



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 889**

51 Int. Cl.:  
**C08B 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02779062 .5**

96 Fecha de presentación : **15.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1448607**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Composición y método para reticular o modificar homogéneamente quitosano en condiciones neutras.**

30 Prioridad: **15.11.2001 US 331415 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.05.2011**

73 Titular/es:  
**PIRAMAL HEALTHCARE (Canada) LIMITED**  
**110 Industrial Parkway North**  
**Aurora, ON L4G 3H4, CA**

72 Inventor/es: **Chenite, Abdellatif;**  
**Berrada, Mohammed;**  
**Chaput, Cyril;**  
**Dabbarh, Fouad y**  
**Selmani, Amine**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 889 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

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un método para modificar químicamente quitosano, que incluye N-sustitución o N-reticulación, en condiciones homogéneas proporcionando disoluciones acuosas neutras de quitosano con reactividad mejorada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El quitosano es un aminopolisacárido obtenido por desacetilación alcalina de quitina, un polisacárido natural que se encuentra en los exoesqueletos de mariscos e insectos. La quitina no se puede disolver en agua excepto en disoluciones acuosas concentradas de ácido mineral, durante cuya disolución hay una disminución del grado de polimerización y probablemente la retirada de algunos grupos acetilo. Tales características han limitado indudablemente su investigación y utilización en muchos campos, a pesar de las ventajas reivindicadas para la quitina y su gran abundancia en la naturaleza. En contraste, las numerosas aplicaciones industriales reivindicadas para el quitosano, se atribuyen en particular a su buena solubilidad en medio ácido suave, vía la formación de grupos amonio.

15 Convencionalmente, el quitosano se disuelve en medio ácido acuoso y se puede mantener en disolución hasta un pH cercano a 6,2 (justo por debajo de su pKa de 6,3). En estas condiciones, la reactividad del quitosano está significativamente, disminuida debido a la predominancia de los grupos  $\text{NH}_3^+$  no reactivos comparada con los grupos  $\text{NH}_2$ , y se sabe que los últimos son nucleófilos y por lo tanto susceptibles de reaccionar con distintos electrófilos debido a su par de electrones sin compartir. Sin embargo, se han empleado varios enfoques químicos para modificar homogéneamente quitosano en condiciones ácidas ( $\text{pH} < 6$ ), específicamente haciendo reaccionar aldehídos, cloruros de ácido, anhídridos de ácido y epóxidos, y similares con grupos amino del quitosano.

20 Para conseguir la modificación del quitosano en condiciones homogéneas, la técnica anterior cita la adición de un codisolvente orgánico (metanol, piridina, etc.) a la disolución de quitosano ácida, para mejorar la reactividad del quitosano (Patente de EE.UU. 4.996.307 y patente de EE.UU. 4.424.346) o el uso de un gran exceso de reactivo (Hirano et al., Biopolymers, 15, 168.5, 1976, Kubota et al., Polymer Journal, 29, 123, 1997). Sin embargo, la presencia de un codisolvente orgánico o un exceso de reactivo no es deseable para aplicaciones médicas. Además, los problemas medioambientales están proporcionando un fuerte incentivo para eliminar el disolvente orgánico y reducir el uso de reactivos. Además, a bajo pH (por debajo de 6,2) el número de grupos amino libres es insuficiente para permitir que el quitosano sufra una reacción con algunos reactivos electrófilos, particularmente los que llevan benzoimidato o grupos epoxi.

25 30 Todos los estudios relacionados con la N-sustitución de quitosano confirman la importancia de la disponibilidad y activación de grupos amino no ionizados libres de quitosano. Una patente reciente (patente de EE.UU. No. 5.977.330) reivindica la N-sustitución de quitosano con buen rendimiento vía una alta activación de grupos amino libres de quitosano controlando dos factores que mejoran la reactividad del quitosano, a saber, el pH neutro y el uso de un disolvente orgánico. Sin embargo, además de un disolvente orgánico, la reacción se realizó heterogéneamente sobre quitosano no precipitado debido a la imposibilidad de mantener quitosano en disolución en condiciones de pH neutro, cuando se usan disoluciones alcalinas convencionales tales como NaOH o  $\text{NH}_4\text{OH}$  como agentes neutralizantes.

La patente de EE.UU. 5.489.401 (otorgada el 6 de febrero de 1996) describe la encapsulación de materiales activos en bolas de quitosano.

35 40 La publicación de Aiba (Makromolekulare Chemie, vol. 194, 1993, pp. 65-75) describe la reactividad del grupo amino de quitosano parcialmente N-acetilado que tiene un grado de acetilación de 56% y 51%.

La publicación de Chenite et al. (Carbohydrate Research, vol 46, 2001, pp, 39-47) describe la caracterización reológica de disoluciones termogelificantes de quitosano/fosfato de glicerol.

45 La patente de EE.UU. 4.996.307 (otorgada el 26 de febrero de 1991) describe la preparación de un quitosano acilado soluble en agua que tiene un grado de acilación de 35 a 65% en presencia de un gran exceso de disolvente orgánico tal como metanol, etanol o isopropanol.

El documento WO 02/40070 (publicado el 23 de mayo de 2002) describe un método para restaurar un disco intervertebral degenerado o dañado en una fase temprana.

50 Sería muy deseable que se proporcionase un método alternativo para modificar o reticular homogéneamente quitosano, proporcionando una disolución acuosa de quitosano, que se pueda mantener bastante en disolución en la cercanía de pH neutro, dado que en tales condiciones el número y la reactividad de los grupos amino libres se mejoran considerablemente.

También sería muy deseable que se proporcionase un método alternativo que permitiera la eliminación de disolvente orgánico y previniera el uso de un exceso de reactivo, y sin embargo aún diera posibles reacciones entre quitosano y grupos funcionales electrófilos, que usualmente requiere pH neutro para que ocurra.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo método para la modificación química, que incluyen la N-substitución o la N-reticulación de quitosano, en condiciones homogéneas proporcionando disoluciones acuosas neutras de quitosano con aminoreactividad mejorada.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo método para la modificación química o la N-reticulación de quitosano, en condiciones homogéneas que evitarían el uso de disolvente orgánico o un gran exceso de reactivo.

10 Recientemente, los inventores encontraron varios tampones, que permiten la neutralización de disolución de quitosano hasta pH neutro o casi neutro sin inducir la precipitación inmediata de un tipo de gel. Con estos tampones, las reacciones homogéneas que implican grupos amino de quitosano se pueden realizar en estas condiciones, sin la necesidad de un codisolvente orgánico (metanol, piridina, etc.) o exceso de reactivo.

Someter el quitosano neutralizado a cualquier reacción con electrófilos en disolución homogénea, conduce a mejoras en rendimiento y calidad del producto final, que es el quitosano modificado.

15 El método y composición de la presente invención de este modo permite la eliminación de disolvente orgánico y catalizador orgánico, y permite la reducción de reactivo, usualmente implicados en la modificación química de quitosano, mejorando el rendimiento y calidad del producto final, esto es el quitosano modificado.

Según la presente invención, se proporciona de este modo una composición que comprende:

a) De 0,1 a 10% en peso de quitosano en una disolución acuosa transparente y ácida de quitosano, en la que dicho quitosano tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%;

b) De 0,1 a 20% en peso de por lo menos un agente tampón que tiene un pKa entre 6,0 y 7,6, y

20 c) De 0,01 a 10% en peso de por lo menos un reactivo que reacciona con los grupos amino del quitosano, en el que dicha composición de quitosano N'-modificado tiene un pH resultante que varía de 6,8 a 7,2, y dicho quitosano sufre una N-modificación, N-injerto o N-reticulación homogénea en dicha composición de quitosano; siendo seleccionado dicho reactivo del grupo que consiste en glutaraldehído, formaldehído, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, un reactivo basado en aldehído propiónico bifuncional, un reactivo que  
25 tiene un grupo éster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo éster de sulfo-succinidimilo y N-sulfo-succinidimilo, reactivo que tiene un grupo reactivo imidoéster seleccionado del grupo que consiste en grupo di-metilpimelidato, di-metiladipimidato, di-metilsuberimidato, y di-metilpropionimidato, y un reactivo que tiene grupo fenilazida, hidrazida, hidroxifenilazida o nitrofenilazida.

en la que dicha composición no comprende un disolvente orgánico.

30 Aún según el método de la presente invención, se proporciona un método para modificar químicamente o reticular quitosano en condiciones homogéneas, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 a) Preparar una disolución acuosa transparente de quitosano, comprendiendo dicha disolución (i) de 0,1 a 10% en peso de un quitosano que tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%, y (ii) de 0,1 a 20% en peso de por lo menos un agente tampón que tiene un pKa entre 6,0 y 7,6, teniendo dicha disolución un pH que varía de 6,8 a 7,2; y

40 b) Disolver homogéneamente por lo menos un reactivo en la disolución de la etapa a) reaccionando dicho reactivo con grupos amino de quitosano; y estando dicho reactivo en una concentración de 0,01 a 10% en peso y en el que dicho reactivo se selecciona del grupo que consiste en glutaraldehído, formaldehído, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, un reactivo basado en anhídrido propiónico bifuncional, un reactivo que tiene un grupo éster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo éster de sulfo-succinidimilo y N-sulfo-succinidimilo, reactivo que tiene un grupo reactivo imidoéster seleccionado del grupo que consiste en grupo di-metilpimelidato, di-metiladipimidato, di-metilsuberimidato, y di-metilpropionimidato, y un reactivo que tiene grupo fenilazida, hidrazida, hidroxifenilazida o nitrofenilazida

45 en el que dicho quitosano en la disolución acuosa está químicamente modificado o reticulado por una substitución selectiva en el grupo amino del quitosano; y en el que no están implicados disolventes orgánicos en la preparación de dicho quitosano químicamente modificado o reticulado.

50 El método puede comprender adicionalmente si se desea una etapa de purificación. Tal etapa de purificación puede consistir en a) dializar el quitosano químicamente modificado o reticulado; b) precipitar el quitosano obtenido en la etapa a), con una disolución básica; c) lavar el quitosano precipitado de la etapa b); y d) secar al aire el quitosano lavado de la etapa c).

También se describe un método de preparación de una composición de gel acuoso basado en quitosano que comprende las etapas de:

- a) preparar un componente de disolución basada en agua que comprende de 0,1 a 10% en peso de quitosano, que tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%, y de 0,1 a 20% en peso de una sal de glicerofosfato; teniendo dicha disolución un pH en el intervalo entre 6,4 y 7,2;
- 5 b) preparar un componente sólido que comprende por lo menos un reactivo de metoxi-poli(etilenglicol) monofuncionalizado soluble en agua, que tiene un peso molecular entre 2.000 y 10.000; y
- c) mezclar homogéneamente dicho componente de disolución y dicho componente sólido para formar una disolución uniforme y homogénea, que tiene de 0,01 a 10% en peso del reactivo de metoxi-poli(etilenglicol) monofuncionalizado, en el que ocurre una N-modificación o N-injerto homogéneo de cadenas de quitosano y la formación de un gel acuoso uniforme homogéneo.
- 10 Para el propósito de la presente invención se definen a continuación los siguientes términos.
- La expresión "modificación homogénea de quitosano" se refiere aquí a una sustitución química en los grupos amino libres de quitosano, mientras el quitosano está en disolución acuosa. Siendo los grupos amino grupos  $\text{NH}_2$  reactivos y siendo denominada también la sustitución química N-sustitución.
- 15 La expresión "acilación homogénea de quitosano" se refiere aquí a una reacción de N-acilación del quitosano conseguida vía la adición de anhídrido de ácido a una disolución acuosa casi neutra de quitosano. En una realización, la reacción de N-acilación se deja seguir con agitación continua a temperatura ambiente. El tiempo de reacción es generalmente de alrededor de 4 a alrededor de 24 horas. Al final de la reacción, el producto N-acilado se dializa con agua pura, se precipita con disolución básica, y se lava y seca al aire.
- 20 La expresión "N-reticulación química homogénea de quitosano" se refiere aquí a la reacción química que se consigue con la adición de reactivos bi(di)-funcionales a la disolución acuosa neutra de quitosano, de este modo dando como resultado una red de quitosano tridimensional hidratado. Los reactivos di-funcionales seleccionados aquí para ejemplificar el presente método son glioxal y polietilenglicol-diglicidil-éter. La disolución de quitosano reticulado generalmente da como resultado un gel. El gel se puede dializar en agua pura y aislar en forma esponjosa después de liofilizar. El gel se puede formar también alrededor de células vivas o materiales biológicamente activos.
- 25 El término "mono-funcionalizado" se usa aquí para calificar a un reactivo tal como una molécula, un oligómero o un polímero que tiene un grupo químico, reactivo con las aminas libres.
- La expresión "di- o bi-funcionalizado" se usa aquí para calificar a un reactivo tal como una molécula, un oligómero o un polímero que tiene dos grupos químicos, reactivo cada uno con aminas libres de quitosano.
- 30 El término "gel" se usa aquí en general y se refiere a geles acuosos biopoliméricos de cualquier tipo, incluyendo particularmente geles sueltos, hidrogeles, etc.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Fig. 1A ilustra un espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de quitosano con 86% de unidades de glucosamina;
- La Fig. 1B ilustra un espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de quitosano reaccionado con anhídrido acético (AA) con una relación  $\text{AA}/\text{NH}_2$  de 0,296 y un grado de sustitución de 26%;
- 35 La Fig. 1C ilustra un espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de quitosano reaccionado con anhídrido butírico (BA) con una relación  $\text{BA}/\text{NH}_2$  de 0,293 y un grado de sustitución de 27%; y
- La Fig. 2A y 2B ilustran el contenido de glucosamina después de la reacción del quitosano con varias cantidades de anhídrido acético (AA) (Fig. 2A) y con varias cantidades de anhídrido butírico (BA) (Fig. 2B).
- 40 La Fig. 3 ilustra la evolución de G' y G'' con el tiempo a temperatura ambiente para la formulación típica que comprende [0,20 g de quitosano (90%) disuelto en 9 ml de disolución de HCl (0,1 M), 0,6 g de  $\beta$ -GP disuelto en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y 0,05 g de mPEG-suc-NHS disuelto en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ];
- La Fig. 4A ilustra un gel de quitosano obtenido por reacción de mPEG-suc-NHS en un sistema acuoso quitosano-glicerofosfato; el gel tiene una buena resistencia y se puede manipular sin daños importantes; y
- 45 La Fig. 4B ilustra un gel compuesto preparado del sistema descrito en A) y con fosfatos de calcio sólidos; la carga de fosfato de calcio era 0,45 g/ml; el gel compuesto resultante retiene una considerable resistencia y elasticidad.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

- Según la presente invención, se proporciona una disolución homogénea de quitosano preparada disolviendo una cantidad conocida de quitosano en una disolución acuosa ácida. El pH de la disolución resultante se controla para mantenerlo cerca de 5,0. En el presente método, el quitosano de partida preferentemente tiene un grado de desacetilación del 70% o más alto. La disolución acuosa ácida de quitosano se neutraliza con un tampón apropiado, que
- 50

debe aumentar el pH de la disolución para que esté en la proximidad de 7, sin inducir la precipitación de un tipo de gel. El tampón apropiado debe ser químicamente inerte. Es deseable seleccionar un agente tampón relativamente débil con un intervalo tampón útil que abarque el pH de precipitación de la disolución de quitosano (pH 6,2). Preferentemente, el agente tiene un pKa entre 6,0 y 7,6.

5 Según la presente invención, un reactivo o un agente de reticulación se añade a continuación a la disolución de quitosano neutralizado para permitir la reacción con los grupos amino reactivos del quitosano con alto rendimiento.

10 Según la realización preferida de la invención, se proporciona una composición de quitosano que comprende de 0,1 a 10% en peso de quitosano en una disolución acuosa transparente, de 0,1 a 20% en peso de por lo menos un agente tampón, siendo suficiente dicho agente tampón para elevar el pH en el intervalo entre 6,4 y 7,2, y de 0,01 a 10% en peso de por lo menos un reactivo que reacciona con los grupos amino del quitosano, y en la que el quitosano sufre una N-modificación, N-injerto o N-reticulación homogénea. En tal realización, el quitosano de partida tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%, y el agente tampón tiene un pKa entre 6,0 y 7,6.

15 En una realización preferida, el agente tampón de dicha composición de quitosano es un tampón biológico. Se puede seleccionar preferentemente en un grupo que comprende sales de fosfato, sales de glicerofosfato, N,N-bis[2-hidroxi-etil]-2-aminoetanosulfonato (BES), 3-[N,N-bis(2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxi-propanosulfonato (DIPSO), N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-4-butanosulfonato (HEPBS), N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-3-propanosulfonato (HEPES), 2-[N-morfolino]etanosulfonato (MES), 4-[N-morfolino]butanosulfonato (MOBS), 2-[N-morfolino]butanosulfonato (MOPS), 3-[N-morfolino]propanosulfonato (MOPS), 3-[N-morfolino]-2-hidroxi-propanosulfonato (MOPSO), bis[2-hidroxi-etil]iminotris-[hidroximetil]metano (BIS-TRIS), BIS-TRIS-propano, o cualquiera de sus derivados o de sus mezclas. Las sales de glicerofosfato preferidas son generalmente sales de glicerofosfato de disodio.

20 En la presente invención, se pretende que cualquier compuesto de fosfato, carbonato, sulfato, sulfonato soluble en agua que tiene un pKa apropiado, incluyendo sales y similares se pueda usar como tampón biológico de la disolución de quitosano.

25 El reactivo tiene por lo menos un grupo reactivo, que quiere decir un grupo químico para reaccionar con los grupos amino del quitosano. Se selecciona en un grupo que consiste en glutaraldehído, formaldehído, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, un reactivo basado en anhídrido propiónico bifuncional, un reactivo que tiene un grupo éster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo éster sulfo-succinimidilo y N-sulfo-succinimidilo, reactivo que tiene un grupo reactivo imidoéster seleccionado del grupo que consiste en grupo di-metilpimelidato, di-metiladipimidato, di-metilsuberimidato y di-metilpropionimidato, y un reactivo que tiene un grupo fenilazida, hidrazida, hidroxifenilazida o nitrofenilazida.

30 En una realización de la presente invención, la modificación de quitosano es una sustitución selectiva en el grupo amino, y preferentemente una N-sustitución homogénea en cadenas de quitosano.

En otra realización, el reactivo es un anhídrido de ácido tal como anhídrido acético, anhídrido propiónico o anhídrido butírico, o similares.

35 En una realización de la presente invención, la modificación de quitosano es una sustitución selectiva en el grupo amino, y preferentemente una N-acilación homogénea de cadenas de quitosano.

En una realización de la presente invención, la modificación del quitosano es una sustitución selectiva en el grupo amino, y preferentemente una reticulación homogénea de cadenas de quitosano vía los grupos amino.

40 Tal modificación de las cadenas de quitosano puede dar como resultado la formación en masa de un gel de quitosano uniforme y homogéneo con un pH fisiológico. Esta formación de gel resultante se puede observar ex vivo tal como in vitro así como in situ o in vivo dentro del cuerpo de mamíferos o seres humanos. Esta formación de gel resultante se puede usar para diseñar materiales basados en quitosano auto-gelificantes. El gel producido con el método puede ser un hidrogel, y se puede liofilizar para producir una esponja de quitosano uniforme y continua con rendimientos mecánicos mejorados.

45 En otras realizaciones, la composición puede comprender un agente farmacéutico, un agente terapéutico o un agente bioactivo, o cualquiera de sus combinaciones. De la misma manera, puede comprender también células vivas suspendidas de mamífero (animales o humanas).

50 En una realización de la invención, la composición de quitosano, como se describe previamente, se puede usar para transportar células vivas in vivo, para producir híbridos célula/polímero in vitro, para propósitos de análisis o diagnóstico in vitro, o para la implantación in vivo en cavidades, órganos o tejidos.

Se pretende que la composición de quitosano de la presente invención se pueda usar para diseñar, desarrollar y fabricar materiales secundarios o productos de interés industrial, médico, quirúrgico o farmacéutico.

También se describe un método para modificar químicamente o reticular quitosano en condiciones homogéneas. El método comprende las etapas de a) preparar una disolución acuosa transparente de quitosano, comprendiendo dicha

5 disolución agua, y de 0,1 a 10% en peso de un quitosano, y de 0,1 a 20% en peso de por lo menos un agente tampón, teniendo dicha disolución un pH que varía de 6,4 a 7,2, y b) disolver homogéneamente por lo menos un reactivo en dicha disolución, reaccionando dicho reactivo con grupos amino del quitosano, y estando dicho reactivo en una concentración de 0,01 a 10% en peso, en el que el quitosano en disolución acuosa está químicamente modificado por una sustitución selectiva en los grupos amino. En tal realización, el quitosano tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%, y el agente tampón tiene un pKa entre 6,0 y 7,6.

10 Se añade un mPEG activado en un extremo a una disolución neutra o casi neutra de quitosano (preferentemente un quitosano parcialmente reacetilado preparado a partir de quitosano desacetilado al 100%). En estas condiciones, el extremo activado permite el injerto rápido de mPEG en cadenas de quitosano vía un enlace covalente con los grupos amino del quitosano. Las cadenas de quitosano injertado con mPEG resultantes en la disolución sufren auto-asociación vía fuerzas intermoleculares tales como enlace de hidrógeno entre el hidrógeno del amino del quitosano y un oxígeno del poliéter.

15 Otros óxidos de monometoxi-polialquileo o sus derivados tales como multibloques (ejemplo: copolímero de monometoxi-poli(etilenglicol)-poli(láctido)) pueden ser también activados en un extremo e injertados en quitosano en las mismas condiciones. El extremo activado consiste en una función anhídrido o grupo éster succinimida, ambos considerados no tóxicos y apropiados para la administración in vivo.

20 El peso molecular del quitosano puede variar dependiendo de la aplicación deseada. En la mayoría de los casos, el peso molecular es de alrededor de 10.000 a 5.000, y más preferentemente de alrededor de 50.000 a 500.000. Cuando el material es monometoxi-poli(etilenglicol), el peso molecular es de alrededor de 500 a alrededor de 20.000, y más preferentemente de alrededor de 2.000 a 10.000.

El éster metoxi-PEG-succinilo-N-hidroxisuccinimida (mPEG-suc-NHS), y metoxi-PEG-carboximetil-NHS (mPEG-cm-NHS) se han hecho reaccionar con quitosano en condiciones homogéneas en disolución acuosa suave para producir formulaciones de hidrogel. Tales formulaciones basadas en quitosano modificado pueden formar geles, a temperatura ambiente, en unos pocos minutos dependiendo de las características de formulación.

25 Previamente a la formación de gel, la formulación se puede cargar también con materiales opcionales, tales como proteínas, fármacos, células, agentes hemostáticos, genes, ADN, agentes terapéuticos, antibióticos, factores de crecimiento, materiales inorgánicos y similares.

30 La composición puede ser inyectable o extruible previamente a dicha formación de un gel acuoso uniforme homogéneo, y se puede inyectar en un cuerpo de un mamífero, animal o ser humano, previamente a dicha formación de un gel acuoso uniforme homogéneo. Una situación ideal es cuando se llega a la formación de un gel acuoso uniforme homogéneo in vivo dentro del cuerpo de un mamífero, animal o ser humano, para propósitos terapéuticos dentro de una cavidad corporal, un órgano o un tejido.

35 Se pueden incorporar ingredientes adicionales dentro de la composición, bien en el componente de disolución o en el componente sólido. Estos ingredientes comprenden un agente farmacéutico o bioactivo terapéutico sólido así como un material de origen biológico, tal como autoinjerto, aloinjerto, xenoinjerto, hueso molido, polvo de hueso desmineralizado, proteínas animales o humanas sólidas, células vivas animales o humanas, y similares. Se pueden incorporar también materiales cerámicos o inorgánicos, tales como bioglas, fosfato de calcio, sulfato de calcio, carbonato de calcio, y similares, con varios niveles de carga.

40 La composición puede entrar en la preparación de un composite o material híbrido de interés industrial, farmacéutico o médico, y particularmente en la preparación de un material quirúrgico, tal como un dispositivo inyectable, un implante o un dispositivo protésico. Es de particular interés cuando la composición entra en la preparación de un implante de composite sólido que contiene calcio y compuestos de fosfato.

La composición se aplica preferentemente a material quirúrgico para reparar, restaurar, reemplazar o regenerar tejidos corporales humanos o animales y/u órganos corporales humanos o animales.

45 Aplicación de composiciones de quitosano modificado/reticulado:

Las composiciones de quitosano en las que el quitosano es una N-modificación, N-injerto o N-reticulación pueden ser de interés específico especialmente por su capacidad para formar rápidamente geles acuosos fuertes.

Tales composiciones de quitosano que forman geles se pueden incorporar por medio de:

- 50
- Formulaciones que forman gel inyectables para propósitos de suministro de fármacos, proteínas o células, etc.; Los fármacos, proteínas se pueden incorporar en forma soluble, poco soluble o casi no soluble;
  - Materiales de tiras de gel para aplicaciones médicas y quirúrgicas en suministro de fármacos, cura de heridas, reparación de tejidos, manipulación de células y tejidos, reemplazo de partes del cuerpo, etc.; los materiales de tira de gel están preformados en la preparación o fabricación;

• Andamiaje para la construcción de composites para formar finalmente un composite sólido o material híbrido, que incorpora el gel basado en quitosano; Tal formulación de quitosano entra en la formulación de composites híbridos de composite mineral; por ejemplo, se pueden preparar composiciones de composite de fosfato de calcio auto-endurecido ("cemento de fosfato de calcio") a partir de un sistema de quitosano modificado.

5 • Matriz encapsulante, de incrustación o portadora para: partículas orgánicas o inorgánicas sólidas tales como fosfatos de calcio, sulfato de calcio, carbonato de calcio; micropartículas tales como nanoesferas, microesferas; partículas de proteína sólida tales como proteínas óseas desmineralizadas y similares; microesferas poliméricas sólidas o microbolas de gel polimérico sólido; bioglas sólido o microesferas o gránulos de mineral; complejos biológicos sólidos tales como ADN y complejos de oligonucleótido; células vivas animales o  
10 humanas en suspensión o adheridas a un sustrato; liposomas y micelas; etc.

Tales composiciones de quitosano que forman gel se pueden aplicar a:

- La encapsulación y suministro de agentes terapéuticos, farmacéuticos o bioactivos en un cuerpo de mamífero, animal o ser humano;
- La encapsulación de células vivas animales o humanas modificadas o no modificadas para propósitos terapéuticos;
- El suministro de células vivas a una parte específica del cuerpo;
- El cultivo y formación in vitro, de equivalentes tridimensionales vivos de tejidos u órganos del cuerpo para propósitos de trasplante in vivo o investigación in vitro o estudios de ensayo;
- El relleno de un defecto, formado quirúrgicamente o por enfermedades o deficiencias, dentro del un tejido u órgano; Ejemplo, defecto óseo, defecto de cartilago, etc.
- El aumento de tejidos;
- La reparación o regeneración in vivo de partes del cuerpo, tales como piel, músculos, nervios, dientes incluyendo dentina y esmalte, huesos incluyendo huesos alveolares, esponjosos y corticales, cartilagos, incluyendo cartilagos articulares, arterias, parches de grasa, menisco, discos intervertebrales, y similares;
- La prevención de adhesiones de tejidos;
- La acción de hemostasis; y

La presente invención se entenderá más fácilmente refiriéndonos a los siguientes ejemplos que se dan para ilustrar la invención en lugar de para limitar su alcance.

**EJEMPLO 1**

**30 Acetilación homogénea de quitosano**

Se preparó una disolución de quitosano (pH 5) disolviendo completamente 1,17 g de quitosano (85% desacetilado) en 50 ml de una disolución de HCl (0,1 M). La disolución de quitosano se enfrió hasta 4°C y manteniendo la temperatura fría, se ajustó su pH a 6,8 añadiendo ~1,42 g de sal de sodio de glicerol-fosfato. A la disolución neutra resultante, se añadió anhídrido acético (véase la Tabla 1). A continuación, se dejó proseguir la reacción con agitación continua y a temperatura ambiente durante alrededor de 16 h. Al final, la mezcla de reacción se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó frente a un volumen de agua pura durante tres días para retirar sales y reactivo sin reaccionar. El quitosano N-acetilado obtenido de este modo se recuperó por liofiltración o por precipitación en disolución de 50% de agua/50% de metanol de NH<sub>4</sub>OH (0,2 M), seguido de filtración, lavado con metanol repetidamente y secado al aire. El análisis de RMN de <sup>13</sup>C confirma la modificación N-acetilo (véase la Fig. 1B) y la integración de los picos permite la determinación de un grado de desacetilación cercano al obtenido por titulación conductimétrica (véase la Tabla 1). Las Figs. 1A a 1C son espectros de RMN de <sup>13</sup>C comparativos de quitosano y quitosano modificado. Las relaciones de los picos integrados a 25 ppm y a 40 ppm con respecto a los picos integrados entre 50 y 110 ppm permiten la determinación de los contenidos de acetilo y butirilo, respectivamente.

Tabla 1

Anhídrido acético (AA)		% de NH <sub>2</sub> substituido	
(g)	Relación AA/NH <sub>2</sub>	Titulación	RMN de <sup>13</sup> C
0,00	0,00	0	0
0,1796	0,296	30	26
0,3592	0,592	51	49
0,5388	0,888	67	64
0,8407	1,184	77	72

La Fig. 2A ilustra el contenido de glucosamina después de la reacción de quitosano con varias cantidades de anhídrido acético.

### **EJEMPLO 2**

#### **Modificación N-butililo homogénea de quitosano**

5 El experimento se realizó como en el Ejemplo 1 anterior, excepto que se usó anhídrido butírico en lugar de anhídrido acético. El análisis de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirma la modificación N-butililo (véase la Fig. 1C) y la integración de los picos permite la determinación de un grado de sustitución sensiblemente cercano al deducido de la titulación conductimétrica (véase la Tabla 2).

Tabla 2

Anhídrido butírico (BA)		% de $\text{NH}_2$ sustituido	
(g)	Relación BA/ $\text{NH}_2$	Titulación	RMN de $^{13}\text{C}$
0,00	0,00	0	0
0,2359	0,293	30	27
0,4729	0,588	51	51
0,7088	0,881	66	64
0,9457	1,176	74	72

10

Aunque no son parte de la invención, los siguientes ejemplos de referencia son útiles para entender como poner en práctica la invención.

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 3: Gel de quitosano reticulado con glioxal**

15

0,47 g de quitosano (85% desacetilado) se disolvieron completamente en 20 ml de disolución de HCl (0,1 M). La disolución de quitosano obtenida de este modo tenía un pH de 5. Esta disolución se enfrió hasta 4°C. Alrededor de 0,67 g de sal de sodio de glicerol-fosfato se añadieron a la disolución de quitosano para ajustar su pH a 6,8. Mientras la disolución resultante se mantenía a temperatura fría, se añadieron 0,2, 0,1, 0,02 o 0,01 ml de disolución acuosa de glioxal (87,2 mM) y se homogeneizó. Se formaron geles transparentes a 37°C más o menos rápidamente dependiendo de la concentración de glioxal (véase la Tabla 3).

20

Tabla 3

Glioxal (mM)	Tiempo de gelificación a 37°C (min)
1,744	Inmediato
0,872	Inmediato
0,262	20
0,174	30
0,087	90

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 4: Gel de quitosano reticulado con polietilenglicol-diglicidil-éter**

25

El experimento se realizó como en el Ejemplo 3 anterior, excepto que la disolución de glioxal fue reemplazada por polietilenglicol-diglicidil-éter (PEGDGly). Se formaron geles transparentes a 37°C más o menos rápidamente como se cita en la Tabla 4, dependiendo de la concentración de PEGDGly. Se obtuvieron los siguientes tiempos de gelificación.

Tabla 4

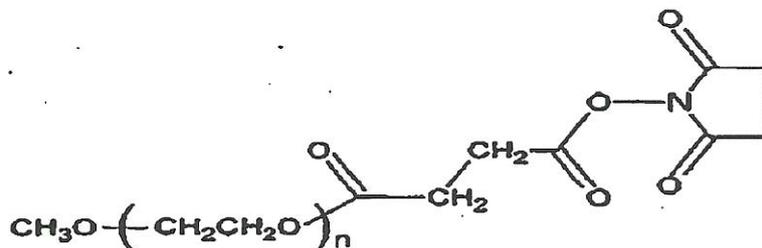
PEGDGly (mM)	Tiempo de gelificación a 37°C (h)
37,00	6
7,40	10
3,70	14
1,85	20
0,37	Sin gelificación

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 5: Preparación de composición de gelificación in situ rápida injertando mPEG en quitosano en disolución acuosa suave para administración in vivo**

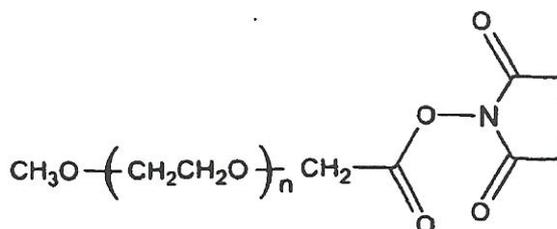
30

El presente ejemplo se refiere a composiciones acuosas que contienen quitosano y mPEG que rápidamente sufren gelificación vía la formación de uniones covalentes y no covalentes entre ambos polímeros. El éster metoxi-PEG-succinil-N-hidroxisuccinimida (mPEG-suc-NHS), y metoxi-PEG-carboximetil-NHS (mPEG-cm-NHS) se hicieron

reaccionar con quitosano en condiciones homogéneas en disolución acuosa suave para producir formulaciones de hidrogel.



**mPEG-suc-NHS**



**mPEG-cm-NHS**

5 Las formulaciones de hidrogel se prepararon disolviendo 200 mg de quitosano (con viscosidad media y un grado de desacetilación del 90%) en 9 ml de disolución de HCl (0,1 M). La disolución resultante se neutralizó añadiendo 600 mg de  $\beta$ -GP disuelto en 1 ml de agua destilada. La disolución tampón de  $\beta$ -GP se añadió cuidadosamente a baja temperatura (5°C) para obtener una disolución líquida homogénea y transparente. El valor de pH medido de la disolución final era 6,94. A la disolución de quitosano neutralizado, se añadió gota a gota a temperatura ambiente 210 mg de mPEG-suc-NHS (M=5197,17 g/mol) disuelto en 10 ml de agua. Se obtuvo rápidamente un gel de quitosano inyectado con mPEG homogéneo y transparente. No se formó precipitado o agregado durante o después de la adición. Para evidenciar la formación de gel, se realizaron ensayos reológicos. La Fig. 3, que representa la evolución del módulo elástico ( $G'$ ) y del módulo viscoso ( $G''$ ) con el tiempo, para la formulación típica, muestra un incremento de inicio de  $G'$  después de alrededor de 10 minutos, lo que indica la gelificación incipiente. Los tiempos de gelificación del quitosano inyectado con mPEG a T.A.(temperatura ambiente) como función de las concentraciones de mPEG-suc-NHS se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5: Tiempo de gelificación a T.A. como función de la concentración de mPEG-suc-NHS**

mPEG-sus-NHS (mg)	Relación molar x 100 NHS/NH <sub>2</sub>	mPEG-suc-NHS	Tiempo de gelificación a T.A. (min)
210	3,71		1
136	2,40		3
75	1,32		6
50	0,88		15
31	0,55		35
20	0,35		90

20 En un experimento similar, el reemplazo de mPEG-suc-NHS por mPEG-cm-NHS conduce a resultados similares. Se obtuvieron también resultados similares cuando el pH de la disolución de quitosano ha sido ajustado, a alrededor de 6,9, añadiendo 150 mg de bis-tris (en lugar de  $\beta$ -GP) disuelto en 1 ml de agua. El tiempo de gelificación depende también del grado de desacetilación (DDA) y del pH, y no ocurrió gelificación si el valor de pH está por debajo de 6. Sin el ajuste de pH en el intervalo de 6,4 a 7,2, el injerto de mPEG en quitosano no puede ocurrir y por lo tanto la gelificación no puede tener lugar.

**EJEMPLO DE REFERENCIA 6: Modificación in situ de quitosano con mPEG, y formación de geles compuestos y composites autoendurecidos**

5 Se preparó un gel compuesto a partir de una disolución acuosa de quitosano (quitosano al 2,0% peso/v, pH<6) y una fase sólida compuesta de alfa-fosfato de tricalcio (1,2 g) y mPEG-suc-NHS (2-7 mg). La mezcla de la disolución de quitosano líquido y la fase sólida se realizó con una relación líquido/sólido que varía de 0,4 a 0,6 ml/g.

Todos los sistemas preparados formaron geles compuestos elásticos fuertes (véase las Figs. 4A y 4B). Cuando se disponen a 37°C en un medio acuoso, los geles compuestos progresivamente se vuelven materiales compuestos sólidos, con mínima contracción. Estos sólidos estaban bien formados después de 2 a 7 días. Las resistencias a la compresión finales de tales composites sólidos variaban de 5 a 20 MPa después de 4 días.

10 La modificación sin situ de quitosano con mPEG combinada con la carga en fosfatos de calcio reactivos permite la formación de geles compuestos y sólidos.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

a) de 0,1 a 10% en peso de quitosano en una disolución acuosa transparente y ácida de quitosano, en la que dicho quitosano tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%;

5 b) de 0,1 a 20% en peso de por lo menos un agente tampón que tiene un pKa entre 6,0 y 7,6, y

c) de 0,01 a 10% en peso de por lo menos un reactivo que reacciona con grupos amino del quitosano, en la que dicha composición de quitosano N-modificado tiene un pH que varía de 6,8 a 7,2, y dicho quitosano sufre una N-modificación, N-injerto o N-reticulación homogénea en dicha composición de quitosano; siendo seleccionado dicho reactivo del grupo que consiste en glutaraldehído, formaldehído, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, un reactivo basado en aldehído propiónico bifuncional, un reactivo que tiene un grupo éster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo éster de sulfosuccinimidilo y N-sulfosuccinimidilo, reactivo que tiene un grupo imidoéster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo di-metilpimelidato, di-metiladipimidato, di-metilsuberimidato, y di-metilpropionimidato, y un reactivo que tiene un grupo fenilazida, hidrazida, hidrofenilazida o nitrofenilazida

15 en la que dicha composición no comprende un disolvente orgánico.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho agente tampón es un tampón biológico de cultivo celular.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que dicho tampón biológico de cultivo celular se selecciona del grupo que consiste en sales de fosfato, sales de glicerofosfato; ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES); ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico (DIPSO); ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(4-butanosulfónico) (HEPBS); ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES); ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES); ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico (MOBS); ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS); ácido β-hidroxi-4-morfolinopropanosulfónico (MOPSO); 2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (BIS-TRIS); y 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano (BIS-TRIS propano), o una de sus mezclas.

4. La composición de la reivindicación 1, que consiste adicionalmente en un agente farmacéutico, un agente terapéutico o un agente bioactivo.

5. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente células.

6. La composición de la reivindicación 5, en la que las células son células de mamífero vivas.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición consiste adicionalmente en un material de origen biológico, tal como autoinjerto, aloinjerto, xenoinjerto, hueso molido, polvo de hueso desmineralizado, proteínas sólidas animales o humanas, células vivas animales o humanas.

8. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición consiste adicionalmente en un material cerámico o inorgánico.

9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho material cerámico o inorgánico es bioglas, fosfato de calcio, sulfato de calcio, o carbonato de calcio.

10. Un método para modificar químicamente o reticular quitosano en condiciones homogéneas, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) preparar una disolución acuosa transparente de quitosano, comprendiendo dicha disolución (i) de 0,1 a 10% en peso de un quitosano que tiene un grado de desacetilación entre 70% y 100%, y (ii) de 0,1 a 20% en peso de por lo menos un agente tampón que tiene un pKa entre 6,0 y 7,6, teniendo dicha disolución un pH que varía de 6,4 a 7,2; y

b) disolver homogéneamente por lo menos un reactivo en la disolución de la etapa a), reaccionando dicho reactivo con grupos amino del quitosano, y estando dicho reactivo en una concentración de 0,01 a 10% en peso, en el que dicho agente reactivo se selecciona del grupo que consiste en glutaraldehído, formaldehído, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, un reactivo basado en aldehído propiónico bifuncional, un reactivo que tiene un grupo éster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo éster de sulfosuccinimidilo y N-sulfosuccinimidilo, reactivo que tiene un grupo imidoéster reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupo di-metilpimelidato, di-metiladipimidato, di-metilsuberimidato, y di-metilpropionimidato, y un reactivo que tiene un grupo fenilazida, hidrazida, hidrofenilazida o nitrofenilazida,

en el que dicho quitosano en la disolución acuosa está químicamente modificado o reticulado por una sustitución selectiva en el grupo amino de quitosano; y en el que no están implicados disolventes orgánicos en la preparación de dicho quitosano químicamente modificado o reticulado.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente la etapa de purificar el quitosano químicamente modificado o reticulado.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la etapa de purificación consiste en:
- a) dializar el quitosano químicamente modificado o reticulado;
  - 5 b) precipitar el quitosano obtenido en la etapa c), con una disolución básica;
  - c) lavar el quitosano precipitado de la etapa d); y
  - d) secar al aire el quitosano lavado de la etapa e).
13. El método de la reivindicación 10, en el que dicho agente tampón es un tampón biológico de cultivo celular.
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en el que el tampón biológico de cultivo celular se selecciona del grupo que consiste en sales de fosfato, sales de glicerofosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES); ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico (DIPSO); ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-4-butanosulfónico (HEPBS); ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES); ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES); ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico (MOBS); ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS); ácido  $\beta$ -hidroxi-4-morfolinopropanosulfónico (MOPSO); 2-bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (BIS-TRIS); y 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano (BIS-TRIS propano), o una de sus mezclas.
- 15 15. El método de la reivindicación 10, en el que la disolución de la etapa a) comprende adicionalmente un agente farmacéutico, un agente terapéutico o un agente bioactivo.
16. El método de la reivindicación 10, en el que la disolución de la etapa a) comprende células suspendidas.
17. El método de la reivindicación 16, en el que las células suspendidas son células de mamífero vivas suspendidas.
- 20 18. El uso de una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la producción in vitro de híbridos célula/polímero para ensayos in vitro.
19. El uso de una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para producir un hidrogel de quitosano uniforme y homogéneo con pH fisiológico.

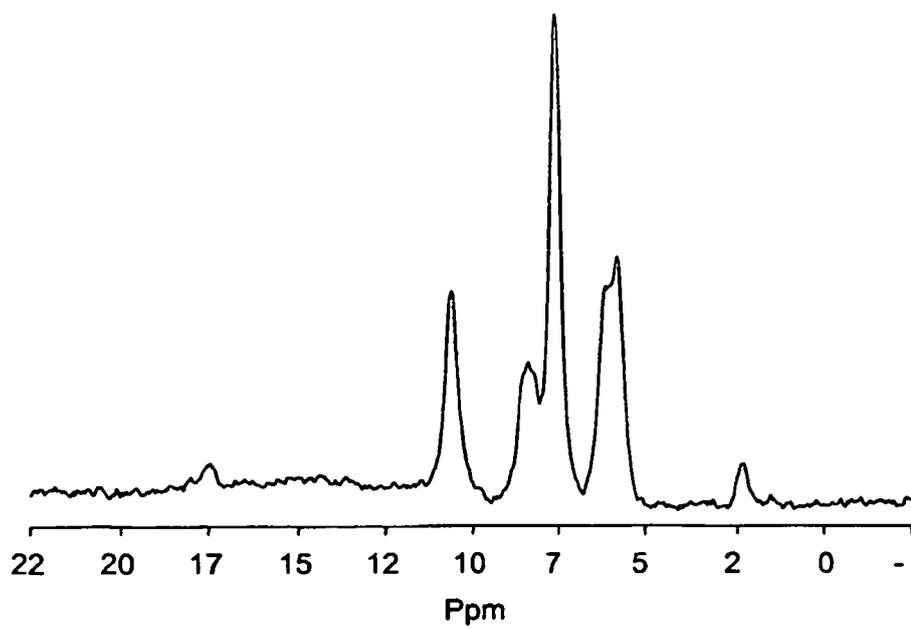
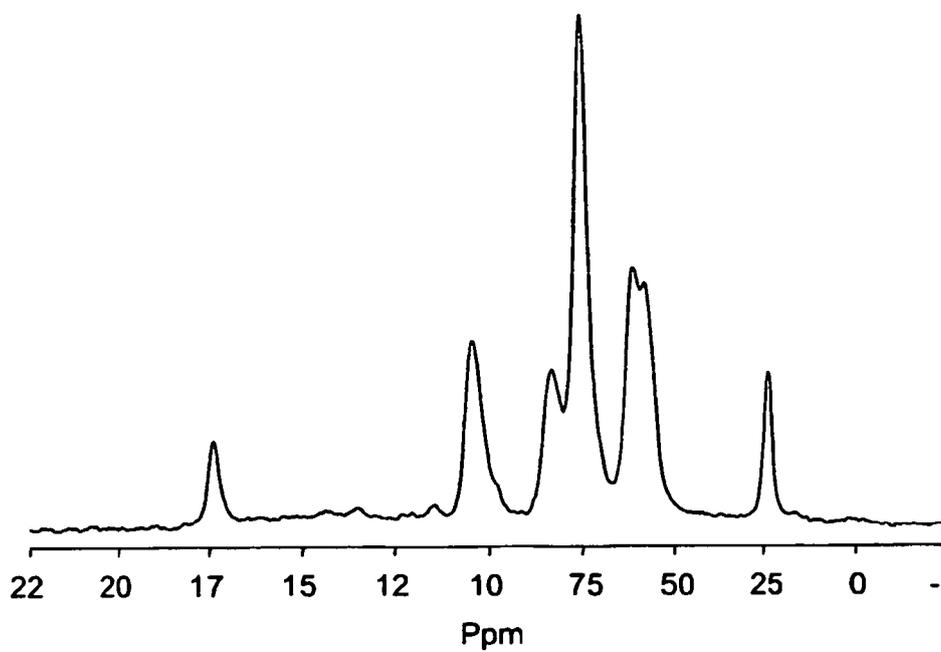


Fig. 1A



**Fig. 1B**

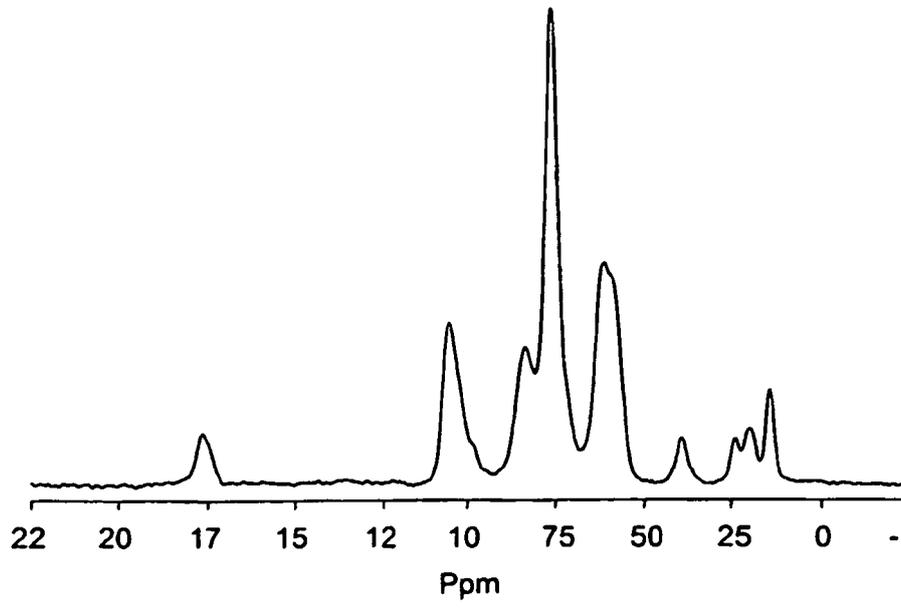


Fig. 1C

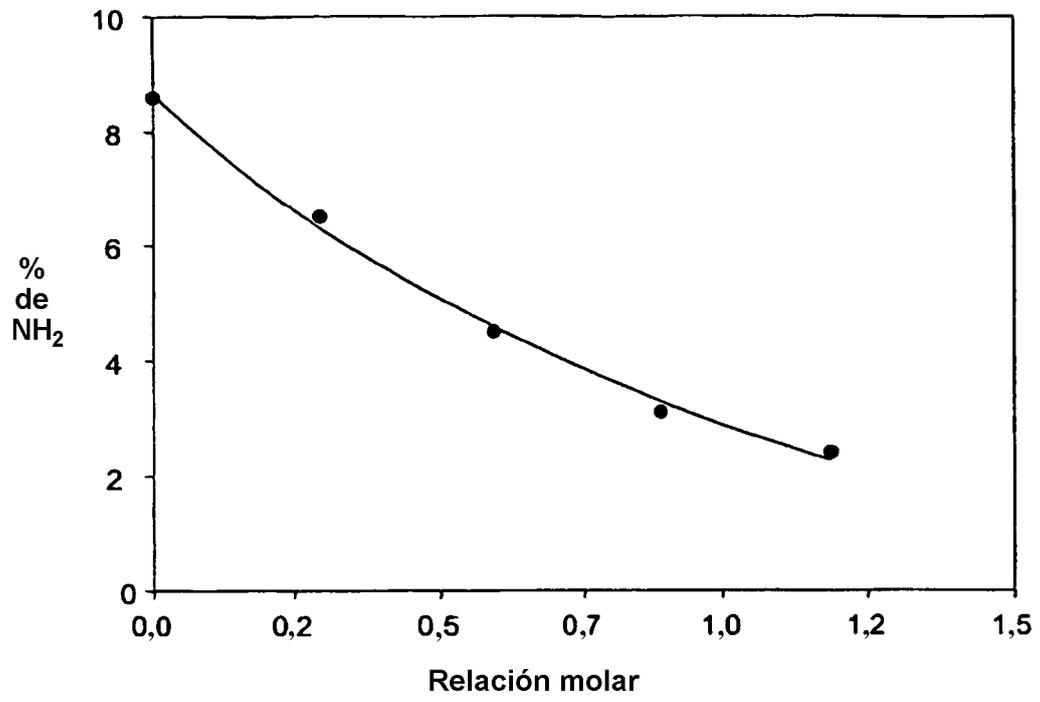


Fig. 2A

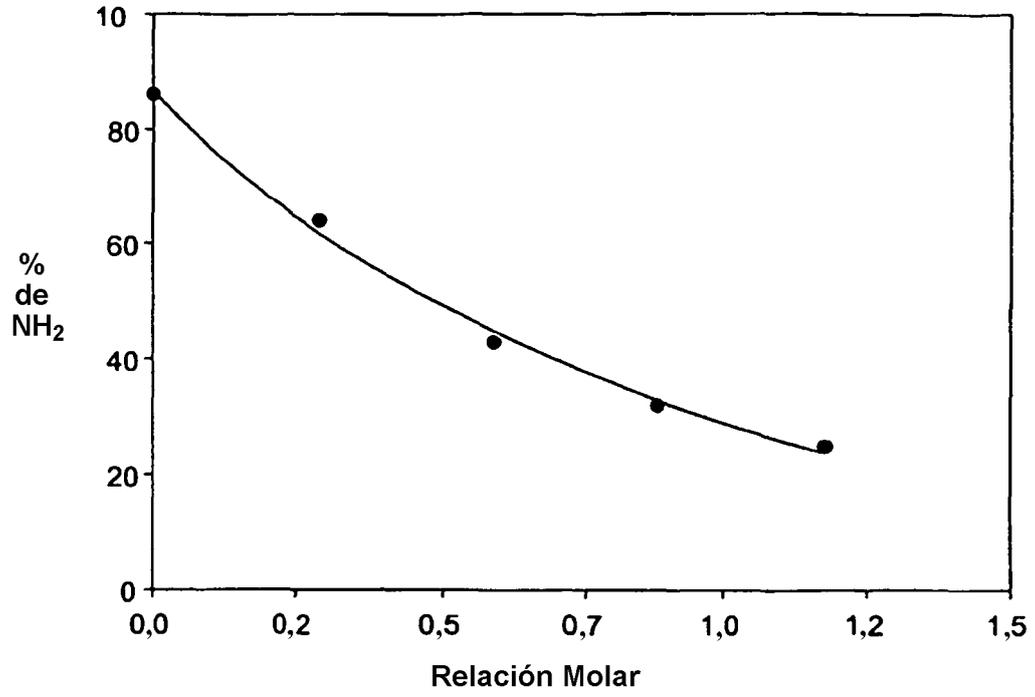


Fig. 2B

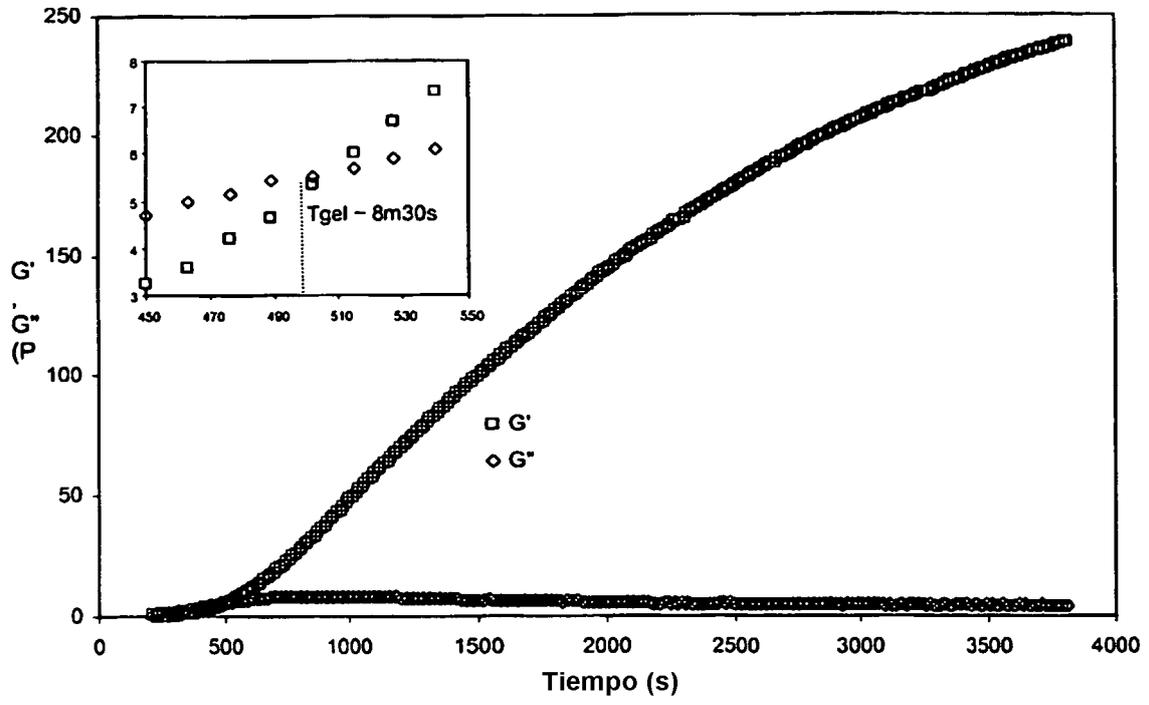


Fig. 3

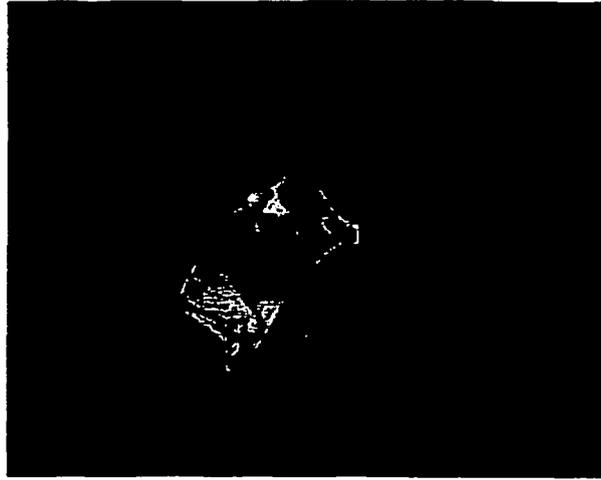


Fig. 4A

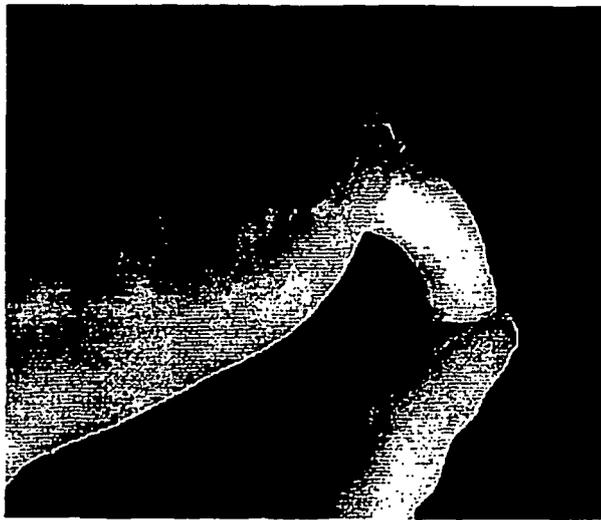


Fig. 4B