

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 897**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08875391 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **24.08.2011 EP 2358758**

54 Título: **Hidrogel bioactivo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2013

73 Titular/es:

**ZETASCIENCE GMBH (100.0%)
Tatzberg 47
01307 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**WERNER, CARSTEN;
FREUDENBERG, UWE;
MEINHOLD, DORIT;
GOUZY, MARLE-FRANCOISE y
WELZEL, PETRA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 394 897 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

Hidrogel bioactivo

5 La invención se refiere a un hidrogel bioactivo, el cual puede emplearse como biomaterial para el reemplazo de tejido biológico, como material de implante o, en el sentido más amplio, en productos de medicina.

Por un biomaterial en el sentido de la invención han de entenderse materiales que son puestos en contacto con un organismo biológico en aplicaciones diagnósticas o terapéuticas. Estos materiales deben satisfacer requisitos especiales en relación con la biocompatibilidad. Por biocompatibilidad se ha de entender la ausencia de reacciones del organismo clínicamente significativas sobre el empleo de materiales, productos de medicina o sistemas médicos.

15 Hidrogeles bioactivos conformes al género expuesto se emplean con particular ventaja como materiales de reemplazo de implantes o tejidos.

En el estado conocido de la técnica se conocen diversas estrategias para crear hidrogeles bioactivos. Se investigaron diferentes materiales de implantes o de reemplazo de tejidos para su empleo en terapias regenerativas, por ejemplo para sustentar la regeneración de vasos sanguíneos y vías nerviosas o como materiales de reemplazo de la piel. Para ello, se desarrollaron materiales de estructura o de soporte, los denominados andamios, a base de componentes principales biológicos o sintéticos los cuales, después del trasplante, deben desempeñar funciones temporalmente importantes de la matriz extracelular EZM (siglas en alemán). Dentro de esta EZM existen células en tejidos naturales. La EZM es una red compleja supramolecular a base de diferentes proteínas estructurales, principalmente colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas y elastina, cuya constitución estructural y composición funcional es esencial para la conservación de la arquitectura normal del tejido así como para funciones específicas para los tejidos.

Según el estado actual de la ciencia, para los procesos regenerativos arriba abordados se emplean los denominados andamios que para las células relevantes para los procesos de regeneración ejercen de forma primaria una función de soporte y sustentación y garantizan la protección frente a una sollicitación mecánica.

A partir del documento US 6.306.922 A y el documento US 6.602.975 se conoce, por ejemplo, emplear materiales fuertemente hidratados, los denominados hidrogeles a base de componentes principales sintéticos o biológicos, que son degradables en el cuerpo a lo largo de prolongados espacios de tiempo sin un efecto dañino para las células.

Con el fin de poder sustentar también procesos multicelulares complejos, se desarrollaron para ello también mezclas a base de componentes de la EZM natural o también materiales para la unión reversible y liberación de moléculas señales terapéuticamente relevantes. Para las funciones mencionadas en último lugar se desarrollaron también combinaciones a base de componentes sintéticos y basados en polisacáridos de la EZM natural, las cuales aprovechan la afinidad particular de estas moléculas por importantes moléculas señal, por ejemplo factores de crecimiento.

A partir de Yamaguchi N et al: "Polysaccharide-poly(ethylene glycol) star copolymer as a scaffold for the production of bioactive hydrogels" BIOMACROMOLECULES JULIO/AGOSTO 2005 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY US, tomo 6, Nº 4, julio de 2005 (07-2005), páginas 1921-1930, XP002539059' y a partir de ZHANG L ET AL: "Manipulation of hydrogel assembly and growth factor delivery via the use of peptide-polysaccharide interactions" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, tomo 114, Nº 2, 28 de agosto de 2006 (28-08-2006), páginas 130-142, XP024957584 ISSN: 0168-3659' así como a partir de SEAL ET AL: "Physical matrices stabilized by enzymatically sensitive covalent crosslinks" ACTA BIOMATERIALIA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, tomo 2, Nº 3, 1 de mayo de 2006 (01-05-2006), páginas 241-251, XP005394598 ISSN: 1742-7061 se conoce el enlace no covalente de polietilenglicol y heparina.

En NIE ET AL: "Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, tomo 122, Nº 3, 18 de septiembre de 2007 (18-09-2007), páginas 287-296, XP022336560 ISSN: 0168--3659, heparina y polietilenglicol están unidos a través de una reacción de Michael de PEG SH-funcionalizado y heparina.

Además, a partir del documento WO 2006/034467 A (JULIAZ INC [US]; HNOJEWYJ OLEXANDER [US]) 30 de marzo de 2006 (30-03-2006) se desprende un PEG activado y una heparina que contiene un componente y un PEG amino-funcional.

El documento WO 2007/127198 A (INCEPT LLC [US]; PATHAK CHANDRASHEKHAR P [US]; SAWHNEY AMARPREET S [US]) 8 de noviembre del 2007 (08-11-2007) se refiere a un gel, obtenido a partir de un PEG, heparina y un éster NHS de hidroxilaminosuccinato.

5 El documento WO 2008/108736 A (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]; YING JACKIE Y [SG]; WAN ANDREW CA [SG]) 12 de septiembre de 2008 (12-09-2008) da a conocer heparina y polietilenglicol, los cuales están unidos a través de una reacción de Michael de heparina SH-funcionalizada y PEG-vinilsulfona.

10 Lo desventajoso de los materiales conocidos en el estado de la técnica es que las complejas misiones terapéuticas de los hidrogeles conocidos no se resuelven de manera lo suficientemente eficaz en todas las exigencias.

Además, la mayoría de los materiales hasta ahora descritos, en virtud de una química de reticulación limitante o del uso exclusivo de sustancias naturales, están limitados a un estrecho intervalo en sus propiedades físicas, en particular en sus propiedades mecánicas en relación con rigidez y expansión.

15 La misión de la invención consiste en proporcionar un material fuertemente hidratado y a modo de gel con propiedades físicas y bioquímicas graduales de forma pre-establecida y un procedimiento para la preparación de un material de este tipo.

20 En tal caso, el material debe ser degradable y biocompatible a largo plazo en el cuerpo, sin productos de disociación tóxicos.

Además de ello, el material debería ofrecer una posibilidad de configurar todas las funciones importantes de la matriz extracelular natural de forma modular, es decir, ampliamente independientes una de otra.

25 Las misiones que se deducen de ello son, en particular:

- mejorar la función de la estructura, sustentación y protección para células en desarrollo, en función del sector de aplicación,
- posibilitar el control de la adhesión celular,
- 30 • posibilitar la unión reversible y la liberación de moléculas señal terapéuticamente relevantes y
- crear la posibilidad de la reconstrucción adaptada a las necesidades mediante células en desarrollo.

El problema de la invención se resuelve mediante un hidrogel bioactivo en calidad de material híbrido a base de heparina y polietilenglicol funcionalizado en los grupos extremos y ramificado en forma de estrella, estando la heparina unida directamente mediante grupos carboxilo de la heparina activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) con los grupos amino en posición terminal del polietilenglicol de forma covalente mediante enlaces amida.

40 Alternativamente, el problema se resuelve mediante un hidrogel bioactivo en calidad de material híbrido a base de heparina y polietilenglicol funcionalizado en los grupos extremos y ramificado en forma de estrella, estando la heparina unida de forma covalente con el polietilenglicol a través de cortas secuencias de péptidos disociables con enzimas en calidad de molécula de reticulación.

45 En este caso, son posibles dos vías:

la primera vía discurre a través de la funcionalización del PEG, teniendo lugar la funcionalización del polietilenglicol con secuencias de péptidos disociables con enzimas mediante reacción del grupo carboxilo activado con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) en el extremo C del péptido con los grupos amino del polietilenglicol y, a continuación, tiene lugar la formación del gel propiamente dicha mediante reacción del grupo amino en el extremo N del péptido unido con el PEG con los grupos carboxilo de la heparina activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS).

55 La segunda vía discurre a través de la funcionalización de la heparina, en donde la funcionalización de la heparina tiene lugar con secuencias de péptidos disociables con enzimas mediante reacción de los grupos carboxilo de la heparina activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) con el grupo amino en el extremo N del péptido y, a continuación, tiene lugar la formación del gel propiamente dicha mediante reacción de la heparina funcionalizada con los péptidos, al reaccionar el grupo carboxilo activado mediante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) en el extremo C del péptido con los grupos amino del PEG.

Ejecuciones secundarias de la invención consisten en proporcionar una lámina a base de los hidrogeles de acuerdo con la invención, la cual puede obtenerse mediante

- injerto de una cantidad definida de materiales de gel líquidos sobre superficies de soporte hidrofobizadas, en particular cubreobjetos u obleas de silicio,
- formación del gel después de cubrir la superficie de soporte con soporte de vidrio hidrofobizado u obleas de silicio,
- transferencia de las superficies de soporte a una disolución de lavado, y
- separación de las láminas después de la expansión de los hidrogeles.

Las láminas generables presentan, en ejecuciones preferidas, un grosor de 80 a 2000 μm , pudiendo crearse también láminas con grosores de varios milímetros a base de este material y según el procedimiento indicado.

En calidad de disolución de lavado se emplea ventajosamente PBS.

Otra aplicación que resulta de la invención consiste en que se pueden producir cuerpos moldeados tubulares en forma de cilindro hueco a partir de hidrogeles de acuerdo con la invención con una longitud de hasta 7 cm y un diámetro interno de 0,1 a 0,8 mm.

Las estructuras tubulares se obtienen, por ejemplo, cuando en una manguera de forma capilar a base de celulosa reconstituida se inyecta además un hidrogel líquido y, a continuación, se introduce un espaciador en la manguera, tras lo cual se forma el hidrogel bioactivo y, a continuación, se retira el espaciador.

Otra aplicación de la invención consiste en un soporte de cultivo celular con un hidrogel de acuerdo con la invención, el cual se caracteriza porque el hidrogel está acoplado de forma covalente a través de capas delgadas de polímero reactivas a base de copolímeros de MSA alternantes, llevándose a cabo la formación de gel en presencia de soportes inorgánicos revestidos con polímero con contenido en grupos anhídrido, y uniendo los hidrogeles al soporte inorgánico a través de los grupos amino del polietilenglicol en forma de estrella.

El procedimiento para la producción de hidrogel bioactivo de acuerdo con la invención se caracteriza porque

- a) se disuelven por separado los componentes heparina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida EDC, N-hidroxisulfosuccinimida s-NHS y polietilenglicol en forma de estrella (star-PEG), tras lo cual
- b) se mezclan EDC y s-NHS en calidad de reactivos de activación para los grupos carboxilo de la heparina, en donde
- c) la heparina es activada mediante la adición de EDC y s-NHC, y porque seguidamente
- d) se añade PEG en forma de estrella y se homogeneiza la mezcla,
- e) a continuación, tiene lugar la formación del gel, en donde
- f) a continuación de la formación del gel, se lava el gel formado.

Una ejecución ventajosa del procedimiento consiste en que

- a) los componentes heparina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida EDC, N-hidroxisulfosuccinimida s-NHS y polietilenglicol en forma de estrella (star-PEG) se disuelven por separado en agua desionizada a 4°C, tras lo cual
- b) EDC y s-NHS se mezclan, en calidad de reactivos de activación para los grupos carboxilo de la heparina, en la relación 2 a 1, en donde
- c) la activación de la heparina tiene lugar después de la adición de EDC y s-NHS a lo largo de 15 min a 4°C, y porque, a continuación,
- d) se añade star-PEG y la mezcla se homogeneiza a 8°C a lo largo de 15 min, y
- e) la formación del gel tiene lugar a lo largo de un espacio de tiempo de 1 a 14 h a la temperatura ambiente, en donde
- f) a continuación, el gel formado se lava con disolución de sal de cocina tamponada con fosfato o, alternativamente, en disoluciones salinas de carácter ácido o básico y en disolución de sal de cocina tamponada con fosfato.

Preferiblemente, la relación de EDC y s-NHS, referida a los grupos amino del star-PEG, asciende a 1,75 hasta 1, ascendiendo la relación de polietilenglicol en forma de estrella a heparina a 1 hasta 1 a 6 hasta 1.

El procedimiento para la producción de los hidrogeles se perfecciona ventajosamente debido a que el hidrogel se modifica, después de la etapa f) del procedimiento con una proteína de adhesión, siendo activado el hidrogel lavado

con una disolución a base de EDC/s-NHS en tampón fosfato 1/15 M con pH = 5 a lo largo de 30 min a 4°C, tras lo cual la disolución se intercambia por una disolución que contiene 0,2 mg/ml de péptido RGD en calidad de proteína de adhesión, a base de tampón borato 100 mM con pH = 8 y se inmoviliza durante 2 h a la temperatura ambiente, tras lo cual el hidrogel modificado se aclara de nuevo con PBS.

5 En calidad de péptido RGD se emplea ventajosamente cicloRGDyK en calidad de proteína de adhesión.

Un perfeccionamiento ventajoso del procedimiento consiste, además, en que el hidrogel es cargado con los factores de crecimiento, factor de crecimiento de fibroblastos básico b-FGF y factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, incubándose los hidrogeles con una disolución de b-FGF o VEGF con una concentración de 1-5 µg/ml en PBS a lo largo de 4 a 24 h, a la temperatura ambiente y, a continuación, lavando en PBS.

10 La concepción de la invención consiste en concebir las propiedades deseadas de los hidrogeles mediante la síntesis de un material híbrido a base de un componente biológicamente activo - el componente heparina de la EZM natural - y un polietilenglicol funcionalizado en los grupos extremos sintético y ramificado en forma de estrella (star-PEG). Estos dos componentes forman la estructura del esqueleto, el andamio propiamente dicho.

15 En función de la aplicación, estos dos componentes principales se unen directamente mediante grupos carboxilo de la heparina, activados mediante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS), y los grupos amino en posición terminal del star-PEG de forma covalente mediante enlaces amida.

20 Alternativamente, se emplea la química de acoplamiento análoga con el fin de unir cortas secuencias de péptidos disociables con enzimas como molécula de reticulación entre star-PEG y heparina. En este caso, la ventaja radica en la síntesis de una red unida de forma covalente entre sí a base de star-PEG y heparina, la cual puede ser degradada localmente mediante la actividad enzimática de células individuales mediante disociación de los puentes péptido. Con ello, se hace posible una reconstrucción parcial y un reemplazo de la matriz sintética por material segregado por las células, además existe la posibilidad de que las células migren al material y que se reúnan con el fin de formar estructuras terapéuticamente importantes, por ejemplo vasos sanguíneos capilares.

25 Independientemente del tipo de reticulación - ya sea directamente entre heparina y star-PEG o a través de las secuencias de péptidos disociables - se pueden variar las propiedades físicas del andamio a lo largo de un amplio intervalo.

30 La adhesión celular de los materiales se controla mediante la modificación preestablecida de la heparina con cortas secuencias de péptidos, por ejemplo mediante secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico-(RGD) ligantes de integrina.

35 El componente biofuncional, la heparina, se emplea junto al control de la adhesión celular, también para la unión y liberación controlada de moléculas señal, terapéuticamente relevantes, por ejemplo factores de crecimiento. La elevada afinidad, generalmente conocida, de la heparina fuertemente cargada de forma negativa por una pluralidad de factores de crecimiento tales como, por ejemplo, bFGF y VEGF, posibilita la unión electrostática reversible e idéntica a la naturaleza y la liberación de estas moléculas señal, importantes para una pluralidad de procesos regenerativos. Se puede influir sobre la carga y liberación en tal caso, en cierta medida, a través de la estructura de la red caracterizada por la anchura de la malla y el grado de reticulación de los materiales del hidrogel.

40 Es particularmente ventajoso que todos los componentes sean, además, biológicamente degradables por completo y que PEG y heparina estén admitidos para su empleo terapéutico en el hombre, por ejemplo ante la Administración de Admisión de Medicamentos Americana "Food and Drug Administration (FDA).

45 Las ventajas de la invención se pueden representar recopiladas como sigue:

50 Como propiedad clave y, por consiguiente, ventaja decisiva frente a los materiales actualmente disponibles, los hidrogeles de acuerdo con la invención pueden reproducir las importantes funciones de la EZM carentes, mencionadas como inconvenientes del estado conocido de la técnica.

55 El andamio de los hidrogeles de acuerdo con la invención, variable a lo largo de un amplio intervalo en sus propiedades físicas tales como, por ejemplo, rigidez e hidratación, forma la función de estructura, apoyo y protección para células en desarrollo. En virtud del amplio intervalo de la rigidez, los materiales son mínimamente invasivos mediante inyección o trasplantables en forma de cuerpos moldeados y funcionales prefabricados.

La variación de las propiedades físicas tiene lugar de forma preestablecida a través de la calidad y cantidad de los puntos de acoplamiento dentro de la red de los hidrogeles. En tal caso, la calidad del acoplamiento se determina, conforme a la concepción, a través de los mecanismos de acoplamiento utilizados o bien a través de los componentes modificados, mientras que, por el contrario, la cantidad de acoplamiento se determina a través de las relaciones de los componentes entre sí y los parámetros de la activación.

La resistencia de materiales de PEG generalmente conocida frente a la adsorción no específica de proteínas reduce interacciones no controladas y no deseadas con biomoléculas, mientras que la interacción con las células terapéuticamente activas y microorganismos puede controlarse y regularse mediante la modificación preestablecida con proteínas de adhesión celular (péptidos RGD). La presentación adecuada de la heparina en la red posibilita la unión reversible y la liberación de moléculas señales terapéuticamente relevantes, y la posibilidad de la reconstrucción adaptada a las necesidades por parte de células en desarrollo se realiza a través de la reticulación por parte de puentes de péptidos enzimáticamente disociables.

Una ventaja esencial estriba, además, en el carácter modular de los hidrogeles. Junto a la amplia variación de las propiedades físicas a través del grado de reticulación, también es posible modular la biofuncionalización, así, por ejemplo, se pueden variar, independientemente entre sí y dentro de amplios intervalos, el control de la adhesión celular a través de péptidos RGD, la reticulación directa o la reticulación con péptidos disociables con enzimas y la carga con factores de crecimiento.

A partir de las propiedades resulta que los biogeles hidroactivos se pueden emplear a largo plazo en espacios de tiempo de varias semanas hasta meses.

En función del sector de empleo, a través de la variación de la relación de los componentes entre sí y la variación de los parámetros del procedimiento para diferentes tipos de tejidos pueden crearse de forma predeterminada diferentes propiedades físicas con el fin de cultivar adecuadamente las células propias del cuerpo a acumular o a migrar. Esto se observa de forma particularmente clara si se consideran, por ejemplo, los requisitos establecidos a células nerviosas o musculares. Por este motivo, es ventajoso que los materiales de implante presenten propiedades graduables a lo largo de un amplio intervalo.

A diferencia del estado conocido de la técnica, la combinación de la posibilidad de la reconstrucción de las estructuras moleculares mediante células en desarrollo y la unión natural de las moléculas señal, en particular de los factores de crecimiento, al componente bioactivo heparina es una etapa de desarrollo decisiva. La ventaja se alcanza en los hidrogeles de acuerdo con la invención debido a que se da la posibilidad para la reconstrucción adaptada a las necesidades mediante células migratorias análogamente a los mecanismos naturales en la EZM, dado que las moléculas señal están unidas de forma reversible.

Sectores de aplicación particularmente preferidos de los hidrogeles de acuerdo con la invención son el empleo como materiales de implante en terapias regenerativas, por ejemplo para sustentar la regeneración de vasos sanguíneos por medio de geles inyectables, para vías nerviosas tanto del sistema nervioso central como también periférico en forma de estructuras tubulares y como material de reemplazo temporal de la córnea en el caso del empleo de láminas.

Otras particularidades, características y ventajas de la invención resultan de la descripción siguiente de ejemplos de realización con referencia al dibujo correspondiente.

En la Fig. 1 está dibujada una representación esquemática del hidrogel sintético a base de heparina y polietilenglicol funcionalizado en los extremos con amino y ramificado en forma de estrella.

El polietilenglicol 1 funcionalizado en los extremos con amino y ramificado en forma de estrella está unido a modo de red en cada caso con moléculas de heparina 2 a través de secuencias de péptidos 5 disociables enzimáticamente. Las moléculas de heparina 2 presentan, además, péptidos RGD 3, es decir, secuencias de arginina-lisina-ácido aspártico-(RGD) ligantes de integrina. Además, se representan esquemáticamente diferentes moléculas señal 4 acopladas a la heparina 2.

El procedimiento base para la producción de hidrogel bioactivo se puede describir como sigue:

Los componentes heparina, EDC, s-NHS y star-PEG se disuelven por separado en agua desionizada sobre hielo a 4°C. La relación de los reactivos de activación para los grupos carboxilo de la heparina es EDC a s-NHS igual a 2 a

1. Después de la disolución, el complejo EDC/s-NHS se añade a la heparina, y los grupos carboxilo de la heparina se activan durante 15 min a 4°C. A continuación, se añade el star-PEG y se homogeneiza la mezcla a 8°C durante 15 min (a 900 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Alemania). A continuación, tiene lugar la formación ulterior de gel a lo largo de un espacio de tiempo de 1 a 14 h a la temperatura ambiente, seguida de varias etapas de lavado (al menos 5 veces durante un espacio de tiempo de 1 h) en PBS – alternativamente los geles acabados se aclaran de forma alternante en disoluciones salinas de carácter ácido o básico y en PBS.

Alternativamente, con péptidos disociables con enzimas se emplean star-PEG funcionalizado o heparina para la reticulación; el proceso técnico es análogo al procedimiento precedentemente descrito.

El transcurso del procedimiento base precedentemente descrito se puede ahora modificar en cada caso bajo condiciones marco específicas con el fin de crear de forma deliberada determinadas propiedades de los hidrogeles.

(A) Se sintetizan hidrogeles según el procedimiento base mediante reacción directa de grupos carboxilo activados por EDC (Sigma–Aldrich, München, Alemania) /s-NHS (Sigma-Aldrich, München, Alemania) de la heparina (PM 14.000, Calbiochem (Merck) Darmstadt, Alemania) con los grupos amino del star-PEG (PM 10.000, Polymer Source, Inc., Dorval, Canadá). EDC/s-NHS se emplea, referido a los grupos amino del star-PEG, en la relación EDC 1,75 a 1 grupo amino.

La relación entre heparina y star-PEG decide en tal caso el grado de reticulación y, por consiguiente, las propiedades físicas de los materiales de gel resultantes. Para ello, se emplean relaciones molares de star-PEG a heparina de 1 a 1 hasta 6 a 1. Derivada de estas relaciones molares se encuentra la denominación de los geles en la Fig. 2 con tipo 1 a tipo 6.

Las propiedades físicas que resultan de la variación de las relaciones se pueden deducir de forma significativa con ayuda de la representación en la Fig. 2.

(BI) Según una ejecución adicional de la invención se producen hidrogeles según el procedimiento base, la cual se diferencia de la ejecución en (A) por la heparina empleada. En lugar de heparina de PM 14.000 se emplea una heparina con una longitud de cadena más corta de PM 4.000 (Sigma-Aldrich, München, Alemania).

(C) En esta ejecución de la invención se producen hidrogeles según el procedimiento base que se diferencian de (A) de nuevo por la heparina empleada. En lugar de heparina de PM 14.000 no modificada se emplea una heparina enzimáticamente disociable y modificada con secuencias de péptidos. Las secuencias de péptidos enzimáticamente disociables se caracterizan según el código de una letra: GPQG↓IAQG o GPQG↓IWGQ, y se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida.

(D) En esta forma de realización, el hidrogel se prepara según el procedimiento base, el cual se diferencia de la ejecución en (A) asimismo por la heparina empleada. En lugar de heparina no modificada de PM 14.000 se emplea una heparina modificada con proteína de adhesión (secuencia: cicloRGDyK, Peptides International, Louisville, KY, EE.UU.).

(E) El hidrogel se produce de nuevo según el procedimiento base, diferenciándose las ejecuciones (A a D) por el star-PEG empleado. En este caso, en lugar de star-PEG de PM 10.000 se emplea un star-PEG con una masa molar de PM 19.000 (Polymer Source, Inc., Dorval, Canadá).

Una variante de esta ejecución estriba en que en lugar de PEG de PM 10.000/19.000 no modificado se emplea un star-PEG modificado - con secuencias de péptidos enzimáticamente disociables. Las secuencias de péptidos enzimáticamente disociables se caracterizan por el código de una sola letra: GPQG↓IAQG o GPQG↓IWGQ, y se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida.

(F) Según otra ejecución, los hidrogeles se producen según las realizaciones (A, B, C y E) que, después de la etapa de lavado, son modificados posteriormente con proteínas de adhesión (en general, péptido RGD, ejemplo cicloRGDyK). Para ello, los materiales de gel lavados son activados con una disolución a base de EDC/s-NHS en tampón fosfato 1/15 M (pH = 5) durante 30 min a 4°C. A continuación, la disolución se intercambia por una disolución que contiene 0,2 mg/ml (cicloRGDyK) a base de tampón borato 100 mM (pH = 8) y se inmoviliza durante 2 h a la temperatura ambiente. Como etapa final, los materiales se aclaran de nuevo varias veces con PBS.

(G) Todos los hidrogeles de las ejecuciones (A a F) se cargan, según otra ejecución ventajosa, a continuación con factores de crecimiento (b-FGF o VEGF). Para ello, los materiales de gel se incuban con b-FGF o VEGF (1-5 µg/ml) disueltos en PBS durante 4 a 24 h a la temperatura ambiente. A continuación, los materiales se lavan en PBS.

5 (H) Los hidrogeles de los tipos 1, 2, 3 y 4 se pueden inyectar, en virtud del escaso grado de reticulación, mediante una jeringa de calibre 27 usual en el comercio.

(I) Los hidrogeles de los tipos 5 y 6 según los ejemplos de realización (A a G) son adecuados, en virtud de su rigidez, también para la fabricación de cuerpos moldeados. Se pueden crear estructuras tubulares de hasta 7 cm de longitud y un diámetro interno de 0,3 a 0,8 mm.

(J) En otra ejecución para la creación de estructuras tubulares, éstas se crean en forma de un sistema híbrido a base de una manguera y materiales de gel de los tipos 1 a 6 conforme a los ejemplos de realización (A a G). Para ello, una manguera capilar (por ejemplo de celulosa reconstituida) con diámetros internos en el intervalo de 0,3 a 0,8 mm se carga mediante inyección con los materiales de gel mezclados finales, todavía líquidos y, a continuación, se introduce en el interior un espaciador (por ejemplo, una varilla de vidrio con un diámetro externo en el intervalo de 0,2 a 0,5 mm). Después de la formación de gel, los sistemas híbridos se expanden y se retira el espaciador del interior. Se forman tubos híbridos a base de un material de soporte de manguera y el hidrogel en el interior. La ventaja de este sistema híbrido radica en la posibilidad de utilizar todos los tipos de gel en el interior, también tipos de gel con escaso módulo de memoria o bien escasa rigidez.

(K) Una aplicación alternativa adicional de los hidrogeles se encuentra en láminas con un grosor de aproximadamente 80 a 2000 µm. Se crean diámetros de 15 a 25 mm a partir de los geles de los tipos 5 o 6 de los ejemplos de realización (A a G) mediante adición por goteo de una cantidad definida de materiales de gel líquidos sobre cubreobjetos u obleas de silicio hidrofobizados que, a continuación, se cubren de nuevo mediante cubreobjetos/obleas de silicio hidrofobizados. Después de la formación del gel, los cubreobjetos se transfieren a PBS y, así, se pueden retirar fácilmente mediante expansión.

(L) Los materiales de gel de los tipos 1 a 6 de los ejemplos de realización (A a G) se acoplaron de forma covalente para soportes de cultivos celulares 2D a través de capas delgadas de polímero, reactivas (copolímeros de MSA alternantes). Para ello, la formación de gel se lleva a cabo en presencia de soportes inorgánicos revestidos con polímeros y que contienen grupos anhídrido y, por consiguiente, los materiales de gel se unen a los soportes inorgánicos a través de los grupos amino del star-PEG.

35 Las ventajas y la actividad de las ejecuciones divulgadas se verificaron experimentalmente.

Los materiales obtenidos según las distintas ejecuciones de la invención permiten, en virtud del tipo de unión química, la graduación de las propiedades físicas a lo largo de un amplio intervalo. El módulo de almacenamiento, como un parámetro clave para la descripción de la rigidez de los materiales y el grado de expansión de los materiales se puede graduar en función del grado de reticulación a lo largo de un amplio intervalo mediante variación de parámetros individuales. En la Figura 2 se representa el módulo de almacenamiento en función del tipo de las distintas ejecuciones de hidrogeles.

El módulo de almacenamiento se determinó con mediciones oscilantes en geles expandidos en PBS en un reómetro rotatorio de la razón social ARES (ARES LN2, TA Instruments, Eschborn, Alemania). Como geometría pasó a emplearse una disposición de placa/placa (diámetro de las placas 25 mm, la separación entre ellas se encontraba en un intervalo de 1,2 a 1,5 mm). Las mediciones se realizaron a 25°C en un intervalo de frecuencias de 10+2 – 10-1 rad x s⁻¹. La amplitud de la deformación se estableció en 3%. El módulo de almacenamiento se midió como una función de la frecuencia de cizalla. Los valores medios del módulo de almacenamiento en el intervalo de frecuencias entre 100 - 101 rad x s⁻¹ se determinaron a partir de al menos 3 mediciones independientes.

LISTA DE SÍMBOLOS DE REFERENCIA

- | | |
|------|--|
| 1 | polietilenglicol en forma de estrella, (PEG), star-PEG |
| 55 2 | heparina |
| 3 | secuencias de arginina-glicina-ácido aspártico-(RGD) ligantes de integrina |
| 4 | moléculas señales |
| 5 | secuencias de péptidos enzimáticamente dissociables |

Abreviaturas en la memoria descriptiva

EZM	matriz extracelular
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
5 s-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos básico
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
PBS	disolución salina tamponada con fosfato
PEG	polietilenglicol

REIVINDICACIONES

- 1.- Hidrogel bioactivo en calidad de material híbrido a base de heparina y polietilenglicol funcionalizado en los grupos extremos y ramificado en forma de estrella, estando la heparina unida directamente mediante grupos carboxilo activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) con los grupos amino en posición terminal del polietilenglicol de forma covalente mediante enlaces amida.
- 2.- Hidrogel bioactivo en calidad de material híbrido a base de heparina y polietilenglicol funcionalizado en los grupos extremos y ramificado en forma de estrella, estando la heparina unida de forma covalente con el polietilenglicol a través de cortas secuencias de péptidos disociables con enzimas en calidad de molécula de reticulación.
- 3.- Hidrogel bioactivo según la reivindicación 2, caracterizado porque la funcionalización del polietilenglicol tiene lugar con secuencias de péptidos disociables con enzimas mediante reacción del grupo carboxilo activado con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) en el extremo C del péptido con los grupos amino del polietilenglicol, y porque, a continuación, se forma el gel mediante reacción del grupo amino en el extremo N del péptido unido con el PEG con los grupos carboxilo de la heparina activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS).
- 4.- Hidrogel bioactivo según la reivindicación 2, caracterizado porque la funcionalización de la heparina tiene lugar con secuencias de péptidos disociables con enzimas mediante reacción de los grupos carboxilo de la heparina activados con 9-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) con el grupo amino en el extremo N del péptido y porque, a continuación, tiene lugar la formación del gel mediante reacción de la heparina funcionalizada con los péptidos, al reaccionar el grupo carboxilo activado mediante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/s-NHS) en el extremo C del péptido con los grupos amino del PEG.
- 5.- Hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque como secuencia de péptidos corta se emplea arginina-glicina-ácido aspártico ligante de integrina.
- 6.- Hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque moléculas señales están acopladas de forma electrostáticamente reversible a la heparina.
- 7.- Hidrogel bioactivo según la reivindicación 6, caracterizado porque como moléculas señales están acoplados de forma electrostáticamente reversible a la heparina factores de crecimiento.
- 8.- Hidrogel bioactivo según la reivindicación 7, caracterizado porque como factores de crecimiento están acoplados a la heparina de forma electrostáticamente reversible bFGF o VEGF.
- 9.- Hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la heparina se emplea con una longitud de cadena de PM 4.000 a 14.000.
- 10.- Hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se emplea star-PEG con una masa molar de PM 10.000 a 19.000.
- 11.- Hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque como heparina se emplea una heparina modificada con secuencias peptídicas de la forma GPQG↓IAGQ o GPQG↓IWGQ disociables enzimáticamente.
- 12.- Hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque como heparina se emplea una heparina modificada con la proteína de adhesión de la secuencia cicloRGDyK.
- 13.- Láminas a base de hidrogeles según una de las reivindicaciones 1 a 12, que se pueden obtener mediante
- injerto de una cantidad definida de materiales de gel líquidos sobre superficies de soporte hidrofobizadas,
 - formación del gel después de cubrir la superficie de soporte con una superficie de cubrición hidrofobizada,
 - transferencia de las superficies de soporte a una disolución de lavado, y
 - separación de las láminas de las superficies de soporte después de la expansión de los hidrogeles.

- 5 14.- Soporte de cultivo celular con un hidrogel según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el hidrogel está acoplado de forma covalente a través de capas delgadas de polímero reactivas a base de copolímeros de MSA alternantes, llevándose a cabo la formación de gel en presencia de soportes inorgánicos revestidos con polímero con contenido en grupos anhídrido, y uniendo los hidrogeles al soporte inorgánico a través de los grupos amino del star-PEG.
- 10 15.- Procedimiento para la producción de hidrogel bioactivo según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que
a) se disuelven por separado los componentes heparina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida EDC, N-hidroxisulfosuccinimida s-NHS y polietilenglicol en forma de estrella, star-PEG, tras lo cual
b) se mezclan EDC y s-NHS en calidad de reactivos de activación para los grupos carboxilo de la heparina, en donde
c) la heparina es activada mediante la adición de EDC y s-NHC, y porque seguidamente
d) se añade star-PEG y se homogeneiza la mezcla,
e) a continuación, tiene lugar la formación del gel, en donde
15 f) a continuación de la formación del gel, se lava el gel formado.
- 20 16.- Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque
a) heparina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida EDC, N-hidroxisulfosuccinimida s-NHS y polietilenglicol en forma de estrella, star-PEG, se disuelven por separado en agua desionizada a 4°C, tras lo cual
b) EDC y s-NHS se mezclan, en calidad de reactivos de activación para los grupos carboxilo de la heparina, en la relación dos a uno, en donde
c) la activación de la heparina tiene lugar después de la adición de EDC y s-NHS a lo largo de 15 min a 4°C, y porque, a continuación,
25 d) se añade star-PEG y la mezcla se homogeneiza a 8°C a lo largo de 15 min, y
e) la formación del gel tiene lugar a lo largo de un espacio de tiempo de 1 a 14 h a la temperatura ambiente, en donde
f) a continuación, el gel formado se lava con disolución de sal de cocina tamponada con fosfato o, alternativamente, en disoluciones salinas de carácter ácido o básico y en disolución de sal de cocina
30 tamponada con fosfato.
- 35 17.- Procedimiento según la reivindicación 15 ó 16, caracterizado porque la relación de EDC y s-NHS, referida a los grupos amino del star-PEG, asciende a 1,75 hasta 1, ascendiendo la relación de star-PEG a heparina a 1 hasta 1 a 6 hasta 1.
- 40 18.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado porque el hidrogel se modifica, después de la etapa f) del procedimiento, con la proteína de adhesión cicloRGDyK, siendo activado el hidrogel lavado con una disolución a base de EDC/s-NHS en tampón fosfato 1/15 M con pH = 5 a lo largo de 30 min a 4°C, tras lo cual la disolución se intercambia por una disolución que contiene 0,2 mg/ml de cicloRGDyK, a base de tampón borato 100 mM con pH = 8 y se inmoviliza durante 2 h a la temperatura ambiente, tras lo cual el hidrogel modificado se aclara de nuevo con PBS.
- 45 19.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque el hidrogel se carga con los factores de crecimiento b-FGF y VEGF, incubándose los hidrogeles con una disolución de b-FGF o VEGF con una concentración de 1-5 µg/ml en PBS a lo largo de 4 a 24 h, a la temperatura ambiente y, a continuación, lavando en PBS.

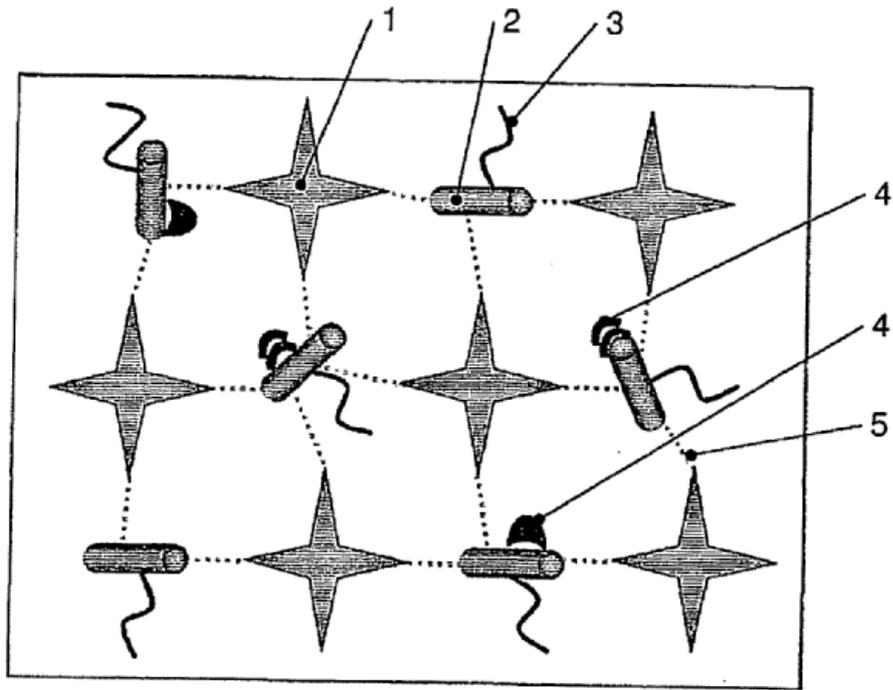


Fig. 1

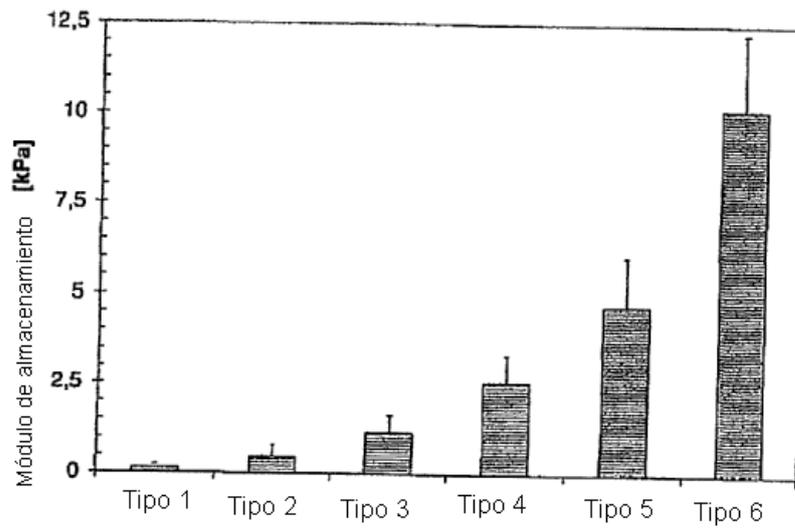


Fig. 2