

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 987**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2009 E 09795949 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2370474**

54 Título: **Método para producir derivados funcionalizados de ácido hialurónico y formación de hidrogeles de los mismos**

30 Prioridad:

28.11.2008 IT RM20080636

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

12.03.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
(100.0%)**

**Piazza Marina, 61
90133 Palermo, IT**

72 Inventor/es:

**GIAMMONA, GAETANO;
PALUMBO, FABIO y
PITARRESI, GIOVANNA**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 397 987 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

Método para producir derivados funcionalizados de ácido hialurónico y formación de hidrogeles de los mismos

5 **Campo de la invención**

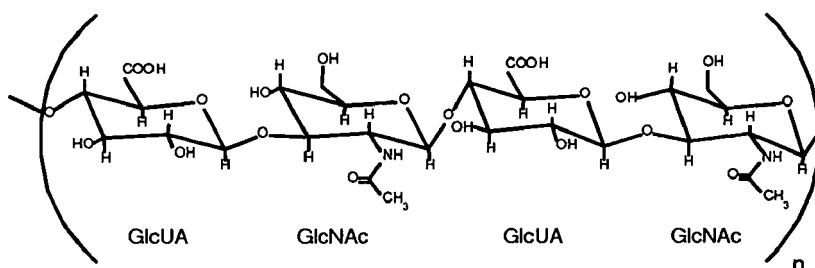
[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de derivados de ácido hialurónico funcionalizados y de hidrogeles relacionados. Más particularmente, la presente invención se refiere a una metodología en dos etapas útil para insertar grupos funcionales en ácido hialurónico, a través de la formación de un grupo activo específico en los grupos hidroxilo de ácido hialurónico y la sustitución posterior del grupo activo insertado, con una porción colgante que contiene, como porción terminal, por lo menos un grupo funcional nucleófilo. El grupo insertado mediante una sustitución nucleófila puede contener, como otra porción terminal, otro grupo funcional nucleófilo aprovechable para funcionalizaciones químicas adicionales, en particular para favorecer la reticulación de cadenas de ácido hialurónico que producen hidrogeles.

15

Técnica anterior

[0002] El ácido hialurónico (HA) es el glicosaminoglicano no sulfatado más abundante presente en la matriz extracelular de todos los tejidos; el HA es un polisacárido constituido por unidades repetitivas de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) cuya estructura química puede representarse por la siguiente fórmula que muestra dos unidades repetitivas consecutivas (el número n de unidades repetitivas podría ser tal que determine un peso molecular comprendido entre 50.000 y varios millones de Dalton).

20



25

[0003] El ácido hialurónico participa activamente en un número de procesos biológicos importantes, tales como la movilidad celular, la diferenciación celular y la cicatrización. En particular, el HA desempeña un papel estructural fundamental en la organización de la matriz extracelular de cartilago que tiene lugar para la formación del proteoglicano más abundante, es decir, el agregano.

30

[0004] El ácido hialurónico con alto peso molecular se usa en viscoscirugía y viscosuplementación, y este se usa en el campo de la oftalmología y para reducir el dolor en la artrosis como un lubricante que puede aplicarse a través de inyecciones intra-articulares.

35

[0005] Recientemente, varios derivados de HA reticulados o funcionales se han producido como películas o esponjas para su aplicación sobre las heridas, en las que este producto tiene propiedades de curación de tejidos.

40

[0006] En el campo de la ingeniería de tejidos – tema emergente que se refiere al desarrollo de tecnologías útiles para obtener la regeneración o la sustitución completa de tejidos humanos dañados – el HA se ha empleado en gran medida para la producción de estructuras porosas tridimensionales como soportes. Estas matrices mejoran el crecimiento y la diferenciación celular del tejido para favorecer la reconstrucción y la regeneración de los tejidos.

45

[0007] Para tales aplicaciones, el HA es útil cuando se sustituye adecuadamente para obtener hidrogeles. Debido a que los hidrogeles conocidos están constituidos por polímeros naturales o sintéticos o sus derivados o por combinaciones de polímeros naturales y sintéticos, cuyas moléculas interactúan como resultado de las interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos o químicos, los hidrogeles son por lo tanto unas redes de polímeros hidrófilos capaces de absorber agua hasta cientos de veces su peso en seco. Considerando sus propiedades hidrófilas y su biocompatibilidad potencial, los hidrogeles reciben un interés creciente para aplicaciones farmacéuticas y farmacéuticas-biomédicas.

50

[0008] La funcionalización química de la estructura de HA de polisacárido insertando grupos funcionales colgantes tiene el objetivo de obtener dispositivos farmacéuticos para prolongar la liberación de fármacos (sistemas de administración de fármacos); en tales sistemas, el fármaco está unido física o químicamente al portador de polisacárido, y este se libera siguiendo las formas y el tiempo capaces de mejorar la biodisponibilidad del fármaco.

55

[0009] Considerando el gran interés hacia las aplicaciones farmacéuticas, biomédicas y cosméticas mencionadas del ácido hialurónico, es evidente la elevada demanda de nuevas estrategias químicas para permitir unas

modificaciones del HA nuevas y más simples. Estos nuevos derivados pueden emplearse entonces para adecuarse a las diversas aplicaciones posibles.

5 **[0010]** En el pasado, se han descrito varias modificaciones químicas del ácido hialurónico que se refieren a sus funcionalidades de hidroxilo y carboxilo y varios derivados de HA para su aplicación en el campo biomédico o farmacéutico.

10 **[0011]** Como ejemplo, la patente de los EE. UU. con n.º 4582865 (Balasz y col. de Biomatrix Inc.) describe la reticulación de HA por reacción con divinilsulfona en unas condiciones sumamente básicas. La solicitud de patente europea EP 0216453 (Fidia S.p.A.) describe esterificaciones de sales de hialuronato con haluros de alquilo en disolventes apróticos polares. Tales derivados han encontrado grandes aplicaciones en el campo farmacéutico, tal como soportes para la ingeniería de tejidos y como dispositivos para controlar la liberación de fármacos. Estos derivados de HA-éster han modificado las características fisicoquímicas, tales como una solubilidad aumentada en disolventes orgánicos, tal como dimetilsulfóxido que mejoran los rendimientos industriales para obtener fibras, soportes porosos y películas.

20 **[0012]** Recientemente, se han propuesto otras estrategias químicas diferentes para obtener una funcionalización de ácido hialurónico con cadenas colgantes funcionales, empleando reacciones tanto en los grupos carboxilo del resto glucurónico como en los grupos hidroxilo de las unidades repetitivas. En particular, varios documentos describen la química de la carbodiimida (empleando compuestos que tienen la fórmula $R^1-N=C=N-R^2$) para obtener una funcionalización química del resto D-glucurónico de HA.

25 **[0013]** Como ejemplo, Prestwich, Poyani y col. emplearon carbodiimidias solubles en agua para insertar cadenas colgantes de hidrazida en la estructura principal de hialuronano (la patente de los EE. UU. 5502081 de Prestwich y col. de The Research Foundation de la State University de Nueva York; la patente de los EE. UU. 5616568 de T. Pouyany y col.; T. Pouyany, G. D. Prestwich Functionalized Derivatives of Hyaluronic Acid Oligosaccharides: Drug Carriers and Novel Biomaterials, Bioconjugate Chem., 1994, 5, 339-347). En estos ejemplos, los grupos carboxilo del ácido hialurónico reaccionan con moléculas bifuncionales que tienen la fórmula general $H_2N-NH-CO-A-CO-NHNH_2$ en la que A es un grupo espaciador genérico, que produce derivados de ácido hialurónico funcionalizados que portan grupos hidrazida colgantes que tienen la fórmula $HA-CONH-NH-CO-A-CO-NH-NH_2$. Siguiendo la misma línea de investigación, Vercruysse y col. (Vercruysse y col., "Synthesis and in Vitro Degradation of New Polyvalent Hydrazide Cross-Linked Hydrogels of Hyaluronic Acid, Bioconjugate Chem., 1997, 8, 686-694) describió cómo funcionalizar el ácido hialurónico usando moléculas que portan más de dos grupos terminales hidrazida, lo que permite una reticulación del polisacárido de partida, produciendo entonces hidrogeles.

35 **[0014]** Aeschlimann y col. (la patente de los EE. UU. 6630457 de Aeschlimann y col. de Othogene LLC que se corresponde con la patente europea con n.º EP 1757314) modificaron el método de activación del grupo carboxilo de HA propuesto por Pouyany, combinando el empleo de carbodiimidias solubles en agua con el uso de activadores nucleófilos tales como hidroxisuccinimidias e hidroxitriazoles. En particular, el método que se da a conocer trata de la introducción de nuevos grupos funcionales en la estructura principal de HA activando en primer lugar sus grupos carboxílicos produciendo grupos éster intermedios, sustituyendo entonces estos grupos salientes de éster usando moléculas que contienen un buen grupo nucleófilo en un lado y un grupo funcional químicamente protegido en otro lado. De esta forma, los productos intermedios activados por HA son más estables y la siguiente funcionalización por moléculas nucleófilas bifuncionales es entonces más selectiva. De tal forma, se han producido derivados de HA-aldehído y amina adecuados para su reticulación posterior, obteniendo de este modo hidrogeles a base de HA biocompatibles.

50 **[0015]** Además, la solicitud de patente WO 02/098923 propuesta por Eurand Pharmaceuticals Ltd, de los inventores Mariotti y col., muestra los métodos para producir derivados de HA funcionalizados en los que sus grupos hidroxilo están esterificados o carbamoilados ($HA-O-CONH-$) y los grupos carboxilo están total o parcialmente esterificados con alcoholes. Tales grupos hidroxilo carbamoilados se obtienen haciendo reaccionar el polisacárido con isocianatos de alquilo, arilo o arilalquilo ($R-N=C=O$). De tal forma, se han obtenido derivados de HA carbamoilados y esterificados para su aplicación como fases estacionarias para un análisis cromatográfico.

55 **[0016]** De forma análoga a cómo se describió por Mariotti y col., Chen Jui-hsiang y col., en la patente EP 1538166 (propuesta por Industrial Technology Research Institute) describe la producción de derivados de HA que portan como cadenas colgantes polímeros hidrófobos, hidrófilos y anfífilos, obtenidos por reacción entre los derivados de isocianatos y polisacárido de los mismos polímeros.

60 **[0017]** Las dos últimas patentes indicadas describen la formación de derivado de HA carbámico en los grupos hidroxilo primarios de las unidades repetitivas de disacárido, realizando una reacción usando sales de HA solubles en disolvente aprótico polar orgánico e isocianatos reactivos. En el presente caso, los grupos hidroxilo del ácido hialurónico se funcionalizaron en una reacción en una única etapa, produciendo entonces un enlace carbámico ($-O-CO-NH-$, que se conoce también como enlace uretánico) entre el ácido hialurónico y la nueva funcionalidad colgante; tal funcionalización puede describirse entonces usando la siguiente fórmula general ($HA-O-CO-NHR$) en la que R podría ser una cadena hidrófila, lipófila o anfífila. No obstante, las metodologías indicadas adolecen del

inconveniente de que la funcionalización se restringe sólo a derivados de isocianatos que tienen que emplearse como reactivos de partida.

[0018] Considerando las metodologías que se describen anteriormente, la presente invención tiene el fin de dar a conocer un nuevo método para la producción de derivados de HA funcionalizados aprovechables para la producción de hidrogeles reticulados o como productos intermedios útiles para obtener una funcionalización adicional, tanto en disolventes acuosos como orgánicos. Un fin adicional de la presente invención es dar a conocer metodologías en las que estos derivados de HA funcionales pueden aprovecharse fácilmente para la producción de nuevos hidrogeles.

10 Sumario de la invención

[0019] Siguiendo el presente fin, de acuerdo con la presente invención se ha encontrado un método químico versátil para obtener derivados funcionales de HA de una forma tal que no implica en la reacción química los grupos carboxilo de los restos glucurónicos de ácido hialurónico. El presente método implica un procedimiento en dos etapas, en el que la primera etapa es la introducción de una porción activa química en por lo menos un grupo hidroxilo de ácido hialurónico para dar un producto intermedio activo, y en el que en la segunda etapa dicho producto intermedio activo reacciona con un reactivo nucleófilo; portando dicho reactivo nucleófilo por lo menos un grupo amino primario. La aplicación consecutiva del procedimiento en dos etapas genera la formación de por lo menos un grupo carbámico ($-O-CO-NH-$) unido a la estructura principal de HA a través de al menos uno de sus grupos hidroxilo.

[0020] En particular, en la primera etapa del método, moléculas de activación específicas tales como el bien conocido y comercialmente disponible bis(carbonato de 4-nitrofenilo) o el carbonato de cloronitrofenilo se emplean para insertar grupos nitrofenoxicarbonilo ($NO_2-Ph-O-CO-$) en los grupos hidroxilo de HA (primarios y/o secundarios); en la segunda etapa el buen grupo saliente insertado (nitrofenoxilo) se sustituye con una molécula nucleófila que tiene la fórmula general NH_2-R . Tal molécula nucleófila debería contener por lo menos un grupo primario de amina, y R representa un NH_2 , un grupo alquilamino, una cadena alquílica, una cadena de arilalquilo, una cadena poliacrílica, una cadena de polioxietileno, un fármaco, un polímero o una proteína.

[0021] De acuerdo con la presente invención, es posible obtener un nuevo enlace carbámico, mediante una reacción en dos fases, en los grupos hidroxilo primarios y/o secundarios de HA, empleando el producto intermedio oportuno de activación. En particular, el reactivo bis(carbonato de 4-nitrofenilo) se ha empleado para generar un derivado de nitrofenilcarbonato reactivo en el HA, fácilmente reactivo hacia las moléculas nucleófilas que portan preferiblemente funcionalidades amino o hidrazida.

[0022] La cadena colgante insertada en la segunda etapa del procedimiento, en caso de necesidad, puede portar por lo menos otro grupo funcional aún disponible para funcionalizaciones químicas adicionales realizadas en un medio acuoso u orgánico, que reaccionan con moléculas que portan otros grupos funcionales, en particular grupos químicos capaces de permitir una reacción de reticulación.

[0023] El método que se da a conocer puede emplearse para producir derivados de HA que portan nuevas funcionalidades químicas de amina o hidrazida o para producir derivados de HA que portan cadenas colgantes hidrófilas o lipófilas.

[0024] De tal forma, una gran diversidad de grupos funcionales químicos comercialmente disponibles puede unirse a HA a través de sus grupos hidroxilo (primarios y/o secundarios). Además, siguiendo el presente procedimiento es posible funcionalizar adicionalmente tales derivados de amino e hidrazida también en un entorno orgánico: en particular, las sales de tetrabutilamonio (TBA) de tales derivados de HA-amino o hidrazida pueden emplearse para una funcionalización adicional. En general, tal funcionalización adicional puede realizarse en un medio tanto acuoso como orgánico, en particular disolventes apróticos polares tales como dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida y sus mezclas.

Breve descripción de las figuras

[0025] Algunos resultados experimentales se ilustran en los siguientes dibujos, en los que:

la **figura 1** muestra el espectro de RMN de 1H (D_2O) de un derivado de HA-EDA que tiene un 50 % en mol/mol de funcionalización en los grupos etilendiamina, obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención;

la **figura 2** muestra el espectro de RMN de 1H (D_2O) de un derivado de HA-BTA que tiene un 52 % en mol/mol de funcionalización en los grupos butilo, obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención;

la **figura 3** muestra el espectro de RMN de 1H (D_2O) del derivado de HA-NH-PEG, que tiene un 33 % en mol/mol de funcionalización en las cadenas de polioxietileno-monometil-monoamino, obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención;

la **figura 4** muestra el espectro de RMN de 1H (D_2O) de un derivado de HA-EDA-MA que tiene un 50 % en mol/mol de funcionalización en los grupos etilendiamina y un 50 % en mol/mol de funcionalización en los

grupos metacrílicos, obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La figura 5 muestra imágenes de SEM de hidrogel de HA-EDA-BC liofilizado a un 0,5 % en p/v.

La figura 6 muestra la proliferación de condrocitos humanos encapsulados en hidrogeles de HA-EDA-BC. Los valores se expresan como la absorbancia \pm la desviación estándar ($n = 9$).

La figura 7 muestra la tinción de células vivas/ muertas de condrocitos encapsulados en 3-D en hidrogeles de HA-EDA-BC después de 3 días de cultivo. Las células muertas se indican mediante los cuadros.

Descripción detallada de la invención

[0026] Entonces, un objeto específico de la presente invención es un procedimiento para la producción de derivados funcionales de ácido hialurónico compuesto por las siguientes etapas consecutivas:

(a) activación de por lo menos un grupo hidroxilo de ácido hialurónico (HA) (este HA como sal soluble en disolventes orgánicos); hacer que reaccione la sal de HA en un disolvente aprótico polar con un agente de carbonación que se elige entre ésteres fenílicos carbónicos o ésteres fenílicos halofórmicos;

(b) reacción de la sal de HA activada obtenida a partir de la etapa (a), por medio de sustitución nucleófila, con un compuesto que tiene la fórmula general $\text{NH}_2\text{-R}$, en la que R puede ser: NH_2 , un grupo aminoalquilo, una cadena de alquilo, una cadena de arilalquilo, una cadena poliacrítica, una cadena de polioxietileno o una molécula de bajo peso molecular (como ejemplo, un fármaco) o una molécula de alto peso molecular (como ejemplo, un polímero, una proteína, etc.); preferiblemente dicha molécula con bajo o alto peso molecular es biocompatible y soluble o bien en disolventes orgánicos o bien en un medio acuoso.

[0027] En particular, el reactivo de carbonación empleado para la primera etapa puede ser el (carbonato de 4-nitrofenilo) (un éster de carbonil fenilo) y/o un carbonato de cloronitrofenilo.

[0028] La sal de ácido hialurónico soluble en disolventes orgánicos debería elegirse preferiblemente entre la sal de tetrabutilamonio (que se indica como TBA) o la sal de cetiltrimetilamonio (que se indica como CTA).

[0029] De acuerdo con algunos aspectos preferidos de realización de la invención, el disolvente orgánico empleado para las reacciones de funcionalización se elige entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida y sus mezclas y ambas etapas de activación (a) y la sustitución nucleófila (b) se llevan a cabo a unas temperaturas entre 10 y 60 °C.

[0030] El grado funcionalizado de los derivados de HA obtenidos puede variar de sólo un grupo hidroxilo a la totalidad de los grupos hidroxilo de HA y el mismo depende (de una forma directamente proporcional) de la cantidad de agente de carbonilación reactivo que se usa en el proceso que se describe anteriormente. Preferiblemente, el grado de funcionalización molar varía entre un 5 y un 95 %, más preferiblemente entre un 20 y un 80 % (para una mejor comprensión de esto, véase el ejemplo 1).

[0031] De acuerdo con otras realizaciones específicas, el compuesto que tiene la fórmula general $\text{NH}_2\text{-R}$ puede elegirse entre hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) y un grupo bis-aminoalquilo que tiene la fórmula $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es un número entre 1 y 30, preferiblemente entre 1 y 10. En otra realización específica que se muestra en la siguiente sección experimental, se han unido unas moléculas bifuncionales tales como etilendiamina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, denominada EDA) e hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$, denominada Hy) a la estructura principal de HA para obtener unos derivados de HA-EDA y de HA-Hy, respectivamente.

[0032] De acuerdo con la presente invención, un derivado de ácido hialurónico tal como HA-EDA o HA-Hy puede aprovecharse para producir un hidrogel a través de un procedimiento de autorreticulación que emplea carbodiimidas como agentes de activación o una reticulación química que emplea moléculas de reticulación bifuncionales tales como, por ejemplo, glutaraldehído u otras moléculas polifuncionales. En la siguiente parte experimental se dan detalles específicos de las realizaciones mencionadas.

[0033] La presente invención da a conocer métodos para emplear sales solubles en disolventes orgánicos, en particular de tetrabutilamonio, de derivados de ácido hialurónico-hidrazina o amino o sales de ácido hialurónico solubles en agua obtenidos usando los procedimientos que se muestran en la presente invención, para realizar derivatizaciones adicionales. Tales derivatizaciones pueden realizarse en disolventes orgánicos o medios acuosos. De acuerdo con otros aspectos preferidos de la presente invención, un derivado de sal de ácido hialurónico obtenido como en la etapa (b) del procedimiento, sigue un procedimiento de funcionalización adicional mediante una sustitución nucleófila con una molécula que tiene la fórmula general $\text{Y-R}'$, en la que Y es un buen grupo saliente tal como halógeno, N-oxisuccinimida, un alcoxilo con 1-6 átomos de carbono, o Y es una porción electrófila de un anhídrido o un epóxido, y R' es una porción tal como grupo acrililo o metacrililo, ambos oportunamente sustituidos; una porción de una molécula soluble en disolvente orgánico o en disolvente acuoso.

[0034] Preferiblemente, la funcionalización adicional se realiza en un disolvente aprótico polar que se elige entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida o sus mezclas, a unas temperaturas comprendidas entre 5 y 60 °C; siguiendo otros aspectos preferidos de la invención, la reacción se realiza en presencia de un catalizador que

se elige entre dietilamina, trietilamina, dimetilaminopiridina y sus mezclas.

[0035] Para la producción de derivados de ácido hialurónico acrílicos o metacrílicos, tal compuesto que tiene la fórmula $Y-R'$ es preferiblemente anhídrido metacrílico, cloruro de metacrilato, cloruro de acrilato, acrilato de glicidilo o metacrilato de glicidilo; para la producción de otro derivado particular, que se muestra en la siguiente parte experimental, el derivado de benzoilcisteína del ácido hialurónico, el compuesto de la fórmula general $Y-R'$ es el monoéster o diéster de N-oxisuccinimida de la N,N'-dibenzoil-L-cistina o sus derivados similares.

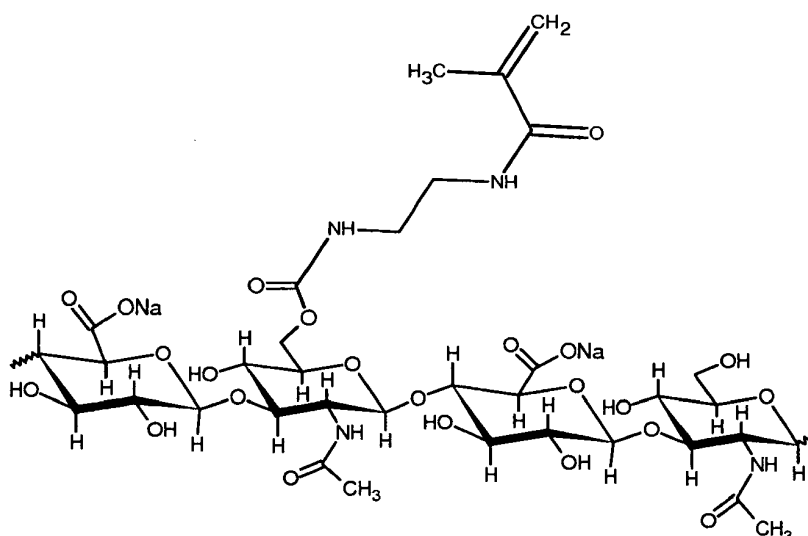
[0036] En este último ejemplo, el derivado obtenido a partir de esta funcionalización adicional se trató posteriormente con un procedimiento de reducción para obtener una porción de benzoil-cisteína unida al ácido hialurónico.

[0037] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención trata de nuevos productos que consisten en derivados funcionalizados de ácido hialurónico que tienen un peso molecular en el intervalo de 50.000–1.500.000 Dalton que pueden obtenerse a partir del proceso que se describe anteriormente.

[0038] A continuación en el presente documento se presentarán unas fórmulas estructurales que han de considerarse sólo como representativas del tipo de funcionalización (enlace covalente) que tiene lugar en un grupo hidroxilo de HA cuando se somete al proceso que se describe anteriormente. Las estructuras que se notifican a continuación en el presente documento no han de considerarse como representativas del grado de funcionalización, que en su lugar es, tal como se indica anteriormente, directamente proporcional a la cantidad de agente de carbonilación reactivo que se usa en el proceso anterior.

[0039] De acuerdo con una realización preferida, la presente invención se refiere a derivados acrílicos o metacrílicos de ácido hialurónico que tienen unos pesos moleculares comprendidos entre 50.000 y 1.500.000 Dalton, que pueden obtenerse a partir del proceso que se describe anteriormente.

[0040] El tipo de funcionalización de tales derivados metacrílicos podría representarse por la siguiente estructura, que describe dos unidades de disacárido consecutivas del ácido hialurónico de partida, en la que por lo menos un grupo hidroxilo se ha funcionalizado



HA-EDA-MA

[0041] Los derivados acrílicos podrían representarse por la fórmula anterior en la que, en lugar de un grupo metacrilato, está presente un grupo acrilato.

[0042] Tales derivados acrílicos o metacrílicos pueden producirse de acuerdo con el procedimiento “en dos etapas” que se da a conocer por la invención, seguido a partir de una funcionalización adicional, tal como se notifica anteriormente.

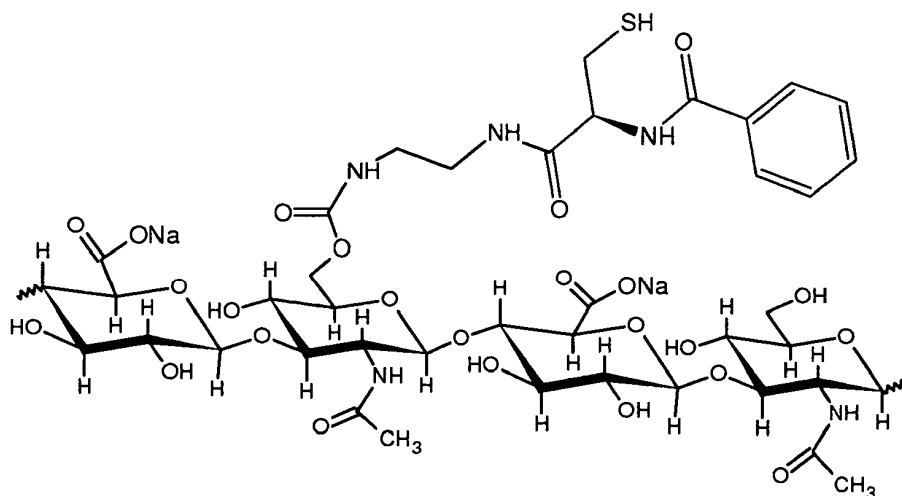
[0043] Además, es posible controlar la cantidad de la funcionalización de la tercera etapa en los grupos acrílicos o metacrílicos para obtener derivados que tienen grupos amino libres que varían de un 5 a un 95 %.

[0044] Un hidrogel reticulado puede obtenerse a partir de los productos que se describen anteriormente empleando un procedimiento de fotoreticulación, en el que la concentración del derivado funcionalizado mencionado en una disolución acuosa u orgánica está comprendida entre un 1 % en p/v y un 20 % en p/v. Preferiblemente, el hidrogel se

obtiene mediante irradiación con unas longitudes de onda comprendidas entre 180 y 800 nm, con o sin un fotoiniciador de radicales, con un tiempo de irradiación comprendido entre 5 min y 10 horas. Tales hidrogeles pueden obtenerse también por irradiación y o de microondas o por otras irradiaciones ionizantes.

5 **[0045]** Tal fotorreticulación puede tener lugar también en presencia de aditivos apropiados como monómeros acrílicos o metacrílicos, metacrilatos y acrilatos de polietilenglicol, tanto mono- como polifuncionales, o en presencia de otros aditivos empleados para cambiar o para mejorar la plasticidad, la dureza, el carácter hidrófilo y lipófilo.

10 **[0046]** De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la misma tiene como objetivo específico un nuevo derivado obtenido de acuerdo con el procedimiento en dos etapas propuesto, teniendo el derivado de ácido hialurónico-benzoilcisteína o sus derivados similares un peso molecular comprendido entre 50.000 y 1.500.000 Dalton, que pueden obtenerse a partir del proceso que se describe anteriormente. Tales derivados de ácido hialurónico-benzoilcisteína podrían representarse por la siguiente estructura, que hace referencia a dos unidades de disacáridos consecutivas del ácido hialurónico de partida, en las que por lo menos un grupo hidroxilo se ha funcionalizado:



HA-EDA-BC

20 **[0047]** Tal derivado aminoácido puede obtenerse siguiendo el procedimiento en dos etapas de acuerdo con la invención y, a continuación, siguiendo una funcionalización adicional tal como se describe anteriormente, y mediante una posterior reducción de puente de disulfuro de derivado de ácido hialurónico.

[0048] En el presente caso es posible obtener un hidrogel reticulado incluso por oxidación por exposición al aire.

25 **[0049]** En general, la presente invención incluye en su alcance hidrogeles obtenidos por medio de los métodos descritos, tales hidrogeles pueden producirse aplicando los procedimientos técnicos adecuados, como nanopartículas o micropartículas, películas, membrana, fibras y soportes.

30 **[0050]** Por último, la presente invención se refiere al uso de los hidrogeles descritos para la producción de dispositivos de administración de genes o de fármacos, para usos cosméticos y agroalimentarios, para la producción de sistemas de recubrimiento de heridas, órganos o tejidos, de materiales y soportes implantables para la regeneración de tejidos.

35 **[0051]** Las características específicas de la presente invención, como sus ventajas y sus metodologías y ejemplos de aplicaciones específicas con referencia a funcionalizaciones adicionales de los derivados, y la preparación de hidrogeles, serán más evidentes en la descripción ejemplificativa detallada en lo siguiente.

Parte experimental

40 EJEMPLO 1

Síntesis de derivado de ácido hialurónico-etilendiamina (HA-EDA).

45 **[0052]** 3 g de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) preparada por disolución de neutralización de ácido hialurónico usando una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio, se disolvieron en 270 ml de dimetilsulfóxido anhidro (peso molecular promedio en peso de ácido hialurónico 270 kDa).

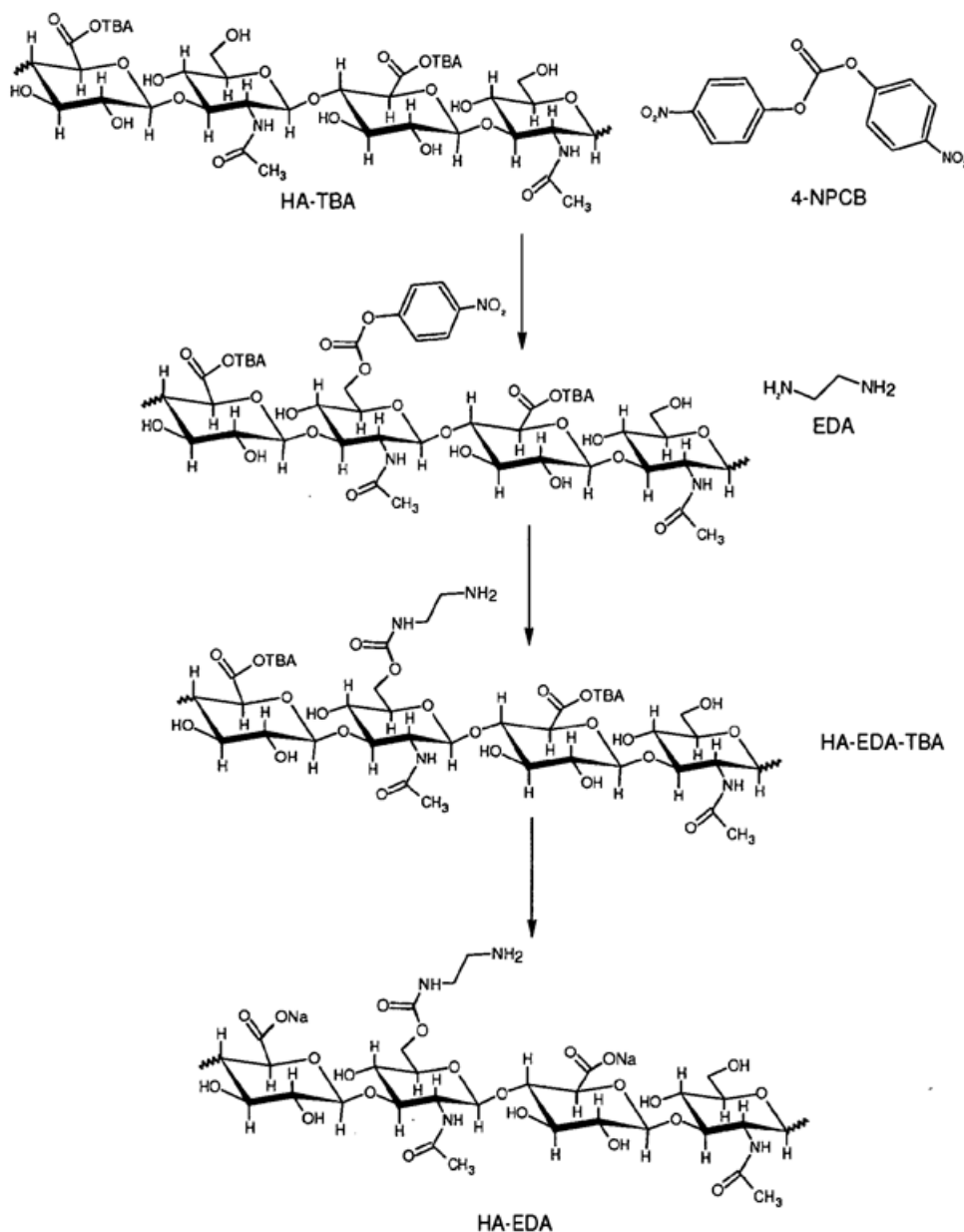
5 **[0053]** La cantidad adecuada de carbonato de bis(4-nitrofenilo) (4-NPCB), que se elige de forma que puedan obtenerse unas relaciones de moles de 4-NPCB/ moles de HA-TBA respectivamente iguales a 0,75, 0,5 y 0,25, se disolvió en 30 ml de dimetilsulfóxido anhidro; esta disolución se añadió gota a gota a la disolución de HA-TBA a 40 °C con agitación. Después de 4 h, 3 ml de etilendiamina (EDA) se añadieron gota a gota y la disolución se dejó a 40 °C durante otras 3 h. A continuación, se logró la evolución de la reacción haciendo que precipite en primer lugar el derivado de ácido hialurónico en acetona, lavando a continuación en el mismo disolvente hasta que se ha obtenido un producto sin productos intermedios de reacción.

10 **[0054]** El sólido obtenido, formado por copolímero de HA-TBA-EDA, se pulverizó finamente.

15 **[0055]** La sal de sodio del derivado de etilendiamino del HA, el derivado de HA-EDA, se ha obtenido haciendo fluir la disolución en dimetilsulfóxido de HA-TBA-EDA a través de una columna cargada con resina DOWEX 50 Wx8 activada en su forma de sodio. El producto se recuperó intercambiando la disolución de DMSO frente a agua usando un procedimiento de diálisis y liofilizando a continuación la disolución acuosa.

20 **[0056]** El **Esquema 1** muestra el procedimiento de funcionalización.

Esquema 1 – Reacción de funcionalización de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) con etilendiamina, para obtener el derivado de HA-EDA.



[0057] El derivado de HA-EDA se caracterizó mediante análisis de RMN de ^1H , tal como se muestra en el espectro que se notifica en la **figura 1** (véanse los dibujos). En particular, la RMN de ^1H (D_2O) mostró: δ 1,9 (m, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$); δ 3,1 (m, $\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$).

5 **[0058]** El grado de funcionalización molar se ha calculado comparando el área del pico en δ 1,9 que puede atribuirse al CH_3 de la porción de N-acetilglucosamina de HA con el área del pico en δ 3,1 que puede atribuirse a la porción de etilendiamina unida al HA. El grado de funcionalización molar se ha expresado como % en moles de porción de etilendiamina insertada por moles de la unidad repetitiva del HA.

10 **[0059]** La **Tabla 1** siguiente muestra como ejemplo la funcionalización molar en los grupos etilendiamina unidos al HA obtenido, empleando tres relaciones diferentes de moles de 4-NPBC/ moles de unidades repetitivas de HA-TBA.

TABLA 1

15

Moles de 4-NPBC/ moles de unidades repetitivas de HA-TBA	Grado de funcionalización molar en los grupos etilendiamina unidos a ácido hialurónico
0,25	22 % en mol/mol
0,50	52 % en mol/mol
0,75	70 % en mol/mol

EJEMPLO 2*Síntesis de derivado de ácido hialurónico-hidrazina (HA-Hy)*

20

[0060] 3 g de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) se disolvieron en 270 ml de dimetilsulfóxido anhidro (peso molecular promedio en peso de ácido hialurónico 270 kDa). 30 ml de una disolución de dimetilsulfóxido anhidro que contiene 0,73 g de carbonato de bis(4-nitrofenilo) (4-NPBC) se añadieron gota a gota a la disolución de HA-TBA y se dejó que reaccionaran durante 4 h a 40 ° C con agitación. Después de este tiempo, se añadieron 2,7 ml de hidrazina monohidrato gota a gota y la disolución se dejó a 40 °C durante 1 h más. A continuación, se logró la evolución de la reacción haciendo que precipite en primer lugar el derivado de ácido hialurónico en éter dietílico, a continuación mediante lavado con acetona. Para obtener la sal de sodio del HA-Hy, la disolución de reacción se hizo fluir a través de una columna cargada con resina DOWEX 50 Wx8 activada en su forma de sodio, se precipitó a continuación en acetona y se lavó con el mismo disolvente. A continuación, el sólido obtenido se disolvió en agua, se dializó frente a agua y, a continuación, se liofilizó. El grado de funcionalización molar, detectado mediante ensayo colorimétrico usando ácido trinitrobenzenosulfónico (TNSB) fue igual a un 50 % en mol-mol.

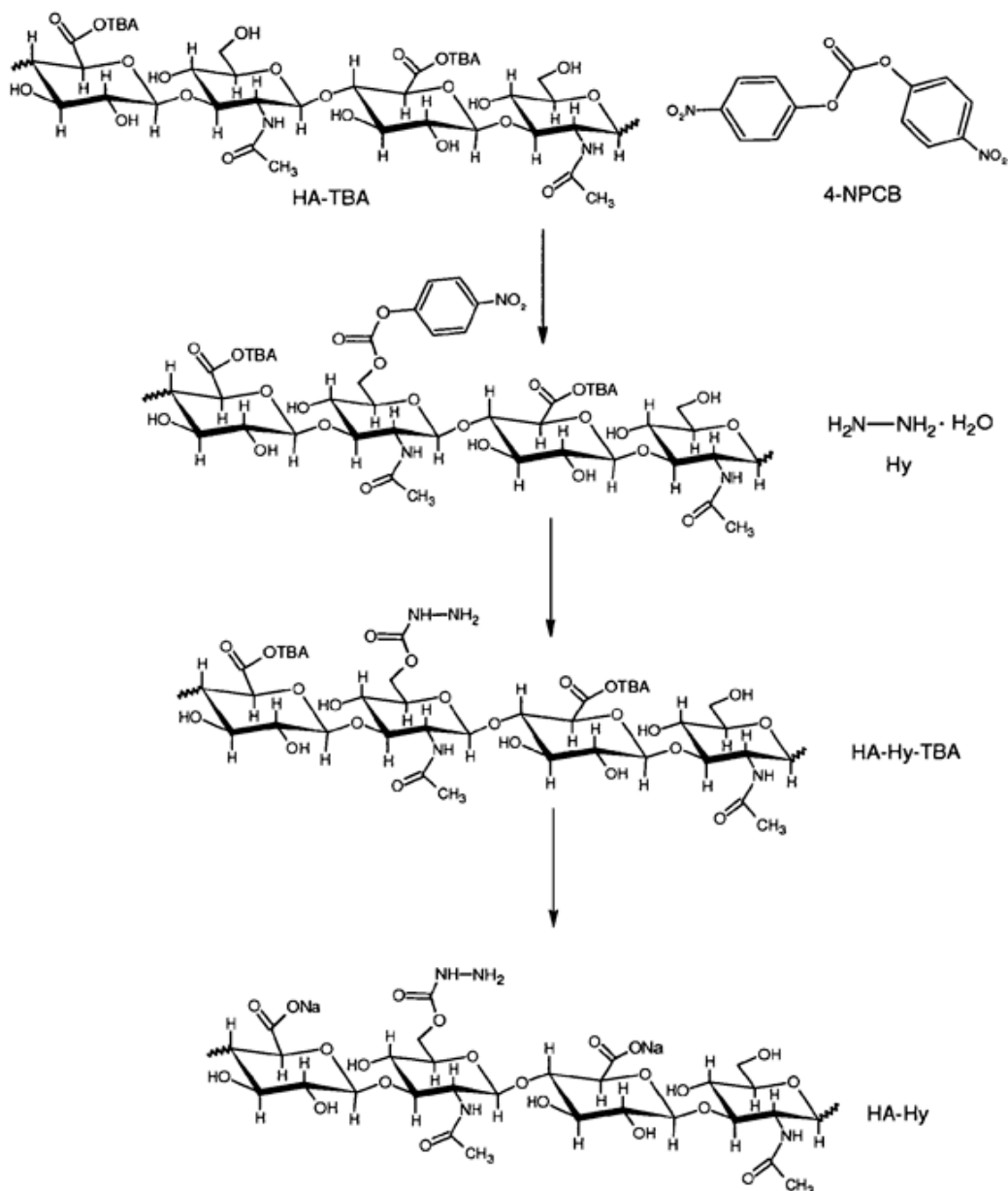
25

30

35

[0061] El **Esquema 2** muestra el procedimiento de reacción.

Esquema 2 – Reacción de funcionalización de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA–TBA) con hidrazina monohidrato para obtener el derivado de HA–Hy



5

EJEMPLO 3

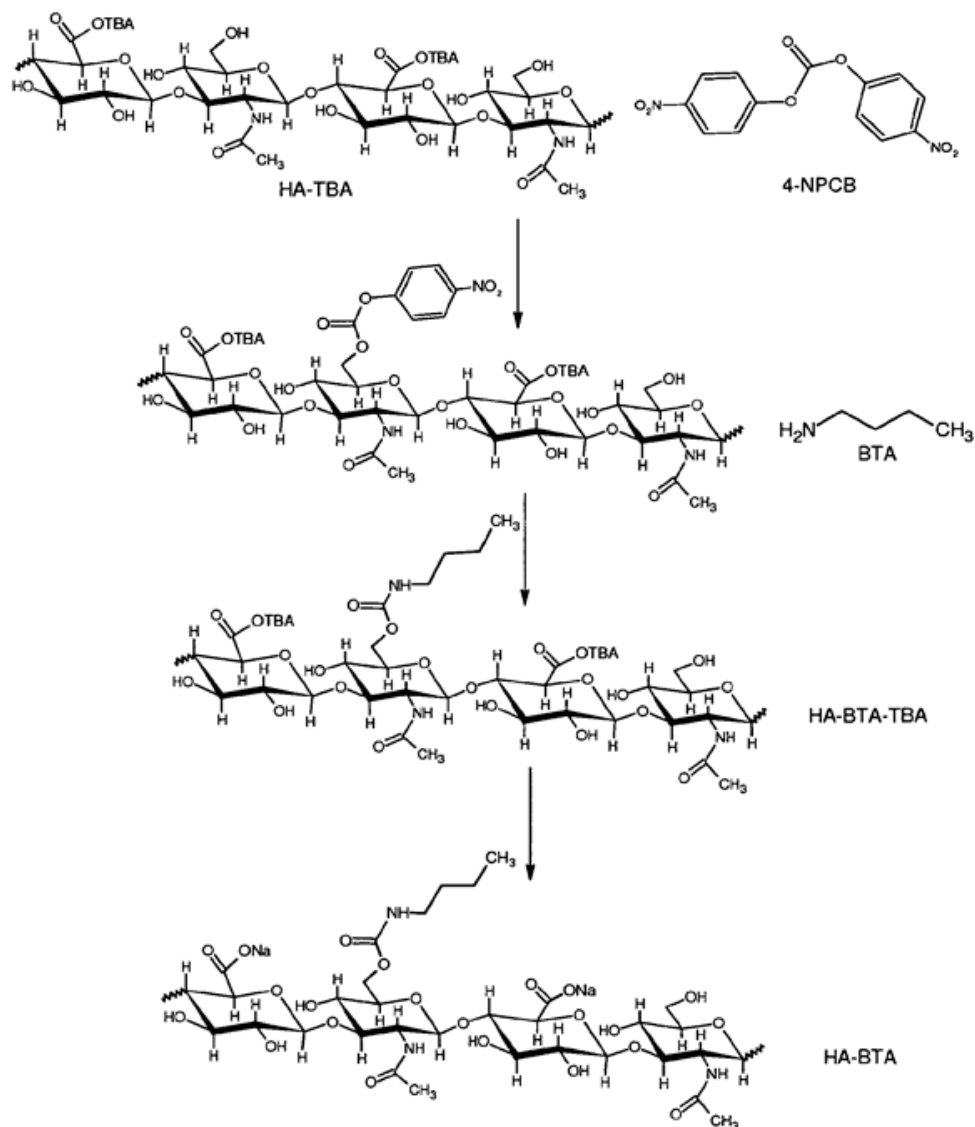
Síntesis del derivado de ácido hialurónico funcionalizado con butilamina (HA–BTA)

10 **[0062]** 3 g de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA–TBA) se disolvieron en 270 ml de dimetilsulfóxido anhidro (peso molecular promedio en peso de ácido hialurónico 270 kDa). 30 ml de una disolución de dimetilsulfóxido anhidro que contiene 0,73 g de carbonato de bis(4–nitrofenilo) (4–NPBC) se añadieron gota a gota a la disolución de HA–TBA y se dejó que reaccionaran durante 4 h a 40° C con agitación. Después de este tiempo, se añadieron 4,7 ml de butilamina gota a gota y la mezcla de reacción se dejó a 40 °C durante 24 h. A continuación, la

15 disolución de reacción se hizo fluir a través de una columna cargada con resina DOWEX 50 Wx8 activada en su forma de sodio, se precipitó a continuación en acetona y se lavó con el mismo disolvente, por último se dializó frente a agua y se liofilizó. En el derivado obtenido, denominado HA–BTA, la ausencia de butilamina sin reaccionar se confirmó por ensayo de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNSB).

20 **[0063]** El **esquema 3** muestra el procedimiento de funcionalización.

Esquema 3 – Reacción de funcionalización de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) con butilamina (BTA) para obtener el derivado de HA-BTA



5 **[0064]** El derivado de HA-BTA se caracterizó mediante RMN de ^1H , tal como se muestra en **la figura 2** de los dibujos adjuntos, mostrando las siguientes señales (D_2O): δ 0,8 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); δ 1,3 ($-\text{NHCH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); δ 1,4 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); δ 2,0 (s, $-\text{NH}-\text{COCH}_3$); δ 3,1 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$). El grado de funcionalización molar se ha calculado comparando las áreas de los picos en δ 0,8, 1,3, 1,4 y 3,1 que pueden atribuirse al metileno de la cadena de butilamina con el área del pico en δ 2,0 que puede atribuirse al grupo metilo de la porción de N-acetilglucosamina de HA. El grado de funcionalización molar fue igual a un 52 % en mol/mol.

EJEMPLO 4

15 Síntesis de derivado de ácido hialurónico-aminopolietilenglicol (HA-NH-PEG)

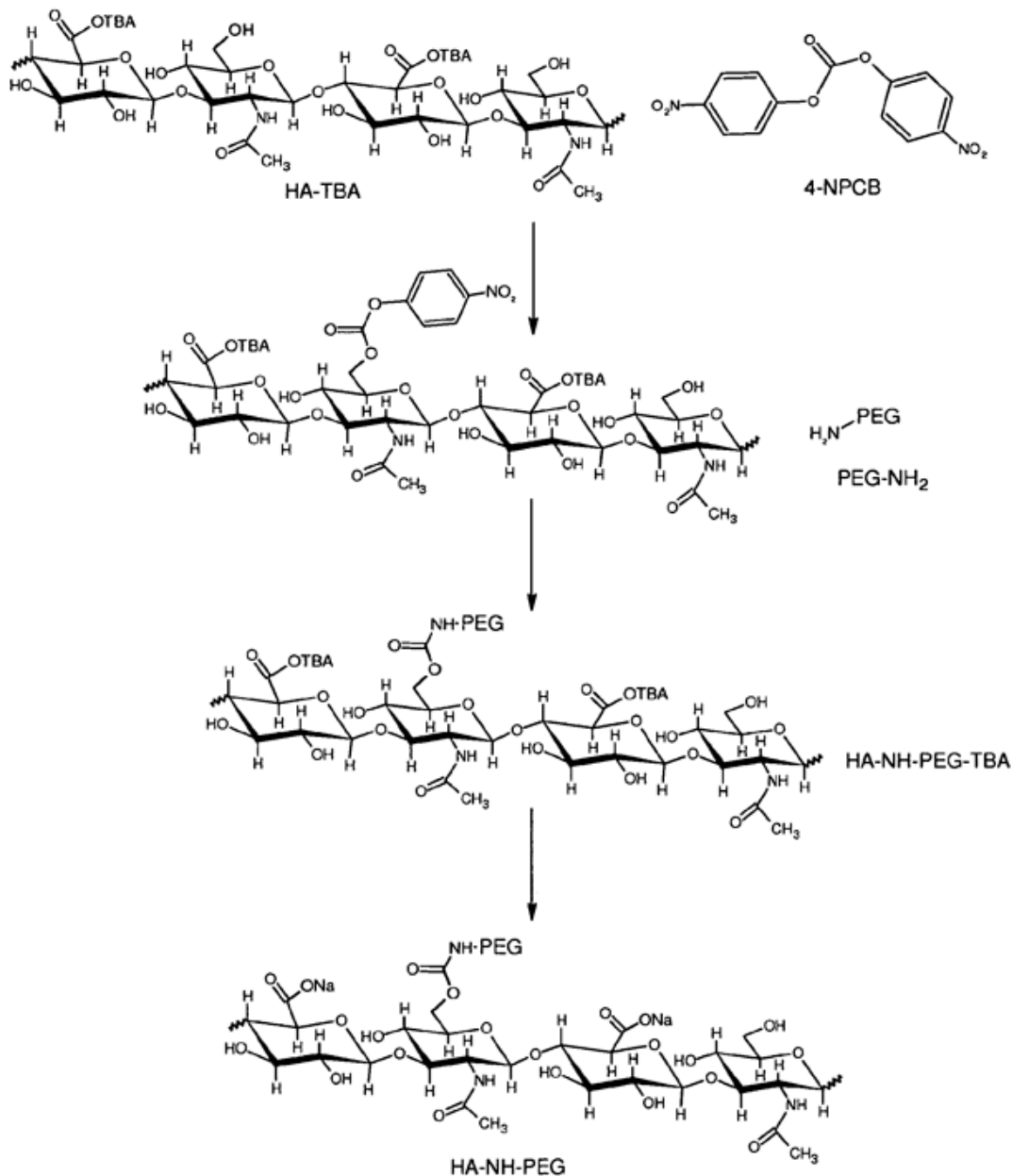
[0065] 1 g de sal de tetrabutilamonio de HA (HA-TBA) (peso molecular promedio en peso de ácido hialurónico de partida igual a 230 kDa) se disolvió en 90 ml de dimetilsulfóxido anhidro. 0,4 g de carbonato de bis(4-nitrofenilo) (4-NPBC) se disolvieron en 10 ml de dimetilsulfóxido anhidro. La disolución de 4-NPBC se añadió gota a gota a la disolución de HA-TBA a 40 °C con agitación, a continuación la reacción se dejó a la misma temperatura durante 4 h.

[0066] Después de este tiempo, 6 g de O-(2-aminoetil)-O-metil-polietilenglicol (PEG-NH₂) (peso molecular 750 Da) disuelto en 5 ml de dimetilsulfóxido se añadieron gota a gota y la disolución se dejó a 40 °C durante 24 h. A continuación, la disolución de reacción se hizo fluir a través de una columna cargada con resina DOWEX 50 Wx8 activada en su forma de sodio, se precipitó a continuación en acetona y se lavó con el mismo disolvente. El producto obtenido, denominado HA-NH-PEG, se disolvió en agua después de la liofilización y se dializó frente a agua

durante 5 días usando una membrana de diálisis Spectrapor que tiene un punto de corte molecular igual a 12.000–14.000.

[0067] El siguiente esquema 4 muestra el procedimiento de funcionalización.

5 **Esquema 4** – Reacción de funcionalización de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) con O-(2-aminoetil)-O-metil-polietilenglicol (PEG-NH₂) para obtener el derivado de HA-NH-PEG



10 [0068] La ausencia de PEG-NH₂ sin reaccionar se confirmó por ensayo colorimétrico de NTSB para grupos amino libres.

15 [0069] El derivado de HA-NH-PEG se ha caracterizado mediante RMN de ¹H, tal como se muestra en la figura 3 de los dibujos adjuntos, en los que están presentes los siguientes picos (D₂O): δ 1,4 (s, -CO-NH-(O-CH₂-CH₂)_n-O-CH₃) δ 2,0 (s, -NH-CO-CH₃); δ 3,7 (s, -CO-NH-(O-CH₂-CH₂)_n-O-CH₃). El grado de funcionalización molar fue igual a un 33 % en mol/mol.

20 *Preparación de derivados metacrílicos de ácido hialurónico-etilendiamina (HA-EDA-MA)*

[0070] Considerando el interés en producir derivados de ácido hialurónico fotorreticulables que se pueden producir en la ingeniería de tejidos, en el campo de la administración de fármacos, el aumento de tejidos etc., una de las

aplicaciones más ventajosas del método que se propone en el presente caso es la funcionalización de copolímeros de ácido hialurónico-amino con porciones metacrílicas.

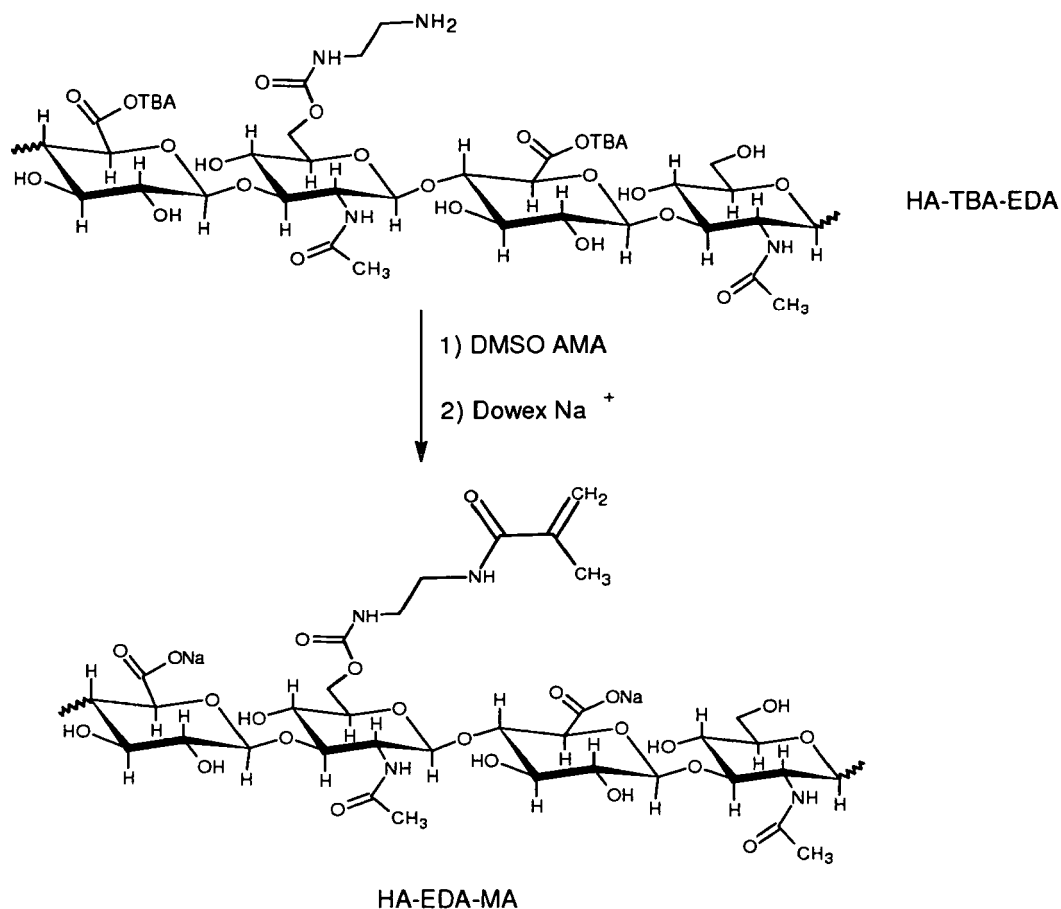
- 5 **[0071]** En la bibliografía científica se han notificado varios ejemplos de derivados de ácido hialurónico metacrílicos. En el procedimiento que se describe en primer lugar por Smeds y col. (J. Biomed. Mat. Res. 2001; 54(1):115–121) el derivado de HA–metacrílico (HA–MA) se produjo en un entorno acuoso usando un exceso molar de 20 veces de anhídrido metacrílico en relación con los grupos hidroxilo primarios de HA. No obstante, usando el presente procedimiento a, se forma un sistema de dos fases, reduciendo de este modo la eficiencia de funcionalización.
- 10 **[0072]** Recientemente, Oudshoorn y col. (Polymer 48 (2007) 1915–1920) describió la formación de copolímero de HA–MA empleando una reacción en disolvente aprótico polar orgánico (dimetilsulfóxido) entre sal de tetrabutilamonio de HA y metacrilato de glicidilo (GMA). En el presente caso, sólo se obtuvo un 30 % en mol/mol de funcionalización usando una relación de moles de GMA con respecto a moles de grupos hidroxilo de HA igual a 200.
- 15 **[0073]** En el método que se da a conocer en el presente caso, la presencia del grupo más nucleófilo en la cadena lateral del ácido hialurónico (como ejemplo, el grupo amino del derivado de etilendiamina de ácido hialurónico) podría aprovecharse de forma conveniente para obtener una funcionalización más eficiente empleando como ejemplo, anhídrido metacrílico (AMA) como reactivo.
- 20 **[0074]** Con el fin de estudiar la potencialidad del método y de mostrar la funcionalización selectiva de los grupos amino libres en el HA, tres lotes diferentes de sal de tetrabutilamonio de derivados de ácido hialurónico-amino (HATBA–EDA) que tienen un grado de funcionalización molar igual a un 75, un 50 y un 25 % en mol/mol (según se obtienen a partir del ejemplo 1) respectivamente, se han preparado empleando el procedimiento descrito en el siguiente Ejemplo 5. En particular, en el presente ejemplo, sólo un exceso molar de dos veces de AMA en
 25 comparación con los grupos amino libres de HA–TBA–EDA fue suficiente para obtener la funcionalización completa de todos los grupos amino presentes en el derivado de HA–etilendiamina, obteniendo los copolímeros denominados HA–EDA–MA. La ausencia de grupos amino sin reaccionar en copolímeros de HA–EDA–MA se evaluó mediante ensayo colorimétrico empleando ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Además, es posible controlar la cantidad de funcionalización en los grupos metacrílicos para obtener derivados de HA–EDA–MA que tienen grupos amino libres
 30 que varían de un 5 a un 95 %.

EJEMPLO 5

Síntesis de derivados metacrílicos de ácido hialurónico–etilendiamina (HA–EDA–MA)

- 35 **[0075]** 1 g de HA–TBA–EDA, obtenido tal como se notifica en el Ejemplo 1, que tiene un grado de funcionalización molar en los grupos etilendiamina igual a un 50 % en mol/mol, se disolvió en 100 ml de dimetilsulfóxido anhidro (DMSO). A continuación, se añadió un volumen apropiado de anhídrido metacrílico (AMA) para obtener un exceso molar de dos veces en comparación con los moles de los grupos amino en el HA–TBA–EDA. El catalizador dietilamina se añadió en una relación equimolar a los moles de los grupos amino de HA–EDA–TBA, y la disolución final se dejó durante 24 h a 40 °C.
- 40 **[0076]** Después de este tiempo, la disolución orgánica se hizo fluir en una columna que contiene resina DOWEX 50 Wx8 activada con sodio. La solución eluida se precipitó a continuación en acetona y el sólido obtenido, denominado
 45 HA–EDA–MA, se lavó varias veces con el mismo disolvente, después se secó, se disolvió en agua y se dializó frente a agua destilada. La disolución se filtró y, a continuación, se liofilizó. El Esquema 5 muestra el procedimiento de reacción.

[0077] Esquema 5 – Reacción de funcionalización de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico–etilendiamina (HA–EDA–TBA) con anhídrido metacrílico (AMA) para obtener un derivado de HA–EDA–MA



5

[0078] El derivado de HA–EDA–MA se caracterizó mediante RMN de ¹H (véase la figura 4), mostrando los siguientes picos (D₂O): δ 1,9 (s, –CO–CH=CH–CH₃); δ 2,0 (s, –NH–CO–CH₃); δ 5,5 y 5,8 (m, –CO–CH=CH–CH₃).

10

[0079] El grado de funcionalización molar se ha evaluado comparando las áreas de los picos en δ 5,5 y 5,8 que pueden atribuirse a los protones de vinilo del grupo metacrílico con el área en δ 1,9 que puede atribuirse al grupo metilo de la porción de N–acetilglucosamina de unidades repetitivas de HA. El grado de funcionalización molar en los grupos metacrílicos unidos a unidades repetitivas de HA–EDA resultó igual a un 50 % en mol/mol, es decir, todos los grupos amino se han derivatizado con anhídrido metacrílico.

15

Preparación de derivado de ácido hialurónico–etilendiamina–benzoilcisteína (HA–EDA–BC)

20

[0080] Una de las propiedades estructurales más importantes de la matriz extracelular es su estructura fibrilar debido a la presencia de colágeno y otras proteínas. Esta estructura fibrilar es fundamental para la conexión de las células con el entorno y para la difusión óptima de los nutrientes y factores humorales. Recientemente, muchos esfuerzos se dirigen a la posibilidad de producir soportes artificiales con una estructura fibrilar (Biomaterials 29 (2008) 1989–2006).

25

[0081] En este contexto, una posibilidad se refiere a la producción de copolímeros híbridos capaces de ensamblarse de manera espontánea con una estructura jerárquica precisa. Por ejemplo, Zhang y col. produjeron unos oligopéptidos autocomplementarios capaces de formar soportes fibrilares de manera espontánea cuando se disuelven en tampones acuosos; estas matrices han encontrado diversas aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos (Chemical Biology 2002, 6:865–871).

30

[0082] El interés en producir soportes capaces de autorreticularse después de la inyección en el cuerpo está justificada por el hecho de que su deposición directa sobre la lesión en tejidos u órganos (es decir, para la reconstrucción del cartílago articular) puede evitar la necesidad de una implantación quirúrgica, facilitando entonces la integración de la nueva matriz extracelular formada con el tejido del huésped.

[0083] Desde este punto de vista, es fundamental que la reticulación no debería implicar reacciones potencialmente

tóxicas para los tejidos, además, la reacción debería permitir la encapsulación de las células regeneradoras de la matriz sin interferir con su viabilidad (*Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 263–273). Por ejemplo, Shu y col. Han desarrollado recientemente un derivado de ácido hialurónico–tiol capaz de reticularse lentamente por oxidación por exposición al aire o de reticularse rápidamente si se emplean derivados de PEG–diacrilato como agentes de reticulación (*Biomaterials* 25 (2004) 1339–1348; *Biomaterials* 24 (2003) 3825–3834 WO 2005/056608).

[0084] Algunos compuestos no poliméricos son capaces de ensamblarse de manera espontánea tanto en medios orgánicos como acuosos para formar hidrogeles. Por ejemplo, el aminoácido N,N'–dibenzoil–L–cistina (DBC) y sus derivados (*J. Med. Chem.* 1967, 10, 1172) forman hidrogeles por autoensamblaje espontáneo incluso a una concentración muy baja. La fuerza impulsora de esta agregación espontánea es la formación de unas interacciones π – π que se apilan, promovidas por los grupos arilo (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 584; *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 11679–11691).

[0085] Considerando las propiedades de la DBC y sus derivados para producir hidrogeles fibrilares por autoensamblaje espontáneo, y debido a que la presencia de un puente de disulfuro podría romperse de forma reversible en caso de necesidad, por una reacción de óxido–reducción simple, para formar grupos tiol libres, y oxidarse a continuación de nuevo para formar un puente S–S, el método que se notifica en la presente invención puede emplearse para sintetizar el derivado de ácido hialurónico–etilendiamina–benzoilcisteína (HA–EDA–BC) capaz de aprovechar las propiedades tanto oxidativas como de autoensamblaje para producir una estructura fibrilar.

EJEMPLO 6

Síntesis de derivado de ácido hialurónico–etilendiamina–benzoilcisteína (HA–EDA–BC)

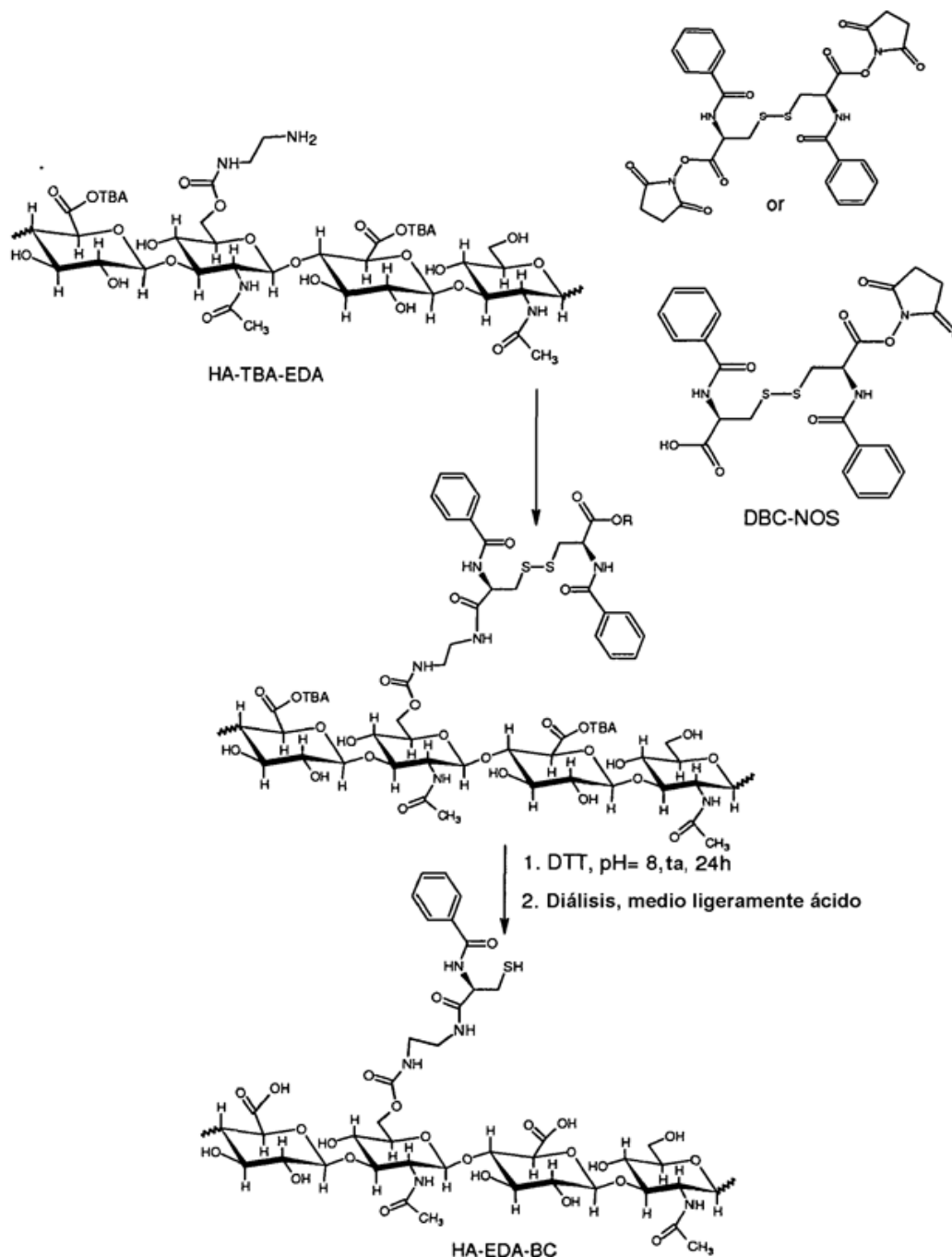
[0086] 1,3 g de N,N'–dibenzoil–L–cistina (DBC) se disuelven en 28 ml de diclorometano y 20 ml de dimetilsulfóxido anhidro. 0,6 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 0,34 g de N–hidroxisuccinimida (NHS) se han añadido a esta disolución. La reacción de activación se ha realizado a temperatura ambiente durante 24 h. Después de este tiempo, la disolución se ha filtrado y el exceso de diclorometano se ha retirado al vacío.

[0087] Esta disolución, que contiene el derivado de N–oxisuccinimida de N,N'–dibenzoil–L–cistina (DBC–NOS), se ha añadido gota a gota a 80 ml de dimetilsulfóxido que contiene 1 g de HA–TBA–EDA con un grado de funcionalización molar de 30 % en mol/mol en los grupos amino. La reacción se ha llevado a cabo con dietilamina como catalizador (960 μ l).

[0088] Después de 28 horas a 40 °C, la disolución se ha eluido en una columna cargada con resina DOWEX 50 Wx8 activada en su forma de sodio, a continuación se ha hecho que el copolímero precipite en éter dietílico, y se ha lavado con etanol y acetona. El HA–EDA–DBC que se obtiene de este modo se ha pulverizado finamente y, a continuación, se ha dispersado en agua hasta que se ha obtenido un hidrogel homogéneo. A continuación, el pH del hidrogel obtenido se ha ajustado a 8 añadiendo NaOH 1 N y, a continuación, se han añadido 1,2 g de ditiotreitol para reducir el puente de disulfuro obteniendo el derivado de ácido hialurónico–etilendiamina–benzoilcisteína (HA–EDA–BC).

[0089] La disolución se ha dejado durante 24 h a temperatura ambiente y, después de regular el pH a 3,5, esta se ha dializado frente a agua ácida durante 5 días. Después, la disolución se ha filtrado y liofilizado. El siguiente **Esquema 6** muestra el procedimiento de funcionalización que se describe anteriormente.

Esquema 6 – Reacción de funcionalización de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico–etilendiamina (HA–EDA–TBA) con el derivado de N–oxisuccinimida de N,N’–dibenzoil–L–cistina (DBC–NOS), y una reducción de puente de disulfuro posterior para obtener el derivado de ácido hialurónico–etilendiamina–benzoilcisteína (HA–EDA–BC)



5

[0090] La RMN de ^1H y los análisis colorimétricos mostraron un grado de funcionalización molar de HA con benzoilcisteína igual a un 30 % en mol/mol. El análisis colorimétrico con TNSB mostró la ausencia de grupos amino sin reaccionar en el derivado de HA–EDA–BC.

10

Hidrogeles de derivados de ácido hialurónico reticulados

[0091] La reticulación de derivados de ácido hialurónico metacrílicos de la serie HA–EDA–MA se realizó en un medio acuoso u orgánico con o sin fotoiniciadores después de la irradiación con rayos γ , rayos UV, irradiación visible, microondas. Se ha confirmado experimentalmente que las disoluciones acuosas (en el intervalo de concentración de un 1–20 % en p/v) de copolímeros de HA–EDA–MA que tienen diversos grados de funcionalización molar en los grupos metacrílicos o etilendiamina unidos al ácido hialurónico, obtenidas de acuerdo con los

15

procedimientos de la presente invención, producen hidrogeles después de la exposición a radiaciones que tienen unas longitudes de onda comprendidas entre 180 y 800 nm, o mediante el empleo de una fuente de microondas, al igual que mediante el empleo de una fuente de rayos γ o de otras fuentes ionizantes.

5 **[0092]** La reticulación del derivado de HA–hidrazina (HA–Hy) se realizó en un entorno acuoso, preferiblemente a pH 4,75 en presencia de carbodiimidias solubles en agua, por ejemplo (1–etil–3–(3–dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDCI).

10 **[0093]** La reticulación del derivado de ácido hialurónico–etilendiamina (HA–EDA) se realizó en tampón de fosfato a pH 7–8 empleando agentes de reticulación bifuncionales o polifuncionales, preferiblemente glutaraldehído.

[0094] La reticulación del derivado de HA–EDA–BC se realizó en tampón de fosfato, preferiblemente a pH 7,4 mediante un proceso de oxidación por exposición al aire.

15 EJEMPLO 7

Producción de hidrogeles a base de HA–EDA–MA

20 **[0095]** Las disoluciones acuosas de copolímero de HA–EDA–MA obtenidas siguiendo el Ejemplo 5, con un grado de funcionalización molar igual a un 50 % en mol/mol en los grupos etilendiamina y un 50 % en mol/mol en los grupos metacrílicos unidos al HA, y con una concentración que varía de un 1 a un 20 % en p/v, se estratificaron en una placa de Petri obteniendo de este modo un espesor de unos pocos milímetros.

25 **[0096]** Las placas de Petri se colocaron en una caja refrigerada a 12 °C, y se irradiaron empleando una lámpara Polymer (Italquartz, Milán) de 125 vatios, que tiene un intervalo de emisión comprendido entre 250 y 370 nm y un pico máximo de intensidad a 310 nm. La distancia entre la lámpara y la placa de Petri era de aproximadamente 30 cm. El tiempo de tales ciclos de irradiación se encontró en el intervalo de 15–90 min. Para cada concentración polimérica, se ha determinado el tiempo transcurrido para obtener películas de hidrogel fácilmente despegables de la placa.

30 **[0097]** La **Tabla 2** siguiente muestra, como ejemplo, los tiempos de irradiación necesarios para obtener películas de hidrogel considerando tres concentraciones diferentes.

35 TABLA 2

Concentración de HA–EDA–MA (p/v)	Tiempo de formación de películas de hidrogel a base de HA–EDA–MA
2 %	60 min
4 %	45 min
8 %	20 min

EJEMPLO 8

Autorreticulación de ácido hialurónico–hidrazina (HA–Hy)

40 **[0098]** El derivado de HA–Hy obtenido como en el Ejemplo 2, que tiene un grado de funcionalización molar en los grupos hidrazina igual a un 50 % en mol/mol, se disolvió en agua destilada para obtener una concentración igual a un 1 % en p/v. El pH de la disolución se ha ajustado a 4,75 empleando unas pocas gotas de HCl 0,1 N.

45 **[0099]** Se añadió una cantidad molar de (1–etil–3–(dimetilaminopropil)–carbodiimida) (EDCI) igual a la cantidad de grupos hidrazina unidos a HA y el pH se ha mantenido constante añadiendo HCl 0,1 N hasta que tuvo lugar la formación de un hidrogel. El hidrogel se recuperó y se lavó en agua destilada, a continuación se liofilizó.

50 **[0100]** El rendimiento en peso de hidrogel fue de un 80 % en comparación con el polímero de partida, el sólido se caracterizó a continuación mediante análisis de FTIR.

EJEMPLO 9

Producción de hidrogeles de HA–EDA–BC

55 **[0101]** Una disolución de formación de gel se obtuvo dispersando la cantidad apropiada del polímero en una disolución de tampón de fosfato Dulbecco a pH 7,4 y, a continuación, se sometió a agitación con vórtex durante 5 min hasta que se obtuvo una solubilización completa. Se prepararon unas muestras de hidrogeles de un 0,5 p/v % a base de HA–EDA–BC por oxidación por exposición al aire. Después de la formación de gel, las muestras se lavaron con agua destilada y se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron y se observaron usando un microscopio de

60

barrido electrónico. Tal como se muestra en las figuras 5 a y 5 b, un hidrogel de HA-EDA-BC muestra una estructura fibrilar con fibrillas interconectadas con un diámetro que varía entre 500 nm y 1 µm.

EJEMPLO 10

5

Ensayo de viabilidad y encapsulación de condrocitos

[0102] Los condrocitos articulares humanos recién aislados con respecto al cartílago articular humano se cultivaron en dos pasadas durante dos semanas en DMEM completo. El HA-EDA-BC liofilizado se esterilizó mediante irradiación UV (usando una lámpara UV de 125 w) durante 2 h. A continuación, 150 mg de HA-EDA-BC se disolvieron en 9,4 ml de DMEM, se sometieron suavemente a agitación con vórtex durante aproximadamente 10 min, a continuación la espuma formada se retiró por sonicación durante 3 min. La encapsulación de condrocitos se llevó a cabo añadiendo 0,6 ml de DMEM que contiene 5×10^6 células y agitando suavemente durante unos pocos minutos para garantizar una distribución de células homogénea. A continuación, 150 µl de suspensión de formación de gel se vertieron en Insertos de NUNC CC (membranas de policarbonato) Multidish de 24 pocillos. Se dejó el hidrogel de formación de gel a continuación durante 2 h antes de añadir 1,1 ml de DMEM y de incubar a 37 °C, 5 % de CO₂. La viabilidad de los condrocitos encapsulados se evaluó mediante ensayo de MTS después de 2 h, 3, 7, 14 y 21 días. Cada día, tres insertos que contienen hidrogel de HA-EDA-BC encapsulado se trataron con 100 ml de disolución de MTS, y se dejó que reaccionaran durante 4 h. A continuación, la absorbancia se leyó en una placa de 96 pocillos a 550 nm (n = 9) usando como blanco un hidrogel de HA-EDA-BC vacío tratado como el hidrogel con los condrocitos. El ensayo de citocompatibilidad de células vivas y muertas se realizó sobre hidrogel cargado con condrocitos de HA-EDA-BC empleando un procedimiento de doble tinción usando calceína AM y homodímero de etidio-III (EthD-III). La calceína AM es una molécula no fluorescente para la cual son permeables las células, que se escinde en el interior de la célula por las esterasas intracelulares para producir su contrapartida fluorescente (fluorescencia verde). El EthD-III es un tinte de ácido nucleico no permeable a través de las células viables pero que puede difundirse a través de la membrana de las células muertas en la que este se une al ADN y da una fluorescencia roja. Después de tres días de cultivo, los insertos que contienen geles se lavaron tres veces con PBS a pH 7,4 y, a continuación, se incubaron durante 1 h con las disoluciones de tinción y, a continuación, se lavaron de nuevo para retirar el exceso de disoluciones de tinción.

30

[0103] Los geles se montaron sobre portaobjetos y se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Axioscop 2 (Zeiss) y se capturaron con una cámara digital AxioCam (Zeiss) en comunicación con un ordenador.

[0104] Tal como se observa en la figura 6, la absorbancia obtenida mediante el análisis de MTS aumenta durante todos los 21 días de incubación, mostrando una buena viabilidad y proliferación de las células en el interior del soporte de hidrogel tridimensional a base de HA-EDA-BC.

35

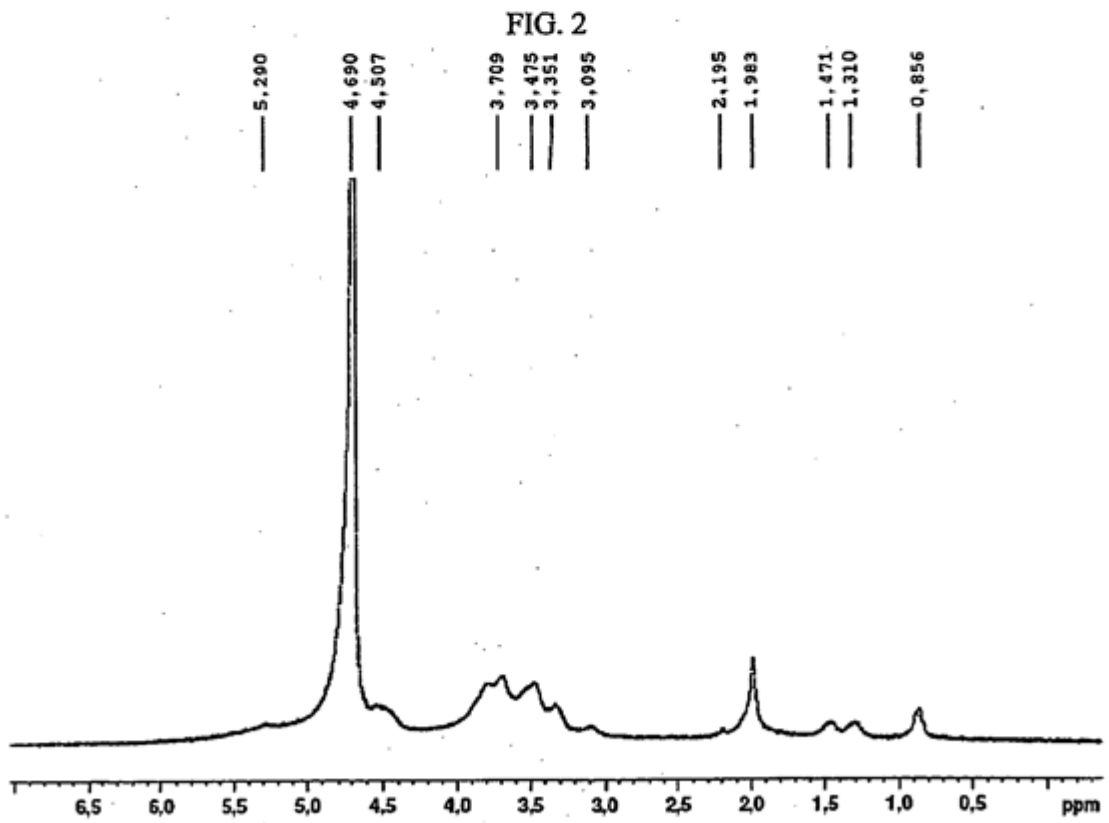
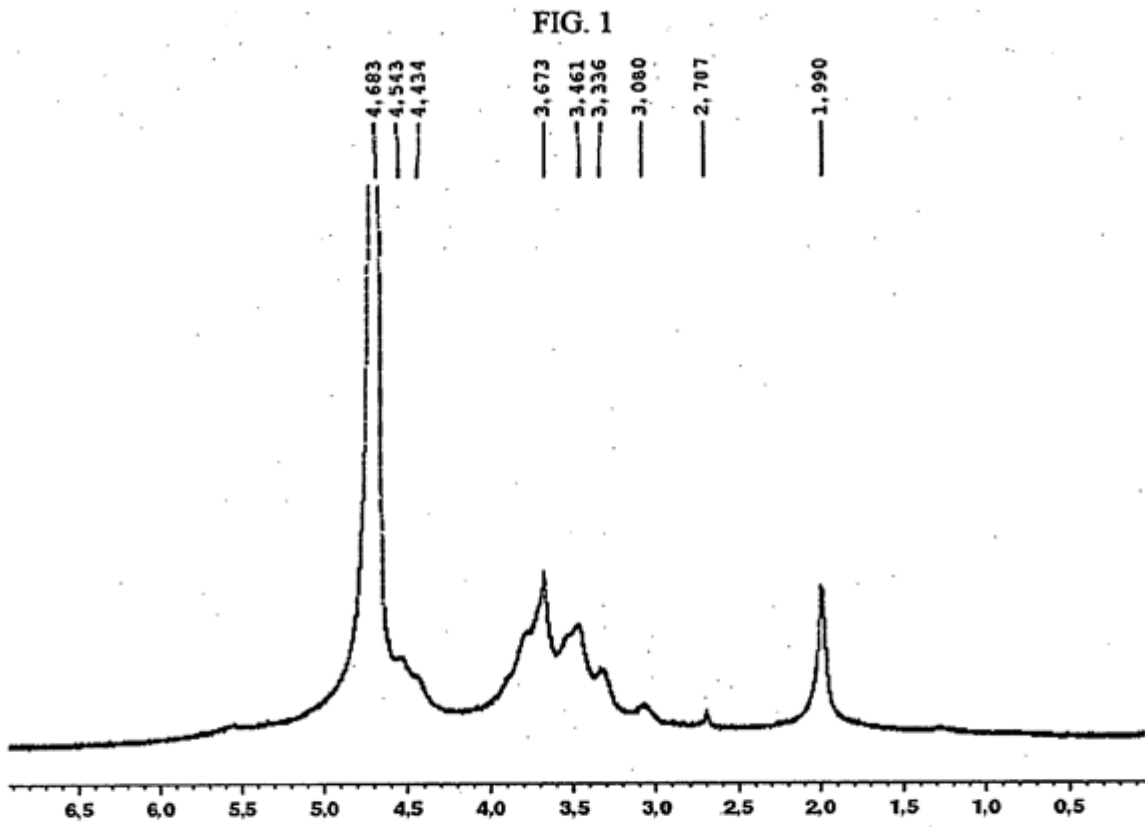
[0105] La imagen de fluorescencia de células vivas y muertas, véase la figura 7, después de tres días de cultivo, muestra varias células vivas y sólo unas pocas células muertas (véanse los cuadros en la imagen) indicando de este modo una buena biocompatibilidad del procedimiento de encapsulación. En la imagen a color original, las células vivas son verdes y las células muertas son rojas.

40

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir derivados funcionalizados de ácido hialurónico que comprende las siguientes etapas consecutivas:
- 5 a) activación de por lo menos un grupo hidroxilo del ácido hialurónico, en forma de una sal del mismo soluble en disolventes orgánicos, por reacción de dicha sal de ácido hialurónico en un disolvente aprótico polar, con un agente de carbonilación seleccionado de ésteres fenílicos carbónicos y ésteres fenílicos halofórmicos;
- 10 b) reacción de la sal de ácido hialurónico activada resultante de la etapa a), a través de una reacción de sustitución nucleófila con un compuesto de la fórmula general $\text{NH}_2\text{-R}$, en la que R está seleccionado del grupo que consiste en NH_2 , un grupo aminoalquilo, una cadena de alquilo o una cadena de arilalquilo, una cadena poliacrílica, una cadena de polioxietileno, un fármaco, un polímero o una proteína.
- 15 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente de carbonilación está seleccionado de bis(4 nitrofenilcarbonato) y clorofenilcarbonato.
3. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–2, en el que dicho compuesto de la fórmula general $\text{NH}_2\text{-R}$ está seleccionado de hidrazina y un grupo diaminoalquilo de la fórmula $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$ en la que n es un número entre 1 y 30, preferiblemente entre 1 y 10.
- 20 4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–3, en el que dicha sal de ácido hialurónico está seleccionada de sal de tetrabutilamonio y sal de cetiltrimetilamonio.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–4, en el que dicho disolvente aprótico polar está seleccionado del grupo que consiste en: dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida y sus mezclas.
6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–5, en el que ambas etapas de activación (a) y de sustitución nucleófila (b) se llevan a cabo a una temperatura comprendida entre 10 °C y 60 °C.
- 30 7. Un proceso para la producción de hidrogel que consiste en someter un derivado funcionalizado de ácido hialurónico obtenido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–6 a una autorreticulación en presencia de una carbodiimida como agente de activación, o a una reticulación química por medio del uso de agentes de reticulación bifuncionales o polifuncionales.
- 35 8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–6, en el que un derivado funcionalizado de ácido hialurónico en forma de sal obtenido a partir de dicha etapa b) se somete a una funcionalización adicional mediante una sustitución nucleófila por reacción con un compuesto de la fórmula $\text{Y-R}'$, en la que Y es un buen grupo saliente seleccionado de halógeno, N-oxisuccinimida, un alcoxilo con 1–6 átomos de carbono, o Y representa la porción electrófila de un anhídrido o un epóxido, y R' está seleccionado del grupo que consiste en: grupo acrililo o metacrililo ambos opcionalmente sustituidos o un grupo que pertenece a una molécula, soluble en disolventes orgánicos o en disolventes acuosos.
- 40 9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha funcionalización adicional se realiza en un medio acuoso o disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente aprótico polar seleccionado del grupo que consiste en: dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida y sus mezclas.
- 45 10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8–9, en el que dicha funcionalización adicional se realiza a una temperatura comprendida entre 5 °C y 60 °C.
- 50 11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8–10, en el que dicha funcionalización adicional se realiza en presencia de un catalizador seleccionado del grupo que consiste en: dietilamina, trietilamina, dimetilaminopiridina y sus mezclas.
- 55 12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8–11, en el que dicho compuesto de la fórmula $\text{Y-R}'$ se corresponde con anhídrido metacrílico, cloruro de metacrililo, cloruro de acrililo, acrilato de glicidilo o metacrilato de glicidilo.
- 60 13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8–11, en el que dicho compuesto de la fórmula $\text{Y-R}'$ se corresponde con el éster de N-oxisuccinimida o diéster de N,N'-dibenzoil-L-cisteína o derivados similares.
14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el derivado obtenido a partir de dicha funcionalización adicional se somete a un proceso de reducción para obtener un resto de benzoil-cisteína o sus derivados similares.
- 65 15. Un derivado funcionalizado de ácido hialurónico que tiene un peso molecular en el intervalo de 50.000 a 1.500.000 Dalton que puede obtenerse a partir del proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1–14.

16. Un derivado funcionalizado de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el grado de funcionalización molar está comprendido entre por lo menos un grupo hidroxilo y la totalidad de los grupos hidroxilo de ácido hialurónico.
- 5 17. Un derivado funcionalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15–16, que puede obtenerse a partir del proceso de la reivindicación 12.
- 10 18. Un hidrogel, que comprende el derivado funcionalizado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 17, que puede obtenerse a partir de un proceso de fotoreticulación, en el que la concentración de dicho derivado funcionalizado en una disolución acuosa u orgánica está comprendida entre un 1 % en p/v y un 20 % en p/v.
- 15 19. Un hidrogel de acuerdo con la reivindicación 18, que puede obtenerse por irradiación con unas longitudes de onda máximas en el intervalo de 180 a 800 nm, en presencia o en ausencia de un iniciador de radicales con unos tiempos de irradiación variables desde 5 min hasta 10 horas.
- 20 21. Un derivado funcionalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15–16, que puede obtenerse a partir del proceso de cualquiera de las reivindicaciones 13–14.
- 25 22. Un hidrogel que comprende el derivado funcionalizado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 21, que puede obtenerse a partir de un proceso de auto-oxidación por exposición al aire.
- 30 23. Hidrogeles obtenidos a partir del proceso de la reivindicación 7 o de acuerdo con las reivindicaciones 18–20 o 22, producidos en forma de nano- o micropartículas, películas, membranas, fibras y soportes.
24. Uso de hidrogeles de acuerdo con la reivindicación 23, para la producción de sistemas para la liberación sostenida de fármacos o material genético, o sistemas para el recubrimiento de heridas, órganos o tejidos, o materiales o soportes implantables para la regeneración de tejidos.



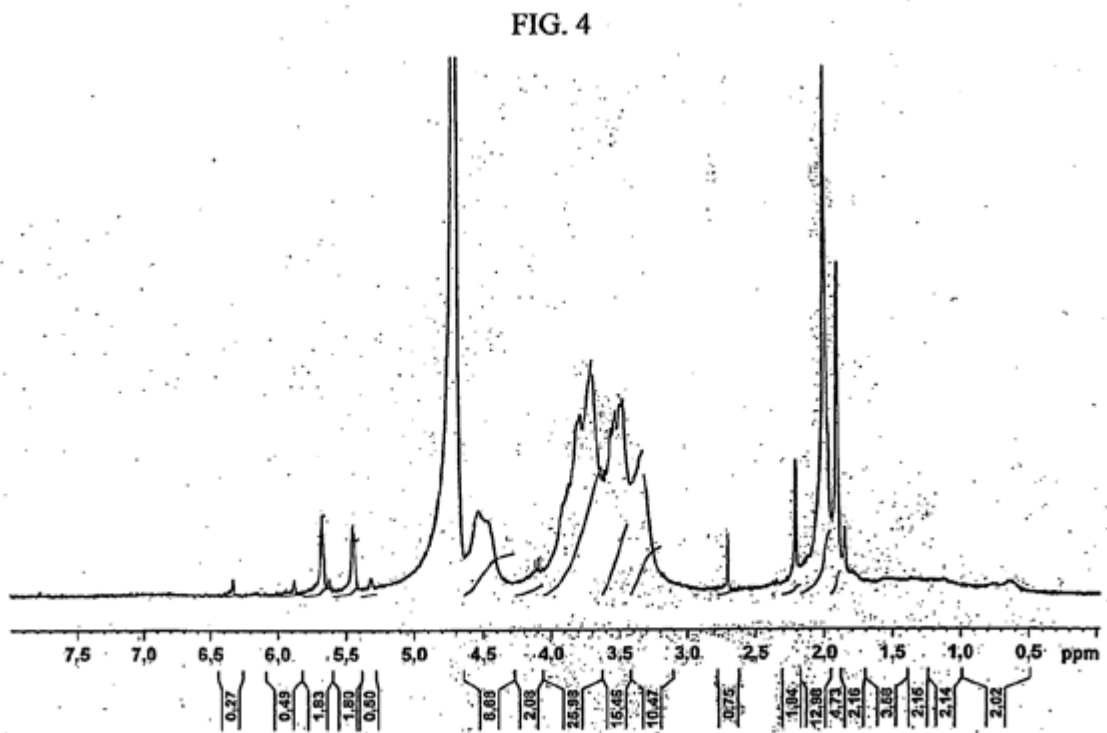
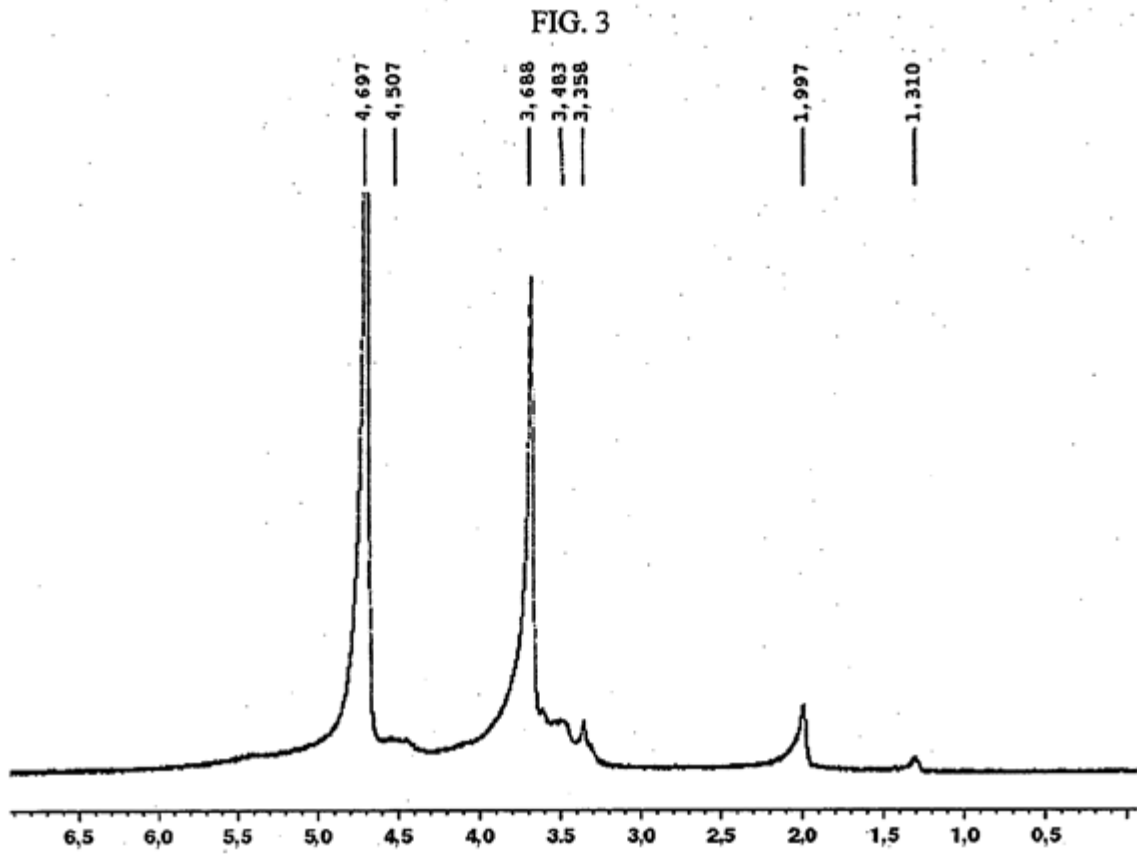


FIG. 5

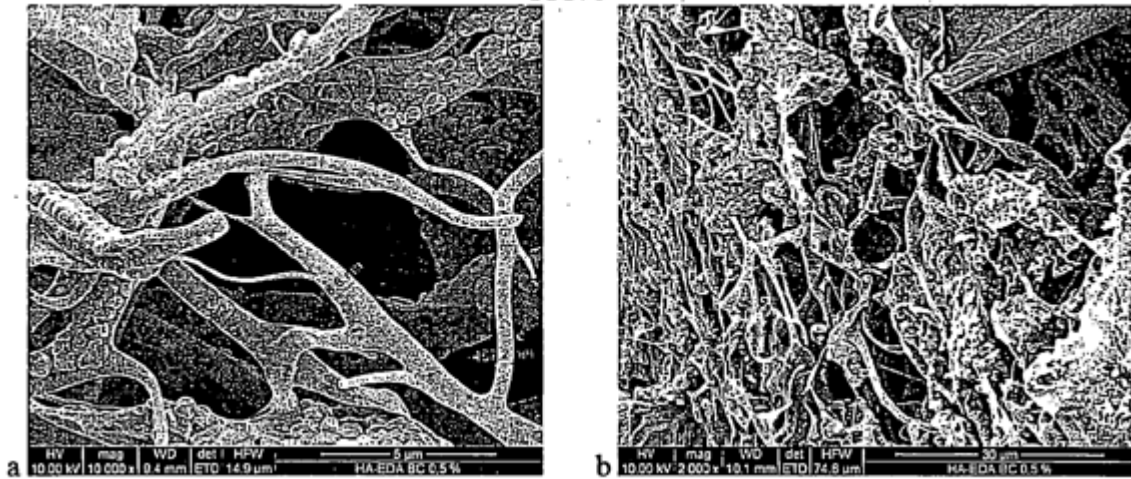


FIG. 6

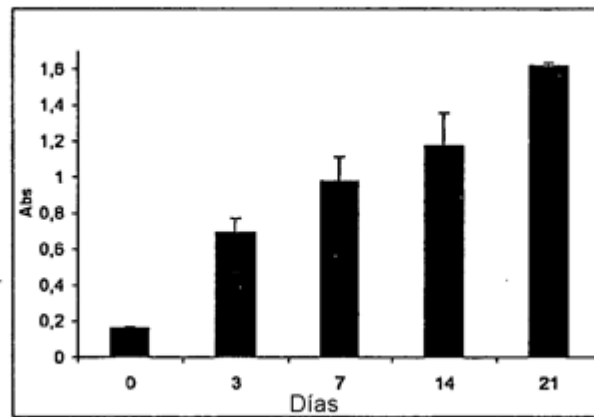


FIG. 7

