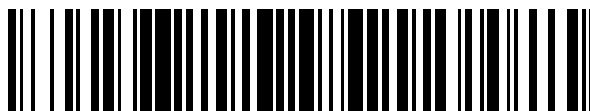


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 866**

51 Int. Cl.:

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2000 E 00975711 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1229940**

54 Título: **Disolución biopolimérica acuosa autogelificante controlada por la temperatura y dependiente del pH**

30 Prioridad:

15.11.1999 US 165641 P

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

08.09.2014

73 Titular/es:

**PIRAMAL HEALTHCARE (CANADA) LIMITED
(100.0%)**

**110 Industrial Parkway North
Aurora, ON L4G 3H4, CA**

72 Inventor/es:

**CHENITE, ABDELLATIF;
CHAPUT, CYRIL;
WANG, DONG y
SELMANI, AMINE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 491 866 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

Disolución biopolimérica acuosa autogelificante controlada por la temperatura y dependiente del pH

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a la composición de ensamblajes moleculares en disolución líquida que permite la formación de geles biopoliméricos controlados por la temperatura y dependientes del pH, tales como los basados en polisacáridos, y a métodos para la preparación de los mismos.

10

Estado de la Técnica

Los biopolímeros y las macromoléculas son materiales atractivos para la preparación y diseño de sistemas autogelificantes y/o autoensamblantes. Numerosos intentos tienden a desarrollar tales sistemas basados en polisacáridos y polipéptidos.

15

La Publicación Internacional No. WO 99/07416 describe una composición en forma de gel que contiene 0,5 a 4% en peso a volumen de quitosano en disolución acuosa ácida con una sal de monofosfato dibásico de un poliol o azúcar para producir gelificación controlada por la temperatura y dependiente del pH.

20

También se propusieron geles formados *in situ* con polisacáridos iónicos. Una composición puede usarse como un dispositivo médico para la administración de fármacos, la aplicación de un agente de diagnóstico, o la prevención de adhesiones postoperatorias, y está compuesta de un vehículo líquido acuoso el cual es capaz de ser gelificado *in situ*. Incluye al menos un polisacárido iónico, al menos un polímero formador de películas, y un medicamento o agente farmacéutico, agua y, opcionalmente, un contraión capaz de gelificar al polisacárido iónico. Sin embargo, la gelificación se alcanza por interacción entre el polisacárido iónico y el polímero formador de películas, o por reticulación inducida por contraiones del polisacárido iónico. Otros geles que se forman *in situ* están basados en una composición de polioxialquileno o en una mezcla *in situ* de polioxialquileno/polisacárido o de alginato/catión.

25

Sería muy deseable disponer de un gel biopolimérico que se forme a la vez que evita cualquier disolvente orgánico, cualquier monómero orgánico, cualquier reticulación iónica o covalente que pueda ser potencialmente tóxica o inducir una menor compatibilidad biológica.

30

Sería muy deseable disponer de un gel biopolimérico que se forme por interacciones libres inducidas por estímulos entre moléculas biológicamente aceptables y bien reconocidas, células encapsuladas y material celular a la vez que retiene su actividad biológica.

35

Sería muy deseable disponer de tales geles, los cuales retendrían su estado sólido o del gel a la temperatura fisiológica ó 37°C.

40

Objeto de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una vía que permita la preparación de una disolución líquida neutra transparente de un biopolímero soluble en ácidos y controlado por el pH a la vez que se evita cualquier precipitación o gelificación heterogénea no deseada.

45

Un segundo objetivo principal de la presente invención es proporcionar una disolución líquida neutra transparente de un biopolímero soluble en ácidos y controlado por el pH que formará térmicamente geles homogéneos sólidos a una temperatura próxima a la temperatura fisiológica.

50

Otro objetivo es proporcionar geles formados dependientes del pH y controlados por la temperatura, los cuales podrían usarse para encapsular células y material celular a la vez que retendrían su actividad biológica.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar geles que retengan su estado sólido o de gel a la temperatura fisiológica ó 37°C.

55

Aún un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de tales geles.

Según la presente invención, se proporciona una composición líquida autogelificante según la reivindicación 1.

60

La composición puede prepararse a partir de ácidos orgánicos y/o inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido acético, ácido salicílico, ácido fórmico, ácido glutámico, ácido fosfórico, ácido ortofosfórico, o ácido glicerosfosfórico, o una mezcla de los mismos.

65

La molécula, residuo o secuencia se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en N,N-bis[hidroxietyl]glicina (BICINE), bis[2-hidroxietyl]iminotris[hidroxietyl]metano (BIS-TRIS), glicil-glicina (GLY-GLY), trietanolamina (TEA), N-

tris[hidroximetil]metilglicina (TRICINE), y tris[hidroximetil]aminometano (TRIZMA), y derivados o mezclas de los mismos.

5 Preferiblemente, la composición además comprende al menos otro polímero soluble en agua, tal como colágeno, metil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxietil propilcelulosa, hidroximetil propil celulosa, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno-co-óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), o policaprolactona dioles, y derivados o mezclas de los mismos.

10 La composición de la presente invención puede además comprender un aditivo sólido en partículas o un aditivo soluble en agua, tal como un fármaco o un agente farmacéutico, microorganismos, células de plantas, células de animales o células de ser humano dispersadas en la misma.

15 La composición de la presente invención puede usarse como un vehículo para administrar *in situ* un agente farmacéutico.

Aún según la presente invención, se proporciona un método para preparar una composición como se definió anteriormente. El método comprende las etapas de:

20 a) disolver el biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH en una disolución acuosa ácida de un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0 a una temperatura que varía de 0 a 20°C para obtener una composición acuosa de biopolímero que tiene una concentración de 0,1 a 10% en peso del biopolímero;

25 b) disolver 0,1 a 10% en peso de la molécula soluble en agua para obtener una formulación líquida transparente con un pH que varía entre 5,8 y 7,4.

La formulación líquida puede calentarse a una temperatura superior a 30°C para obtener un gel sólido, gel que tiene un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4.

30 La composición de la presente invención puede usarse en cosmética, farmacología, medicina y/o cirugía, en un dispositivo implantable o un implante para reparaciones, reconstrucción y/o reemplazamiento de tejidos y/u órganos, como un sistema implantable para administrar fármacos transdérmica o dermatológicamente, como un implante oftalmológico o un sistema de administración de fármacos, o en matrices artificiales cargadas de células para ingeniería genética y cultivo de materiales híbridos modificados por bioingeniería y equivalentes de tejidos.

35 La composición puede cargarse con células seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos (cartílago articular), fibrocondrocitos (menisco), fibroblastos de ligamentos (ligamento), fibroblastos de la piel (piel), tenocitos (tendones), miofibroblastos (músculo), células madre mesenquimales y queratinocitos (piel). Tal composición puede usarse en el cultivo y la modificación genética de cartílagos articulares artificiales y tejidos y órganos cartilagosos, para aplicaciones quirúrgicas o de ensayos de laboratorio.

40 La composición de la presente invención también puede usarse en el procesado y modificación genética de sustitutos artificiales vivos para ligamentos, tendones, piel, músculos óseos y órganos metabólicos, para aplicaciones quirúrgicas o de ensayos de laboratorio, en sustitutos vivos para el reemplazamiento de cartílagos articulares, fibrocartílagos, órganos cartilagosos, ligamentos, tendones, tejidos óseos o piel, para inducir una formación ectópica de tejidos semejantes a fibrocartílagos o cartílagos, como un biomaterial en forma de gel inyectable o implantable que actúa como gel el cual actúa como soporte, vehículo, dispositivo restructor o sustituto para la formación *in situ* de tejidos semejantes a huesos, fibrocartílagos o cartílagos, y/o en cosmética, farmacología, medicina y/o cirugía.

50 Para el fin de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos y expresiones.

55 Se pretende que la expresión "temperatura de gelificación" signifique cualquier temperatura que varía de aproximadamente 30°C a aproximadamente 80°C, preferiblemente entre 30°C y 60°C, y más preferiblemente a aproximadamente la temperatura fisiológica ó 37°C.

La expresión "biopolímero soluble en ácidos controlado por el pH" se refiere a un polímero biológico que se disuelve en un medio acuoso ácido, y precipita o gelifica heterogéneamente cuando se aumenta el pH.

60 El término "tridimensional" se refiere en la presente memoria al hecho de que la disolución polimérica es gelificada y conformada simultáneamente por el molde en el que la disolución se vertió inicialmente. Los geles pueden producirse en vasos, platos, tubos de plástico o vidrio, o entre dos placas para obtener cualquier forma esperada.

65 La expresión "gelificación *in situ*" se refiere en la presente memoria a la formación de geles inyectando la disolución líquida dentro de sitios específicos de entornos de mamíferos o seres humanos, por ej., cualquier tejido (músculos, hueso, ligamentos, cartílagos) y órgano. La gelificación *in situ* permite el llenado completo y preciso de defectos de

tejidos o de cavidades corporales. La gelificación de una mezcla de biopolímero es inducida por la temperatura fisiológica.

5 La expresión "gelificación endotérmica" se refiere en la presente memoria al mecanismo térmico de la disolución, el cual permite que la disolución gelifique tras reposar a la temperatura deseada. La inducción de transiciones de sistemas de sol a gel requiere energía vía, por ejemplo, la temperatura.

10 El término "residuo" se refiere en la presente memoria a una serie de moléculas biológicas que tienen una función química específica. Ejemplo: los residuos aminoácidos.

10 El término "secuencia" se refiere en la presente memoria a la asociación de dos o varias moléculas o residuos. Ejemplo: una secuencia de residuos aminoácidos (LYS-ASP-PRO-GLY-LYS).

15 La expresión "carácter básico" se refiere en la presente memoria a la capacidad de una molécula química en disolución acuosa para capturar protones (H^+), dando así lugar a un aumento del pH.

20 La expresión "células o materias celulares" se refiere en la presente memoria a entidades biológicas vivas, tales como células aisladas, dispersiones celulares, agregados de células, esferoides de células o células adheridas a partículas de microesferas sólidas, que están encapsuladas dentro de los geles.

Es posible formar diferentes materiales gelificados, materiales que son moldeados (formas, tubos, membranas, películas personalizadas...) o conformados *in situ* dentro de entornos biológicos (llenado de defectos de tejidos).

25 En una realización preferida, la disolución acuosa de biopolímero autogelificante tiene un pH por encima del necesario para la precipitación normal, y se transforma en un gel sólido tras la estimulación térmica. Este gel de biopolímero puede usarse como un vehículo para fármacos o como un sistema no vivo de administración terapéutica, como material sustituyente para tejidos y órganos y como encapsulante de células o microorganismos vivos. Las matrices tipo gel se forman rápidamente a temperaturas entre 30 y 60°C. Tales sistemas acuosos se usan como materiales de relleno inyectables, inyectados y gelificados *situ* para rellenar y reparar defectos de tejidos.

30 Los geles biopoliméricos pueden aplicarse para usos quirúrgicos de reconstrucción y regeneración y para fines de administración de fármacos. Proporcionan geles poliméricos bioerosionables térmicamente reversibles o irreversibles con componentes biológicamente bien conocidos y compatibles para una amplia gama de aplicaciones médicas/biotecnológicas.

35 Descripción de las figuras

40 La Fig. 1 ilustra una representación del módulo elástico G' (Pa) vs. la temperatura (grados Celsius) que ilustra la gelificación/desgelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con MOPS (2,0% p/v) tras enfriar/calentar;

45 La Fig. 2 ilustra una representación del módulo elástico G' (Pa) vs. la temperatura (grados Celsius) que ilustra la gelificación/desgelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con MOPSO (3,0% p/v) tras enfriar/calentar;

La Fig. 3 ilustra una representación del módulo elástico G' (Pa) vs. la temperatura (grados Celsius) que ilustra la gelificación/desgelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con BIS-TRIS (3,0% p/v) tras enfriar/calentar;

50 La Fig. 4 ilustra una representación del módulo elástico G' (Pa) vs. la temperatura (grados Celsius) que ilustra la gelificación/desgelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con MES (8,0% p/v) tras enfriar/calentar;

55 La Fig. 5 ilustra una representación del módulo elástico (Pa) vs. la temperatura (grados Celsius) que ilustra la gelificación/desgelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con BES (2,0% p/v) tras enfriar/calentar;

60 La Fig. 6 ilustra una representación de la turbidimetría (NTU) vs. el tiempo que ilustra la gelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con GP (8,0% p/v, pH=7.2) y sin GP (pH=5,4) a 37°C;

La Fig. 7 ilustra una representación de la turbidimetría (NTU) vs. el tiempo que ilustra la gelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con BES (2,0% p/v) y sin BES (pH=5,4) a 37°C; y

65 La Fig. 8 ilustra una representación de la turbidimetría (NTU) vs. el tiempo que ilustra la gelificación térmica de una disolución de quitosano (2% p/v, desacetilación igual a 85%) con BIS-TRIS, a diferentes contenidos de BIS-TRIS, de 2,0 a 4,0% p/v, a 37°C.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención se propone un nuevo mecanismo de gelificación que combina la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones hidrófilas/hidrófobas. Sólo puede conseguirse a través de interacciones complejas entre macromoléculas biológicas o polímeros sintéticos, moléculas de agua y moléculas bioquímicas específicas que tengan acciones especiales.

Según la presente invención, el biopolímero en cuestión debe de ser insoluble en agua en condiciones neutras pH = 7.

Se describe un método para preparar una composición el cual comprende las etapas de: a) disolver un biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH según la reivindicación 1 en una disolución acuosa ácida de un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0 para obtener una composición acuosa de biopolímero que tiene una concentración de 0,1 a 5% en peso de dicho biopolímero, y b) disolver en dicha composición acuosa de biopolímero de 0,1 a 10% en peso de una molécula soluble en agua que tenga un carácter básico moderado según la reivindicación 1, para obtener una formulación líquida transparente con un pH que varía entre 6,5 y 7,4. La etapa final es el calentamiento de la formulación líquida a una temperatura superior a 30°C para obtener un gel sólido, donde dicho gel tiene una concentración de 0,1 a 5,0% en peso de dicho biopolímero, y una concentración de 0,1 a 10% en peso de dicha molécula, y tiene un pH de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

La disolución acuosa ácida se prepara a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos que se seleccionan del grupo que consiste en ácido acético, ácido ascórbico, ácido glutámico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido salicílico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido propiónico, ácido fórmico, y una mezcla de los mismos. La solubilización en disolución acuosa de biopolímeros solubles en ácidos controlados por el pH requiere disoluciones acuosas ácidas que tengan un pH que varíe de 1,0 a 5,0.

El biopolímero seleccionado es un quitosano soluble en ácidos que gelifica por acción del pH, siendo dicho biopolímero quitosano catiónico y que porta grupos amino, o colágeno.

En la disolución biopolimérica puede incorporarse un segundo polímero seleccionado de un grupo que comprende colágeno, metil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxietil propilcelulosa, hidroximetil propil celulosa, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno-co-óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), policaprolactona dioles, y derivados, y cualquier mezcla de los mismos.

La molécula mezclada se requiere para que juegue un papel doble: 1) aumentar el pH de la disolución biopolimérica hasta el de las condiciones fisiológicas, y 2) prevenir la gelificación o agregación inmediata. La molécula requerida, preferencialmente seleccionada de sales orgánicas específicas y aminoácidos, debe tener un carácter básico moderado y un pKa entre 6,0 y 7,6. Típicamente, la molécula seleccionada debe tener una gran sensibilidad en términos de hidrofilia/hidrofobia (hidratación y deshidratación hidrófoba) y sensibilidad térmica. Tales efectos están basados en la competencia por hidratarse entre grupos apolares y polares de dicha molécula, lo cual permite el diseño de máquinas moleculares por conversión de energía libre.

La molécula es preferiblemente una sal de sodio, magnesio o hierro de N-[carbamoilmetil]-2-aminoetano-sulfonato (ACES), N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetano-sulfonato (BES), 3-[N,N-bis(2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (DIPSO), N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-3-propano-sulfonato (HEPES), 2-[N-morfolino]etano-sulfonato (MES), 4-[N-morfolino]butano-sulfonato (MOBS), 3-[N-morfolino]butano-sulfonato (MOPS), 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (MOPSO), 3-[N-tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (TAPSO), N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano-sulfonato (TES), bis[2-hidroxietil]iminotris[hidroximetil]metano (BIS-TRIS), 3-mofolino 1-1-propanodiol, y derivados, y cualquier mezcla de los mismos.

La molécula también puede seleccionarse de residuos aminoácidos específicos, secuencias de aminoácidos o poli(aminoácidos) que tengan un carácter básico y un pKa entre 6,0 y 7,6, preferencialmente histidina (His).

A la disolución líquida de la etapa a) o b) que contiene biopolímero puede añadirse un agente farmacéutico o bioactivo. Puede ser muy soluble, escasamente soluble o no soluble en la formulación acuosa. A la disolución líquida de biopolímero de la etapa a) o b) pueden añadirse aditivos sólidos en partículas tales como microesferas o nanoesferas no poliméricas, gránulos o polvos minerales o cerámicos.

La mezcla puede dispensarse para que gelifique en un receptor deseado, en un molde o dentro de un tejido, órgano o cavidad corporal. Puede mantenerse una líquida no gelificada estable a una temperatura que varía de aproximadamente 0°C a aproximadamente 20°C. La temperatura de solidificación varía de aproximadamente 37°C a aproximadamente 60°C, y preferiblemente aproximadamente 37°C.

Prácticamente, la mezcla se introduce dentro del cuerpo de un animal o ser humano por inyección o administración endoscópica, y gelificarse *in situ* a una temperatura de aproximadamente 37°C.

La Tabla 1 siguiente proporciona una composición de algunos ejemplos preferidos de agentes amortiguadores del pH/gelificantes con una disolución de quitosano (desacetilación igual a 85%) al 2% p/v.

Tabla 1

Agente	pKa	Concentración (mM)	pH	Temperatura intrínseca de gelificación (°C)
BES	7,1	85,03	7,1	38,5
MOPS	7,2	86,5	7,2	32
MOPSO	6,9	121,35	7,2	32,2
BIS-TRIS	6,5	191,20	7,15	25,5
MES	6,1	361,0	7,2	35,5

5 Formación de geles biopoliméricos

Se disuelve un biopolímero seleccionado en forma de polvo en una disolución acuosa ácida hasta que se obtiene una disolución transparente. La proporción de biopolímero varía de 0,5 a 10,0% p/v, preferencialmente de 1,0 a 3,0% p/v. El pH de la disolución acuosa de biopolímero varía de 4,0 a 5,5. Las disoluciones acuosas de biopolímero pueden esterilizarse por tratamiento en autoclave o filtración a través de filtros estériles en línea (0,22 micrómetros). Las disoluciones acuosas de biopolímero recientemente preparadas se almacenan preferiblemente a una temperatura baja positiva (4°C). La molécula añadida con un moderado carácter básico se disuelve en agua, a continuación se mezcla con la disolución acuosa de biopolímero a una temperatura que varía de 4 a 15°C, preferiblemente 10°C. Cuando se alcanza una disolución acuosa homogénea transparente con un pH que varía de 5,8 a 7,0, dicha disolución se vierte en el receptor deseado y se mantiene a la temperatura apropiada para que gelifique.

La naturaleza del ácido que se usa para las disoluciones ácidas de biopolímero no influye fundamentalmente en la transición sol a gel del sistema. El pH final de la disolución depende del pH de la disolución agua/ácido así como de las concentraciones de biopolímero y de la molécula. Como el biopolímero y la molécula son dos componentes básicos tienden a aumentar el pH de la disolución ácida en la que están disueltos. Las concentraciones de biopolímero y de la molécula en ésta pueden equilibrarse para alcanzar el pH apropiado de la disolución, a la vez que se tiene en consideración el límite de solubilidad de ambos componentes, y particularmente el del biopolímero.

25 Formación de geles *in situ*

La molécula seleccionada ensayada para que se incorpore en la disolución polimérica fue histidina, pero se obtuvieron similares resultados con otros aminoácidos o moléculas sintéticas que tenían funciones similares y carácter básico. La gelificación *in situ* de la disolución de biopolímero puede llevarse a cabo dispensando la disolución desde una jeringa hipodérmica. Si se necesita, la disolución puede pregelificarse (iniciar la gelificación térmica) manteniendo la jeringa y la disolución de biopolímero a la temperatura deseada, idealmente 37°C, hasta que aparezcan los primeros signos de gelificación. La mezcla de biopolímero lista para gelificar se administra a continuación para que rellene los defectos o cavidades del tejido y complete el procedimiento de gelificación *in situ* (a 37°C). Un material ideal para la inyección de tal disolución para gelificar es una aguja de calibre 20 y por debajo. Las cavidades corporales y los defectos de los tejidos actúan como receptores de la disolución, pero los materiales líquidos permanecen en un entorno acuoso abierto. La conformabilidad y difusibilidad de las disoluciones de biopolímero dependen de las propiedades de la disolución y del material. La mayor viscosidad da lugar a la formación *in situ* de geles más compactos y menos conformables.

40 Uso terapéutico y otros usos de los geles biopoliméricos

Tal gel biopolimérico como el previamente descrito es un material ideal para un sistema de administración de fármacos. Tal vehículo formador *in situ* semejante a un gel, en el que antes de la gelificación se incorpora un aditivo sólido en partículas o soluble en agua, puede administrarse tópicamente, directamente al sitio del cuerpo a tratar o diagnosticar. Dentro de la composición y del gel pueden incorporarse agentes antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios esteroides o no esteroides, anticancerosos, anti-fibrosis, antivíricos, antiglaucoma, mióticos y anticolinérgicos, antipsicóticos, antihistamínicos y descongestionantes, anestésicos y antiparasitarios. De manera similar, pueden incorporarse dentro de la composición o gel agentes farmacéuticos no vivos con fines de restauración, reconstrucción o regeneración.

Los microorganismos vivos, células de plantas, células de animales o células de ser humano pueden ser idénticamente atrapados dentro del gel de biopolímero por introducción antes de la gelificación. Los geles cargados con células o microorganismos pueden aplicarse con fines biotecnológicos en medicina o en otras áreas industriales. Los geles de biopolímeros que se forman *in situ* pueden formarse subcutánea, intramuscular, intraperitonealmente o dentro de tejidos biológicos conjuntivos, defectos óseos, fracturas, cavidades articulares, conductos o cavidades corporales, fondo de saco del ojo, vasculaturas de tumores sólidos, etc...

La presente invención se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se dan para ilustrar la invención en lugar de limitar su alcance.

60

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra los experimentos típicos de disoluciones ácidas de biopolímero neutralizadas con un órgano-sulfonato, preferencialmente N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetano-sulfonato (BES), y transformadas en gel tras reposar a 37°C.

Experimento 1: gelificación de quitosano/BES

En este experimento, se disolvieron en 8,5 mL de disolución acuosa de HCl (0,1 M) 200 mg de quitosano desacetilado en un 85%. La disolución de quitosano, así obtenida tenía un pH de aproximadamente 5,0, se enfrió a alrededor de 4°C. A continuación, se disolvieron 200 mg de BES en forma de sal de sodio en 1,5 mL de agua fría y se añadieron lentamente a la disolución fría de quitosano con vigorosa agitación. El pH de la disolución homogénea y transparente resultante aumenta hasta aproximadamente 7,17. Esta disolución se colocó en un vial de centelleo en la incubadora a 37°C. La gelificación en masa se produce en 10 minutos.

Experimento 2: gelificación de colágeno/BES

Se aisló colágeno de cartílago de la articulación de la rodilla de ternero y estaba principalmente constituido por colágeno tipo II. Se preparó una disolución acuosa de colágeno (2% p/v) disolviendo 200 mg de colágeno en 8,5 mL de una disolución de ácido acético con un pH de aproximadamente 3,6. Una vez que se obtuvo una disolución transparente se enfrió hasta aproximadamente 4°C y a continuación se añadió una disolución fría de 200 mg de BES en 1,5 mL de agua con agitación continua. Cuando la disolución neutra resultante (pH ~ 7,2) pareció bastante homogénea y transparente se vertió en una placa Petri y se colocó a 37°C. Se formó un gel uniforme homogéneo en 15 minutos.

Experimento 3: gelificación de quitosano-colágeno/BES

En primer lugar se disolvió colágeno (100 mg) del mismo origen (Ejemplo 1, Experimento 2) en 10 mL de una disolución de ácido acético (0,1 M). A continuación, se añadieron 100 mg de quitosano a la disolución resultante y se agitó hasta que todo el quitosano estuvo completamente disuelto. Después, el sistema completo se enfrió hasta aproximadamente 4°C, y se añadieron con agitación continua 200 mg de BES en forma de sal de sodio disuelta en 1,5 mL de agua fría. Una vez que la disolución fue perfectamente homogénea y transparente, la mezcla líquida se vertió en una placa Petri y se colocó a 37°C. El gel se formó en 5 minutos.

Ejemplo 2

Este ejemplo muestra los experimentos típicos de disoluciones ácidas de biopolímero neutralizadas con una hidroxialquilamina terciaria, preferencialmente bis-[2-hidroxietil]iminotris[hidroximetil]metano (BIS-TRIS), y transformadas en gel tras reposar a 37°C.

Experimento 1: gelificación de quitosano/BIS-TRIS

Se preparó una disolución de quitosano con un pH de alrededor 5,0 disolviendo 200 mg de quitosano desacetilado en un 85% en 8,5 mL de disolución acuosa de HCl (0,1 M). Esta disolución de quitosano se enfrió a alrededor de 4°C, después de lo cual se añadieron lentamente a la disolución fría de quitosano con vigorosa agitación 400 mg de BIS-TRIS disueltos en 1,5 mL de agua fría. El pH de la disolución homogénea y transparente resultante aumenta hasta aproximadamente 7,15. Esta disolución se colocó en un vial de centelleo en la incubadora a 37°C. La gelificación en masa se produce en 10 minutos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida autogelificante, que permite la formación de geles biopoliméricos controlados por la temperatura y dependientes del pH a una temperatura entre 30 y 80°C, **caracterizada porque** comprende:
- 5 a) un medio ácido basado en agua, y
- b) 0,1 a 10% en peso de un biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH seleccionado de colágeno y un biopolímero quitosano catiónico que porta grupos amino, y
- 10 c) 0,1 a 10% en peso de una molécula soluble en agua, capaz de capturar protones en disolución acuosa dando de este modo lugar a un aumento del pH, seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 - sales de sodio, magnesio o hierro de N-[carbamoilmetil]-2-aminoetano-sulfonato (ACES), N,N-bis[2-hidroxietyl]-2-aminoetano-sulfonato (BES), 3-[N,N-bis(2-hidroxietyl)amino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (DIPSO), N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-3-propano-sulfonato (EPPS), N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-4-butano-sulfonato (HEPBS), N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-2-etano-sulfonato (HEPES), N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-2-hidroxiopropano-sulfonato (HEPSO), 2-[N-morfolino]etano-sulfonato (MES), 4-[N-morfolino]butano-sulfonato (MOBS), 3-[N-morfolino]propano-sulfonato (MOPS), 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (MOPSO), piperazina-N',N'-bis[2-etanosulfonato] (PIPES), piperazina-N,N'-bis[2-hidroxiopropanosulfonato] (POPSO), 3-[N-tris(hidroxietyl)metilamino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (TAPSO), o N-tris[hidroxietyl]metil-2-aminoetano-sulfonato (TES), o mezclas de los mismos;
- 20 - N,N-bis[hidroxietyl]glicina (BICINE), bis[2-hidroxietyl]iminotris-[hidroxietyl]metano (BIS-TRIS), glicil-glicina (GLY-GLY), trietanolamina (TEA), N-tris[hidroxietyl]metilglicina (TRICINE), tris[hidroxietyl]aminometano (TRIZMA), o mezclas de los mismos;
- 25 - un residuo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en histidina, arginina, lisina, asparagina, y glutamina o una mezcla de los mismos, residuo aminoácido que opcionalmente está modificado con un radical acetilo, t-butilo, bencilo, benzoilo, etilo, formilo, o metilo;
- 30 - una secuencia de aminoácidos que incluye alanina, histidina, arginina, lisina, ácido aspártico, glutamina, glicina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, norleucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, o valina,
- 35 donde dicha composición líquida tiene un pH final que varía de 5,8 a 7,4.
2. Una composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** se convierte en un gel a una temperatura entre 30 y 60°C, preferiblemente a una temperatura de 37°C.
- 40 3. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada porque** dicha composición se prepara a partir de un ácido orgánico y/o inorgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido acético, ácido salicílico, ácido fórmico, ácido glutámico, ácido fosfórico, ácido ortofosfórico, y ácido glicerofosfórico, o una mezcla de los mismos.
- 45 4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** dicho biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH es un biopolímero quitosano catiónico que porta grupos amino.
- 50 5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** dicho biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH es colágeno.
- 55 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** además comprende al menos otro polímero soluble en agua.
- 60 7. Una composición según la reivindicación 6, **caracterizada porque** dicho al menos otro polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en colágeno, metil celulosa, hidroxietyl celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxietil propilcelulosa, hidroximetil propil celulosa, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno-co-óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), y policaprolactona dioles, y derivados o mezclas de los mismos.
- 65 8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** además comprende un aditivo sólido en partículas o un aditivo soluble en agua.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** además comprende un fármaco o un agente farmacéutico.

10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** además comprende microorganismos, células de plantas, células de animales o células de ser humano dispersadas en la misma.
- 5 11. Una composición según la reivindicación 10, **caracterizada porque** dichas células de animales o células de ser humano se seleccionan del grupo que consiste en condrocitos (cartilago articular), fibrocondrocitos (menisco), fibroblastos de ligamentos (ligamento), fibroblastos de la piel (piel), tenocitos (tendones), miofibroblastos (músculo), células madre mesenquimales y queratinocitos.
- 10 12. Un método para preparar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** comprende las etapas de:
- 15 a) disolver un biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH seleccionado de colágeno y un biopolímero quitosano catiónico que porta grupos amino en una disolución acuosa ácida que tiene un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0, a una temperatura que varía de 0°C a 20°C, para obtener una composición acuosa de polímero que tiene una concentración de 0,1 a 10% en peso de dicho polímero;
- 20 b) disolver 0,1 a 10% en peso de una molécula soluble en agua, capaz de capturar protones en disolución acuosa dando de este modo lugar a un aumento del pH, seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 - sales de sodio, magnesio o hierro de N-[carbamoilmetil]-2-aminoetano-sulfonato (ACES), N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetano-sulfonato (BES), 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (DIPSO), N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-3-propano-sulfonato (EPPS), N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-4-butano-sulfonato (HEPBS), N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-2-etano-sulfonato (HEPES), N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-2-hidroxiopropano-sulfonato (HEPSO), 2-[N-morfolino]etano-sulfonato (MES), 4-[N-morfolino]butano-sulfonato (MOBS), 3-[N-morfolino]propano-sulfonato (MOPS), 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (MOPSO), piperazina-N',N'-bis[2-etanosulfonato] (PIPES), piperazina-N,N'-bis[2-hidroxiopropanosulfonato] (POPISO), 3-[N-tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxiopropano-sulfonato (TAPSO), o N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano-sulfonato (TES), o mezclas de los mismos;
- 30 - N,N-bis[hidroxietil]glicina (BICINE), bis[2-hidroxietil]iminotris-[hidroximetil]metano (BIS-TRIS), glicil-glicina (GLY-GLY), trietanolamina (TEA), N-tris[hidroximetil]metilglicina (TRICINE), o tris[hidroximetil]aminometano (TRIZMA), o mezclas de los mismos;
- 35 - un residuo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en histidina, arginina, lisina, asparagina, y glutamina o una mezcla de los mismos, residuo aminoácido que opcionalmente está modificado con un radical acetilo, t-butilo, bencilo, benzoilo, etilo, formilo, o metilo;
- 40 - una secuencia de aminoácidos que incluye alanina, histidina, arginina, lisina, ácido aspártico, glutamina, glicina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, norleucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, o valina,
- 45 para obtener una formulación líquida transparente con un pH que varía entre 5,8 y 7,4.
- 50 13. El método según la reivindicación 12, **caracterizado porque** dicha disolución acuosa ácida se prepara a partir de un ácido orgánico y/o inorgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido acético, ácido salicílico, ácido fórmico, ácido glutámico, ácido fosfórico, ácido ortofosfórico, y ácido glicerofosfórico, o una mezcla de los mismos.
- 55 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, **caracterizado porque** dicho biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH es un biopolímero quitosano catiónico que porta grupos amino.
- 60 15. El método según la reivindicación 14, **caracterizado porque** el quitosano tiene un grado de desacetilación que varía de 35 a 99%.
- 65 16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, **caracterizado porque** dicho biopolímero soluble en ácidos que gelifica por acción del pH es colágeno.
17. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, **caracterizado porque** además comprende añadir un aditivo sólido en partículas a la disolución de biopolímero de la etapa a) o b).
18. El método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, **caracterizado porque** además comprende añadir al menos otro polímero soluble en agua a la disolución de biopolímero de la etapa a) o b).

19. El método según la reivindicación 18, **caracterizado porque** dicho al menos otro polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en colágeno, metil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxietil propil celulosa, hidroximetil propil celulosa, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno), copolímeros poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno-co-óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), y policaprolactona dioles, y derivados o mezclas de los mismos.
20. Un método para preparar un gel de biopolímero sólido que tenga un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4, que comprende calentar una formulación líquida según las reivindicaciones 1 a 11 a una temperatura superior a 30°C e inferior a 80°C.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

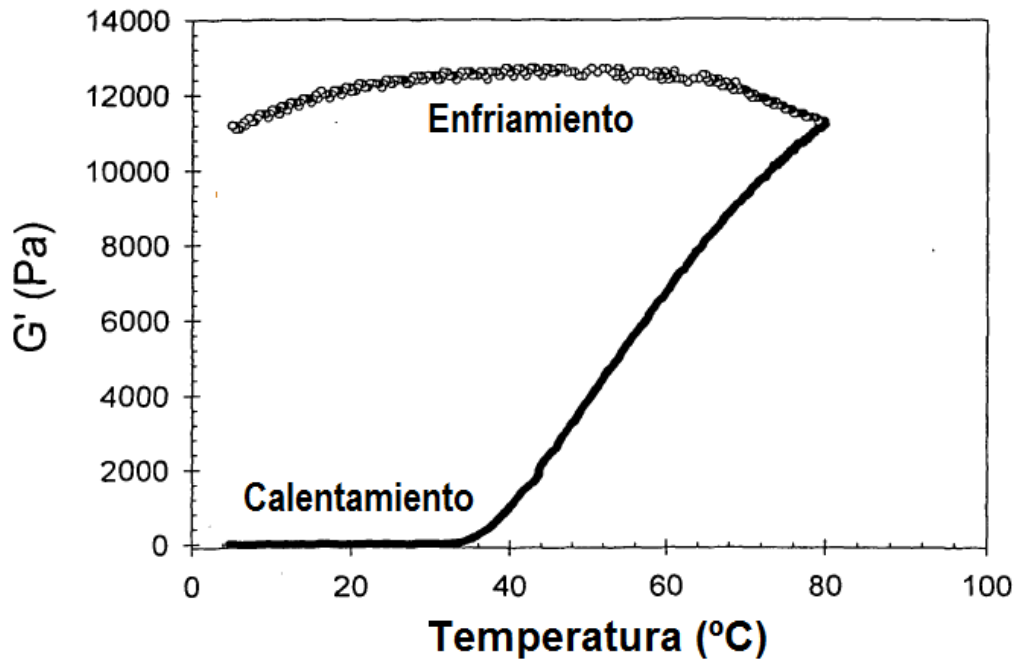


Fig. 1

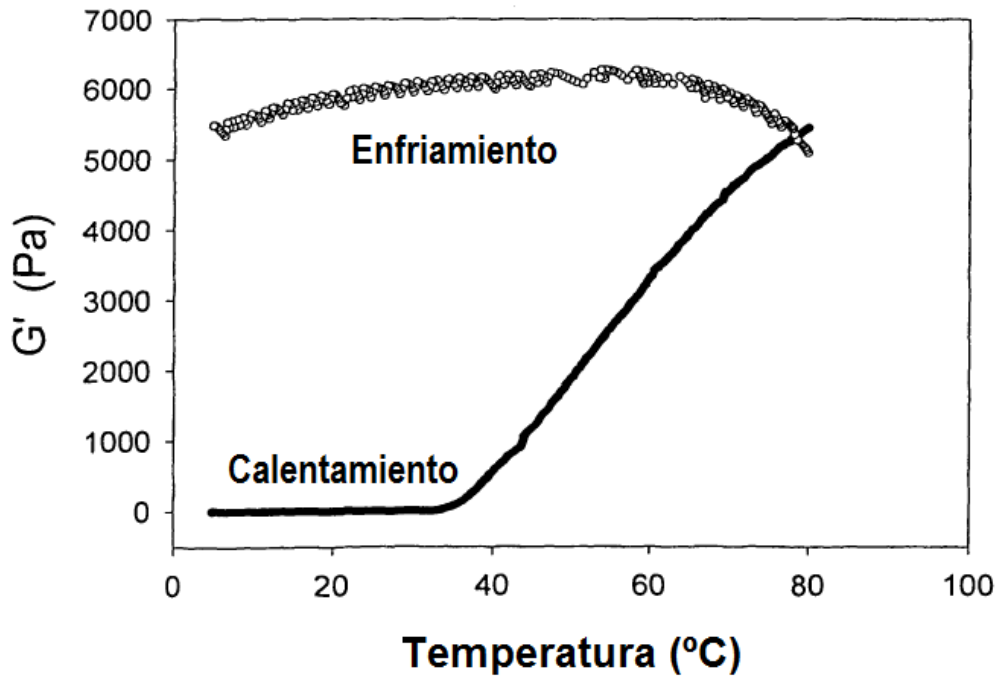


Fig. 2

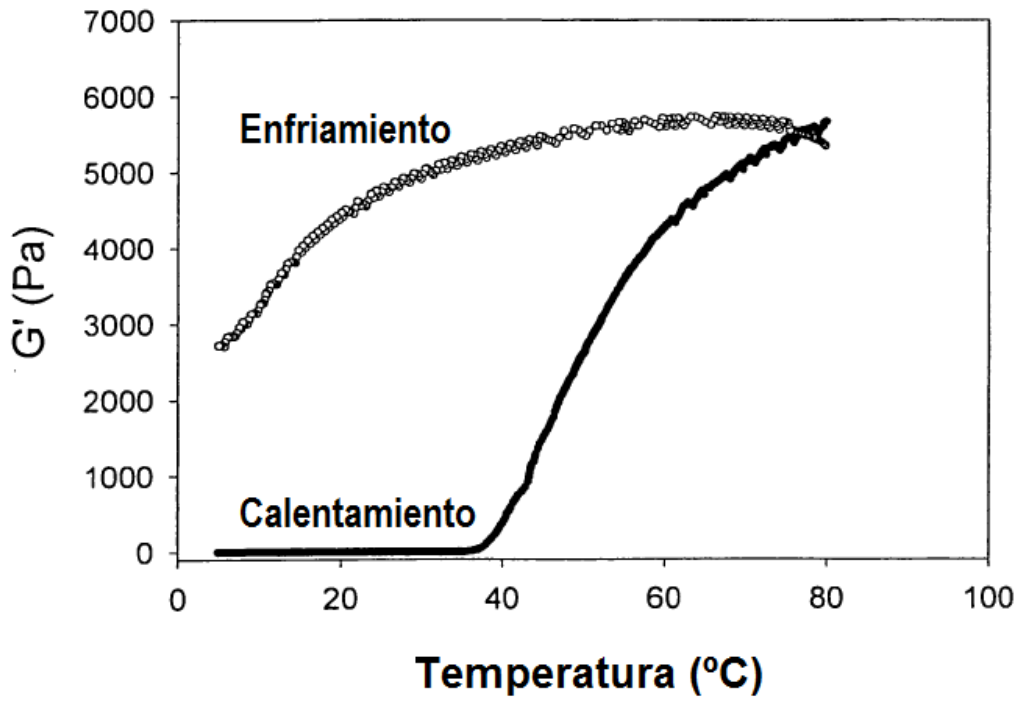


Fig. 3

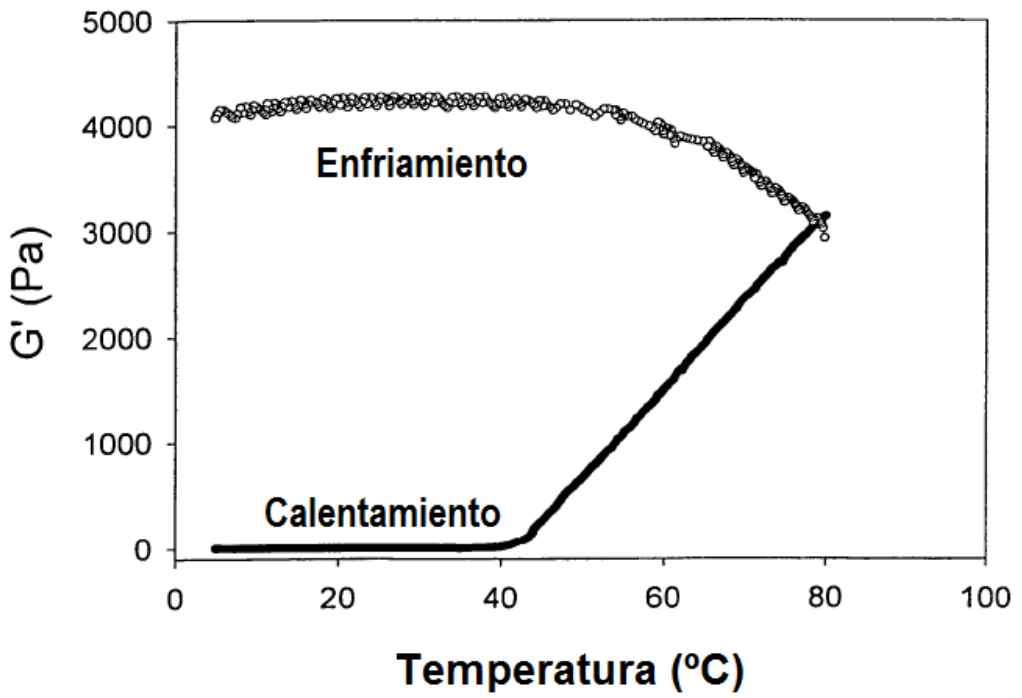


Fig. 4

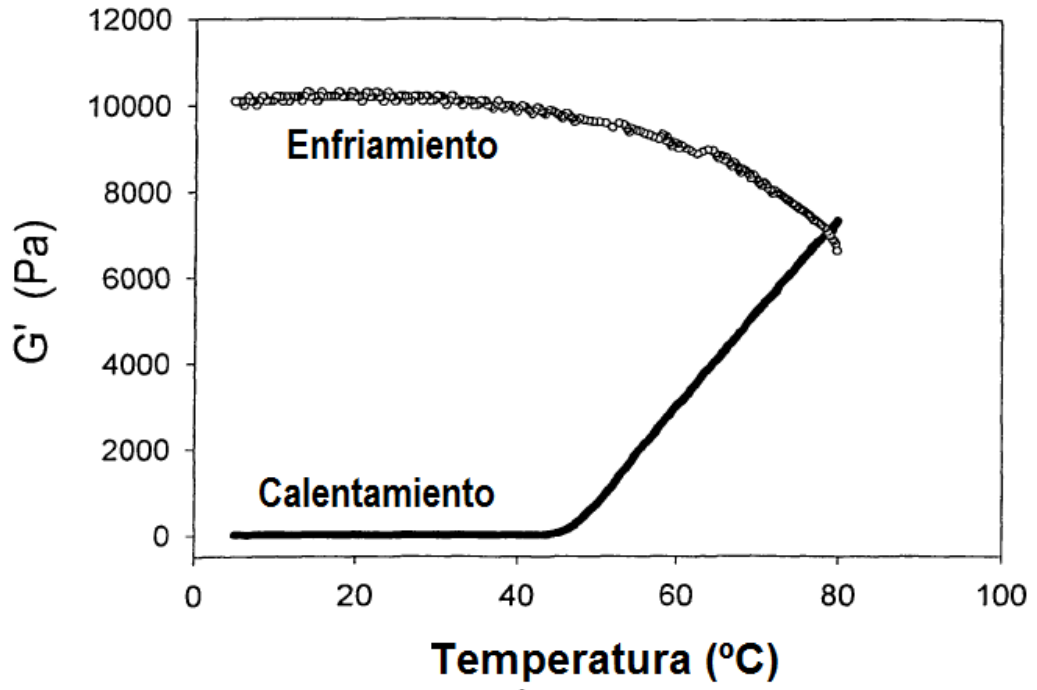


Fig. 5

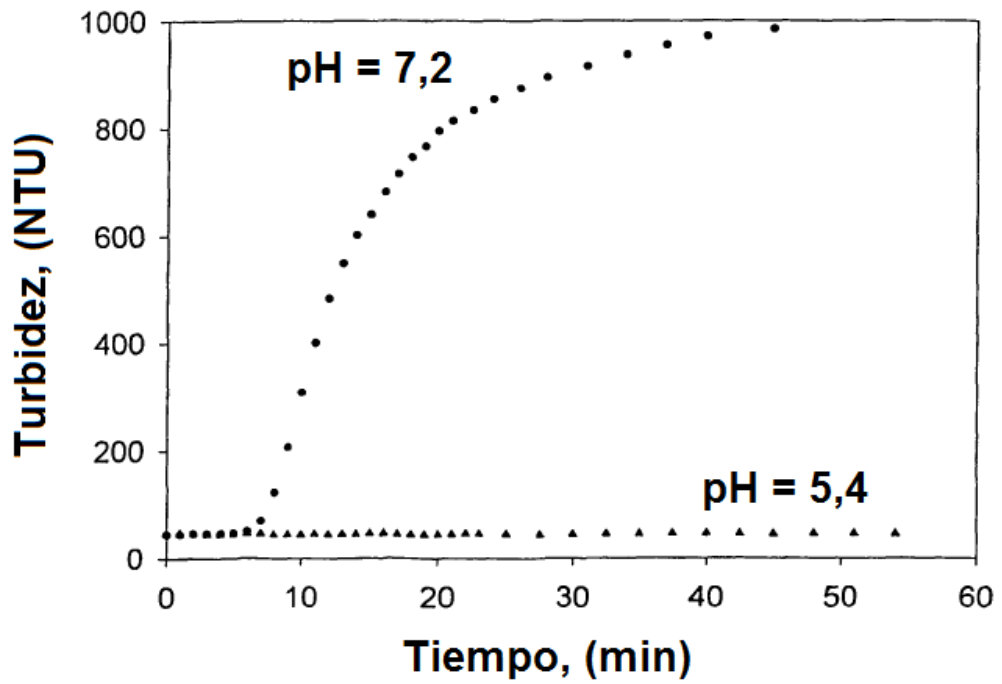


Fig. 6

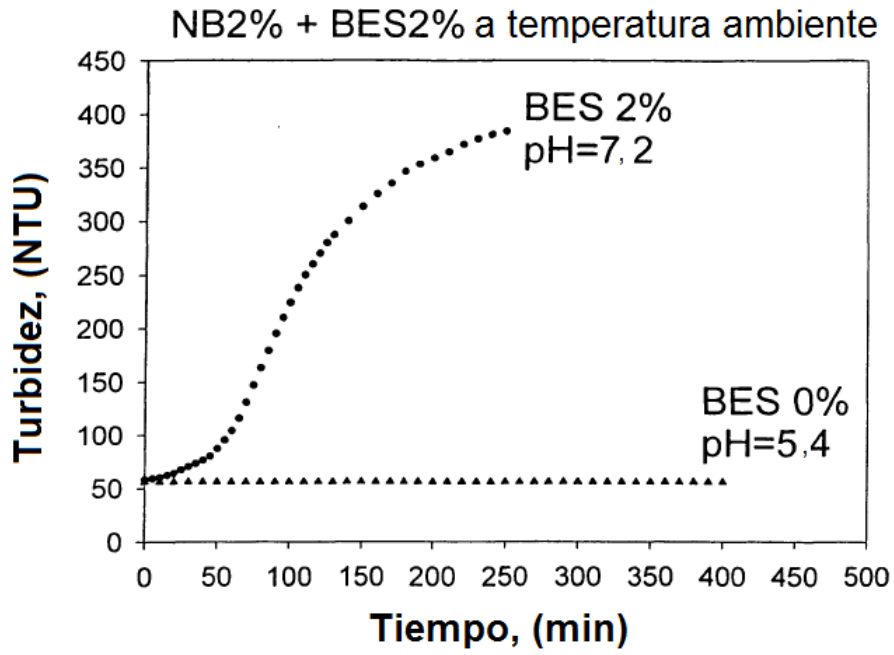


Fig. 7

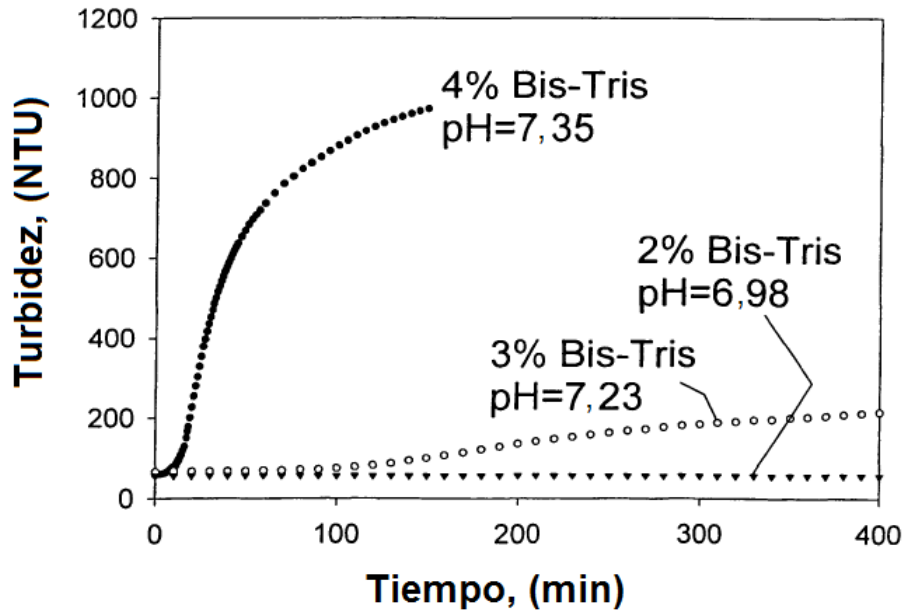


Fig. 8