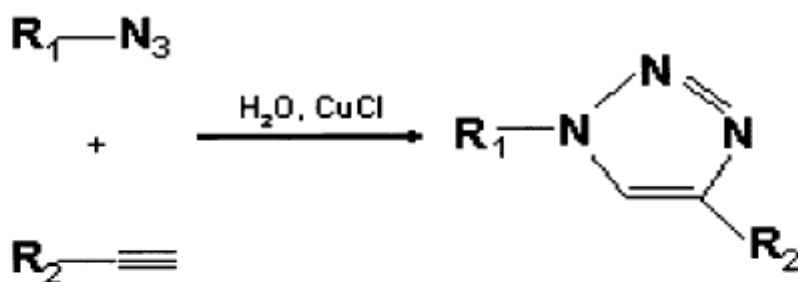
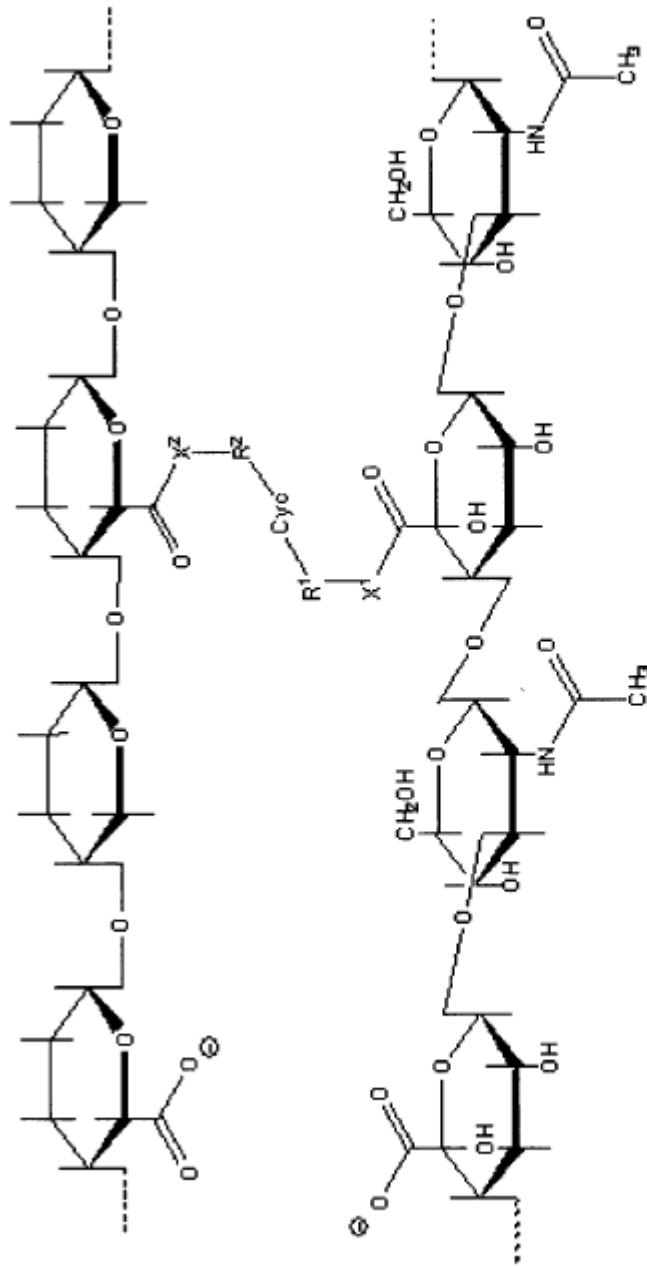


Fig. 1



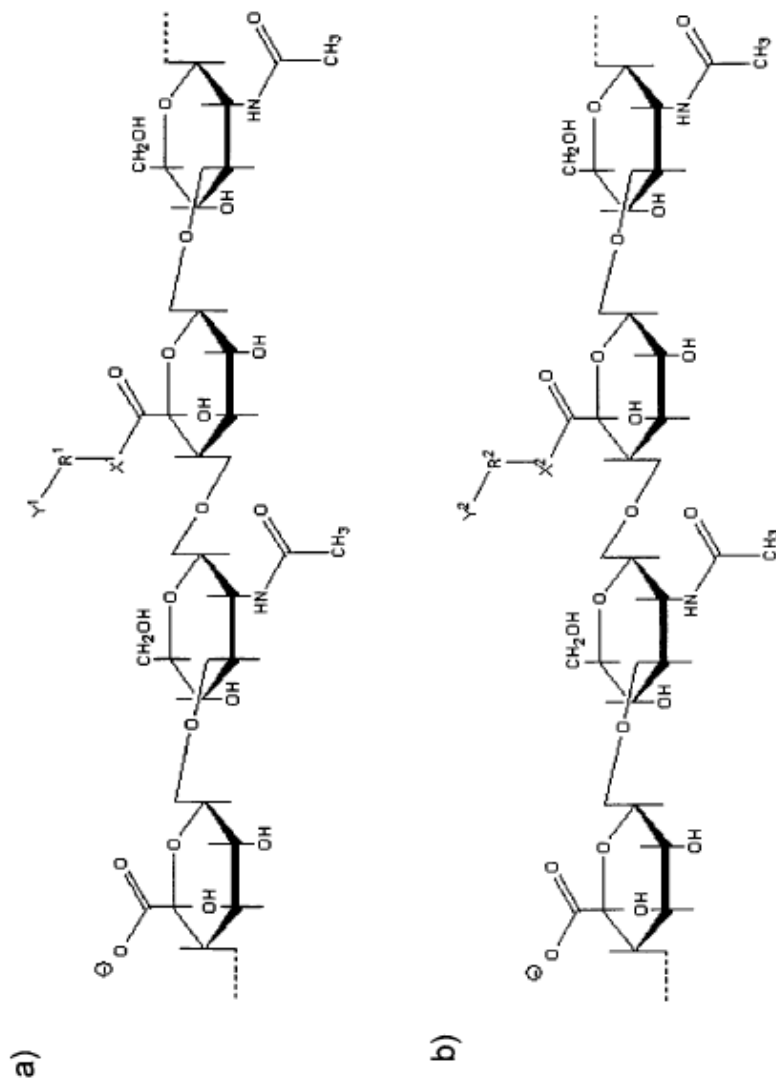
Esquema de la reacción "clic" entre una azida y un alquino

Fig. 2



Estructura general de los productos entrecruzados descritos en la invención

Fig. 3



Estructura general de los bloques de polisacáridos a) y b) que pueden ser usados en la reacción de cicloadición

Fig. 4



Hidrogel obtenido del entrecruzamiento de las cadenas de ácido hialurónico por medio de cicloadición Huisgen (azida-alquino)

Fig. 5

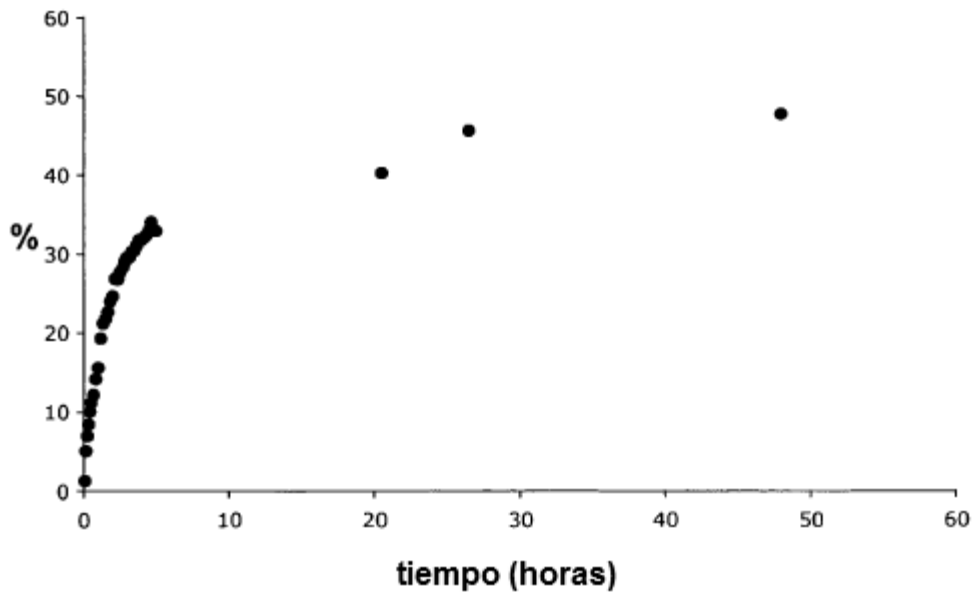


Fig. 6

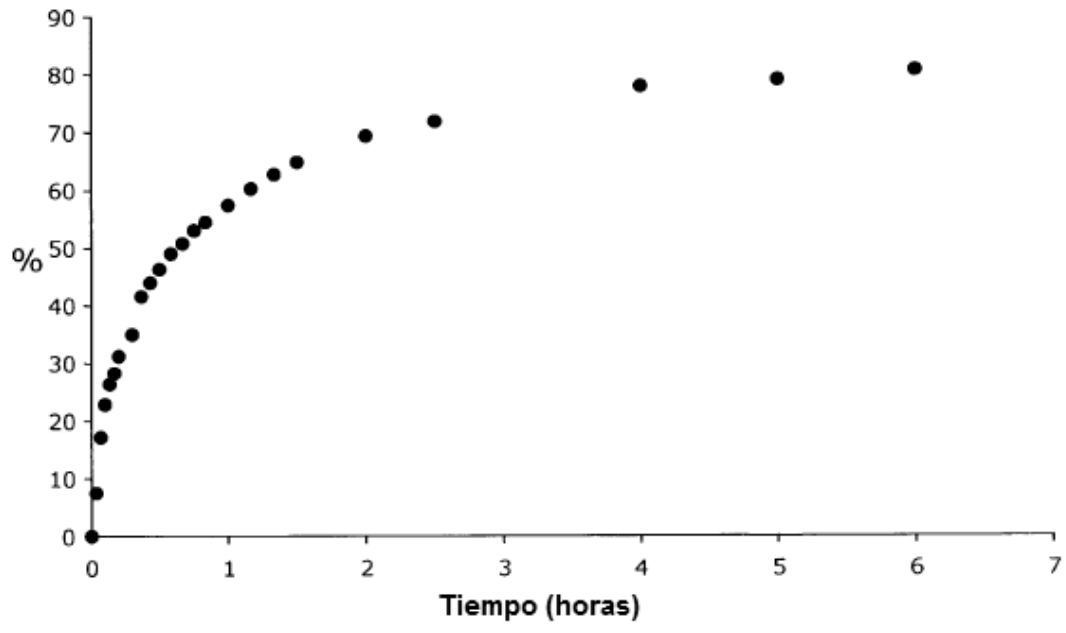


Fig. 7

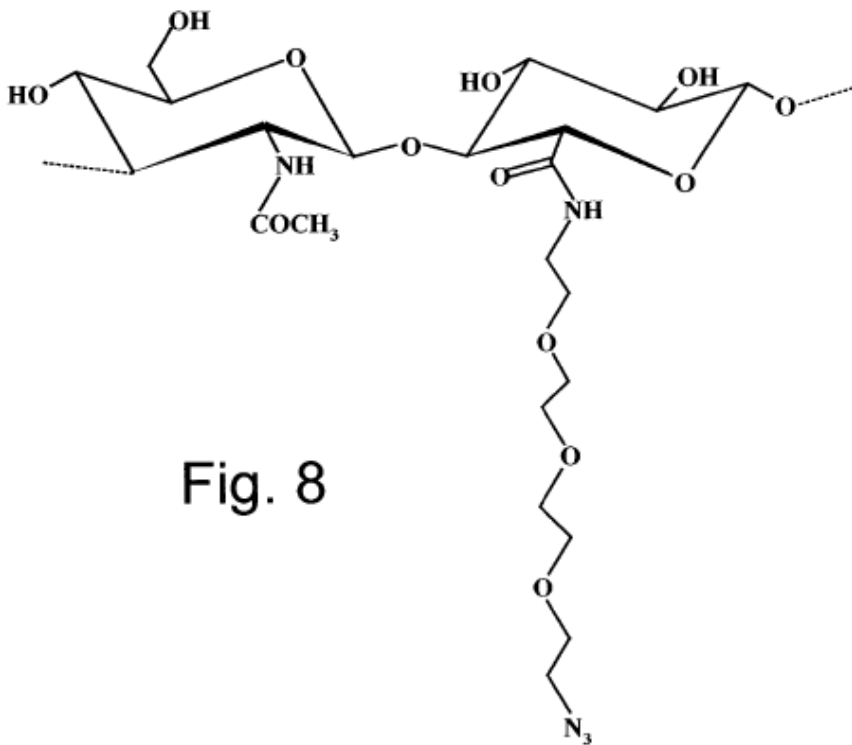


Fig. 8

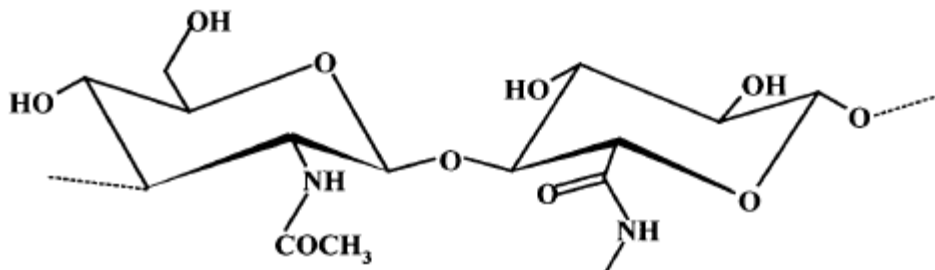


Fig. 9

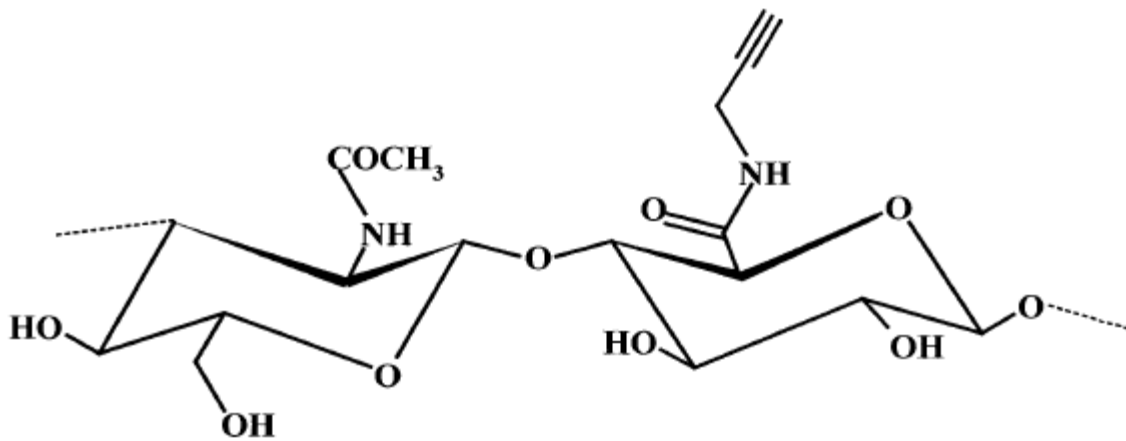
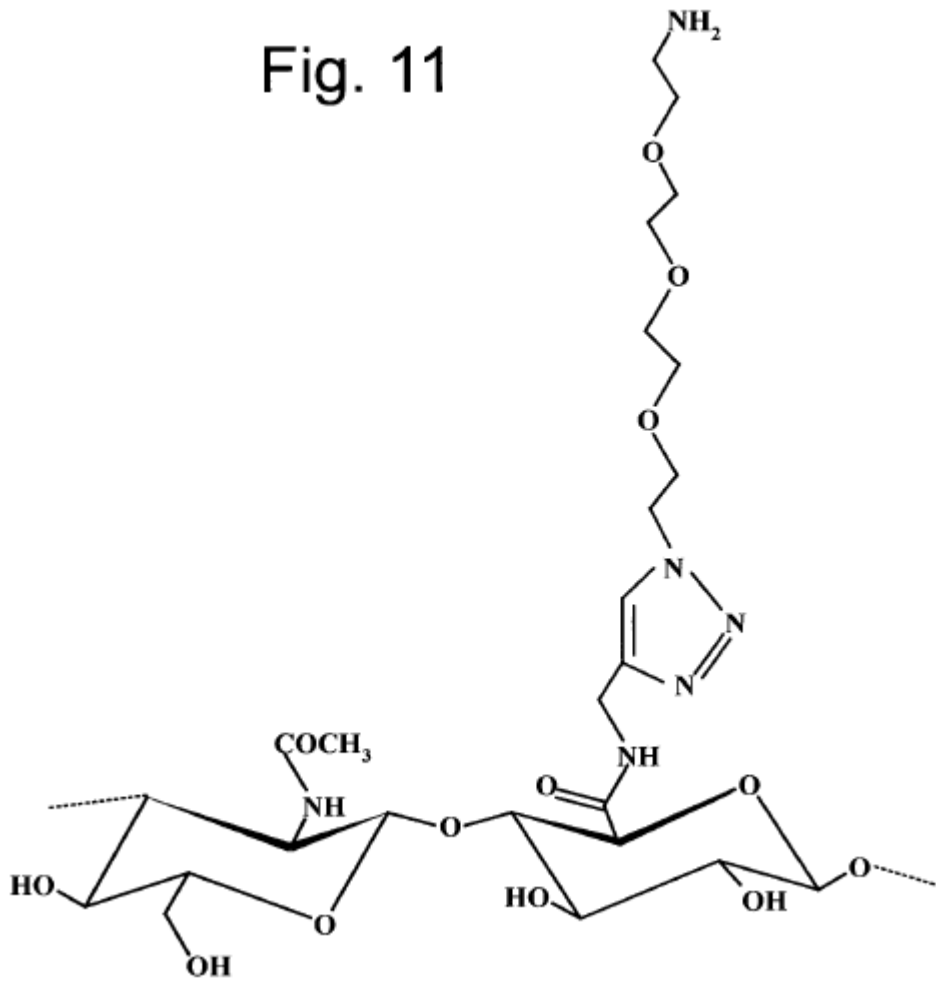


Fig. 10

Fig. 11



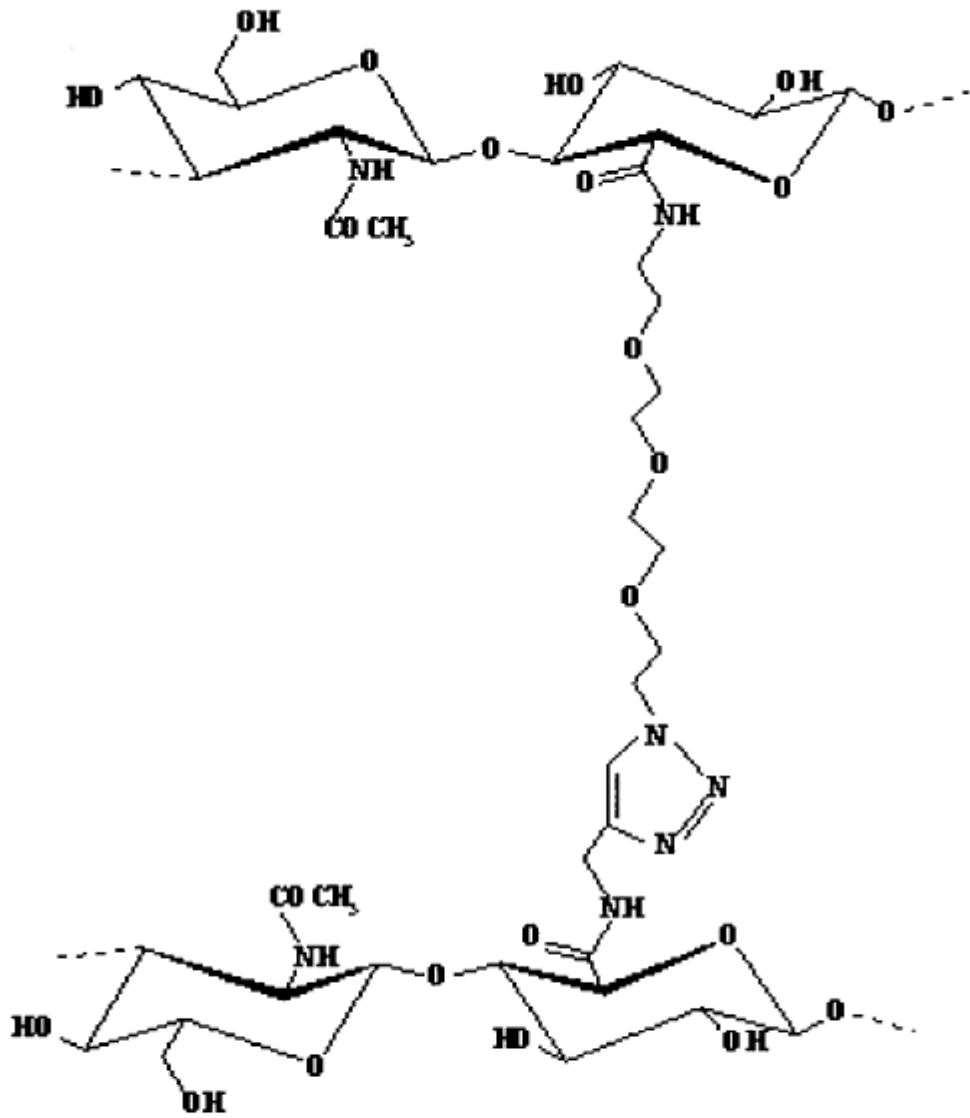
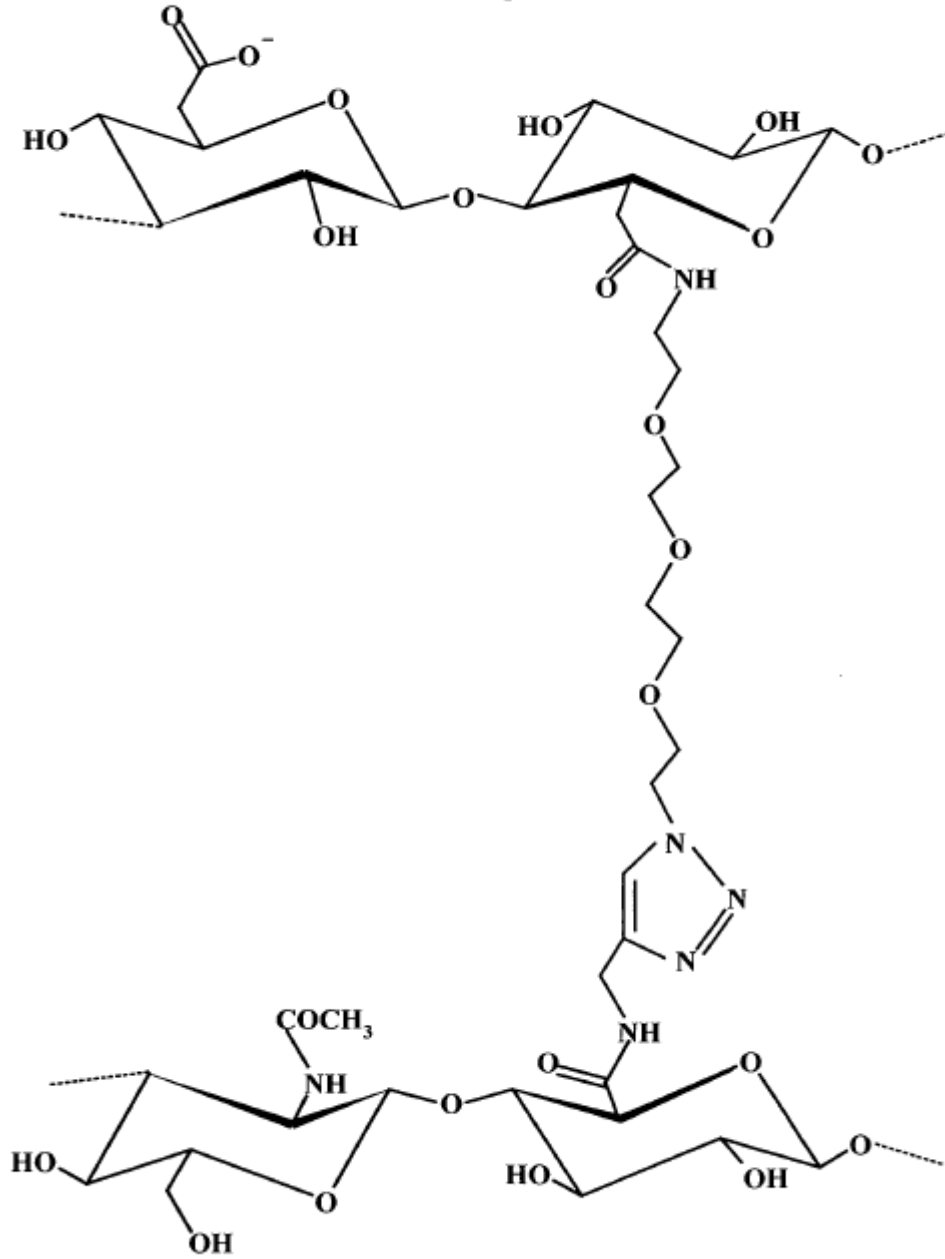


Fig. 12

Fig. 13



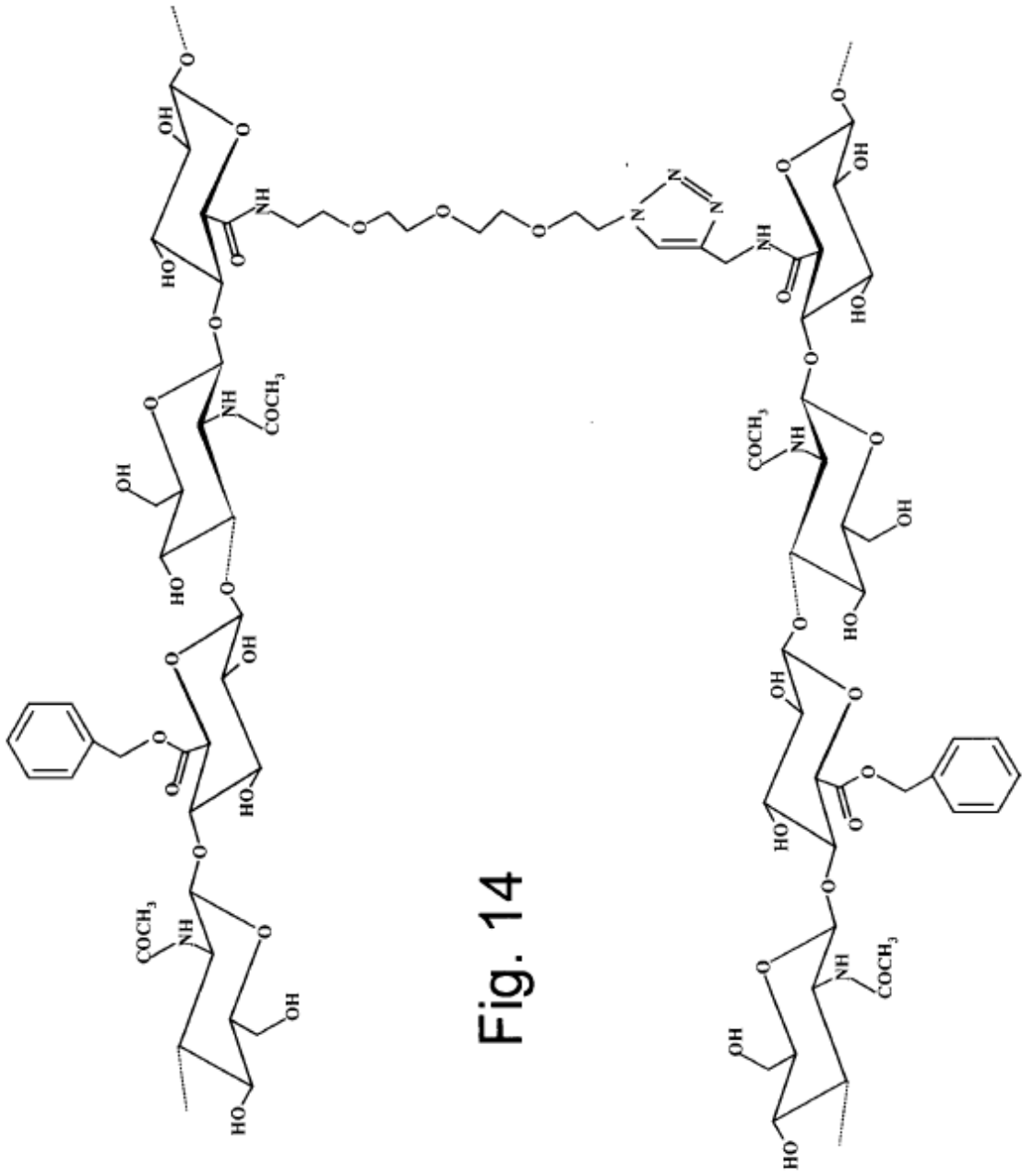


Fig. 14

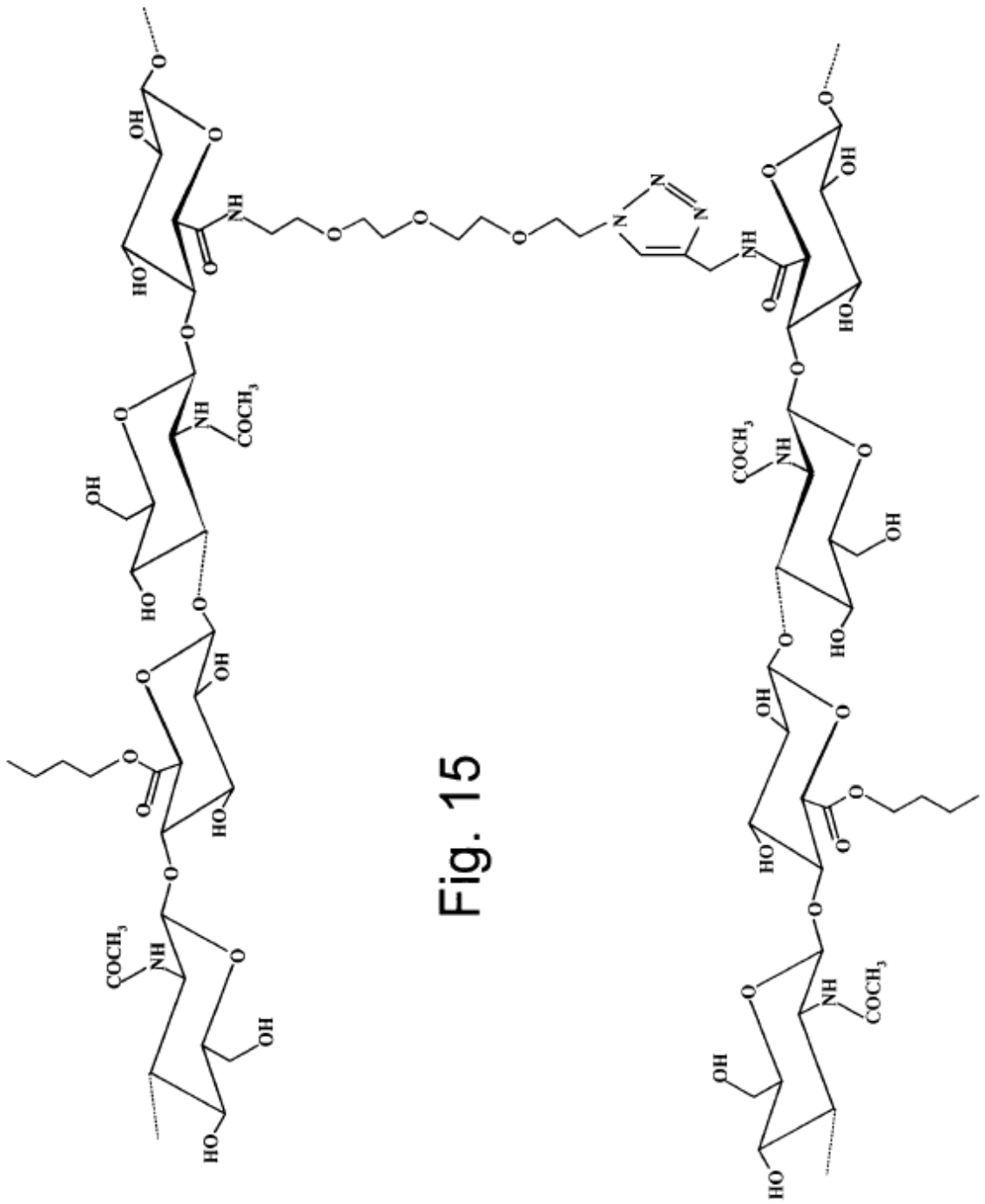


Fig. 15

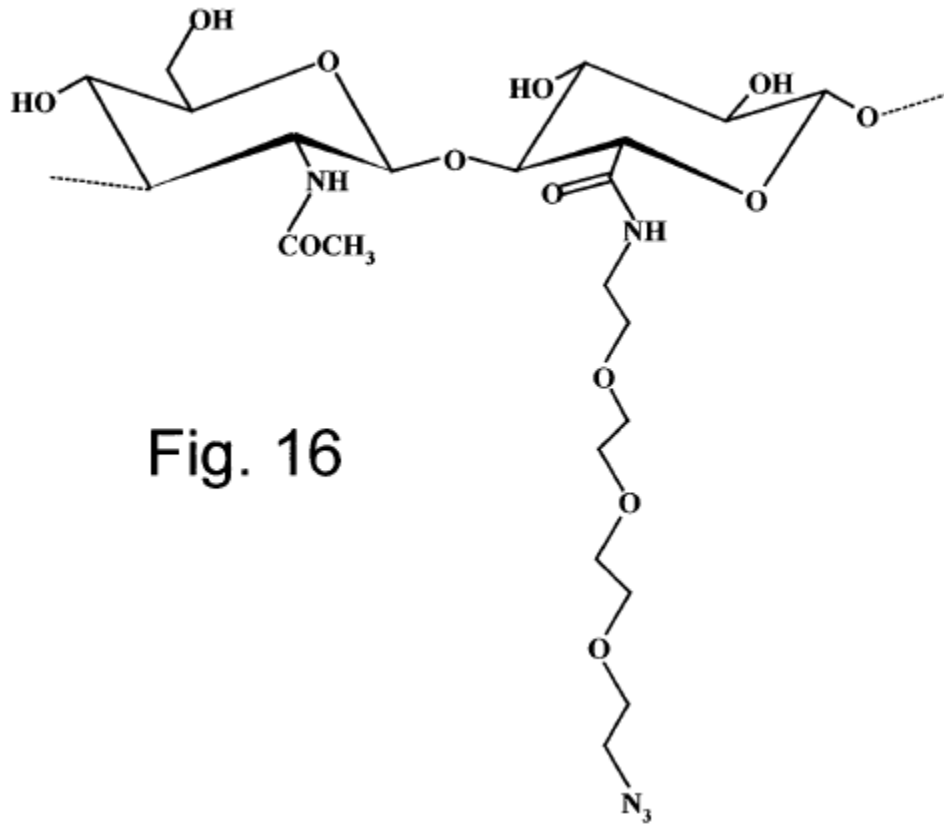


Fig. 16

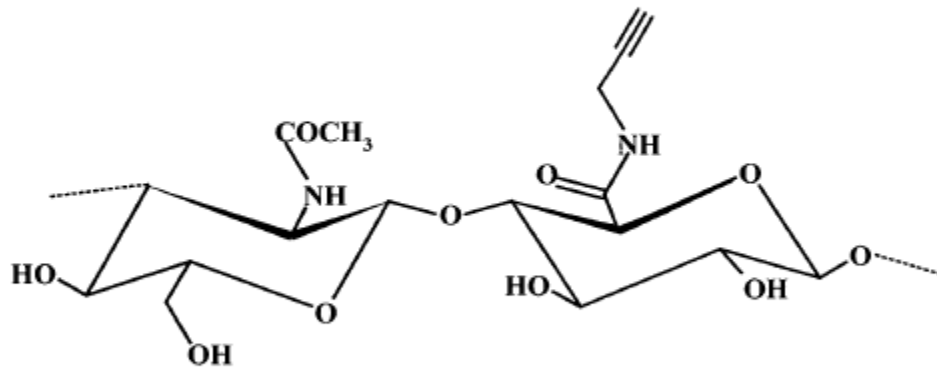
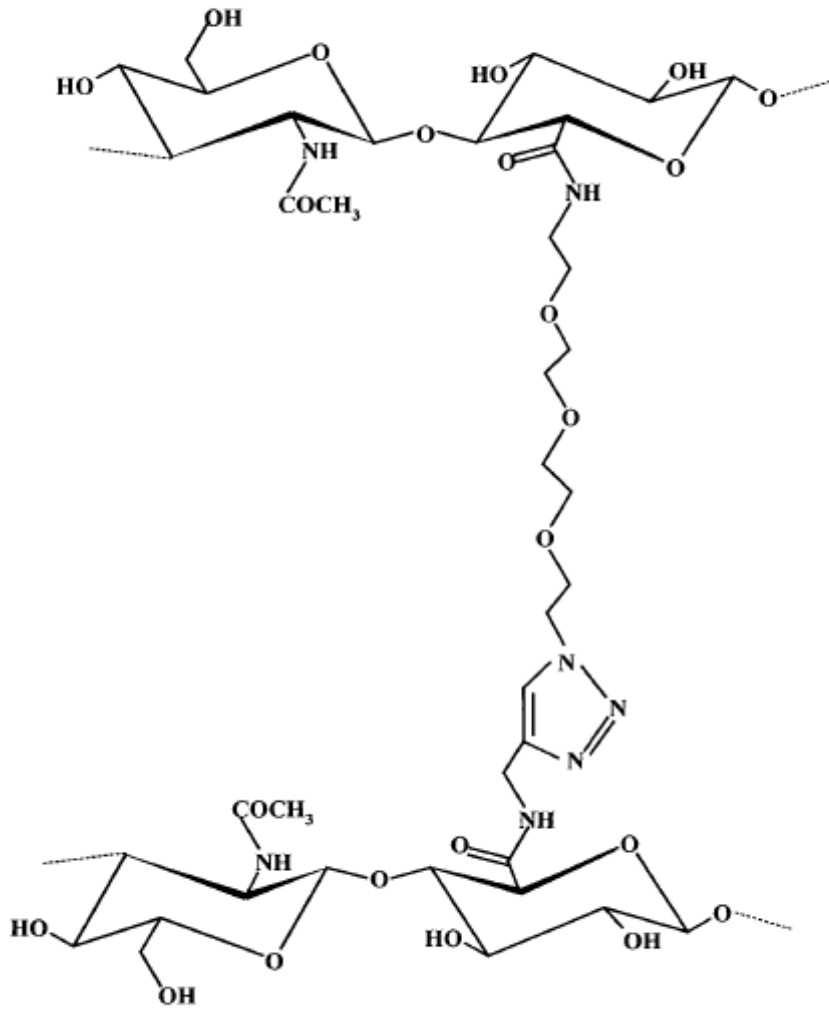


Fig. 17

Fig. 18



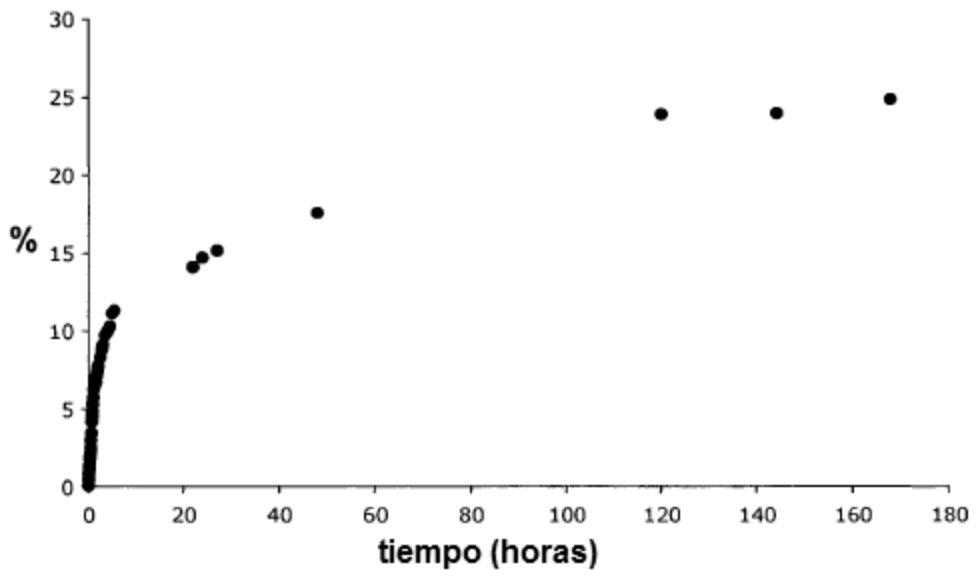


Fig. 19

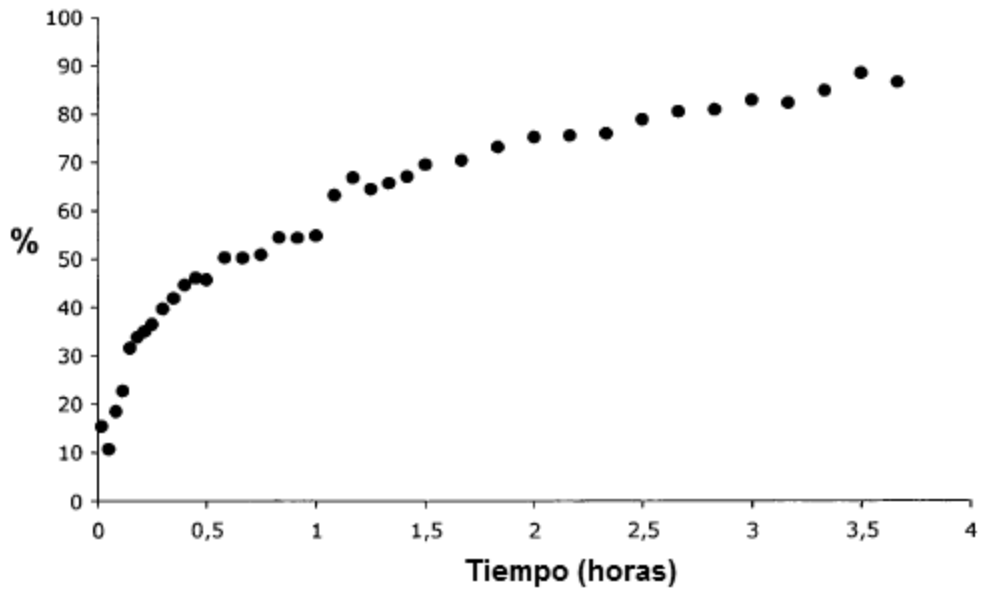


Fig. 20

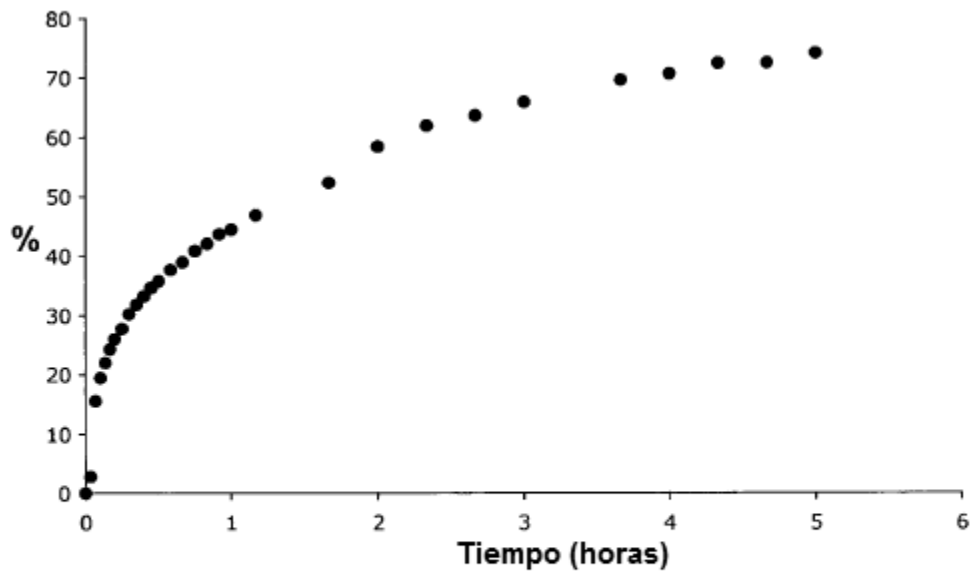


Fig. 21

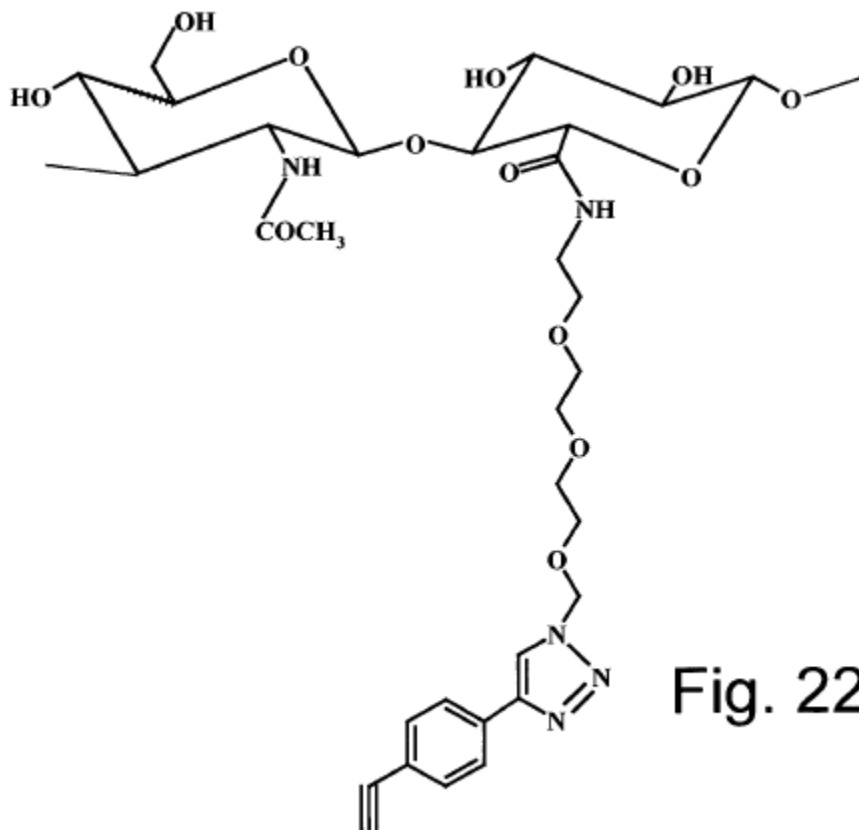


Fig. 22

Fig. 23

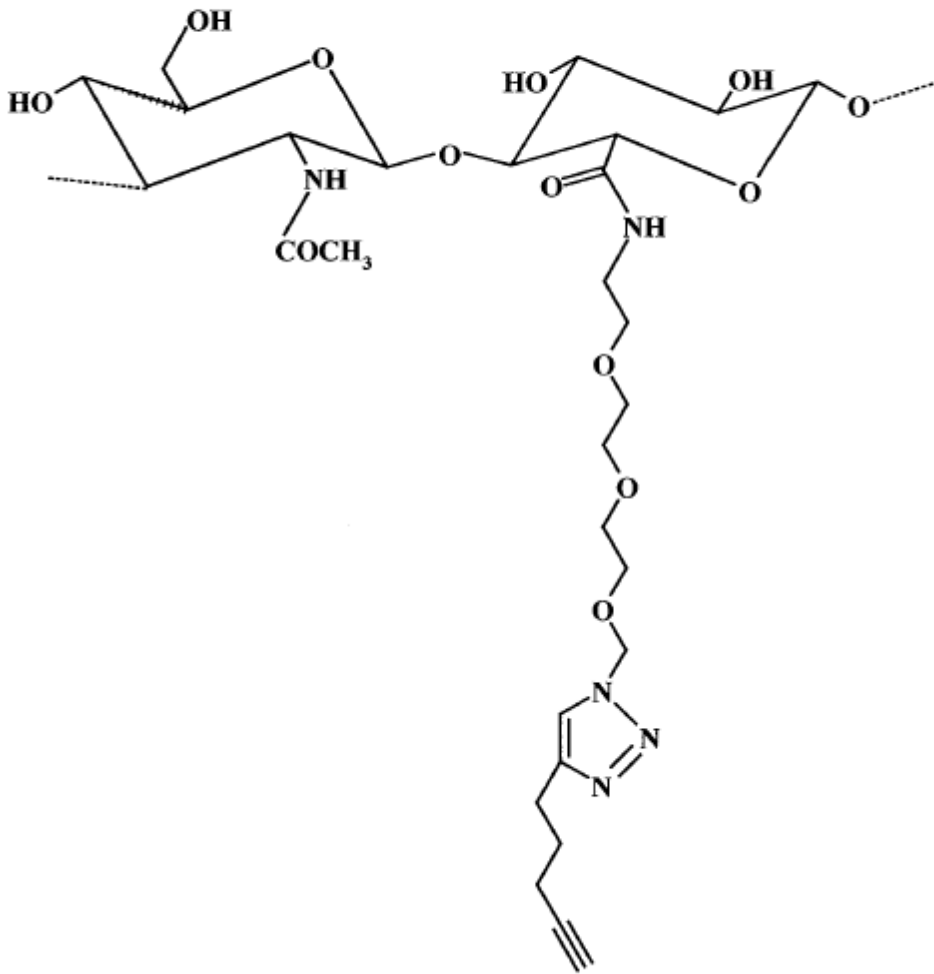


Fig. 24

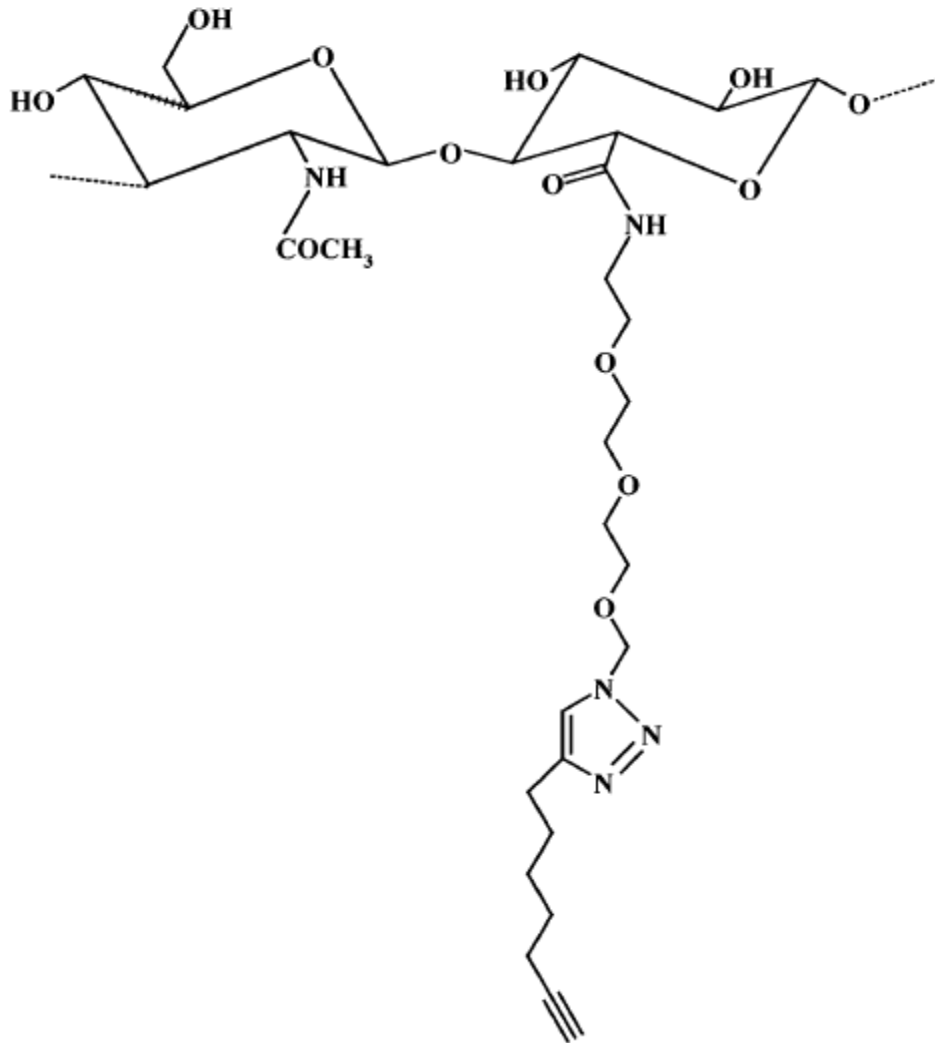


Fig. 26

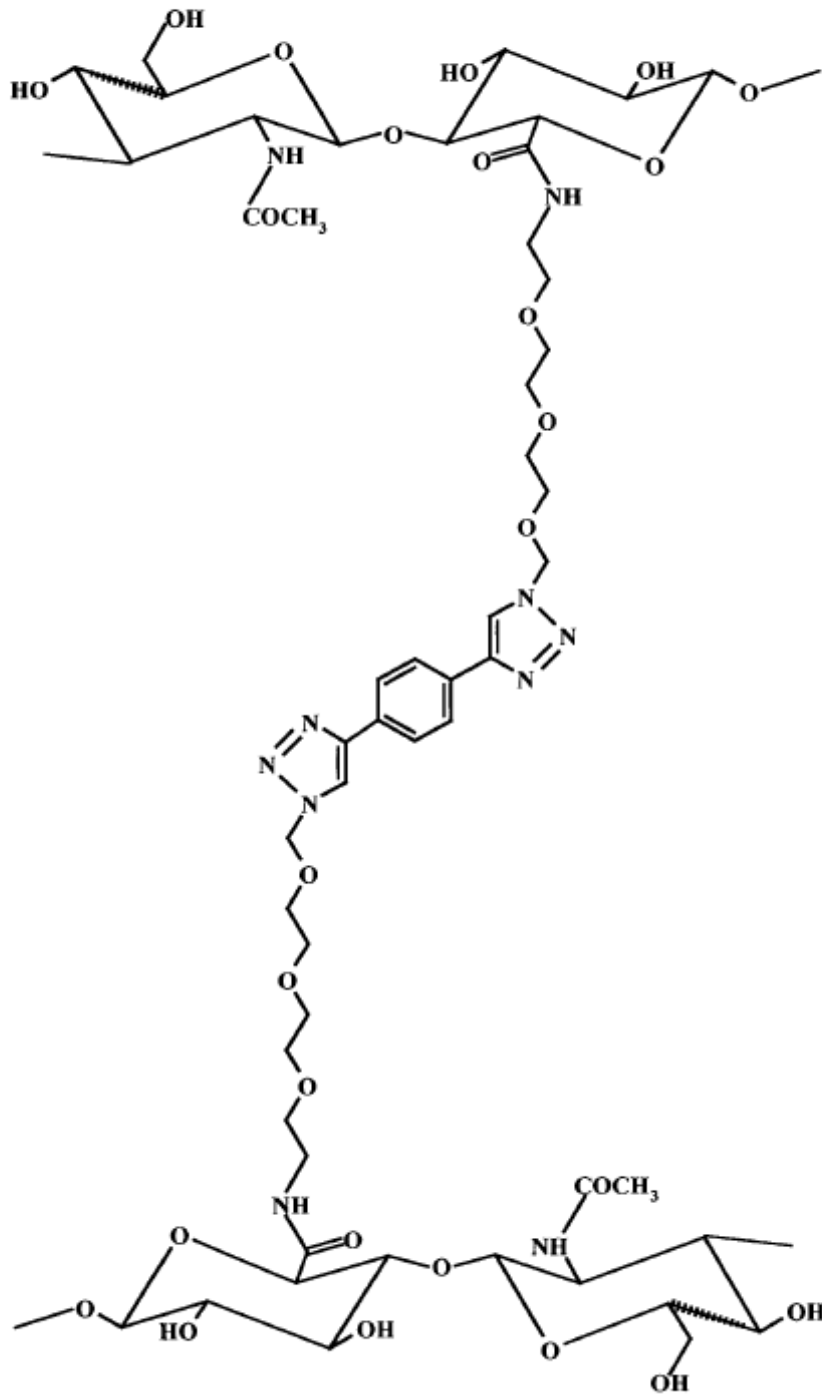
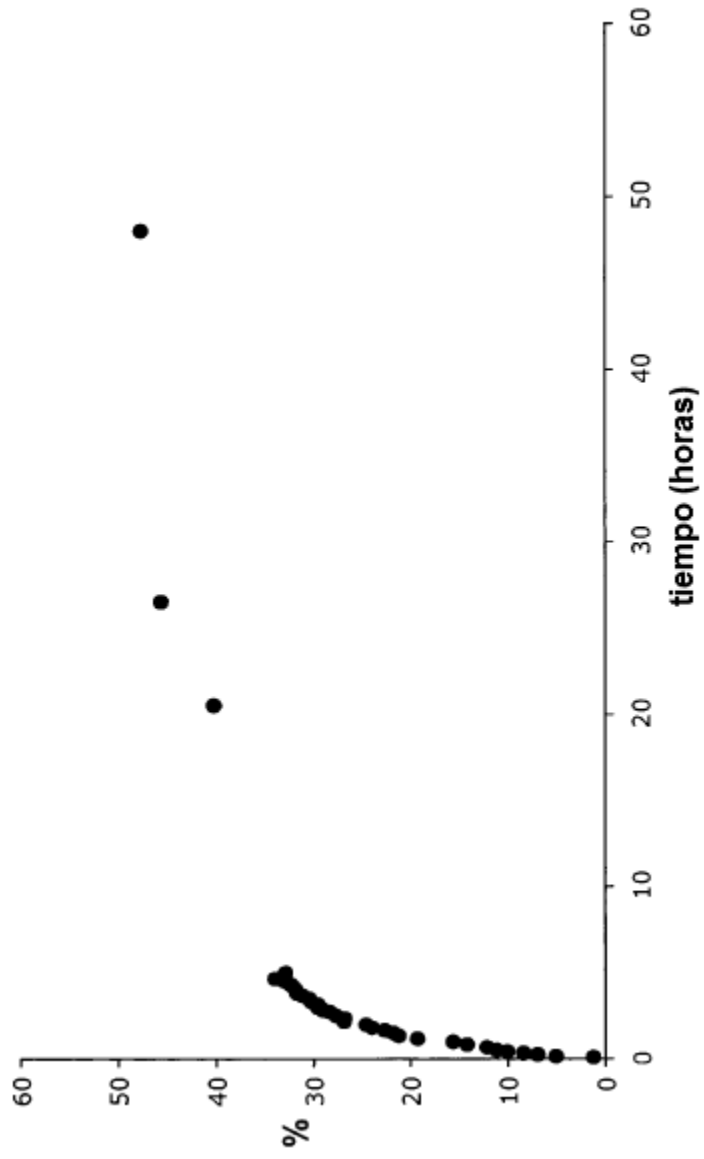


Fig. 27



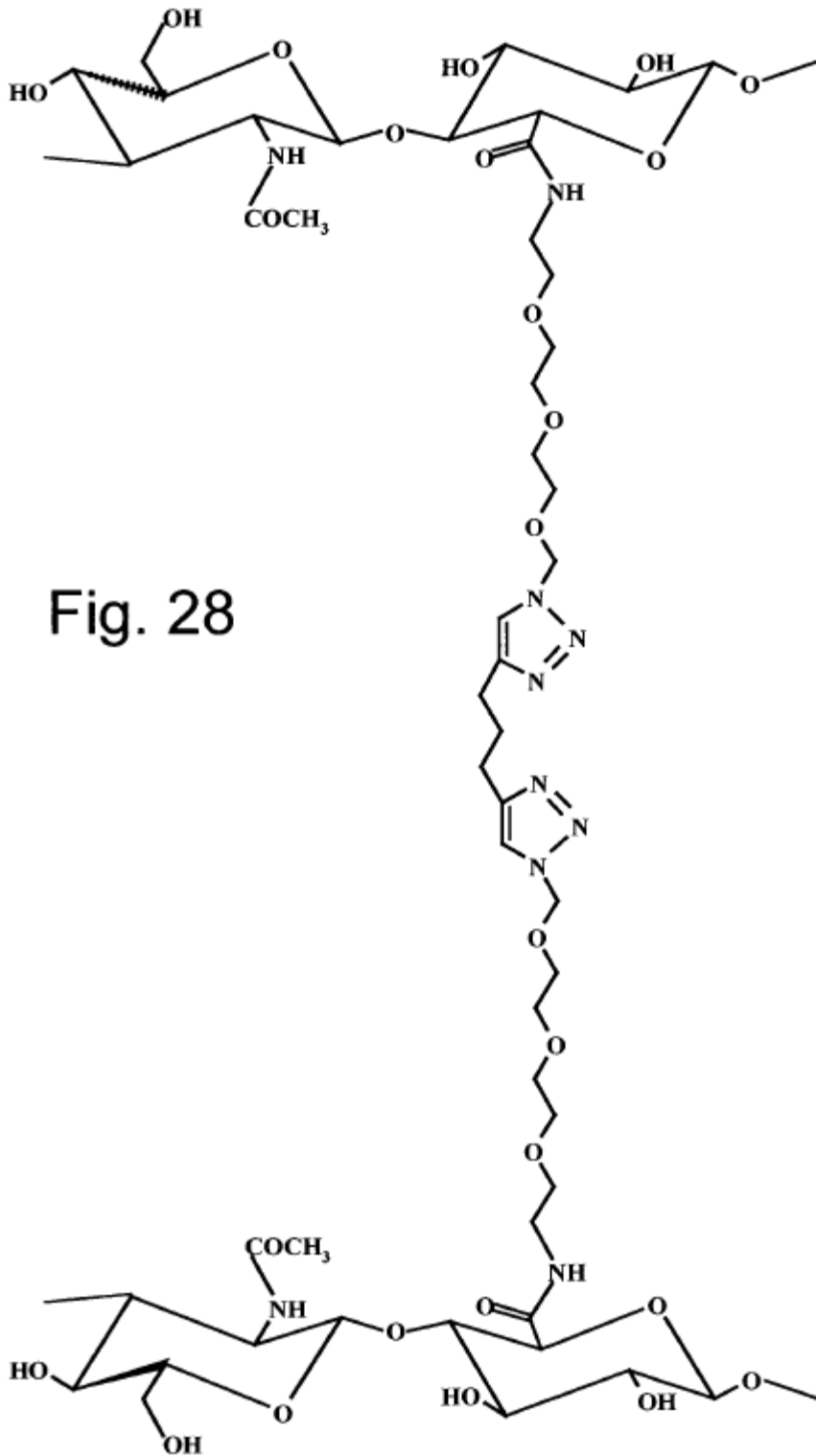


Fig. 28

Fig. 29

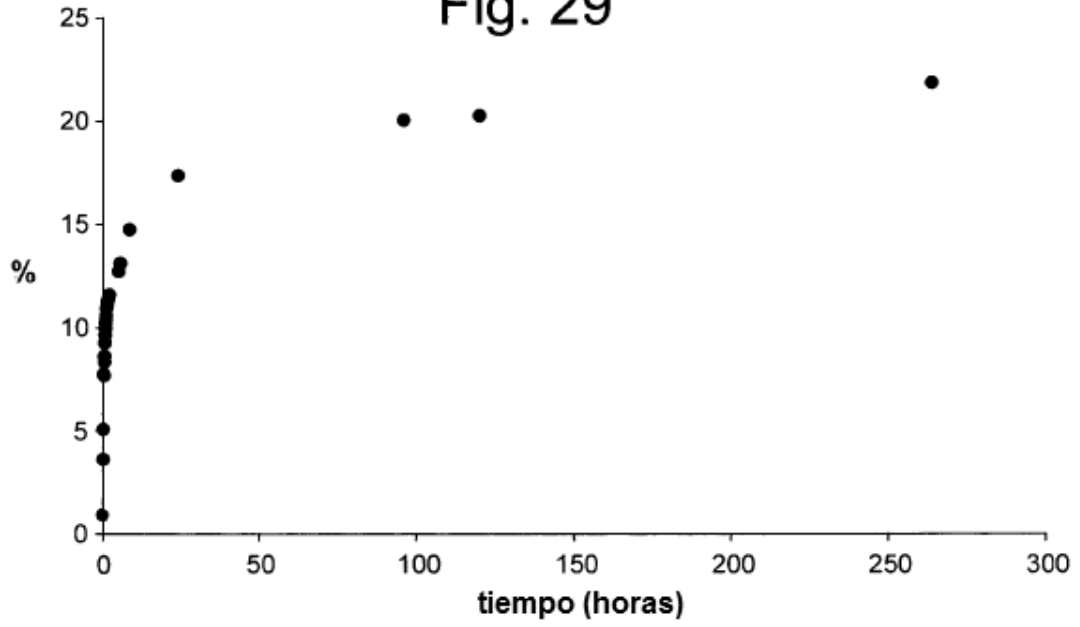
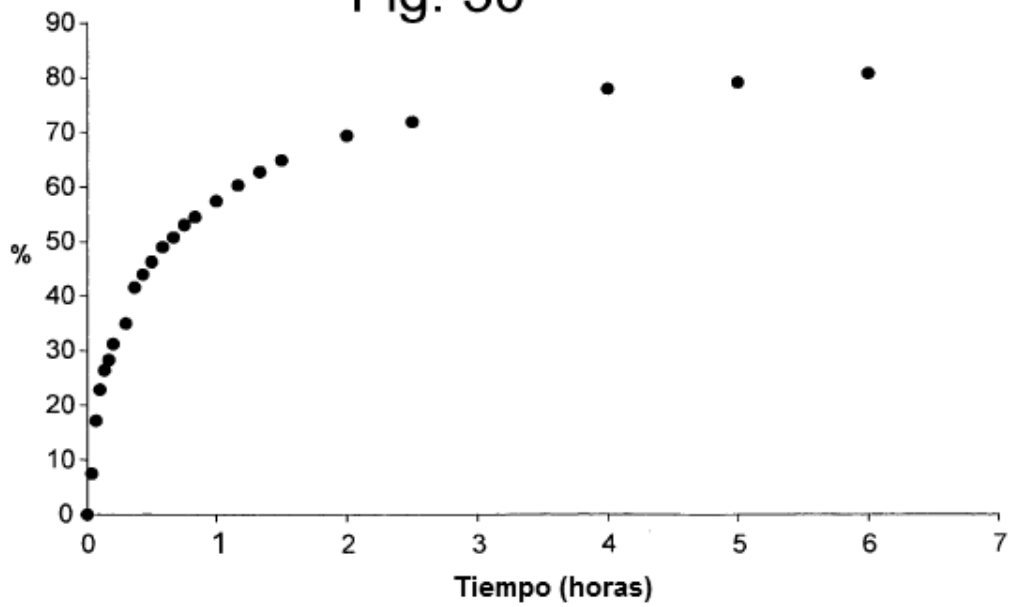


Fig. 30



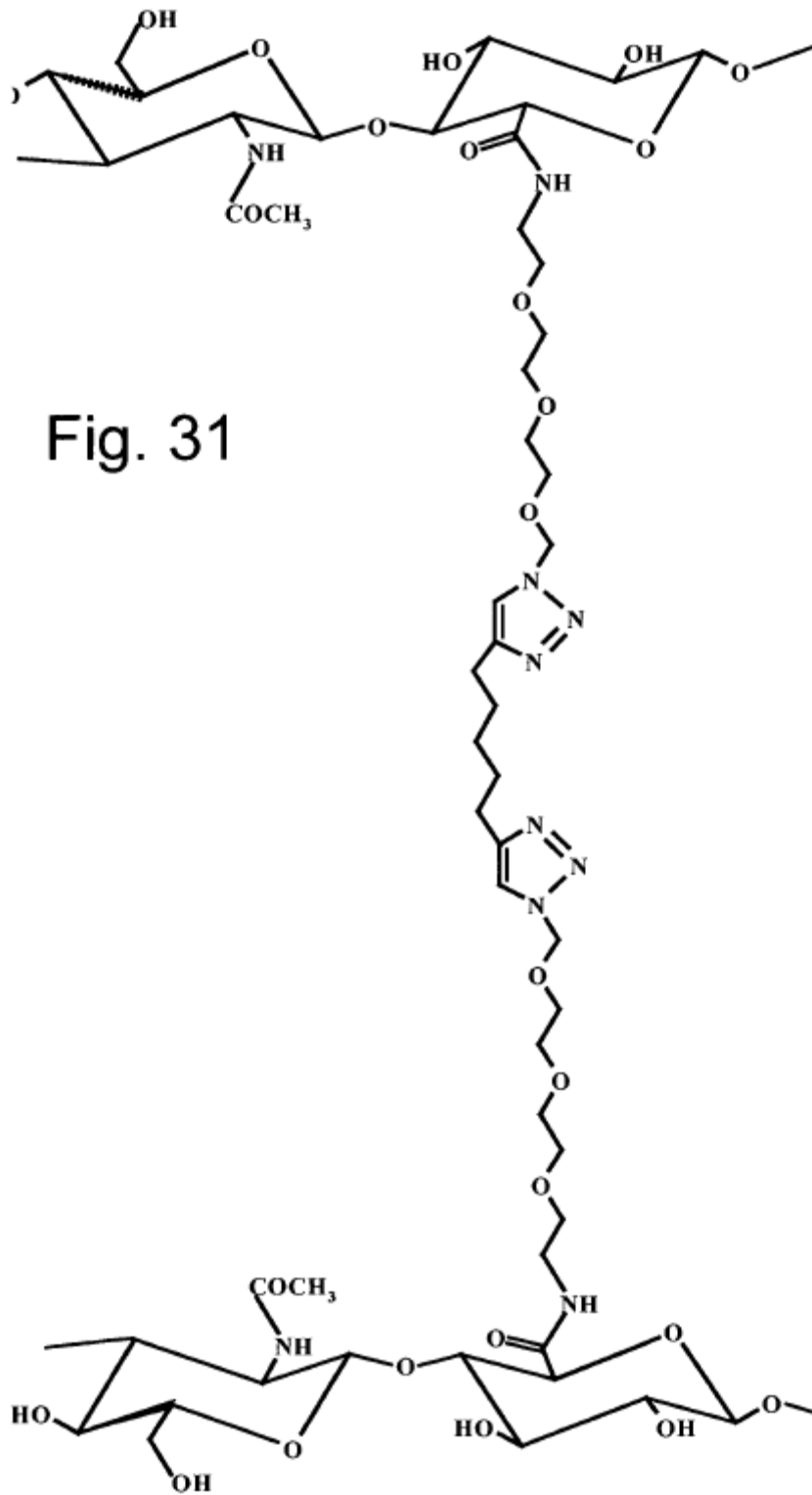


Fig. 31

Fig. 32

