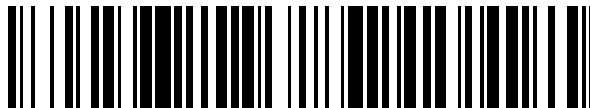


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 093**

51 Int. Cl.:
C08B 37/00 (2006.01)
C08G 65/333 (2006.01)
C08G 81/00 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 8/91 (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08804024 .1**
96 Fecha de presentación: **11.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2190884**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE DERIVADOS (POLI(ÓXIDO DE ETILENO) POLI(ÓXIDO DE PROPILENO)) TERMOSENSIBLES, ÚTILES PARA FUNCIONALIZAR EL QUITOSANO.**

30 Prioridad:
11.09.2007 FR 0757506

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.12.2011

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, RUE MICHEL-ANGE
75016 PARIS, FR y
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1**

72 Inventor/es:
**AUZELY-VELTY, Rachel y
CREUZET, Caroline**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 370 093 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

Procedimiento de preparación de derivados (poli(óxido de etileno) poli(óxido de propileno)) termosensibles, útiles para funcionalizar el quitosano.

5 La presente invención se refiere a nuevos polímeros termosensibles, que pueden ser utilizados en particular en la síntesis de derivados del quitosano.

10 Los hidrogeles reversibles formados *in situ* a consecuencia de un aumento de la temperatura suscitan actualmente un interés creciente debido a sus numerosas aplicaciones potenciales en los campos cosmético, farmacéutico y biomédico. En estos sistemas, la formación de las uniones físicas necesarias para la gelificación se debe generalmente a la asociación de polímeros que poseen una temperatura crítica inferior de separación de mezcla. Estos polímeros denominados de LCST (Lower Critical Solution Temperature) conducen a una separación de fase cuando la temperatura se vuelve superior a la LCST. En efecto, estos sistemas ven aumentar su hidrofobia con la temperatura. Como ejemplos, se pueden citar la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) y los poliéteres tribloques de poli(óxido de etileno) (POE) y de poli(óxido de propileno) (POP) comercializados con el nombre de Pluronics® (BASF) o Poloxamers® (ICI) (Gil *et al.* 2004). Los tribloques POE-POP-POE tienen la propiedad de formar unos geles a alta temperatura; ahora bien para ello, necesitan estar a unas concentraciones en disolución muy elevadas (de 200 a 300 g/l), lo cual no constituye unas condiciones óptimas para la biocompatibilidad. Una de las estrategias posibles para evitar este problema se basa en el injerto a un bajo índice de estos polímeros sobre un biopolímero, tal como el quitosano. Este enfoque presenta varias ventajas; un comportamiento termogelificante se puede observar en medio acuoso con bajas concentraciones en polímero (10 g/l), que combina por otra parte las propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y biológicas del quitosano. Este polisacárido de origen natural aumenta la velocidad de cicatrización de heridas abiertas, estimulando la respuesta inmunitaria y la reconstrucción de los tejidos, previniendo las infecciones microbianas y absorbiendo el exudado. Resulta asimismo ser un buen sustrato para el cultivo celular y estimula, además, el crecimiento celular. Estas propiedades hacen de él por lo tanto un buen candidato para la cicatrización de las heridas, la medicina regeneradora (reconstrucción ósea) y la elaboración de sistemas de administración de medicamentos (implantes, disoluciones, hidrogeles, parches).

20 En este contexto, los inventores han desarrollado unos sistemas termogelificantes mediante injerto de polímeros de LCST sobre el quitosano. Estos sistemas consisten en unas disoluciones acuosas cuyo pH varía ventajosamente de 4 a unos valores de pH fisiológico, que conducen a unos geles transparentes mediante calentamiento.

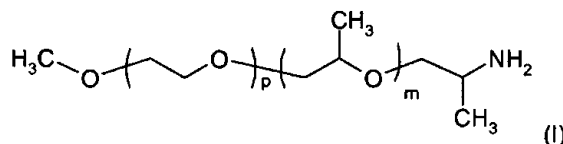
35 Se han dedicado pocos trabajos al desarrollo de hidrogeles termorreversibles a base de polímeros naturales. Chenite *et al.* (Biomaterials (2000), 21 2155-2161) han mostrado la posibilidad de obtener unos sistemas termogelificantes a partir de disoluciones acuosas a pH fisiológico de quitosano y de sales de glicerol-2-fosfato. Sin embargo, la obtención de estos geles necesita la utilización de una cantidad importante de sales que no permite su utilización en ciertas aplicaciones biomédicas. Unos derivados de quitosano portadores de cadenas de PNIPAM han sido desarrollados asimismo con el objetivo de utilizarlos en ingeniería tisular (Cho *et al.* Biomaterials (2004), 25, 5743-5751). Sin embargo, la PNIPAM no presenta las características de biocompatibilidad requeridas para aplicaciones *in vivo* reales. Chung *et al.* (Curr. Applied Phys. (2005), 5, 485-488) han descrito la síntesis de derivados del quitosano termoespesantes portadores de cadenas de tipo Pluronics®, biocompatibles. Pero la naturaleza bifuncional de dichas cadenas hace que el control de la síntesis resulte relativamente difícil.

45 El poli(óxido de etileno) poli(óxido de propileno), POEPOP, denominado comercialmente Jeffamine® (Huntsman). Es un copolímero con disposición aleatoria de unidades óxido de etileno y óxido de propileno de la familia de los Pluronics®. Este copolímero biocompatible había sido utilizado por L'Alloret (FR 2 811 995) para preparar unos copolímeros injertados termogelificantes derivados de polímeros sintéticos o de derivados de polisacáridos diferentes del quitosano (celulosa y derivados, galactomananos, alginatos). Este polímero ha sido utilizado asimismo para funcionalizar el quitosano. El quitosano posee una función aminica en posición C-2, que permite efectuar unas reacciones regioselectivas. La síntesis del quitosano-POEPOP se basa en la funcionalización del POEPOP por un azúcar reductor en una primera etapa (reacción de acoplamiento de tipo peptídico entre el POEPOP y el ácido galacturónico protegido seguida de la desprotección de los hidroxilos de azúcar, que conduce al derivado POEPOP-GA), seguida en una segunda etapa del acoplamiento del POEPOP modificado con el quitosano por una reacción de aminación reductora. El carbono C-1 del azúcar, debido a su carácter hemiacetalico, puede reaccionar con la función amina del quitosano (Creuzet *et al.*, l'actualité chimique (2006), 294, 34-38). Sin embargo, este procedimiento no permite producir cantidades importantes (industriales) de polisacáridos modificados; siendo el derivado POEPOP-GA de síntesis difícil de realizar y costosa.

60 Los inventores han desarrollado así un nuevo procedimiento de síntesis a través de un nuevo derivado, el POEPOP-acetal, para conducir a unos derivados CHI-POEPOP de grado de sustitución (DS) variable, ventajosamente solubles en medio acuoso a pH 4 y termogelificantes. La temperatura de transición sol-gel depende del grado de sustitución, lo cual permite ajustar las propiedades en función de las aplicaciones deseadas. Para ampliar las aplicaciones, unos derivados CHI-POEPOP-POE, ventajosamente solubles en medio acuoso a unos valores de pH fisiológico, han sido por otra parte desarrollados a partir del intermedio POEPOP-acetal o del derivado CHI-POEPOP.

La invención tiene por lo tanto por primer objeto un procedimiento de preparación de derivado POEPOP-acetal termosensible que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- 5 a. Reacción de una o varias polieteraminas estáticas (POEPOP) de fórmula genérica (I)



10 en la que p representa un número entero comprendido entre 1 y 40, ventajosamente entre 3 y 29, y m representa un número entero comprendido entre 1 y 40, ventajosamente entre 1 y 31,

con el anhídrido succínico para conducir al ácido correspondiente;

- 15 b. Acoplamiento del ácido obtenido tras la etapa a) con la 2,2-dimetoxietilamina para conducir al derivado POEPOP-acetal buscado.

20 En el marco de la presente invención, las abreviaturas POEPOP hacen referencia a uno o varios copolímeros estadísticos de óxido de etileno y de óxido de propileno. En el marco del procedimiento según la invención, es posible utilizar o bien un solo copolímero estadístico de óxido de etileno y de óxido de propileno, o bien una mezcla de diferentes copolímeros estadísticos de óxido de etileno y de óxido de propileno, pudiendo dichos copolímeros diferir en particular por la relación óxido de propileno/óxido de etileno y el peso molecular.

25 Las polieteraminas estadísticas utilizadas en el marco de la presente invención son ventajosamente unos copolímeros comercializados por Huntsman con la denominación comercial Jeffamine®, en particular los copolímeros estadísticos:

- de masa molecular aproximada de 600 g/mol, siendo la relación óxido de propileno/óxido de etileno de 9/1;
- de masa molecular aproximada de 1.000 g/mol, siendo la relación óxido de propileno/óxido de etileno de 3/19;
- de masa molecular aproximada de 2.000 g/mol, siendo la relación óxido de propileno/óxido de etileno de 29/6; y
- 30 - de masa molecular aproximada de 2.000 g/mol, siendo la relación óxido de propileno/óxido de etileno de 10/31.

35 Además de los productos disponibles en el comercio, las polieteraminas estadísticas pueden ser fácilmente preparadas mediante unos procedimientos convencionales bien conocidos por el experto en la materia (Y. Deng, J. Ding, G. Yu, R. H. Mobbs, F. Heatley, C. Price, C. Booth, Plmer (1992), 33, 1959-1962; G. -E. Yu, F. Heatley, C. Booth, T G. Blease, Eur. Polym. J. (1995), 31, 589-593).

40 Se sabe que la repartición estadística de los motivos óxido de etileno y óxido de propileno se traduce por la existencia de una temperatura inferior crítica de separación de mezcla, más allá de la cual se observa una separación de fases macroscópica.

45 En el marco de la invención, la expresión "derivado termosensible" designa un polímero de LCST, es decir un polímero cuya solubilidad en agua se modifica más allá de una cierta temperatura. Se trata de polímeros que presentan una temperatura de separación de mezcla por calentamiento (o punto de turbidez) que define su zona de solubilidad en agua. La temperatura de separación de mezcla mínima obtenida en función de la concentración en polímero se denomina LCST. Para cada concentración en polímero, se observa esta temperatura de separación de mezcla por calentamiento; es superior a la LCST que es el punto mínimo de la curva. Por debajo de esta temperatura, el polímero es soluble en agua; por encima de esta temperatura, el polímero pierde su solubilidad en el agua.

50 Por soluble en el agua, se entiende que las unidades presentan una solubilidad a 20°C de por lo menos 1 g/l, preferentemente por lo menos 2 g/l.

55 La medición de la LCST puede llevarse a cabo visualmente: se determina la temperatura a la cual aparece el punto de turbidez de la disolución acuosa; el punto de turbidez se traduce por la opacificación de la disolución, o la pérdida de transparencia.

60 De manera general, una composición transparente tendrá un valor de transmitancia máximo, sea cual sea la longitud de onda comprendida entre 400 y 800 nm, a través de una muestra de 1 cm de espesor, de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90% (véase el documento EP 291 334). La transmitancia se puede medir disponiendo una muestra de 1 cm de espesor en el rayo luminoso de un espectrofotómetro que trabaja en las longitudes de onda del espectro luminoso.

El procedimiento se lleva a cabo ventajosamente por lo menos parcialmente en unas condiciones anhidras, con el fin de asegurar buenos rendimientos. Como ejemplo de disolvente particularmente apropiado para la realización de la etapa a), se puede citar la dimetilformamida (DMF), en particular la DMF anhidra.

En un modo de realización preferido de la invención, a una disolución de POEPOP, en la DMF, ventajosamente la DMF anhidra, se añade el anhídrido succínico en disolución en la DMF, ventajosamente la DMF anhidra. La disolución de POEPOP/DMF (anhidra) se mantiene ventajosamente bajo atmósfera inerte, tal como bajo nitrógeno. La cantidad molar necesaria de anhídrido succínico es como mínimo la cantidad molar de POEPOP, ventajosamente el anhídrido succínico se introduce en ligero exceso (ventajosamente 1,05 equivalentes molares).

El disolvente utilizado en la etapa b) es ventajosamente asimismo DMF, en particular la DMF anhidra.

En la etapa b), la reacción de acoplamiento se efectúa ventajosamente en presencia de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]-carbodiimida y de diisopropiletilamina (o de trietilamina). Así, la etapa b) comprende ventajosamente la adición sucesiva

- de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]-carbodiimida y de diisopropiletilamina (o de trietilamina), solubilizada en la DMF anhidra, y después
- de 2,2-dimetoxietilamina.

Es posible asimismo añadir previamente un N-hidroxibenzotriazol. La etapa b) comprende entonces ventajosamente la adición sucesiva

- de N-hidroxibenzotriazol, y después
- de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]-carbodiimida y de diisopropiletilamina (o de trietilamina), solubilizada en la DMF anhidra, y después
- de 2,2-dimetoxietilamina.

El procedimiento según la invención permite realizar las etapas a) y b) "en un solo bote", es decir en un solo y mismo reactor, sin etapa intermedia de aislamiento del compuesto obtenido tras la etapa a). Las etapas a) y b) se realizan por lo tanto ventajosamente "en un solo bote".

Para asegurarse de que, previamente a la reacción de acoplamiento, se termina la reacción del POEPOP con el anhídrido succínico, el medio de reacción se deja bajo agitación el tiempo necesario. El medio de reacción se puede dejar así bajo agitación a temperatura ambiente y a presión atmosférica. A escala del laboratorio (<500 ml), el medio de reacción se deja ventajosamente bajo agitación a temperatura ambiente y a presión atmosférica durante 5 horas.

Tras la etapa b), el medio de reacción se deja ventajosamente bajo agitación a temperatura ambiente y a presión atmosférica el tiempo necesario para asegurarse de que la reacción de acoplamiento está terminada, lo cual se asegura, a escala del laboratorio (<500 ml), dejando la disolución bajo agitación toda una noche.

Para recuperar el POEPOP-acetal, se puede proceder ventajosamente de la manera siguiente. El disolvente (DMF) se evapora y el producto se recoge en un disolvente apropiado tal como el diclorometano. La fase orgánica se lava sucesivamente con agua acidulada (pH 4) y después con agua. La fase orgánica se seca, por ejemplo se seca sobre sulfato de sodio, y después se evapora para dar el derivado acetal.

El procedimiento según la invención permite obtener el derivado POEPOP-acetal con unos rendimientos superiores a 80%.

En una variante de la invención, se hace reaccionar, en la etapa a), una sola polieteramina estadística. En otra variante de la invención, se hace reaccionar, en la etapa a), por lo menos dos polieteraminas estadísticas diferentes.

La invención tiene como segundo objeto un derivado POEPOP-acetal obtenido mediante el procedimiento, designando las abreviaturas POEPOP unos copolímeros estadísticos de óxido de etileno y de óxido de propileno, idénticos o diferentes, tales como los definidos anteriormente.

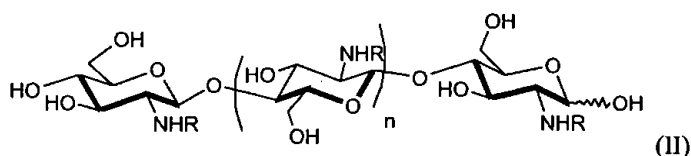
La invención tiene como tercer objeto un procedimiento de síntesis de quitosano injertado que comprende (i) una etapa de hidrólisis del derivado POEPOP-acetal según la invención en derivado POEPOP-CHO (es decir en el aldehído correspondiente) seguida (ii) de una etapa de injerto de dicho derivado POEPOP-CHO sobre el quitosano o uno de sus derivados mediante una reacción de tipo aminación reductora.

La primera etapa (i) consiste en desproteger la función aldehído del POEPOP-acetal. Para ello, a escala del

laboratorio (<500 ml), éste se solubiliza ventajosamente en una mezcla de ácido trifluoroacético/agua (TFA/H₂O), por ejemplo en las proporciones (4/1) (v/v). El medio de reacción se puede dejar bajo agitación durante una noche a temperatura ambiente y a presión atmosférica. Después de la evaporación de la mezcla TFA/H₂O, el aldehído obtenido se puede solubilizar en una mezcla de etanol/agua (en particular EtOH/H₂O (1/1) (v/v)) y el pH de la disolución se ajusta ventajosamente a pH 5,1.

El aldehído se añade entonces al quitosano, que puede ser previamente solubilizado en una mezcla de CH₃COOH/EtOH (3:2 v/v) por ejemplo. El pH de la mezcla se ajusta entonces a 5,1. Se añade ventajosamente una disolución acuosa de un agente reductor, tal como una disolución acuosa de cianoborohidruro de sodio o de picolinborano (PicBH₃) o de borohidruro de sodio. El medio de reacción se puede dejar bajo agitación el tiempo necesario, 24 horas a la escala del laboratorio (<500 ml), a temperatura ambiente y a presión atmosférica. El producto esperado se puede recuperar mediante precipitación, ajustando el pH del medio de reacción a 9. Este último se lava entonces, se filtra y se seca.

El quitosano o uno de sus derivados responde ventajosamente a la fórmula (II) siguiente:



en la que n está comprendido entre 60 y 6.000 y R representa

- un átomo de hidrógeno H,
- un radical acetilo COCH₃, estando el grado de acetilación ventajosamente comprendido entre 0 y 0,5, más ventajosamente entre 0 y 0,2.

Los inventores han constatado que el grado de sustitución del POEPOP sobre el quitosano, DS₁, se puede ajustar en función de las condiciones de reacción utilizadas y, en particular, depende de la concentración en aldehído (POEPOP-CHO). La tabla 1 reúne las condiciones de reacciones utilizadas para la síntesis de diferentes muestras de CHI-POEPOP de DS₁ variable: teniendo la polietilamina estadística una masa molecular aproximada de 2.000 g/mol, siendo la relación óxido de propileno/óxido de etileno de 29/6.

Tabla 1. Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis de los derivados CHI-POEPOP de DS variable.

| Reacción | NaCNBH ₃ ^a | POEPOP-CHO ^a | Rendimiento (%) | DS ₁ ^b |
|----------|----------------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | 1,2 | 0,05 | 72 | 0,04 |
| 2 | 1,2 | 0,1 | 63 | 0,1 |
| 3 | 1,2 | 0,2 | 48 | 0,17 |

^a Número de equivalentes molares/mol de unidad de repetición; ^b obtenido mediante RMN 1H

Los datos de la tabla 1 muestran que la reacción de injerto está perfectamente controlada. Esta permite llegar a una familia de productos de DS₁ variable, lo cual permite ajustar la gama de temperatura pertinente para la aplicación prevista. En el caso del derivado POEPOP ensayado (polímero relativamente hidrófobo que se asocia rápidamente mediante calentamiento), se observa que cuanto más elevado es el grado de sustitución DS₁, más baja es la temperatura de transición. Así, para unos valores de DS₁ = 0,04, la temperatura de transición se sitúa alrededor de 40°C mientras que para unos valores de DS₁ = 0,17, la temperatura de transición se sitúa alrededor de 25°C.

El grado de sustitución del POEPOP sobre el quitosano está comprendido ventajosamente entre 0,02 y 0,3, más ventajosamente entre 0,05 y 0,2.

Los derivados CHI-POEPOP obtenidos mediante este procedimiento presentan unas propiedades termogelificantes interesantes, a saber cuando están puestos en disolución, una transición sol-gel reversible y controlable. Además, son solubles en agua a unos pH próximos de 4 (±1). Los derivados de quitosano CHI-POEPOP pueden ser solubilizados en unas composiciones acuosas (pH de 4 ± 1), por ejemplo en una cantidad comprendida entre 2 y 30 g/l, que pueden por otra parte comprender un medio cosmética o farmacéuticamente aceptable. Las disoluciones acuosas resultantes conducen a unos líquidos muy viscosos o a unos geles transparentes por calentamiento. Estos sistemas, biorresorbibles, pueden ser utilizados en unas formulaciones cosméticas, farmacéuticas o biomédicas, que pueden ser transparentes, para modificar sus propiedades reológicas en función de la temperatura. La capacidad de gelificación de las disoluciones acuosas que comprenden los derivados CHIPOEPOP a unas temperaturas próximas a las del cuerpo humano puede permitir evitar cirugías, pudiendo entonces estos geles ser inyectados o aplicados en unos sitios específicos. Estos termogeles presentan además la ventaja de ser bioresorbibles. Estas disoluciones

acuosas pueden por lo tanto ser utilizadas como hidrogel inyectable en unas aplicaciones terapéuticas o cosméticas.

Con el fin de ampliar las aplicaciones, unos derivados CHI-POEPOP-POE termogelificantes solubles en medio acuoso a unos valores de pH fisiológico han sido desarrollados a partir del intermedio POEPOP-acetal o del derivado CHI-POEPOP obtenido. Estos derivados se caracterizan por la presencia, además de las cadenas POEPOP, de cadenas poli(óxido de etileno) (POE) injertadas directamente en el quitosano, que confieren al quitosano las propiedades de solubilidad en agua a pH neutro. Bhattarai *et al.* (Macromol. Biosci. (2005), 5, 107-11 y J. Controlled Release (2005), 103, 609-624) han mostrado que la introducción de cadena POE en el quitosano puede llevar a un comportamiento termoasociativo si el DS no es demasiado elevado (DS ~ 0,07-0,1). Para unos DS superiores a 0,1, los derivados CHI-POE son solubles en agua pero ya no muestran efecto termoespesante. Los inventores han constatado que la síntesis de derivados CHI-POE de DS < 0,1 no permite obtener una perfecta solubilidad de los polímeros en agua. Por otra parte, el aumento de la viscosidad de las disoluciones de los derivados CHI-POE de DS ~ 0,07-0,1 descrito por Bhattarai *et al.* sigue siendo moderada (aumento de un factor 6 para una disolución acuosa a 30 g/l). Por el contrario, los derivados CHI-POEPOP-POE según la invención permiten ganancias en viscosidad muy superiores.

El procedimiento de síntesis de quitosano injertado comprende por lo tanto ventajosamente una etapa suplementaria (iii) de funcionalización del derivado quitosano CHI-POEPOP obtenido tras la etapa (ii) por un polímero, en particular un poli(óxido de etileno) (POE). El POE puede tener una masa molecular comprendida entre 1.000 y 5.000 g/mol. El grado de sustitución del POE sobre el quitosano, DS₂, debe ser superior a 0,1 para obtener una perfecta solubilidad de los derivados en agua. El grado de sustitución del POE sobre el quitosano, DS₂, está comprendido ventajosamente entre 0,1 y 0,5, más ventajosamente entre 0,1 y 0,3.

Según una variante de la invención, se prepara en primer lugar un derivado monoaldehídico del POE. Para ello, se puede añadir lentamente a una disolución de monoéter metílico de poli(óxido de etileno) en un disolvente apropiado, tal como una disolución de CH₂Cl₂/dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro (97/3 (v/v)), bajo nitrógeno, una disolución de Dess-Martin Periodinane (DMP) en un disolvente tal como el DMSO. La mezcla de reacción se puede dejar bajo agitación, por ejemplo durante 2 horas a la escala del laboratorio (<500 ml), a temperatura ambiente. El medio se concentra después, se precipita el producto, se aísla y se seca.

A una disolución de quitosano-POEPOP, que puede ser previamente solubilizado en una mezcla CH₃COOH/EtOH (3/2 (v/v)), se añade una disolución acuosa que contiene el derivado monoaldehídico del POE. El pH de la mezcla se ajusta entonces a 5,1. Se puede añadir una disolución acuosa de cianoborohidruro de sodio o de picolin-borano o de borohidruro de sodio (agentes reductores). El pH del medio de reacción se ajusta a 9 y después se purifica y se aísla CHI-POEPOP-POE.

Según otra variante de la invención, el derivado CHI-POEPOP-POE se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- a' Preparación de un derivado de quitosano, CHI-POE, a partir del quitosano nativo mediante injerto de cadena poli(óxido de etileno), teniendo dicha cadena ventajosamente una masa molecular comprendida entre 1.000 y 5.000 g/mol; debiendo tener dicho derivado CHI-POE un grado de sustitución superior a 0,1;
- b' Reacción del derivado CHI-POE obtenido en la etapa a) con el derivado POEPOP-acetal según la invención previamente hidrolizado para conducir al derivado buscado.

El quitosano nativo puede en primer lugar ser modificado con un derivado aldehídico del POE, obtenido mediante oxidación con la ayuda del agente reactivo de Dess-Martin (Dess-Martin periodinane (DMP)) del alcohol correspondiente comercial, que conduce a la formación de una base de Schiff. Ésta puede ser reducida en medio acuoso homogéneo en presencia de un agente reductor (picolin-borano (PicBH₃) o borocianohidruro de sodio (NaCNBH₃) o borohidruro de sodio (NaBH₄)) para conducir a un derivado CHI-POE, soluble en agua a pH neutro. Éste se purifica, por ejemplo mediante ultrafiltración. La introducción de cadenas POEPOP sobre el derivado anterior, mediante el mismo procedimiento que el descrito anteriormente (injerto del POEPOP sobre el quitosano) conduce al producto esperado.

Además de a través de oxidación del POE-OH por el agente reactivo de Dess-Martin, los derivados aldehídicos del POE pueden ser preparados mediante otros métodos bien conocidos del experto en la materia, tales como por ejemplo una oxidación en presencia de ácido acético y de DMSO (N. Bhattarai, H. R. Ramay, J. Gunn, F. A. Matsen, M. Zhang, J. Controlled Release 103 (2005), 609-624) y J. M. Harris, E. C. Struck, M. G. Case, M. S. Paley, J. M. Vanalstine, D. E. Brooks, J. Polym. Part A.: Polym Chem. 22 (1984), 341-352).

La primera variante que consiste en injertar el POE directamente en el derivado CHI-POEPOP presenta la ventaja de ser más simple de realizar para la purificación del producto final.

La invención tiene como cuarto objeto un derivado de quitosano CHI-POEPOP-POE susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención.

La invención se refiere asimismo a una composición acuosa que comprende por lo menos un derivado de quitosano CHI-POEPOP-POE según la invención y una fase acuosa. El derivado de quitosano CHI-POEPOP-POE está presente ventajosamente en una cantidad comprendida entre 2 y 30 g/l. El pH de dicha composición acuosa varía ventajosamente de 4 al pH fisiológico, preferentemente el pH es próximo al pH fisiológico (pH fisiológico \pm 1), presentando el derivado quitosano CHI-POEPOP-POE la ventaja de ser soluble en agua al pH fisiológico. La composición acuosa según la invención puede comprender por otra parte un medio cosmética o farmacéuticamente aceptable.

La invención tiene por objeto asimismo la utilización de la composición acuosa según la invención para la fabricación de geles mediante calentamiento.

Los derivados CHI-POEPOP-POE presentan, tal como para los derivados CHI-POEPOP unas propiedades termogelificantes interesantes, a saber cuando son puestos en disolución, una transición sol-gel reversible y controlable. Las disoluciones acuosas resultantes conducen a unos líquidos muy viscosos o a unos geles transparentes por calentamiento, en particular a una temperatura que puede ser próxima a la del cuerpo humano. Además, estos derivados presentan la ventaja de ser solubles en agua al pH fisiológico lo cual facilita sus aplicaciones biomédicas. Estos sistemas, biorresorbibles, pueden así ser utilizados en unas formulaciones cosméticas, farmacéuticas o biomédicas, que pueden ser transparentes, para modificar sus propiedades reológicas en función de la temperatura. En particular, pueden ser utilizados para la fabricación de hidrogeles inyectables.

Esta familia de derivados termogelificantes del quitosano solubles en medio acuoso cuyo pH varía de 4 a unos valores de pH fisiológico es susceptible de encontrar unas aplicaciones diversas en los campos cosmético, farmacéutico o biomédico.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, pero no son limitativos. En estos ejemplos, la concentración en polímero se expresa en g/l o en monomol/l, que corresponde al número de moles de unidades de repetición en 1 l de disolución.

Ejemplo 1: Síntesis de un derivado POEPOP-acetal

A una disolución de POEPOP (7,01 g, 3,2 mmoles), en la DMF anhidra (300 ml) bajo nitrógeno, se añade el anhídrido succínico (0,336 g, 3,36 mmoles) en disolución en la DMF anhidra (20 ml). El medio de reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente (y a presión atmosférica) durante 5 horas. Se añaden después sucesivamente, el *N*-hidroxibenzotriazol (HOBT) (0,432 g, 3,2 mmoles), solubilizado en la DMF anhidra (10 ml), la 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]-carbodiimida (EDC) (0,675 g, 3,52 mmoles) y la diisopropiletilamina (DIEA) (0,600 ml, 3,52 mmoles) solubilizadas juntas en la DMF anhidra (10 ml) y por último la 2,2-dimetoxietilamina (0,47 g, 4,48 mmoles). El medio de reacción se deja bajo fuerte agitación durante una noche a temperatura ambiente y a presión atmosférica. Después de la evaporación de la DMF, el producto se recoge con diclorometano. La fase orgánica se lava sucesivamente con agua acidulada (pH 4), y después con agua. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio, y después se evapora para dar el derivado acetal esperado con un rendimiento de 86%.

Ejemplo 2: Síntesis de un derivado CHI-POEPOP con un DS de 0,1

(Adición de 0,11 equivalente molar de POEPOP con respecto al quitosano). La primera etapa consiste en desproteger la función aldehído del POEPOP-acetal. Éste (1,8 g, 0,66 mmoles) se solubiliza en una mezcla TFA/H₂O (23 ml) en las proporciones (4/1) (v/v). El medio de reacción se deja bajo fuerte agitación durante una noche a temperatura ambiente y a presión atmosférica. La mezcla TFA/H₂O se evapora mediante un rotavapor. El aldehído así obtenido (0,66 mmoles) se solubiliza en una mezcla EtOH/H₂O (1/1 (v/v), 15 ml) y el pH de la disolución se ajusta a pH 5,1. Ésta se añade entonces al quitosano (1 g, 6 mmoles), previamente solubilizado en una mezcla CH₃COOH 0,2 M/EtOH (3:2 (v/v), 320 ml). El pH de la mezcla se ajusta entonces a 5,1 con una disolución de hidróxido de sodio (0,5 M). Se añade una disolución acuosa (2 ml) de cianoborohidruro de sodio (0,532 g, 7,2 mmoles). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente y a presión atmosférica, el pH del medio de reacción se ajusta a 9, lo cual conduce a la precipitación del producto esperado. Este último se lava entonces sucesivamente con unas mezclas EtOH/H₂O (3/2, 7/3, 4/1, 9/1 (v/v)) y después con etanol. El producto se filtra sobre sinterizado 4 y se seca al aire libre. Se obtienen 1,6 g de derivado CHI-POEPOP (rendimiento 63%). El grado de sustitución (determinado mediante RMN ¹H a 25°C) del derivado es de 0,1.

Ejemplo 3: Síntesis de un derivado CHI-POEPOP-POE

Síntesis efectuada con un POE de masa molar de 2.000 g/mol, un CHI-POEPOP de DS 0,1 y se tiene como objetivo un DS en POE de ~0,25.

A una disolución de monoéter metílico de poli(óxido de etileno) (2 g, 1 mmol) en una disolución de CH₂Cl₂/DMSO anhidro (97/3, (v/v), 100 ml), bajo nitrógeno, se añade lentamente una disolución de Dess-Martin Periodinane (DMP) (0,424 g, 1 mmol) en el DMSO (4 ml). La mezcla de reacción se deja bajo agitación durante 2h a temperatura

ambiente. El medio se concentra con el evaporador rotativo hasta la obtención de un aceite blanquecino. El aceite residual se precipita en el éter etílico (600 ml).

5 El producto en bruto se aísla mediante filtración sobre sinterizado 4. El derivado monoaldehídico del POE obtenido después de la filtración se seca bajo presión reducida a 25°C durante 2h.

10 A una disolución de quitosano-POEPOP de DS 0,1 (0,3 g, 0,75 mmoles) previamente solubilizada en una mezcla CH₃COOH 0,2 M/ EtOH (3/2 (v/v), 80 ml), se añade una disolución acuosa de POE oxidado (0,52 g, 0,26 mmoles). El pH de la mezcla se ajusta entonces a 5,1 con una disolución de hidróxido de sodio (0,5 M). Se añade una disolución acuosa (2 ml) de cianoborohidruro de sodio (0,028 g, 0,375 mmoles). Después de 24h de agitación a temperatura ambiente y a presión atmosférica, el pH del medio de reacción se ajusta a 9. El producto, que no precipita, se purifica a continuación mediante ultrafiltración utilizando H₂O como disolvente de lavado (y una membrana Millipore YM 10 mínimo preferentemente 30 ó 100). Después de la liofilización, se obtiene el derivado CHI-POEPOP-POE (rendimiento 66%).

15

Ejemplo 4: Comportamiento reológico de los derivados CHI-POEPOP en medio acuoso

20 Se ha verificado que las disoluciones acuosas que comprenden los derivados CHI-POEPOP, a una concentración de 10 g/l (0,024 monomol/l) en AcOH 0,3M/AcONa 0,05 M, presentan una transición sol-gel que es reversible.

Los resultados se indican en la figura 1 que representa la evolución de la viscosidad (Pa/s) de la disolución acuosa en función de la temperatura (°C). Leyenda:

25 Ida 1: punteado (.....)
Vuelta 1: línea continua (———)
Ida 2: línea discontinua (- - - - -)

Se observa por lo tanto que la transición sol-gel es reversible y reproducible.

Ejemplo 5: Comportamiento reológico de los derivados CHI-POEPOP-POE en medio acuoso

30 La figura 2 demuestra la transición sol-gel reversible del derivado CHI-POEPOP-POE (DS₂ = 0,26, DS₁ = 0,17) soluble en medio acuoso a pH neutro. Las curvas indican la variación de los módulos de conservación (elástico) G' y de pérdida (viscoso) G'' (Pa) en función de la temperatura (°C) para el copolímero termoasociativo a base de quitosano CHI-POEPOP-POE, en las condiciones de realización siguientes: frecuencia fijada a 1 Hz; velocidad de calentamiento: 1°C/min; disolvente: NaCl 0,1 M; Cp = 40 g/l (0,035 monomol/l) durante un primer calentamiento y un segundo calentamiento.

35 Leyenda de la figura 2:

40 G', ida 1: punteados (.....)
G'', ida 1: una línea, un punto (-.-.-.-.)
G', ida 2: línea continua (———)
G'', ida 2: línea discontinua (- - - - -)

45

Se observa por lo tanto que la transición sol-gel es reproducible.

Ejemplo 6: Comportamiento reológico de los derivados CHI-POEPOP y CHI-POEPOP-POE en medio acuoso, en función de la temperatura

50

Demostración del carácter termogelificante

55 Unas mediciones reológicas en flujo y en régimen dinámico han permitido demostrar claramente el comportamiento termoasociativo de los derivados CHI-POEPOP y CHI-POEPOP-POE.

60 La figura 3 muestra la evolución de la viscosidad en función de la temperatura medida a partir de disolución de derivados CHI-POEPOP de DS₁ variable, en las condiciones de realización siguientes: velocidad de cizallado: 1 s⁻¹; velocidad de calentamiento: 1°C/min.; disolvente: ácido acético (AcOH) 0,3 M/acetato de sodio (AcONa) 0,05 M; concentración en polímero = Cp = 0,024 monomol/l. Las curvas indican la evolución de la viscosidad (Pa.s) en función de la temperatura (°C).

Leyenda de la figura 3:

65 CHI-POEPOP DS₁ = 0,17: línea continua (-----)
CHI-POEPOP DS₁ = 0,1: línea discontinua (———)
CHI-POEPOP DS₁ = 0,04: línea punteada (.....)

CHI: línea continua en negrita (—)

Se constata un aumento importante de la viscosidad en un factor comprendido entre 100 y 1.000 en función del DS_1 . La temperatura de transición está estrechamente relacionada con el DS_1 .

El efecto de la concentración en polímero sobre la viscosificación de la disolución en función de la temperatura se ilustra en la figura 4. La figura 4 representa la curva de la viscosidad (Pa.s) en función de la temperatura ($^{\circ}C$) para la muestra CHI-POEPOP de $DS_1 = 0,1$, en las condiciones de realización siguientes: velocidad de cizallado: $1 s^{-1}$; velocidad de calentamiento: $1^{\circ}C/min.$; disolvente: AcOH 0,3 M/AcONa 0,05 M.

Leyenda de la figura 4:

CHI-POEPOP, $DS_1 = 0,1$, 15 g/l, 0,036 monomol/l: línea continua (—)
 CHI-POEPOP, $DS_1 = 0,1$, 10 g/l, 0,024 monomol/l: línea discontinua (- - - -)
 CHI-POEPOP, $DS_1 = 0,1$, 5 g/l, 0,012 monomol/l: línea punteada (.....)

Sea cual sea la concentración, la ganancia en viscosidad alcanza un factor próximo a 1.000.

La temperatura de transición no cambia sustancialmente.

La figura 5 compara la evolución de los módulos de conservación (elástico) G' y de pérdida (viscoso) G'' en función de la temperatura para los diferentes CHI-POEPOP. La intersección entre el módulo de conservación G' y el módulo de pérdida G'' se sitúa en la temperatura crítica T_c . Esta temperatura delimita dos dominios: en la zona de baja temperatura ($T < T_c$) el carácter viscoso es predominante, en la zona de alta temperatura ($T > T_c$) el carácter elástico es predominante. Las curvas indican la variación de los módulos G' y G'' (Pa) en función de la temperatura ($^{\circ}C$) para diferentes copolímeros termoasociativos CHI-POEPOP en las condiciones de realización siguientes: frecuencia fijada a 1 Hz; velocidad de calentamiento: $1^{\circ}C/min.$; disolvente AcOH 0,3 M/AcONa 0,1 M; $C_p = 0,024$ monomol/l.

Leyenda de la figura 5:

G' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,1$: línea punteada (.....)
 G'' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,1$: una línea, un punto (-.-.-.-)
 G' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,17$: línea continua (—)
 G'' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,17$: línea discontinua (- - - -)
 G' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,04$: línea continua en negrita (—)
 G'' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,04$: una línea, dos puntos (-.-.-.-)

Se observa un aumento importante de los módulos G' y G'' en función de la temperatura para los derivados de DS_1 más elevado ($DS_1 = 0,17$ y $0,1$). A baja temperatura, los compuestos en disolución a pH 4 presentan un comportamiento de tipo disolución viscosa ($G' < G''$) pero por encima de $25^{\circ}C$, adoptan un comportamiento de tipo gel ($G' > G''$). El fenómeno de termoasociación está por lo tanto bien demostrado para estos derivados.

Ejemplo 7: Comparación de los comportamientos reológicos de los derivados CHI-POEPOP y de los derivados CHI-POEPOP-POE en medio acuoso

Se han estudiado los comportamientos reológicos de los derivados CHI-POEPOP y CHI-POEPOP-POE en medio acuoso. Las condiciones de realización son las siguientes:

- CHI-POEPOP de $DS_1 0,17$ en $CH_3COOH 0,3M/CH_3COONa 0,1M$ (14,9g/l o 0,024 monomol/l) y
- CHI-POEPOP-POE ($DS_{POEPOP} (DS_1) = 0,18$ y $DS_{POE} (DS_2) = 0,28$) en un tampón de fosfato (pH=7,4, $[NaCl] = 0,134M$) (28,8g/l o 0,025 monomol/l);
- la frecuencia se fija a 1 Hz;
- la velocidad de calentamiento es de $1^{\circ}C/min.$

Los resultados se indican en la figura 6 que representa la variación de los módulos G' y G'' (Pa) de la disolución acuosa en función de la temperatura ($^{\circ}C$). Leyenda:

G' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,17$: línea punteada (.....)
 G'' , CHI-POEPOP $DS_1 = 0,17$: una línea, un punto (-.-.-.-)
 G' , CHI-POEPOP-POE $DS_1 = 0,18$: línea continua (—)
 G'' , CHI-POEPOP-POE $DS_1 = 0,18$: línea discontinua (- - - -)

Según la figura 6, se puede observar que los módulos G' y G'' son más elevados a temperaturas bajas, en el caso

del derivado CHI-POEPOP-POE. El efecto espesante inducido por la presencia de grupos POE se observa asimismo cuando se compara la viscosidad de las disoluciones de CHI-POE y de quitosano nativo en las mismas condiciones de disolvente. Esta diferencia se acentúa cuando el derivado CHI-POE se solubiliza, tal como en el presente caso para el derivado CHI-POEPOP-POE, en el tampón fosfato a pH 7,4 (con [NaCl]=0,134M), en el que las repulsiones electroestáticas han disminuido en gran medida, favoreciendo así las asociaciones intercadenas. Por otra parte, se puede observar que la presencia de cadenas POE injertadas provoca la aparición del punto de cruce de las curvas G' y G'' a una temperatura más baja, pero no tiene ningún efecto significativo sobre el valor de los módulos a las temperaturas elevadas. Estos resultados parecen indicar por lo tanto que durante el aumento de temperatura, los injertos POEPOP se agregan entre sí y la presencia de cadenas POE refuerza el fenómeno de asociación.

La figura 7 muestra la evolución de la viscosidad en función del gradiente de cizallado para una disolución de CHI-POE a 17,7 g/l (0,025 monomol/l) en diferentes disolventes y el quitosano inicial.

Leyenda de la figura 7: viscosidad (Pa.s) en función de la temperatura (°C)

CHI-POE PBS - tampón de fosfato (pH=7,4, [NaCl]=0,134 M): línea continua (—)

CHI-POE ácido - AcOH 0,3M/AcONa 0,05 M: línea punteada (.....)

CHI nativo ácido - AcOH 0,3M/AcONa 0,05 M: línea continua en negrita (—)

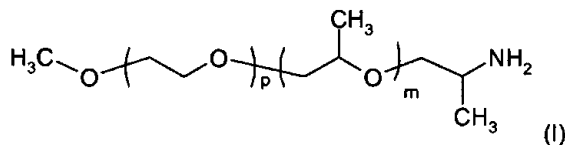
Se constatan unos valores de viscosidades más elevadas para el derivado CHI-POE. Para este derivado, la utilización de un tampón fosfato a pH 7,4 (con [NaCl]=0,134M), en el que las repulsiones electroestáticas han disminuido en gran medida, favorece las asociaciones intercadenas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un derivado POEPOP-acetal termosensible que comprende las etapas sucesivas siguientes:

5

a. Reacción de una o varias polieteraminas estadísticas (POEPOP) de fórmula genérica (I)



10 en la que p representa un número entero comprendido entre 1 y 40, ventajosamente entre 3 y 29, y m representa un número entero comprendido entre 1 y 40, ventajosamente entre 1 y 31,

con el anhídrido succínico para conducir al ácido correspondiente;

15 b. Acoplamiento del ácido obtenido tras la etapa a) con la 2,2-dimetoxietilamina para conducir al derivado POEPOP-acetal buscado.

2. Procedimiento de preparación según la reivindicación 1, caracterizado porque el disolvente de la reacción utilizado en la etapa a) es la DMF anhidra.

20

3. Procedimiento de preparación según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque tras la etapa a) y previamente a la etapa b), el medio de reacción se deja bajo agitación.

25 4. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el disolvente de la reacción utilizado en la etapa b) es la DMF.

5. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la reacción de acoplamiento, etapa b), comprende asimismo la adición de 1-etil-3[3-(dimetilamino)propil]-carbodiimida y de diisopropiletilamina.

30

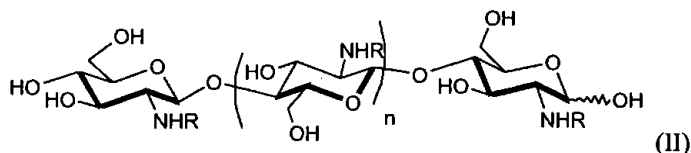
6. Procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las etapas a) y b) se llevan a cabo "en un solo bote".

35 7. Derivado POEPOP-acetal obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

8. Procedimiento de síntesis de quitosano injertado que comprende (i) una etapa de hidrólisis del derivado POEPOP-acetal según la reivindicación 7 en derivado POEPOP-CHO seguida (ii) de una etapa de injerto de dicho derivado POEPOP-CHO sobre el quitosano o uno de sus derivados mediante una reacción de tipo aminación reductora.

40

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho quitosano o uno de sus derivados responde a la fórmula (II) siguiente:



45

en la que n está comprendido entre 60 y 6.000 y R representa

- un átomo de hidrógeno H, o

50 - un radical acetilo COCH_3 , estando el grado de acetilación ventajosamente comprendido entre 0 y 0,5, más ventajosamente entre 0 y 0,2.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, caracterizado porque comprende una etapa suplementaria (iii) de funcionalización del derivado quitosano CHI-POEPOP obtenido tras la etapa (ii) por un polímero.

55

11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el derivado quitosano CHI-POEPOP está funcionalizado por un poli(óxido de etileno) que tiene ventajosamente una masa molecular comprendida entre 1.000 y 5.000 g/mol, siendo el grado de sustitución DS_2 superior a 0,1.
- 5 12. Derivado de quitosano CHI-POEPOP-POE susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11.
13. Composición acuosa que comprende por lo menos un derivado de quitosano CHI-POEPOP-POE según la reivindicación 12 y una fase acuosa.
- 10 14. Composición acuosa según la reivindicación 13, caracterizada porque el derivado de quitosano CHI-POEPOP-POE está presente en una cantidad comprendida entre 2 y 30 g/l.
- 15 15. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, caracterizada porque el pH de dicha composición acuosa está comprendido entre 4 y el pH fisiológico.
16. Composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende por otra parte un medio cosmética o farmacéuticamente aceptable.
- 20 17. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 para la fabricación de geles mediante calentamiento.

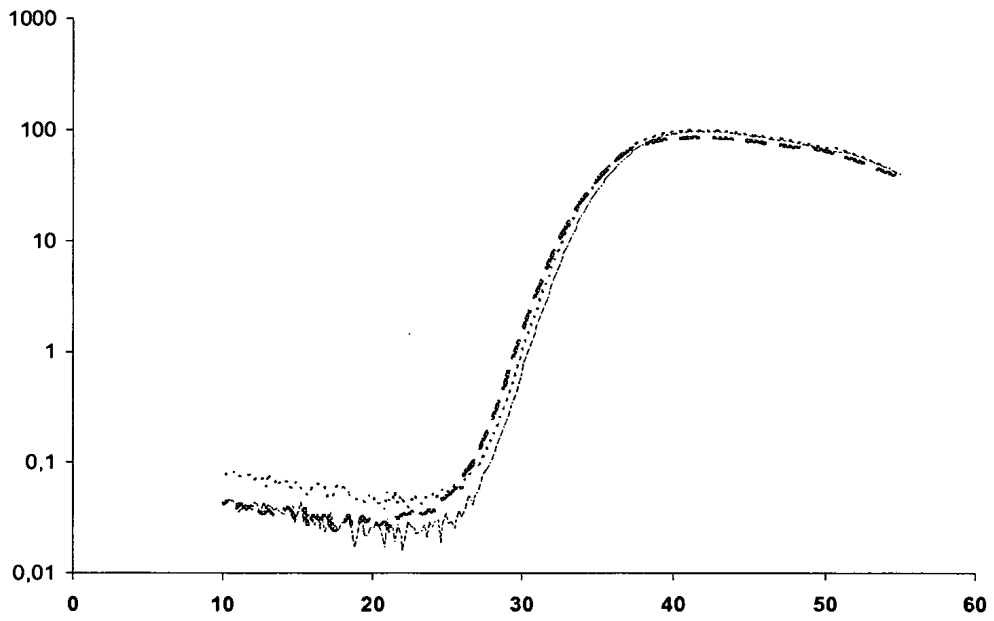


Fig. 1

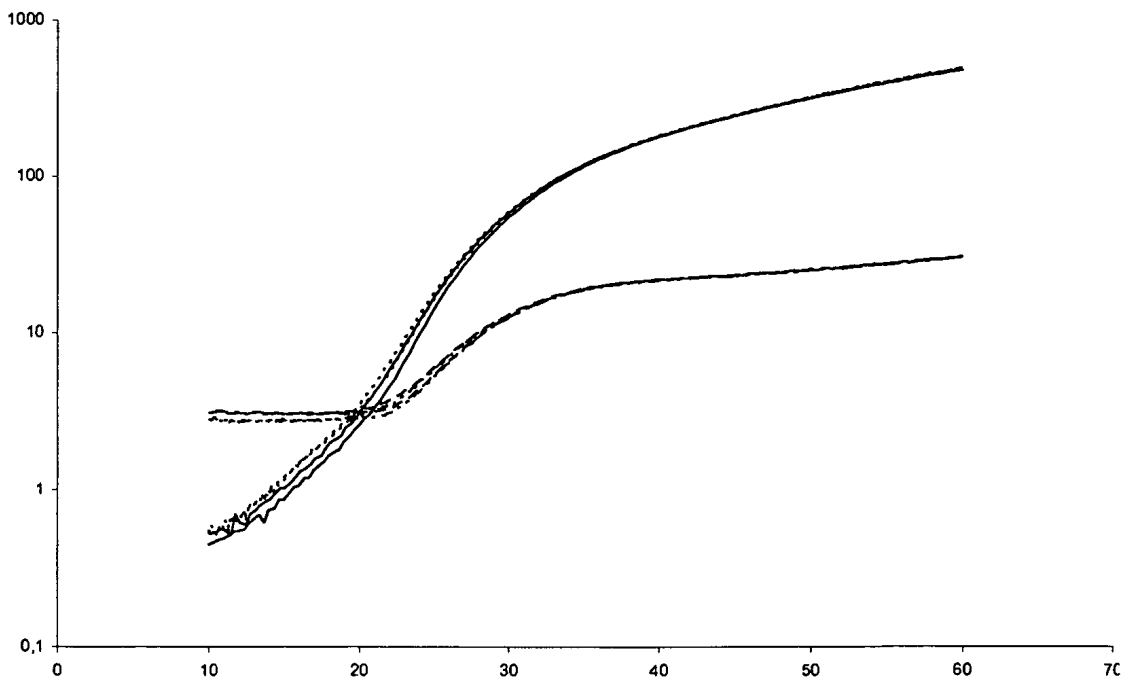


Fig. 2

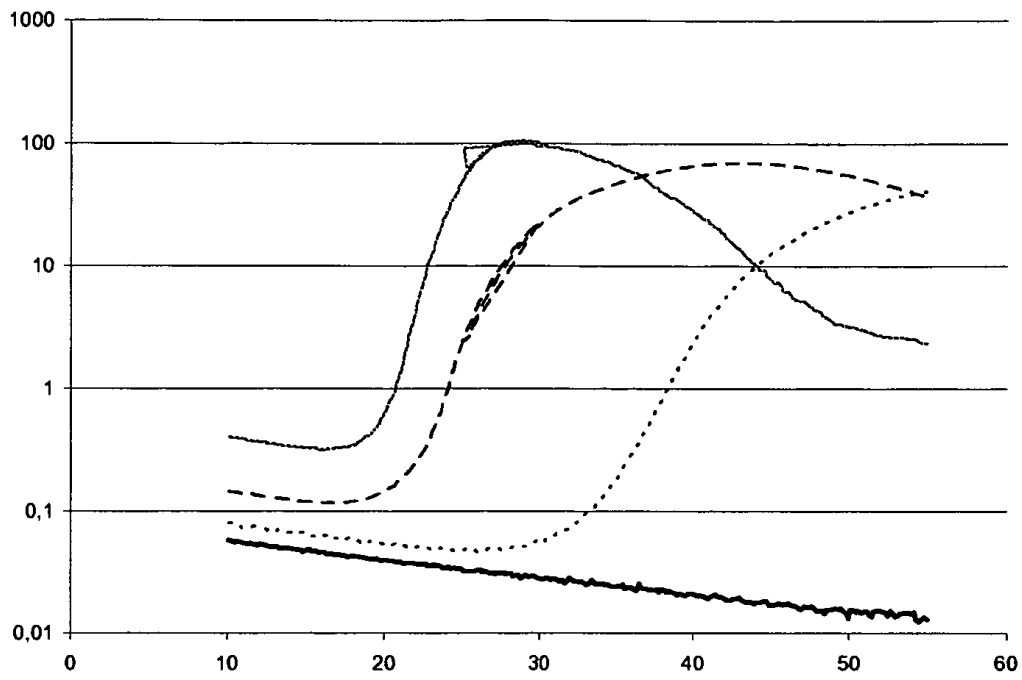


Fig. 3

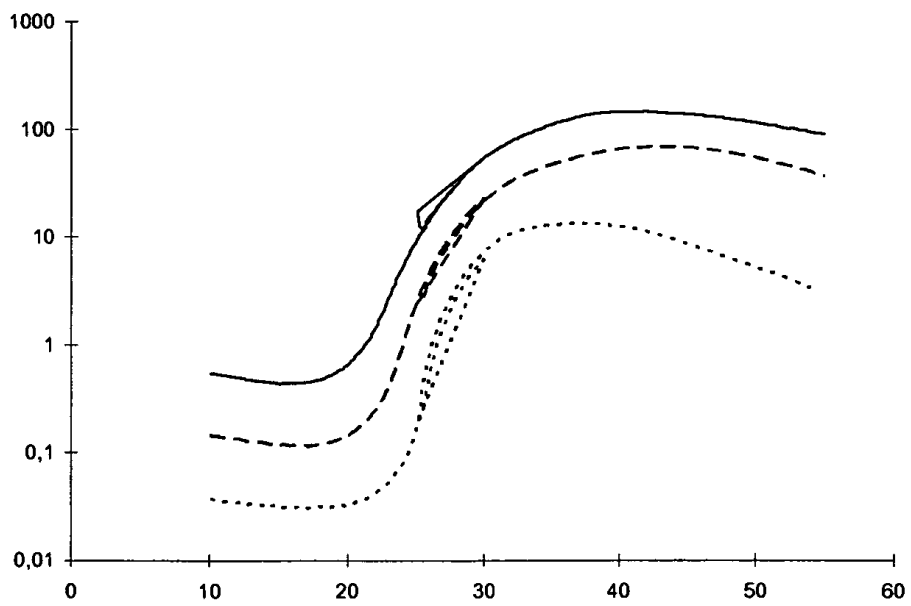


Fig. 4

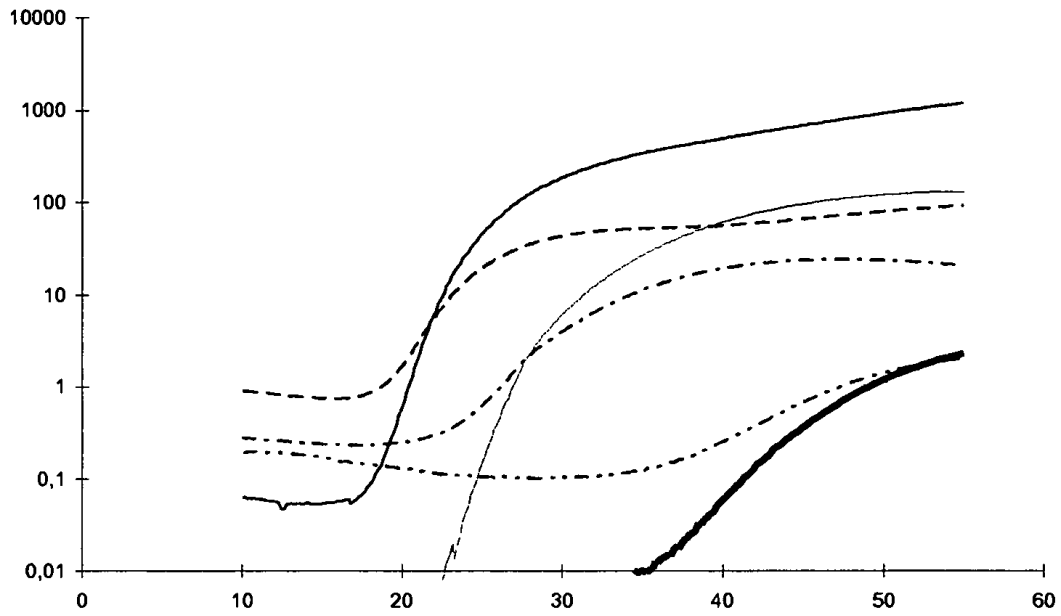


Fig. 5

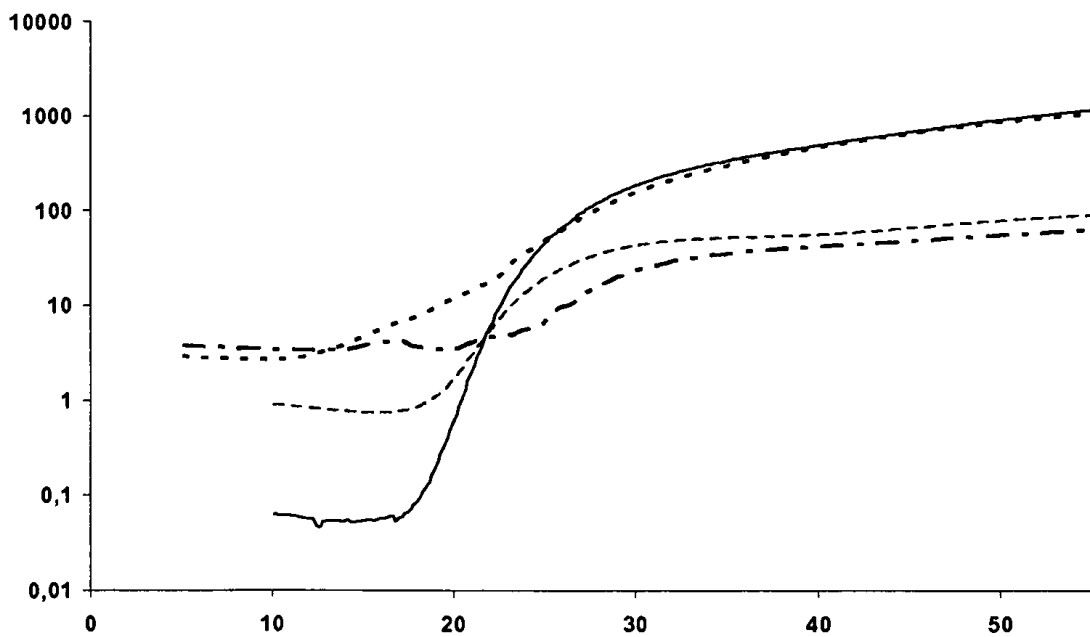


Fig. 6

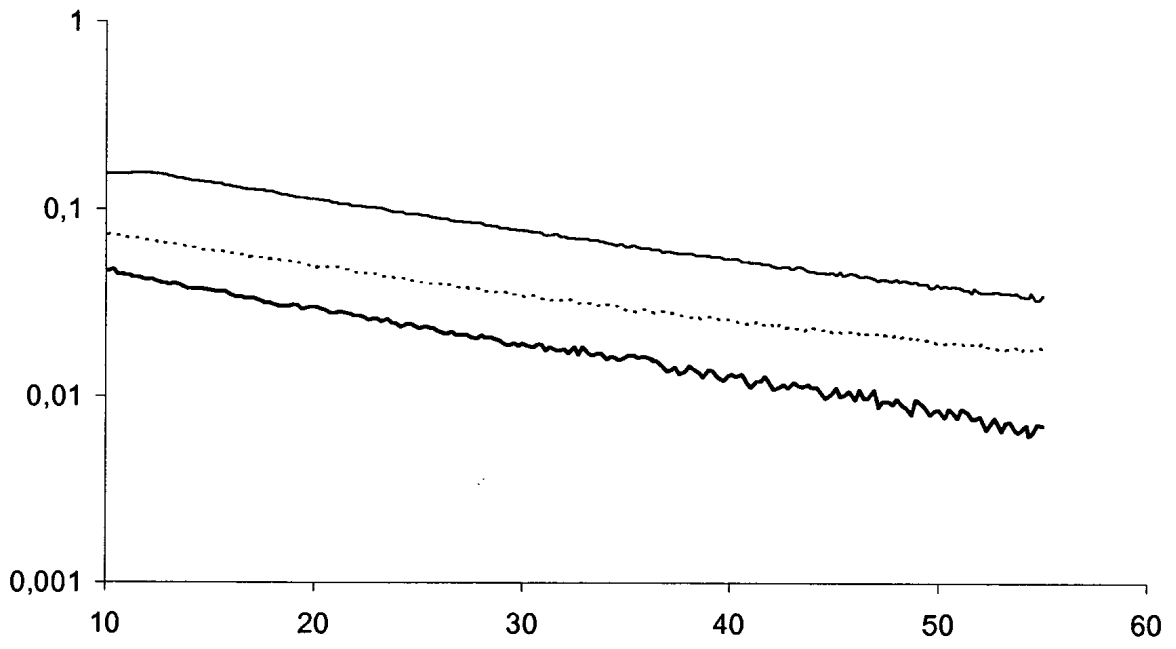


Fig. 7