

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 080**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/48 (2006.01)

A61K 31/721 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2010 E 10809176 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2509644**

54 Título: **Hidrogel de dextrina para aplicaciones biomédicas**

30 Prioridad:

10.12.2009 PT 09104879

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

01.02.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE DO MINHO (100.0%)

Largo do Paço

4704-553 Braga, PT

72 Inventor/es:

PORTELA DA GAMA, FRANCISCO MIGUEL y

MAIO MOLINOS, MARIA CABRAL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 558 080 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidrogel de dextrina para aplicaciones biomédicas

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de los biomateriales con aplicación en la regeneración tisular, centrándose específicamente en la producción de hidrogeles de dextrina oxidada novedosos, que pueden ser inyectables, y con potencial para la inclusión y el transporte de biomoléculas, fármacos, nanogeles de dextrina y compuestos granulares, así como para la encapsulación celular.

Antecedentes de la invención

10 El aumento en la esperanza de vida promedio implica una sobrecarga de tejidos y órganos. En los últimos años se han desarrollado un gran variedad de hidrogeles (clase de redes poliméricas tridimensionales, altamente hidratadas (contenido en agua $\geq 30\%$ del peso total)) y se han aplicado en regeneración tisular. Estos materiales están compuestos por cadenas poliméricas hidrófilas, que pueden ser o bien sintéticas o bien naturales, atractivas para estrategias de ingeniería tisular debido a la posibilidad de imitar de manera reproducible la estructura química de tejidos biológicos y sus propiedades en general.

15 Se han explorado polímeros sintéticos y naturales como portadores farmacológicos. Desafortunadamente, la mayoría de los polímeros usados clínicamente, aunque se toleran ampliamente, son todavía polímeros sintéticos no biodegradables, por ejemplo polietilenglicol (PEG) (Fuertges y Abuchowski, 1990) y copolímeros de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) (Vasey *et al.*, 1999). Por tanto, con el fin de garantizar su eliminación renal y excluir la amenaza de una acumulación progresiva tras una administración repetida, sólo pueden usarse polímeros con un peso molecular por debajo del umbral renal (aproximadamente 40.000 Da) (Hreczuk-hirst *et al.*, 2001).

20 Una variedad de materiales naturales pueden usarse para formar hidrogeles para ingeniería tisular, tal como colágeno, quitosano, alginato y ácido hialurónico (HA). Sin embargo, el rendimiento de estos materiales *in vivo* no es siempre el mejor, tal como establecen Drury y Mooney (2003). El quitosano altamente puro y homogéneo es bastante difícil de producir; por otro lado, la bioactividad proinflamatoria limita su uso biomédico. La seguridad de los materiales de colágeno es una preocupación, debido al riesgo de contaminación. El alginato se ha destacado varias veces como polisacárido prometedor para la síntesis de hidrogeles para aplicaciones de ingeniería tisular. Sin embargo, el alginato no se degrada específicamente, experimentando una disolución no controlada lenta, siendo por tanto difícil de eliminarlo del cuerpo. Adicionalmente, polímeros como el pululano (Nogusa *et al.*, 1995) o dextrano (Nishikawa *et al.*, 1996), a los que se hace referencia en esta área, que son biodegradables de manera inherente, incluso con bajos niveles de funcionalización (para promover una unión del fármaco o para reducir las tasas de degradación) pueden pasar fácilmente a ser no degradable (Vercauteren *et al.*, 1996). Algunos de estos polímeros derivados de manera natural (incluyendo el dextrano) son inmunogénicos, lo que impide su administración repetida (Hreczuk-hirst *et al.*, 2001). Un estudio de fase I que implica dextrano-doxorubicina ha mostrado pruebas de hepatotoxicidad (Danauser-Reidl *et al.*, 1993).

35 La inyectabilidad es comúnmente una propiedad objetivo a la hora de desarrollar hidrogeles, garantizando su administración en un procedimiento mínimamente invasivo. El tiempo de entrecruzamiento es una característica muy importante de estos materiales, que determina su idoneidad para una aplicación específica. Por ejemplo, un periodo de gelificación de más de 30 min no es adecuado para una intervención maxilofacial.

40 La presente invención, que pretende superar los inconvenientes mencionados anteriormente, describe un hidrogel a base de dextrina inyectable, con potencial para la inclusión y el transporte de biomoléculas, fármacos, nanogeles y compuestos granulares, así como para la encapsulación celular. Simultáneamente, este biomaterial está previsto para proporcionar tiempos de entrecruzamiento y propiedades mecánicas controlables, a través del ajuste de parámetros específicos, tales como el grado de oxidación y concentración del agente de entrecruzamiento. Dextrina significa un polímero de glucosa producido mediante la hidrólisis de almidón, que consiste en unidades de glucosa unidas principalmente mediante enlaces α -1,4. Además de α -1,4, puede haber una proporción de enlaces α -1,6, dependiendo la cantidad de la fuente del almidón. Cualquier dextrina es una mezcla de polímeros de glucosa de diferentes longitudes de cadena.

50 Se hace referencia a las formulaciones de hidrogel a base de dextrina en un pequeño número de artículos y patentes, revisados más adelante. De hecho, la dextrina es una herramienta emergente en el campo biomédico por no ser tóxica y no presentar inmunogenicidad (Treetarnmathurot *et al.*, 2009). Se ha aprobado por la FDA como la solución para diálisis peritoneal Icodextrin™. Icodextrin (una dextrina polidispersa) también se ha desarrollado como solución portadora para la administración intraperitoneal de un agente anticarcinogénico (Kerr *et al.*, 1996). Un trabajo reciente también ha informado de la capacidad de conjugados de dextrina para presentar una actividad antiendotoxina así como para regular la respuesta inflamatoria (Davtyan *et al.*, 2007; Avetisyan *et al.*, 2006). En otro

trabajo reciente, se usó el complejo de dextrina-hidroxiapatita (HAp) como material de relleno óseo, con buen rendimiento (Asai *et al.*, 2009). Además, un nanogel, organizado mediante el autoensamblaje de dextrina anfifílica se ha descrito como posibles portadores de fármacos (Gonçalves *et al.*, 2007). Un material similar (un nanogel de dextrina) se ha desarrollado también por Orienti *et al.* (2009; documento WO2009/016663A1). Se usaron microesferas a base de dextrina para la encapsulación del fotosensibilizador porfirina, que se agrega en disoluciones acuosas, permitiendo su administración en la forma monomérica, en terapia fotodinámica (Luz *et al.*, 2008). Colin Brown (2010) también desarrolló una formulación de dextrina que puede impedir o reducir la incidencia sobre adhesiones posoperatorias (documento US2010/0240607A1).

Recientemente, Carvalho *et al.* (2007) produjeron hidrogeles de dextrina, concretamente dextrina-VA y dextrina-HEMA, como sistemas de administración controlada de fármacos. Sin embargo, el método usado para producir estos hidrogeles, es decir la polimerización radicalaria, requiere iniciadores químicos para activar el proceso de gelificación (por ejemplo persulfato de amonio), que pueden reaccionar con estructuras celulares y resultar tóxicos. Además, esto implica la modificación de la cadena principal de dextrina con monómeros acrílicos y la gelificación es rápida. Por tanto, estos materiales a base de dextrina no presentan las principales propiedades requeridas para un hidrogel inyectable, esencialmente debido a limitaciones tales como la citotoxicidad y la falta de control sobre los tiempos de entrecruzamiento.

La tolerabilidad clínica probada de la dextrina, que se degrada fácilmente mediante amilasas (Davies, 1994), sugiere que puede reunir propiedades excelentes para el desarrollo de sistemas portadores de fármacos y en global en aplicaciones biomédicas. Con este propósito, es particularmente relevante el hecho de que la dextrina es un recurso abundante, estando ya disponible en una formulación de calidad médica con excelente biocompatibilidad. Adicionalmente, se han conseguido largos tiempos de circulación de plasma (horas o días) mediante la funcionalización de la cadena polimérica principal, permitiendo una capacidad mejorada para la selección como diana de tejido (Hreczuk-hirst *et al.*, 2001; Hardwicke *et al.*, 2008; Treetarmathurot *et al.*, 2009). El bajo peso molecular de la dextrina también es una propiedad crucial y determinante, ya que favorece un aclaramiento renal sano.

La patente estadounidense n.º 5.541.234, de Unger *et al.*, describe hidrogeles con alta porosidad y baja densidad, hechos de alginato y/u otros polisacáridos, incluyendo dextrina, en los que la concentración de polímero que origina la densidad ideal para la estructura porosa se encuentra preferiblemente entre el 1% y el 10%. En los casos particulares de agar, carragenanos, gelatinas y caseínas, el proceso de entrecruzamiento tiene lugar preferiblemente a altas temperaturas, convirtiendo la gelificación *in situ* en inviable, de lo contrario los tejidos que rodean el hidrogel podrían verse dañados seriamente. También se indica el uso de disolventes a lo largo de la reacción de entrecruzamiento, que, teniendo presente las aplicaciones biomédicas, es una clara desventaja en comparación con el procedimiento descrito en la presente invención. Unger *et al.* no ofrecen la posibilidad de asociar biomoléculas o células. Además, la gelificación se basa estrictamente en el uso de agentes de entrecruzamiento, sin modificación previa de los polisacáridos. La dextrina, un polímero de glucosa, necesita un pretratamiento, por ejemplo oxidación mediante ácido peryódico, tal como se propone en esta invención, que permita la posterior gelificación mediante la adición de un agente de reticulación. Además, todavía en el alcance de la presente invención, la concentración de polímero que garantiza la textura ideal es del 30%, dando lugar a un hidrogel inyectable, con tiempos de entrecruzamiento atractivos (5-30 min), lo que permite su manipulación e implantación sin prisa, cuando se usa en aplicaciones de cirugía maxilofacial, como adyuvante a compuestos granulares osteogénicos. Una concentración de polímero por debajo del 25% originará un fluido viscoso en lugar de un hidrogel.

El documento WO98/12228 A1 da a conocer formulaciones de hidrogel para su uso en aplicaciones de ingeniería tisular. Los hidrogeles comprenden un alginato o un polisacárido, tal como dextrano, que se ha sometido a una etapa de oxidación con peryodato de sodio y que se hace reaccionar adicionalmente con un agente de entrecruzamiento tal como dihidrazida de ácido adípico.

Bouhadir *et al.* (1999; US2007/07186413) concibieron hidrogeles para la liberación controlada de productos farmacéuticos, basándose en el uso de polisacáridos entrecruzados con dihidrazida de ácido adípico (ADH), como en la presente invención. El polisacárido preferido es el alginato. El procedimiento que conduce a la producción de un hidrogel incluye la oxidación parcial de alginato seguido de polimerización con ADH. De esta manera, a través de la oxidación del polisacárido, los autores aspiran a la producción de un material degradable *in vivo*. De hecho, la no degradabilidad es una limitación principal para el uso biomédico de alginatos, dado que evita su eliminación y excreción eficaces. También está previsto un mejor control sobre la reacción de gelificación, dado que la gelificación ionotrópica llevada a cabo comúnmente con alginato no es satisfactoria. En todavía otro aspecto de la patente, se desarrollan conjugados de fármaco-polímero, que permiten un control mejorado de la liberación de fármaco, en este caso no basándose sólo en fenómenos de transferencia de masa.

En el caso de la presente invención, la retención del biomaterial en los riñones no es un problema, debido al bajo peso molecular de la dextrina, cuya degradación y eliminación puede controlarse a través del grado de sustitución. A este respecto, la dextrina conlleva una clara ventaja en comparación con los alginatos. Por otro lado, en la presente invención se planea una estrategia para evitar la liberación rápida de productos farmacéuticos del hidrogel altamente

poroso. De hecho, puede conseguirse un grado adicional de control sobre la liberación de fármaco usando nanogeles con núcleos hidrófobos, que pueden solubilizar productos farmacéuticos poco solubles en agua, permitiendo simultáneamente un control adicional sobre las propiedades farmacocinéticas del sistema. Este es un enfoque bastante más simple que la estrategia planeada por Bouhadir y colegas, basándose en el uso de conjugados de producto farmacéutico-polímero. Adicionalmente, estos autores no proporcionan información sobre el perfil de degradación de los hidrogeles en un medio fisiológico, ni en lo que respecta a su porosidad, parámetros cruciales relativos a su viabilidad como sistemas de liberación controlada de fármacos. Además, los hidrogeles de alginato revelan propiedades mecánicas comparativamente malas. Para la misma concentración de agente de entrecruzamiento (ADH), la resistencia del hidrogel a fuerzas compresivas (proporcional al número de enlaces intermoleculares) es menor que el hidrogel de alginato, lo que es probable que se traduzca también en un peor perfil de biodegradación.

En la patente estadounidense US 6.991.652 B2, Burg y colegas describen materiales compuestos hechos de una matriz porosa de micropartículas con geometría variable (esferas, cilindros o una red), hecha preferentemente de colágeno, que puede portarse en un fluido líquido o viscoso. En esta invención, los materiales compuestos se cultivan con células, que pueden proliferar y originar un nuevo tejido. Además, los materiales compuestos pueden administrarse mediante inyección, de una manera mínimamente invasiva, reivindicándose que son útiles para una amplia gama de aplicaciones de ingeniería tisular. Se hace referencia a la dextrina como uno de los materiales que pueden constituir la fase de fluido que porta la matriz porosa, sin embargo la patente no describe cómo pueden obtenerse hidrogeles a partir de dextrina, cuya función parece ser aumentar la viscosidad de la fase de fluido. En la presente invención, los hidrogeles de dextrina pueden asociarse, por ejemplo, con gránulos bioactivos, partículas de cerámica, biomoléculas o células, como en la invención de Burg *et al.*, y también con nanogeles, concretamente nanogeles de dextrina, dotando al material compuesto de versatilidad mejorada, concretamente permitiendo su uso para el transporte y la liberación controlada de moléculas bioactivas. Además, esta invención incluye una metodología para la gelificación de dextrina, que da como resultado propiedades mecánicas y biodegradabilidad controlables, favoreciendo su uso para la liberación controlada de productos farmacéuticos asociada con el transporte de una fase sólida en un sistema inyectable.

La patente WO2005/042048A2, de Hill *et al.*, publicada en 2005, describe la producción de hidrogeles inyectables hechos de proteínas y polisacáridos, con tiempos de gelificación de aproximadamente 2 horas, que permiten la incorporación de productos farmacéuticos, concretamente, pero no solo, para regeneración ósea. El concepto desarrollado para la estrategia de gelificación se basa en este caso en la reactividad de los grupos de amina de las proteínas y los polisacáridos. En el caso de polisacáridos neutros, la oxidación debe llevarse a cabo en primer lugar. De esta manera se obtiene como resultado un proceso de gelificación largo, en oposición al obtenido en el caso de la presente invención a través del uso de ADH.

La patente japonesa JP2005/298644A2, desarrollada por Akiyoshi y colegas, describe la producción de un hidrogel híbrido, hecho de pululano. El hidrogel se obtiene mediante la polimerización radicalaria, usando una mezcla de metacrililoil-pululano con un nanogel de pululano, también metacrilado. El nanogel se autoensambla a través de la interacción hidrófoba de restos de colesterol injertados en el polisacárido. De esta manera se obtiene un hidrogel con un nanogel dispersado que puede portar productos biofarmacéuticos, concretamente proteínas. La presente invención también contempla la incorporación de un nanogel como dispositivo de liberación controlada de fármacos, difiriendo de la invención de Akiyoshi en aspectos relevantes, concretamente el alto peso molecular del pululano usado por Akiyoshi *et al.* (100 kDa) (en oposición a la dextrina de bajo peso molecular) y el uso de un iniciador de polimerización, 2,2'-azobis [2-(2-imidazolin-2-il)propano. Aunque la patente no describe detalles con respecto a la inyectabilidad del hidrogel, el alto peso molecular del pululano plantea dudas referentes a la eficacia de la excreción biológica, incluso más porque no queda claro si los enlaces intermoleculares son degradables. De hecho, tal como se ha notificado para hidrogeles de metacrililoil-dextrina, es probable que los hidrogeles de metacrililoil-pululano no sean degradables *in vivo* (Cadée *et al.*, 2000). Por otro lado, el iniciador puede ser tóxico (Ameer *et al.*, 2001). Por tanto, el uso del hidrogel de dextrina, así como del nanogel de dextrina, asociado con el método de gelificación basado en dextrina oxidada y ADH como agente de reticulación, ofrece ventajas significativas, con respecto a la biocompatibilidad y capacidad de excreción. Posteriormente, Akiyoshi *et al.* (documento JP2009/149526A2) notificaron el uso del mismo hidrogel para la liberación controlada de citocinas.

La presente invención es única ya que introduce un hidrogel hecho de dextrina, un hidrogel obtenido a través de métodos químicamente simples y baratos, sin usar catalizadores o iniciadores tóxicos. Estos procesos crean una velocidad de gelificación conveniente para la manipulación del material, permitiendo su inyectabilidad en, por ejemplo, un defecto tisular, con fines de regeneración, permitiendo la producción de hidrogeles con propiedades mecánicas y biodegradabilidad adecuadas para cada aplicación. Estas características hacen posible la fácil incorporación, por ejemplo, de biomoléculas, cerámica bioactiva y células, así como de nanogeles (por ejemplo de dextrina), dando como resultado, en el último caso, un material compuesto multidimensional (con una fase hidrófoba dispersada a nivel nanométrico), con una versatilidad mejorada en vista de su uso como portador para la liberación controlada de moléculas bioactivas.

La presente invención se refiere a la producción de hidrogeles hechos de dextrina y dihidrazida de ácido adípico,

que pueden ser inyectables, con aplicación como 1) estructura principal para regeneración tisular; 2) como portador de microsferas bioactivas, por ejemplo compuestos granulares osteogénicos bioactivos para adyuvancia en regeneración ósea; 3) encapsulación celular; 4) vehículo para moléculas bioactivas (concretamente proteínas o polisacáridos, por ejemplo colágeno) que promueven la adhesión y proliferación celular, y 5) nanogeles autoensamblados (por ejemplo hechos de dextrina) asociados con sistemas de administración de fármacos.

En esta invención, se usa una metodología rápida para preparar hidrogeles degradables a partir de dextrina oxidada (oDex) y dihidrazida de ácido adípico, sin el uso de ningún iniciador químico. Pueden obtenerse periodos de gelificación de desde 1 hasta 30 minutos, dependiendo de la concentración de los componentes.

La cadena de homopolisacárido de dextrina puede oxidarse usando ácido peryódico. El ión peryodato ataca uno de los grupos hidroxilo del diol vecino en residuos de dextrina, entre las posiciones C2-C3 del anillo de glucopiranosido, rompiendo el enlace C-C y produciendo dos grupos aldehído reactivos. Los aldehídos reaccionan con moléculas tales como ácido adípico (ADH), que a su vez actúa como agente de reticulación, dando lugar a hidrogeles. La concentración de agente de entrecruzamiento afecta directamente a la densidad de enlaces intermoleculares, lo que a su vez influye en las propiedades mecánicas, de degradación y de gelificación de los hidrogeles. Sin embargo, la cantidad de ADH usada debe optimizarse teniendo en cuenta el número de residuos oxidados disponibles, de modo que se maximice el número de enlaces químicos viables, en detrimento de la aparición de grupos colgantes. Además, la presencia de excesivos grupos reactivos puede comprometer las propiedades mecánicas de hidrogeles por medio de impedimento estérico, por lo que debe moderarse el grado de funcionalización de la cadena polimérica.

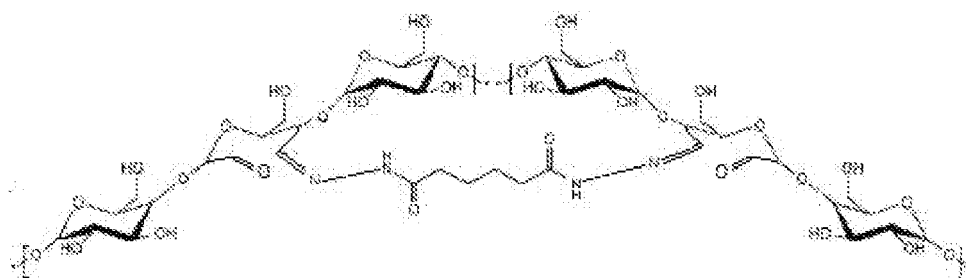
Los hidrogeles de oDex/ADH son degradables tanto hidrolíticamente, a nivel de sus enlaces intermoleculares covalentes, como enzimáticamente, a través de la acción α -amilasa. Dependiendo de la densidad de entrecruzamiento es posible obtener diferentes perfiles de degradación. La estructura apretada de poros de cientos de nanómetros altamente interconectados se suelta suavemente a lo largo del proceso de degradación, permitiendo predecir cierta conformidad hacia la invasión celular, una vez que el material se ha inyectado, especialmente si la matriz presenta señales quimioatrayentes o péptidos de adhesión, que pueden introducirse fácilmente (por ejemplo usando nanogeles cargados con moléculas bioactivas).

En cuanto a la biocompatibilidad, los hidrogeles de dextrina no son tóxicos. Las células se adhieren y proliferan a lo largo de su superficie de contacto, permitiendo la perspectiva de una buena interacción tejido-hidrogel *in vivo*. Adicionalmente, los hidrogeles de oDex/ADH no son hemolíticos.

Pueden destacarse muchas ventajas con respecto a los hidrogeles de oDex/ADH en comparación con otros hidrogeles conocidos, concretamente 1) una metodología de producción simple y rápida; 2) ausencia de iniciadores químicos (generalmente tóxicos); 3) bajo peso molecular (lo que favorece la biodegradación y el aclaramiento renal); 4) biocompatibilidad; 5) posibilidad de inclusión/encapsulación de moléculas/células específicas; 6) material de partida derivado de manera natural, de bajo coste, y ya disponible en calidad médica; 7) potencial para servir como portador de sistemas microparticulados, por ejemplo para aplicaciones de regeneración ósea; 8) gran potencial para servir como sistema de liberación controlada de fármacos, tanto para productos biofarmacéuticos (proteínas terapéuticas) como moléculas insolubles en agua (a través de la incorporación de nanogeles con núcleos hidrófobos).

Sumario de la invención

La presente invención se preparó en vista de la técnica anterior descrita anteriormente y el objeto de la presente invención son formulaciones de hidrogel de dextrina oxidada reticulada con dihidrazida de ácido adípico que comprende la siguiente estructura:



que presenta la capacidad de incorporación dentro de su estructura porosa tridimensional.

En una realización preferida el hidrogel incorpora polisacáridos tales como quitosano, ácido hialurónico, entre otros;

proteínas, tales como colágeno, fibronectina, caseína, entre otros; nanogeles; materiales granulares; moléculas bioactivas y células.

5 En otra realización preferida, las proteínas están incluidas en un porcentaje de entre el 0-20 de la composición de hidrogel, en peso seco, y los polisacáridos están incluidos en un porcentaje de entre el 0-20 de la composición de hidrogel, en peso seco.

El hidrogel de la presente invención es inyectable, no tóxico no hemolítico.

En otra realización el hidrogel se obtiene a partir de una dextrina con un grado de oxidación de entre el 10-50%, preferiblemente entre el 25-35%, con un bajo peso molecular, entre 1200-8000 Da y presenta una estructura porosa continua, con un diámetro de aproximadamente 1 μm .

10 Además, en otra realización, la biodegradación del hidrogel se produce mediante erosión, o bien superficial o bien erosión volumétrica, y se caracteriza por un perfil de degradación no lineal acompañado de un aumento en el tamaño del poro.

15 En otra realización preferida la degradación del hidrogel se produce hidrolíticamente, al nivel de sus enlaces intermoleculares covalentes, o enzimáticamente, a través de la acción α -amilasa presente en tejidos humanos o incluida en la formulación de hidrogel.

Otro objeto de la presente invención es el método de producción de la formulación de hidrogel, que comprende las siguientes etapas:

a) oxidar la dextrina con ácido peryódico;

b) eliminar el peryodato sin reaccionar;

20 c) gelificar desde 1 hasta 30 minutos, mediante la adición de un agente de reticulación, tal como dihidrazida de ácido adipico, preferentemente a un pH en el intervalo de 5,0-7,5, y a una concentración de entre el 3-40%, preferiblemente entre el 3-10%, en base molar en relación con los residuos de glucosa.

En una realización preferida la concentración de dextrina oxidada es de entre el 5-40% (p/v), preferiblemente entre el 25-30% (p/v).

25 En otra realización preferida se incorpora un nanogel en el hidrogel en una proporción del 1-25% del peso de dextrina, mezclando el nanogel con la dextrina oxidada, antes de la adición de ADH, siendo las dimensiones del nanogel de entre 10-10000 nm.

En otra realización preferida el nanogel se carga previamente con productos farmacéuticos.

30 Otro objeto de la presente invención es el uso del hidrogel para regeneración tisular y liberación controlada de fármacos.

Otro objeto de la presente invención es un biomaterial que comprende el hidrogel.

Además, la presente invención se refiere a un sustituto de hueso sintético que comprende el hidrogel.

Otro objeto de la presente invención es un sistema para la administración controlada de fármacos que comprende el hidrogel.

35 Otro objeto de la presente invención es un implante óseo o relleno óseo que comprende el hidrogel.

Además la presente invención se refiere a una composición que comprende un hidrogel.

Finalmente, la presente invención se refiere a una prótesis médica que comprende el hidrogel de la presente invención.

Descripción de los dibujos

40 Figura 1 - Oxidación con peryodato de la dextrina, produciendo dos grupos aldehído en las posiciones C2 y C3 de una unidad de D-glucosa.

Figura 2 – Espectro de ¹H-RMN de dextrina oxidada (DO del 25%).

Figura 3 - Reacción de polimerización de oDex con ADH y productos de degradación mediante hidrólisis.

Figura 4 - Variación de los tiempos de entrecruzamiento con el grado de oxidación y la concentración de dihidrazida de ácido adípico. (+) a lo largo de 1 h de gelificación (++) gelificación en menos de 30 min (+++) gelificación en menos de 1 min. El material se consideró gelificado cuando dejó de deslizarse a lo largo de una superficie inclinada 90°. * Calculado como la razón molar de peryodato de sodio por unidad de glucosa inicial en dextrina. ** Calculado en base molar, teniendo en cuenta el número de residuos de glucosa en la dextrina original.

Figura 5 – Curva de compresión que muestra el comportamiento típico para un hidrogel de oDex DO del 35% con un 4% de ADH.

Figura 6 – Módulo de compresión de (A) hidrogeles de oDex entrecruzados como una función de la concentración de ADH (en razón molar, teniendo en cuenta el número de residuos de glucosa en la dextrina original, oDex DO del 35% (30% p/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0), y (B) hidrogeles de oDex entrecruzados como una función del grado de oxidación de dextrina (oDex DO del 35% y un 5% de ADH en tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0)). Los resultados se presentan como promedio ± DE, n=3. ns: no significativo, p > 0,05; ** p < 0,01, en comparación con la máxima concentración de ADH usada.

Figura 7 - Módulo de compresión de hidrogeles de oDex entrecruzados como una función del disolvente en el que se preparan. Se prepararon todos los hidrogeles con oDex (30% p/v) y 5% ADH. Los resultados se presentan como promedio ± DE, n=3. ns: no significativo, p > 0,05; * p < 0,05, en comparación con el disolvente en el que los hidrogeles se sintetizan normalmente (tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0).

Figura 8 – Valores de absorbancia de MTT obtenidos tras 48 h de incubación de células 3T3 en contacto directo con (A) diferentes concentraciones de agente de reticulación (ADH) solo, y (B) diferentes concentraciones de dextrina oxidada sola. Los resultados se presentan como promedio ± DE, n=3. ** p < 0,01, en comparación con el control T0 (24 h tras la siembra de las células).

Figura 9 – Valores de absorbancia de MTT obtenidos tras 48 h de incubación de células 3T3 con productos de degradación (diluciones 1:1, 1:2 y 1:4) de hidrogeles de oDex (DO del 35% y al 40%). Los resultados se presentan como promedio ± DE, n=3. Ns: no significativo, p>0,05; *p<0,05; ** p < 0,01, en comparación con el control T0.

Figura 10 – Evaluación morfológica de células 3T3 en contacto directo con hidrogeles de dextrina (DO del 35%), placas de cultivo de células TCPS (control), gel de agarosa (control negativo) y caucho de látex (control positivo). Aumento de 10x. Las sombras oscuras en el lado izquierdo muestran parte del disco de látex o hidrogel.

Figura 11 – Valores de absorbancia de MTT obtenidos tras 48 h de incubación de células 3T3 en hidrogeles de oDex (DO del 35% y del 40%). Los resultados se presentan como promedio ± DE, n=3. ** p < 0,01, en comparación con el control T0.

Figura 12 – Imágenes de crio-SEM a partir de una sección transversal de hidrogel de oDex (A) antes y (B) después de la inmersión en tampón PBS durante 24 horas y (C, D) hidrogel de oDex-nanogel. Las flechas muestran los nanogeles de dextrina (oDex DO del 35%).

Figura 13 – Perfiles de pérdida de masa y liberación acumulativa de nanogel de oDex, oDex-nanogel (1 mg/ml) y oDex-nanogel (3 mg/ml). Se muestran la media ± DE, n=6.

Descripción detallada de la invención

Los biomateriales están presentes en un número creciente de aplicaciones clínicas, siendo una herramienta fundamental en nuevas tecnologías tales como ingeniería tisular, administración dirigida de productos farmacéuticos, medicina regenerativa, etc. La biocompatibilidad de biomateriales es un requisito principal. Idealmente, entre otras propiedades, un biomaterial debe ser no tóxico, no inmunogénico, tener una interacción favorable con células y tejidos, a la luz de la aplicación prevista. Para varias aplicaciones, tales como ingeniería tisular y administración de fármacos, la biodegradabilidad y la eliminación/excreción completa son altamente deseables. La dextrina, aunque es bastante abundante, barata y está disponible en calidad médica, se ha considerado hasta la fecha como un material prometedor, pero por un número restringido de científicos. De hecho, aunque parece reunir una biocompatibilidad excelente, con particular interés la eliminación eficaz mediante los sistemas biológicos, debido a su bajo peso molecular y biodegradación mediante amilasas. Esta invención describe un hidrogel hecho de dextrina con propiedades interesantes para aplicaciones biomédicas que incluyen, pero no únicamente, la administración de productos farmacéuticos y regeneración tisular. El simple hecho de que el hidrogel esté hecho de dextrina

representa una ventaja significativa.

Esta invención se refiere a una formulación novedosa de hidrogeles hechos de dextrina oxidada reticulada con dihidrazida de ácido adípico, que presenta la capacidad de encerrar dentro de su estructura porosa tridimensional polisacáridos, proteínas, nanogeles, micropartículas o células, para regeneración tisular y administración de agentes bioactivos.

Se obtienen hidrogeles a base de dextrina a partir de procedimientos químicos más sencillos, más rápidos y más económicos, en comparación con otras formulaciones existentes, y no requieren ningún catalizador ni iniciador tóxico para desencadenar la reacción de entrecruzamiento. La propia dextrina garantiza propiedades superiores para estos hidrogeles, tales como la capacidad de aclararse de manera eficaz del cuerpo humano, debido a su bajo peso molecular y biodegradabilidad.

Oxidación de dextrina

En el contexto de esta invención, la dextrina, un polímero derivado de manera natural, se usa como material de partida para producir hidrogeles. La dextrina es un polímero sacárido que contiene glucosa unido mediante unidades de D-glucosa en α -1,4, que contienen pocos enlaces α -1,6 (< 5%), que tiene la misma fórmula general que el almidón, pero más pequeño y menos complejo. En la presente invención, se oxida una cadena de homopolisacárido de dextrina usando ácido peryódico. El ión peryodato ataca uno de los grupos hidroxilo del diol vecino en residuos de dextrina, entre las posiciones C2-C3 del anillo de glucopiranosido (figura 1), rompiendo el enlace C-C y produciendo dos grupos aldehído reactivos.

La cuantificación de grupos aldehído, es decir el grado de oxidación (DO), puede realizarse usando el ácido trinitrobenzenosulfónico (tBC). Se sabe bien que los carbazatos reaccionan con aldehídos para formar carbazonas estables de una manera similar a la formación de hidrazonas, haciendo posible determinar el contenido en aldehído de dextrina mediante análisis de espectroscopía de ^1H -RMN.

El grado de oxidación de oDex puede controlarse fácilmente mediante la cantidad relativa de peryodato de sodio usada, posibilitando que los grupos aldehído reactivos libres creen enlaces covalentes con moléculas de reticulación (por ejemplo ADH), así como con péptidos de unión por adhesión celular (por ejemplo, GRGDY) o incluso con fármacos específicos para sistemas de administración controlada.

Gelificación – hidrogel de oDex/ADH

El grado de polimerización promedio de la dextrina es de aproximadamente 10-12. Cada molécula debe participar en dos enlaces distintos con diferentes moléculas para reticularse eficazmente. La formación de más de dos enlaces no implica necesariamente una potenciación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles (véase el ejemplo 2). La modificación excesiva de la cadena polimérica original, que hace que esté disponible un mayor número de grupos oxidados reactivos puede ser perjudicial para la organización molecular de la nueva estructura polimérica, por medio de impedimento estérico por transposición. En la presente invención, la dextrina oxidada presenta un DO de entre el 10-50%, preferiblemente entre el 25-35%, lo que significa de dos a tres residuos de glucosa oxidada en promedio por molécula de dextrina. DO superiores al 50% producen disoluciones muy viscosas que reaccionan inmediatamente con ADH, afectando a la buena homogenización, y dando como resultado hidrogeles mates y quebradizos.

Los grupos hidrazida en ADH reaccionan con los grupos aldehído en oDex y forman una red de enlaces hidrazona hidrolizables (figura 3). Una vez que se escinden estos enlaces covalentes, la dextrina puede difundir fácilmente a través de tejidos humanos y eliminarse mediante aclaramiento renal, debido al bajo peso molecular, bastante por debajo del umbral renal (~40.000 Da). Por tanto, además de los enlaces glicosídicos que se producen de manera natural en la dextrina, los enlaces hidrazona proporcionan un nivel de control adicional sobre las propiedades mecánicas de estos hidrogeles. El porcentaje de dihidrazida de ácido adípico para producir los hidrogeles proporcionados por esta invención se sitúa entre el 3-40%, preferiblemente entre el 3-10% (en razón molar de ácido adípico con respecto a residuos de dextrina oxidada). El ejemplo 2 muestra el estudio de la influencia de la concentración de ácido adípico sobre las propiedades mecánicas de los hidrogeles de oDex. Las concentraciones crecientes de agente de reticulación dan como resultado reacciones de entrecruzamiento más rápidas y, en consecuencia, una difusividad afectada del agente de entrecruzamiento a través de la malla polimérica. Así, una cantidad excesiva de ADH no producirá una matriz polimérica homogénea con buenas propiedades mecánicas. Por otro lado, cantidades desmedidas de esta molécula homobifuncional en un estado no polimerizado pueden revelarse como citotóxicas. Por tanto, debe minimizarse la concentración de ADH, y optimizarse según la concentración de polímero y su DO.

En esta invención, la concentración de dextrina oxidada para la preparación de hidrogeles de oDex se sitúa entre el 5-40% (p/v), preferiblemente entre el 25-30% (p/v). Por encima de estas concentraciones, la solubilización de

dextrina es impracticable, y por debajo de las mismas los tiempos de entrecruzamiento son demasiado altos (es decir, de más de 24 h).

Se conoce bien que la reactividad de grupos hidrazida con aldehídos es óptima a menores valores de pH. En condiciones ácidas, los aldehídos se protonan y son más susceptibles de ataque nucleófilo por los grupos hidrazida. Sin embargo, en condiciones de neutras a básicas, están en vigor cinéticas más lentas y se requiere un intervalo de tiempo más largo para que se complete la reacción, produciendo un menor grado de entrecruzamiento funcional. No obstante, los hidrogeles a base de dextrina proporcionados en el presente documento pueden prepararse a pH fisiológico, sin comprometer sus propiedades mecánicas y gelificando en 1-30 min. Este periodo de tiempo adecuado permite la manipulación e inyección sin prisas del hidrogel, y su ajuste apropiado en el defecto que pretende regenerarse o el sitio para la liberación controlada de fármaco. Estos hidrogeles no requieren ningún disolvente especial, todos sus componentes son solubles en agua a temperatura ambiente.

Perfiles de degradación de hidrogeles de oDex/ADH

Los hidrogeles de oDex experimentan hidrólisis y se degradan las uniones entrecruzadas con el tiempo. El hinchamiento aumentado a lo largo del tiempo es una consecuencia de la hidrólisis de los entrecruzamientos (enlaces hidrazona) en la red del hidrogel. Cuando se hidrolizan los entrecruzamientos en el hidrogel, la red se hincha y embebe más agua, conduciendo a una hidrólisis adicional. Una vez que se rompen los enlaces, las dihidrazidas y la dextrina oxidada pueden difundir a través de los tejidos y eliminarse por el organismo, gracias a sus bajos pesos moleculares, mediante lo cual los perfiles de biodegradación de los hidrogeles de dextrina son especialmente interesantes para aplicaciones biomédicas, en las que se requiere una bioabsorción gradual del biomaterial implantado, especialmente en casos de regeneración tisular. El ejemplo 3 presenta estudios del perfil de degradación realizados con hidrogeles de oDex/ADH proporcionados por esta invención.

Biocompatibilidad

La biocompatibilidad de los hidrogeles constituye una cuestión de suma importancia en la perspectiva de su aplicación farmacéutica o biomédica. Se considera que un material es biocompatible cuando verifica un complejo y amplio conjunto de condiciones (norma ISO 10993, 1992), incluyendo la ausencia de citotoxicidad y la no estimulación de una respuesta inflamatoria agravada. Generalmente, los hidrogeles presentan buena biocompatibilidad. La determinación del potencial citotóxico de los materiales puede ser cualitativa y/o cuantitativa (norma ISO 10993-5, 1992). La evaluación cualitativa se basa en la observación microscópica de células, que tiene como objetivo sacar conclusiones sobre su morfología general, vacuolización, adhesión celular y lisis de membrana. La evaluación cuantitativa se basa a su vez en índices de mortalidad, crecimiento, inhibición y proliferación celular, o formación de colonias. El ejemplo 4 proporciona los estudios de biocompatibilidad *in vitro* de hidrogeles de oDex, que se aplican a ambos métodos de evaluación mencionados anteriormente. Los hidrogeles a base de dextrina proporcionados por la presente invención no son tóxicos. Las células se adhieren y proliferan a lo largo de su superficie de contacto, permitiendo la perspectiva de una buena interacción tejido-hidrogel *in vivo*.

Hidrogel DexOx/ADH -moléculas bioactivas y células

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles (módulo de compresión) así como su interacción con células y tejidos, *in vivo*, pueden verse favorecidas por la inclusión de proteínas (el 0-20% de la composición de los hidrogeles, en peso seco) y polisacáridos (el 0-20% de la composición de los hidrogeles, en peso seco) en la formulación inicial. Es probable que la mayor densidad obtenida, asociada a efectos de entrecruzamiento, mejore la estabilidad en presencia de tensión mecánica. Las proteínas tales como colágeno, fibronectina, caseína, entre otros, pueden alterar la densidad de los hidrogeles, estableciendo enlaces con grupos oxidados no reticulados a través de grupos de amina. Por otro lado, las proteínas (por ejemplo, colágeno y fibronectina) presentan secuencias peptídicas (por ejemplo, RGD), que promueven una adhesión celular más eficaz, lo que puede ser necesario para potenciar la viabilidad y proliferación de células incorporadas en el hidrogel, para fomentar los mecanismos de regeneración tisular, por ejemplo, a través de la administración de factores de crecimiento. El uso de polisacáridos tales como quitosano o ácido hialurónico, entre otros, permiten la variación de la carga de superficie de los hidrogeles, haciendo que sea positiva o negativa, respectivamente. Adicionalmente, la selección del peso molecular de los polisacáridos usados (degradables para los casos mencionados) permite la modulación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles y perfiles de degradación.

Hidrogel DexOx/ADH - Nanogel

La incorporación de nanogeles, compuestos por dextrina modificada, manano, quitosano o ácido hialurónico, pero no exclusivamente, obtenidos mediante autoensamblaje a través de los restos hidrófobos injertados, permiten la incorporación en el hidrogel de una fase hidrófoba nanodispersada, constituida por núcleos hidrófobos que permiten la disolución de productos farmacéuticos escasamente solubles en agua. La incorporación del nanogel en el hidrogel se lleva a cabo mezclando el nanogel con la dextrina oxidada, antes de la adición de ADH (véase el ejemplo 5). El

nanogel puede cargarse previamente con productos farmacéuticos (por ejemplo estatinas, fármacos antiinflamatorios o, prácticamente, cualquier molécula hidrófoba). El uso del nanogel permite, de manera fácil, la incorporación de moléculas que, siendo escasamente solubles en agua, apenas se incorporarían en el entorno hidratado de un hidrogel. Por otro lado, la nanofase de los núcleos hidrófobos actúa como sistema de liberación controlada. La liberación está controlada, en este sistema, no sólo por la transferencia de masa mediante difusión y la velocidad de degradación del gel. El uso de nanogeles con diferentes dimensiones (10-10000 nm, según el polisacárido usado), permite un control adicional sobre la liberación de los productos farmacéuticos.

Las partículas de nanogel pueden actuar como depósito de fármaco desde el que puede activarse la liberación mediante un estímulo (al que son sensibles), o simplemente liberarse de manera controlada por difusión. Puede obtenerse la difusión simultánea de moléculas de diferente naturaleza desde la misma plataforma, añadiendo dos (o más) poblaciones diferentes de nanogeles cargados con diferentes fármacos en la misma matriz de hidrogel, en la que la velocidad de liberación de cada soluto está controlada mediante la interacción entre el hidrogel y los nanogeles. La principal ventaja reside en la mejora del perfil de liberación cinética del fármaco, ya que la fase de hidrogel proporciona una barrera frente a la difusión adicional que modera o elimina la liberación por estallido inicial típica observada en sistemas de administración de fármacos de hidrogel o nanogel.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, se describe la presente invención con más detalle y específicamente con referencia a los ejemplos, que sin embargo no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplo 1 - Hidrogel de oDEX/ADH

Oxidación de la dextrina. Se oxidaron disoluciones acuosas de dextrina (al 2% p/v) con una disolución de m-peryodato (Panreac) de 2 ml, cuya concentración varió según el grado de oxidación teórico (DOt) deseado. Se envolvieron los matraces en papel de aluminio y se agitó la reacción durante 20 h a temperatura ambiente, tras lo cual se añadió gota a gota una cantidad equimolar de dietilenglicol para reducir cualquier cantidad de peryodato sin reaccionar. Se dializó la disolución resultante durante 3 días frente a agua, usando una membrana de diálisis con un MWCO de 1000 Da, y luego se liofilizó durante 10 días (figura 1).

Determinación de grupos aldehído mediante análisis de ¹H-RMN. Se define el grado de oxidación (DO) de oDex como el número de residuos oxidados por 100 residuos de glucosa, cuantificado usando el carbazato de terc-butilo (tBC). Se disolvió oDex en tampón fosfato pH 6,0, 0,1 M (1 ml, 1% p/v), posteriormente se disolvió un exceso de 5 veces de tBC en el mismo tampón (1 ml) y se añadió por separado. Se permitió que la mezcla reaccionara durante 24 h a temperatura ambiente. Entonces se retiró el tBC de bajo peso molecular en exceso usando un sistema de columna de desalación PD-10 y se liofilizó el filtrado durante 48 h. Después de eso, se disolvió el producto resultante en agua deuterada (D2O) (7,5 mg/ml) y se analizó mediante ¹H-RMN. Se usó el espectro de ¹H-RMN para determinar el DO calculado como una proporción del área de pico en los espectros de RMN según la ecuación 1.

$$DO (\%) = (X/Y) \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

donde, X es la integral promedio a δ 7,3 ppm correspondiente a los protones conectados a los carbonos que se modificaron con tBC e Y es la integral promedio de los protones anoméricos a δ 4,8 ppm y δ 5,4 ppm

Preparación de hidrogeles oDex-ADH. Se disolvió oDex en tampón fosfato pH 6,0, 0,1 M (al 30% p/v) a temperatura ambiente y se añadió una disolución de dihidrazida de ácido adípico (ADH) (preparada por separado) a diferentes concentraciones (al 5%, al 15% y al 30% en base molar, teniendo en cuenta el número de residuos de glucosa en la dextrina original). Se permitió que avanzase la reacción de entrecruzamiento durante 2 h. Se consideró el material gelificado cuando se detuvo el deslizamiento a lo largo de una superficie inclinada 90°.

La figura 2 representa un espectro de ¹H-RMN típico obtenido para la dextrina oxidada al 25% (oDex al 25%). Los picos entre δ 4,0 y δ 3,4 ppm se asignan a protones en las posiciones 2, 3, 4, 5 y 6, mientras que el pico a δ 5,4 ppm se atribuye al protón anomérico de la unidad de glucosa. El espectro también muestra un pequeño pico a δ 5,3 ppm correspondiente al protón anomérico en la dextrina con uniones α -1,6. Los tres picos entre δ 7,4 y δ 7,2 ppm se asignan al protón unido al carbono que se modificó con tBC, y el singlete a δ 1,5 ppm se asignó a tBC.

Para evaluar el perfil de gelificación de hidrogeles de oDex, se accedió a la solubilidad de oDex. Se prepararon varias disoluciones de polímero de oDex con diferentes concentraciones en tampón fosfato pH 6,0. Se observó que las disoluciones superiores al 30% (p/v) eran extremadamente viscosas y prácticamente imposibles de homogeneizar. Así, se consideró esta concentración como el umbral de la solubilidad de oDex en tampón fosfato pH 6,0, y se aplicó más adelante en la síntesis de todos los hidrogeles de oDex. A continuación, se sometió oDex a entrecruzamiento con diversas concentraciones de dihidrazida adípica (figura 3). Se produjeron inicialmente doce muestras de hidrogel con DO que variaban entre el 25% y el 50% y concentraciones de ADH de entre el 5% y el

30% (en razón molar, teniendo en cuenta el número de residuos de glucosa en la dextrina original).

La figura 4 muestra los periodos de gelificación aproximados obtenidos. Tal como se esperaba, los tiempos de entrecruzamiento disminuyen con DO crecientes, así como con cantidades crecientes de agente de reticulación. Se halló que DO superiores al 40% producen disoluciones muy viscosas que reaccionan inmediatamente con ADH, afectando la buena homogenización, y dando como resultado hidrogeles mates y quebradizos. A través del control del DO y las concentraciones ADH, es posible por tanto un buen control sobre el tiempo de gelificación, haciendo que este hidrogel sea adecuado como sistema inyectable.

Ejemplo 2 - Propiedades mecánicas

Se evaluaron las propiedades mecánicas de hidrogeles de dextrina entrecruzados usando una máquina de ensayos mecánicos, el instrumento de ensayos Shimadzu-AG-IS 1 kN. Se colocó cada disco de hidrogel (área superficial = 133 mm²) entre dos placas circunferenciales metálicas paralelas, de modo que la fuerza de compresión fuese uniforme a lo largo de la muestra, y se comprimió a temperatura ambiente con una velocidad de deformación constante de 0,5 mm min⁻¹. El módulo de compresión de los hidrogeles es directamente proporcional a la densidad de entrecruzamientos intermoleculares. Así, se evaluó la influencia de la concentración de ADH, el DO y también el tipo de disolvente usado sobre la extensión de entrecruzamiento intermolecular, cuantificando el módulo de compresión de los hidrogeles de oDex.

La figura 5 presenta una curva de compresión típica para los hidrogeles de oDex, a partir de la que se determinó el módulo de compresión, usando la ecuación 2:

$$\text{Módulo de compresión (KPa)} = (\text{tensión máx.} / \text{área superficial}) \times 10^{-3} \quad (\text{ec. 2})$$

Para cada condición, se analizaron muestras por triplicado; los valores facilitados en las figuras 6 y 7 representan la media y la desviación estándar.

La concentración creciente de ADH dio como resultado un aumento en el módulo de compresión de hidrogeles de oDex entrecruzados (figura 6A), lo que sugiere el establecimiento de un número creciente de enlaces intermoleculares ya que están disponibles para reaccionar más grupos hidrazida. Se notificó la misma tendencia por Maia *et al.* (2005) con hidrogeles de dextrano y por Bouhadir *et al.* (1999) con hidrogeles de poli(aldehidoguluronato), revelando los primeros una fuerza de compresión inferior incluso con mayores concentraciones de agente de reticulación. De hecho, el máximo módulo de compresión obtenido con hidrogeles de guluronato fue de 560 KPa, con ADH 150 mM, mientras que con aproximadamente 130 mM (equivalente al 10% en razón molar) se registró un módulo de compresión de 600 KPa para hidrogeles de oDex al 35%. Por tanto, los hidrogeles de dextrina parecen tener mejores propiedades mecánicas.

Se evaluó la influencia del grado de oxidación sobre los entrecruzamientos intermoleculares, y no se identificó una relación de proporcionalidad directa entre el módulo de compresión y el DO. Los hidrogeles de oDex de DO del 25% revelaron la máxima fuerza de compresión (aproximadamente de 533 KPa), aunque no hubo ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) con relación a hidrogeles de oDex de mayor DO (figura 6B).

Los hidrogeles inyectables deben poder proseguir su procedimiento de polimerización *in situ*, lo que significa que los líquidos intersticiales y/o la sangre no deben interferir en el mismo, por ejemplo mediante la influencia del pH del medio. Además, las condiciones intrínsecas necesarias para la formación del hidrogel no deben ser nocivas para los tejidos circundantes. Así, se evaluó la influencia del pH sobre la densidad de enlaces intermoleculares midiendo el módulo de compresión de diversos hidrogeles de oDex preparados en cuatro disolventes diferentes: agua dd (aproximadamente pH 5,77), tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0), PBS (pH 7,4) y cDMEM (aproximadamente pH 7,5), respectivamente. Se muestran los resultados en la figura 7. De hecho, se conoce bien que la reactividad de grupos hidrazida con aldehídos es óptima a menores valores de pH. En condiciones ácidas, los aldehídos se protonan y son más susceptibles de ataque nucleófilo por los grupos hidrazida. Sin embargo, en condiciones de neutras a básicas, están en vigor cinéticas más lentas y se requiere un intervalo de tiempo más largo para que se complete la reacción, produciendo un menor grado de entrecruzamiento funcional. Una posible explicación de los bajos valores del módulo de compresión (58 KPa) de hidrogeles preparados en cDMEM, podría asignarse a la presencia de aminoácidos en disolución, que podrían estar interaccionando con grupos aldehído en oDex, tras la hidrólisis de enlaces hidrazona. μ

Ejemplo 3 - Biocompatibilidad

Se evaluó la citotoxicidad celular para disoluciones de macromonómeros no entrecruzados, hidrogeles entrecruzados y extractos de degradación de hidrogeles usando los ensayos Live and Dead® y MTT, tal como se describe a continuación.

Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3. Se hicieron crecer fibroblastos embrionarios de ratón 3T3 (ATCC

CCL-164) en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma) complementado con suero de ternero recién nacido al 10% (Invitrogen, R.U.) y penicilina/estreptavidina 1 µg/ml (medio completo DMEM) a 37°C en el 95% de aire humidificado que contiene el 5% de CO₂. A una confluencia del 80%, se recogieron los fibroblastos 3T3 con tripsina-EDTA al 0,05% (p/v) y se subcultivaron en el mismo medio.

- 5 Ensayo Live and Dead. Se usó el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® para células de mamífero (Invitrogen, R.U.) para determinar la viabilidad celular. Este kit proporciona un ensayo de viabilidad celular mediante fluorescencia de dos colores, basándose en la determinación simultánea de las células vivas y muertas con dos sondas que miden la actividad esterasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática.

- 10 Se sembraron fibroblastos embrionarios de ratón 3T3 (5 x 10⁴ células/pocillo) en una placa de poliestireno de 6 pocillos (Orange Scientific) y se incubaron a 37°C, el 5% de CO₂ durante 24 horas. Entonces, se retiró el medio de cultivo y se colocaron discos de hidrogel (Ø 4mm, grosor de 2 mm) en los pocillos, en contacto directo con las células. A intervalos de tiempo regulares, se añadieron 200 µl de una disolución de calceína AM 2 µM y homodímero-1 de etidio 4 µM, en PBS estéril, a los pocillos, se incubaron durante de 30 a 45 minutos a 37°C, el 5% de CO₂ (tal como indica el fabricante) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. Se usaron discos de látex y gel de agar (Farmacopea de los EE.UU.) como controles positivos y negativos, respectivamente.

- 20 MTT. Se determinó la viabilidad de las células de fibroblasto 3T3 usando el ensayo de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). El ensayo MTT mide con precisión la actividad de células vivas mediante la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Las deshidrogenasas mitocondriales de células viables escinden el anillo de tetrazolio, produciendo cristales de MTT-formazán de color púrpura que pueden disolverse en DMSO, dando como resultado una disolución de color púrpura que se mide de manera espectrofotométrica. El aumento del número de células da como resultado un aumento de la absorbancia.

- 25 También se evaluó la adhesión de los fibroblastos a hidrogeles de oDex, mediante el ensayo MTT. Para este ensayo, se formaron hidrogeles de oDex en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo de poliestireno de 96 pocillos. Tras 2 h de polimerización, se lavaron los hidrogeles de oDex con PBS y tres veces con cDMEM. Entonces, se añadieron células de fibroblastos 3T3 (3x10³ células/pocillo) a cada pocillo. Se renovó el medio de cultivo cada 2 días. Para los ensayos de control, se hicieron células directamente en el fondo de los pocillos. Tras 48 h, se lavaron cuidadosamente los hidrogeles tres veces con PBS, para retirar las células flotantes, y se desprendió la capa celular antes de llevar a cabo el ensayo MTT.

- 30 También se evaluó la biocompatibilidad de los extractos de degradación de hidrogeles. En pocas palabras, se sembraron células de fibroblastos 3T3 (5x10² células/pocillo) en una placa de poliestireno de 96 pocillos y se expusieron a extractos de degradación de hidrogeles (200 µl; diluciones 1:1, 1:2 y 1:4) obtenidos por separado a partir de tres hidrogeles de oDex (DO del 40%). Tras 48 h de incubación a 37°C, se evaluó la citotoxicidad de los extractos usando el ensayo MTT. Además, también se sometieron a prueba la dextrina oxidada y ADH solos para determinar su potencial citotóxico. Brevemente, se expusieron las células 3T3 (5x10² células/pocillo) sembradas en una placa de poliestireno de 96 pocillos a concentraciones crecientes de estos componentes durante 48 h a 37°C, tras lo cual se evaluó la citotoxicidad usando el ensayo MTT. Se esterilizó en primer lugar la dextrina oxidada mediante el proceso de esterilización con óxido de etileno (ETO). Se realizaron todas las mediciones de biocompatibilidad por triplicado o más y los resultados facilitados son la media.

- 40 Las figuras 8A y 8B representan los valores de absorbancia de MTT obtenidos tras una incubación durante 48 horas con diferentes concentraciones de ADH y oDex, respectivamente. Tras una incubación durante 48 horas, mayores concentraciones de ADH (al 2-4% p/v) inducen muerte celular. Sin embargo, cuando la cantidad de ADH usada para formar los hidrogeles de oDex (al 5% en base molar que corresponde al 1% p/v) se incubaba con fibroblastos 3T3, no se observa ninguna diferencia significativa en los valores de absorbancia de MTT. Adicionalmente, oDex no induce muerte celular, aunque no se observa proliferación en presencia del material. En conjunto, los resultados apuntan a un alto nivel de compatibilidad de la cantidad de ADH y oDex usada para la producción del hidrogel de oDex.

Los productos de la degradación de los hidrogeles pueden ser potencialmente citotóxicos; con el fin de evaluar su toxicidad, los extractos obtenidos durante la degradación del hidrogel de oDex se incubaron con fibroblastos embrionarios de células 3T3 de ratón y se usó el ensayo MTT para medir la viabilidad celular de fibroblastos 3T3. Se muestran los resultados en la figura 9.

- 50 Se observa muerte celular cuando los productos de degradación de oDex están en contacto directo con células, aunque este efecto se atenúa a medida que se diluyen los productos de degradación. En los pocillos en los que se usan los productos de degradación (dilución 1:1), se observó la sedimentación de estos productos de degradación. Este hecho sugiere que la muerte celular podría estar provocada por la presión mecánica o por la oxigenación y difusión de nutrientes disminuidas provocadas por la sedimentación de los productos. Para evaluar la citotoxicidad de oDex, también se realizó el ensayo Live and Dead®. Se colocaron hidrogeles de oDex (DO del 35%) en contacto directo con células y se usaron discos de látex y geles de agar como controles positivos y negativos,

respectivamente. Tal como se esperaba, los discos de látex revelaron alta toxicidad, para células son principalmente de color rojo (células muertas). Al contrario, con discos de agar e hidrogeles de oDex, la mayoría de las células están vivas (células verdes). Tal como ilustra la figura 10, los hidrogeles de oDex no inhiben la proliferación celular. Aunque el número de células es inferior en comparación con los pocillos de control, las células son adherentes y conservan la morfología típica de fibroblastos.

Para evaluar los efectos de los hidrogeles de oDex sobre la adhesión de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3, se formaron hidrogeles de oDex (DO del 35% y el 40%) en el fondo de pocillos de poliestireno y entonces se sembraron las células. Se usaron pocillos de poliestireno como control. Se evaluó la adhesión celular con la prueba de MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Tal como se observa en la figura 11, tras una incubación durante 48 horas, el número de células adheridas es significativamente mayor en ambos hidrogeles de oDex en comparación con el control (pocillos de poliestireno). Esto es un resultado algo inesperado y bastante interesante, puesto que en otros hidrogeles de dextrina desarrollados en este laboratorio, no se observó una proliferación mejorada en comparación con poliestireno.

Ejemplo 4 - Hidrogel de oDEX/ADH - nanogel de dextrina

Se preparó nanogel de dextrina: se obtuvieron las nanopartículas de hidrogel autoensambladas disolviendo la dextrina liofilizada con grupos acrilato injertados (VA), sustituida con 1-hexadecanetriol (C16) hidrófobo (dextrina-VMA-SC₁₆) en PBS. Se obtuvo la disolución tras aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente, con agitación. Se confirmó la formación del nanogel mediante dispersión de luz dinámica. Se disolvió oDex, DO del 35%, (al 30% p/v) en PBS (oDex) o en una suspensión de nanogel (oDex-nanogel) durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. Entonces, se mezclaron las suspensiones de oDex con el 5% (en base molar teniendo en cuenta el número de residuos de glucosa en la dextrina original) dihidrazida de ácido adípico con la punta de la pipeta. Se permitió que avanzase el entrecruzamiento a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

Ejemplo 5 – Perfil de degradación de hidrogel de ODEX/ADH y liberación de nanogel de dextrina/FITC

Tras prepararse y pesarse (W_i), se sumergieron los hidrogeles en PBS o DMEM, y se incubaron a 37°C. A intervalos regulares, se retiraron de las disoluciones, se secaron con papel de filtro, se pesaron (W_t) y se devolvieron al mismo recipiente. Se reemplazó la disolución tampón en cada medición y se almacenó la antigua para análisis adicional. Se determinó el porcentaje de pérdida de masa usando la ecuación (ecuación 3):

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = 100 - [(W_t / W_i) \times 100] \quad (\text{ec. 3})$$

Preparación de nanogel de dextrina marcado con FITC. FITC es una sonda fluorescente usada comúnmente en estudios biológicos, debido a su biocompatibilidad. Para obtener nanogeles marcados con FITC, se formó una disolución de nanogel (preparado tal como se describe a continuación en el ejemplo 6 y en Gonçalves *et al.*, 2007) disolviendo 10 mg de dextrina-VMA-SC₁₆ en 1,3 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7 y se agitó durante 30 min. Simultáneamente, se preparó una disolución de fluoresceína disolviendo 5 mg de SAMSA [(5-(2-(γ -3)-S-(acetilmercapto)succinilo)amino)fluoresceína, Invitrogen] en 0,5 ml de NaOH 0,1 M y se agitó durante 15 min. Entonces, se añadieron 7 μl de HCl 6 M y 0,1 ml de tampón NaPO₄ 0,5 M pH 7 y se agitó durante 10 min. Finalmente, se mezclaron la disolución de nanogel y la disolución de fluoresceína y se agitaron durante 30 min. Se separó el FITC no unido usando una columna Sephadex G25 PD10 (Amersham Biosciences) equilibrada con PBS, y se eluyó el nanogel marcado (nanogel/FITC) con PBS.

Evaluación de la liberación de nanogel de dextrina/FITC. Se obtuvo el hidrogel de oDex-nanogel/FITC tal como se describió previamente (preparación del hidrogel de oDex-nanogel). Se evaluó la liberación de nanogel/FITC desde los hidrogeles de oDex-nanogel mediante fluorimetría. Se midió la intensidad de fluorescencia del PBS retirado de los hidrogeles, a intervalos regulares, usando un espectrofluorímetro (Fluorolog Horiba Jobin Yvon). Se recogieron los espectros de fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 460 nm y registrando la emisión entre 470 y 600 nm a intervalos de 1 nm. Se ajustó la anchura de rendija a 6,0 nm para la excitación y la emisión. Se midió la intensidad de fluorescencia al máximo del pico obtenido (520 nm). Se obtuvo el porcentaje de nanogel/FITC liberado del hidrogel de oDex-nanogel mediante la ecuación 4:

$$\text{Liberación de nanogel/FITC (\%)} = [\text{nanogel/FITC}]_{\text{det}} / [\text{nanogel/FITC}]_{\text{tot}} \times 100 \quad (\text{ec. 4})$$

donde, $[\text{nanogel/FITC}]_{\text{det}}$ es la intensidad de fluorescencia detectada en el PBS recogido al tiempo determinado y $[\text{nanogel/FITC}]_{\text{tot}}$ es la intensidad de fluorescencia del nanogel/FITC total incorporado en el hidrogel de oDex.

Dependiendo de la estructura química del esqueleto del polímero, puede producirse la degradación del hidrogel mediante erosión o bien superficial o bien volumétrica. La erosión superficial tiene lugar cuando la velocidad de erosión supera la velocidad de permeación de agua en el volumen del polímero. La erosión volumétrica se produce cuando permean moléculas de agua en el volumen de la matriz a una velocidad más rápida que la erosión,

mostrando por tanto una cinética de degradación/erosión compleja. En hidrogeles de oDex, la degradación se produce principalmente mediante erosión volumétrica y se caracteriza por un perfil de degradación no lineal acompañado por un tamaño de poro creciente, tal como se observa en las figuras 13A y 13B. La variación en el tamaño de poro durante la degradación de la red del hidrogel es importante puesto que afecta al hinchamiento del hidrogel, la difusión de moléculas, y el suministro de células cuando se usan los hidrogeles para encapsulación celular.

Este ejemplo también muestra los estudios sobre el perfil de liberación de nanogeles de dextrina embebidos en hidrogeles de oDex/ADH (figura 13). Se producen nanogeles de dextrina según el ejemplo 6, y tienen un perfil de degradación similar a los hidrogeles de oDex/ADH.

La morfología de los hidrogeles de oDex (examinada mediante crio-SEM - figura 12) presenta una estructura porosa continua, con un diámetro de aproximadamente 1 μm . Con un mayor aumento, pueden observarse las partículas de nanogel presentes en el hidrogel de oDex-nanogel. No son perceptibles diferencias morfológicas obvias en comparación con las formulaciones de oDex y oDex-nanogel. Todos los hidrogeles tienen una morfología al azar y estructura porosa similar y los nanogeles incorporados no tuvieron una influencia significativa sobre la morfología de la red del hidrogel de oDex.

A pesar de sus muchas propiedades favorables, los hidrogeles también tienen algunas limitaciones. La baja resistencia a la tracción limita su uso en aplicaciones de soporte de carga y, como consecuencia, puede producirse la disolución prematura o el flujo de salida del hidrogel del sitio local seleccionado como diana. Con respecto a la administración de fármacos, el inconveniente más importante de los hidrogeles está relacionado con la cantidad y homogeneidad de carga de fármaco, que pueden estar limitadas, especialmente en el caso de fármacos hidrófobos; por otro lado, el alto contenido en agua y los grandes poros con frecuencia dan como resultado una liberación de fármaco relativamente rápida. Con el fin de superar estas limitaciones, puede usarse el nanogel de dextrina también proporcionado por esta invención para producir un nuevo hidrogel bidimensional. Puesto que este nanogel se obtiene mediante autoensamblaje de moléculas anfífilas, y se ha mostrado que incorporan y estabilizan tanto proteínas como pequeños productos farmacéuticos hidrófobos, la presencia de la nanofase puede ser útil para el desarrollo del material como sistema de liberación controlada de fármacos.

Según los estudios de pérdida de masa realizados, la velocidad de degradación del hidrogel de oDex es diferente de la hallada en hidrogeles de oDex-nanogel. En aproximadamente 25 días, la red del hidrogel de oDex se solubiliza por completo, por otro lado en este momento sólo se observó una pérdida de masa de aproximadamente el 70% en hidrogeles de oDex-nanogel. Sin embargo, sólo se observa una ligera pérdida de masa en comparación con las dos formulaciones con diferentes cantidades de nanogel. La velocidad de degradación más lenta observada en presencia del nanogel puede asignarse a una reticulación adicional de la red del hidrogel.

Simultáneamente, se evaluó la liberación del nanogel (marcado previamente con FITC) de los hidrogeles de oDex-nanogel mediante fluorimetría. Se liberó gradualmente el nanogel a lo largo del tiempo, siendo análogo a la degradación del hidrogel. El material compuesto de hidrogel de oDex-nanogel podría ser útil para superar el fenómeno de liberación por estallido inicial observado a menudo en los sistemas de administración de fármacos de nanogel ya que permite la liberación lenta y controlada del nanogel.

Bibliografía

Patentes

Colin Brown, US2010/0240607A1, Dextrin-containing composition for preventing surgical adhesions

Isabella Orienti and Elena Paolini, WO2009/016663A1, Amphiphilic dextrin conjugates and their use in pharmaceutical formulations as complexing agents for hydrophobic drugs to improve the aqueous solubility and consequently the therapeutic efficacy of the complexed drugs

Kamal Bouhadir, Genevieve Kruger and David Mooney, US2007/07186413, Hydrogels and water soluble polymeric carriers for drug delivery

Karen Burg, US2006/6,991,652 B2, Tissue engineering composite Kazunari Akiyoshi, Matsuda Osamu, Kishida Tusanao, Shimizu Takeshi, JP2009/149526A2: Sustained release preparation for subcutaneous or intramuscular injection, containing cytokine - nanogel composite

Kazunari Akiyoshi, Morimoto Nobuyuki, Iwasaki Yasuhiko, JP2005/298644A2, Preparation of hybrid gel for conveyance of bioactive substance, involves copolymerizing functional monomer with compound obtained by introducing polymerizable group to water-soluble polysaccharide

Peter Unger and Ronald Rohrbach, US1996/5541234, Process for making low density hydrogel material having high surface areas.

Ronald Hill, Richard Klann, Francis Lamberti, WO2005/042048A2, Methods and compositions for regenerating connective tissue

5 Otra bibliografía

Hreczuk-hirst D, Chicco D, German L, Duncan R. Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;230:57 - 66.

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24:4337-4351.

10 Nogusa H, Yano T, Okuno S, Hamana H, Inoue K. Synthesis of carboxymethylpullulan peptide doxorubicin conjugates and their properties. *Chem. Pharm. Bull.* 1995;(43):1931-1936.

Nishikawa M. Pharmacokinetic evaluation of polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996;21(2):135-155. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X96004036>.

15 Vercauteren R, Bruneel D, Schacht E, Duncan R. Effect of the Chemical Modification of Dextran on the Degradation by Dextranase. *J. of Bioactive and Comp. Polymers*. 1990;5:4-15.

Danauser-Reidl S, Hausmann E, Schick H, et al. Phase-I clinical and pharmacokinetic trial of dextran conjugated doxorubicin(AD-70, DOX-OXD). *Invest. New Drugs*. 1993;(11):187-195.

20 Treetharnmathurot B, Dieudonné L, Ferguson EL, et al. Dextrin-trypsin and ST-HPMA-trypsin conjugates: enzyme activity, autolysis and thermal stability. *International journal of pharmaceutics*. 2009;373(1-2):68-76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429290>.

Kerr, D.J., Young, A.M., Neoptolemos, J.P., Sherman M, Van-Geene, P., Stanley, A., Ferry, D., Dobbie JW, Vincke, B., Gilbert, J., El Eini, D., Dombros, N. F-, Las G. Prolonged intraperitoneal infusion of 5-fluorouracil using a novel carrier solution. *Br. J. Cancer*. 1996;74:2032-2035.

25 Davtyan T, Hakobyan I, Muradyan R, Hovhannisyan H, Gabrielyan E. Evaluation of amino acids as mediators for the antibacterial activity of iodine-lithium-□□-dextrin in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother*. 2007;(59):1114-1122.

Avetisyan S, Hakobyan G, Davtyan T. Modulation of endotoxin-induced respiratory splash of granulocytes and monocytes in patients with familial Mediterranean fever by iodine- lithium-□-dextrin and sodium thiosulfate. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2006;(1):11-13.

30 Asai, T., Hayashi, T., Hamajima, S., Mieki, A., Kataoka, H., Kawai T. Development of Bone Filling Material made from the Dextrin Complex American Association for Dental Research, Maiami, Florida. 2009.

Carvalho J, Gonçalves C, Gil AM, Gama FM. Production and characterization of a new dextrin based hydrogel. *European Polymer Journal*. 2007; (May).

Luz, P.P., Neri, C.R., Serra OA. Dextrin-Microencapsulated Porphyrin: Luminescent Properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1130:91-96.

35 Davies DS. Kinetics of icodextrin. *Perit. Dial. Int.* 1994;14:S45-S50.

Bouhadir KH, Hausman DS, Mooney DJ. Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. 1999;40:3575-3584.

40 Jia X, Burdick J a, Kobler J, et al. Synthesis and Characterization of in Situ Cross-Linkable Hyaluronic Acid-Based Hydrogels with Potential Application for Vocal Fold Regeneration. *Macromolecules*. 2004;37(9):3239-3248. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma035970w>.

Goncalves, C., Martins, J.A., Gama FM. Self-assembled nanoparticles of dextrin substituted with hexadecanethiol. *Biomacromolecules*. 2007;8(2):392-398.

Gonçalves, C., Gama FM. Characterization of the self-assembly process of hydrophobically modified dextrin.

European Polymer Journal. 2008;44(11):3529-3534.

Anseth KS, Bowman CN, Brannon-Peppas L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*. 1996;17(17):1647-1657. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961296876447>.

- 5 Maia J, Ferreira L, Carvalho R, Ramos MA, Gil MH. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. *Polymer*. 2005;46:9604-9614.

Massia SP, Stark J. Immobilized RGD peptides on surface-grafted dextran promote biospecific cell attachment. *Journal of biomedical materials research*. 2001;56(3):390-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372057>.

- 10 Ferreira L, Rafael A, Lamghari M, et al. Biocompatibility of chemoenzymatically derived dextran-acrylate hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2004;68(3):584-96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762939>.

Carvalho J, Moreira S, Maia J, Gama FM. Characterization of dextrin-based hydrogels: Rheology, biocompatibility, and degradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010 Apr;93(1):389-99.

- 15 Moreira, S; Costa, R; Guardão L.; Gärtner F.; Vilanova M.; Gama M. In Vivo Biocompatibility and Biodegradability of Dextrin-based Hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2010;25(2):141-153.

Maia J, Ribeiro MP, Ventura C, et al. Ocular injectable formulation assessment for oxidized dextran-based hydrogels. *Acta biomaterialia*. 2009;5(6):1948-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286432>.

- 20 Chen YM, Shiraiishi N, Satokawa H, et al. Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomaterials*. 2005;26(22):4588-96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15722128>.

Schneider GB, English A, Abraham M, et al. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials*. 2004;25(15):3023-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967535>.

- 25 Carvalho V, Castanheira P, Faria TQ, Gonçalves C, Madureira P, Faro C, Domingues L, Brito RM, Vilanova M GM. Biological activity of heterologous murine interleukin-10 and preliminary studies on the use of a dextrin nanogel as a delivery system. *Int J Pharm*. 2010;400(1-2):234-42.

Ameer, GA, Crumpler, ET and Langer, R. Cell killing potential of a water-soluble radical initiator, *International Journal of Cancer*, 2001, Volume 93 Issue 6, 875 - 879.

Cadée JA, van Luyn MJA, Brouwer LA, Plantinga JA, van Wachem PB, De Groot CJ, et al. In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels. *Int J Biomed Mater Res*. 2000;50:397-404

- 30 Fuertges, F., & Abuchowski, A. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol) -modified proteins. *J. Controlled Release*, 1990; 11, 139-148.

Vasey, P., Twelves, C., Kaye, S., Wilson, P., Morrison, R., Duncan, R., et al. (1999). Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 (HPMA copolymer doxorubicin): first member of a new class of chemotherapeutic agents: drug-polymer conjugates. *Clin. Cancer Res*, 5, 83-94.

- 35 Hardwicke, J., Ferguson, E. L., Moseley, R., Stephens, P., Thomas, D. W., Duncan, R., et al. (2008). *Journal of Controlled Release*. *Journal of Controlled Release*, 130, 275-283.

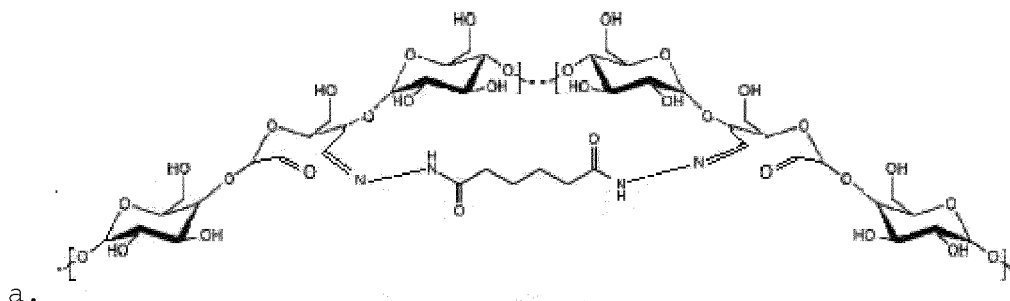
Orientl, I, Zuccari, G, Carosio, R and Montaldo, PG, Improvement of aqueous solubility of fenretinide and other hydrophobic antitumor drugs by complexation with amphiphilic dextrans, *Drug Delivery*, 2009; 16(7): 389-398

Las siguientes reivindicaciones exponen una realización particular de la invención.

40

REIVINDICACIONES

1. Formulaciones de hidrogel de dextrina oxidada reticulada con dihidrazida de ácido adípico que comprende la siguiente estructura:



- 5 que presenta la capacidad de incorporación dentro de su poro tridimensional, en las que dicha dextrina tiene un peso molecular de entre 1200 y 8000 Da.
2. Hidrogel según la reivindicación anterior, en el que incluye polisacáridos, proteínas, nanogeles, nanopartículas, materiales granulares, moléculas bioactivas y células.
3. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las proteínas son colágeno, fibronectina, caseína.
- 10 4. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las proteínas están incluidas en un porcentaje de entre el 0-20 de la composición de hidrogel, en peso seco.
5. Hidrogel según las reivindicaciones 1-2, en el que los polisacáridos son quitosano, ácido hialurónico.
6. Hidrogel según las reivindicaciones 1-2 y 5, en el que los polisacáridos están incluidos en un porcentaje de entre el 0-20 de la composición de hidrogel, en peso seco.
- 15 7. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es inyectable.
8. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se obtiene a partir de una dextrina con un grado de oxidación de entre el 10-50%, preferiblemente entre el 25-35%.
9. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que presenta una estructura porosa continua, con un diámetro de 1 μm .
- 20 10. Método de producción de la formulación de hidrogel descrita en las reivindicaciones anteriores, que comprende las siguientes etapas:
 - a) oxidar la dextrina con ácido peryódico;
 - b) eliminar el peryodato sin reaccionar;
 - 25 c) gelificar mediante la adición de un agente de reticulación, tal como dihidrazida de ácido adípico, preferentemente a un pH en el intervalo de 5,0-7,5.
11. Método según la reivindicación anterior, en el que el porcentaje de dihidrazida de ácido adípico usado es de entre el 3-40%, preferiblemente entre el 3-10%, en base molar en relación con los residuos de glucosa.
12. Método según las reivindicaciones 10-11, en el que la concentración de dextrina oxidada es de entre el 5-40% (p/v), preferiblemente entre el 25-30% (p/v).
- 30 13. Método según las reivindicaciones 10-12, en el que el periodo de gelificación es de desde 1 hasta 30 minutos.
14. Método según las reivindicaciones 10-14, en el que se incorpora un nanogel o una nanopartícula en el hidrogel,

en el que las dimensiones del nanogel o la nanopartícula son de entre 10-10000 nm.

15. Método según las reivindicaciones 10-14, en el que la incorporación del nanogel o la nanopartícula en el hidrogel se lleva a cabo mezclando el nanogel o la nanopartícula con la dextrina oxidada, antes de la adición de ADH.

5 16. Método según las reivindicaciones 10-15, en el que el nanogel o la nanopartícula se incorpora en una proporción del 1-25% del peso de dextrina.

17. Método según las reivindicaciones anteriores 14-16, en el que el nanogel o la nanopartícula se carga previamente con productos farmacéuticos.

10 18. Biomaterial que comprende el hidrogel descrito en las reivindicaciones 1-9 y obtenido mediante el método descrito en las reivindicaciones 10-17.

19. Sustituto de hueso sintético que comprende el hidrogel descrito en las reivindicaciones 1-9 y obtenido mediante el método descrito en las reivindicaciones 10-17.

20. Sistema para la administración controlada de fármacos que comprende el hidrogel descrito en las reivindicaciones 1-9 y obtenido mediante el método descrito en las reivindicaciones 10-17.

15 21. Implante óseo o relleno óseo que comprende un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y obtenido mediante el método descrito en las reivindicaciones 10-17.

22. Composición que comprende un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y obtenido mediante el método descrito en las reivindicaciones 10-17.

20 23. Prótesis médica que comprende un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y obtenido mediante el método descrito en las reivindicaciones 10-17.

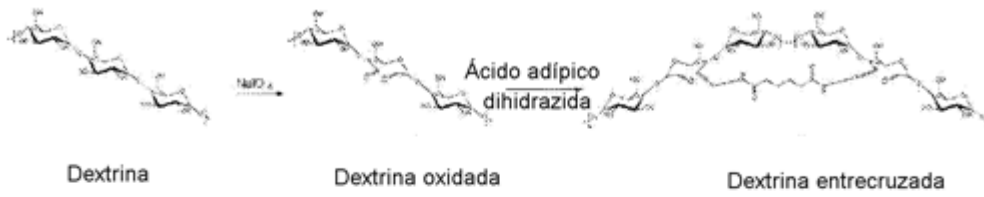


Figura 1

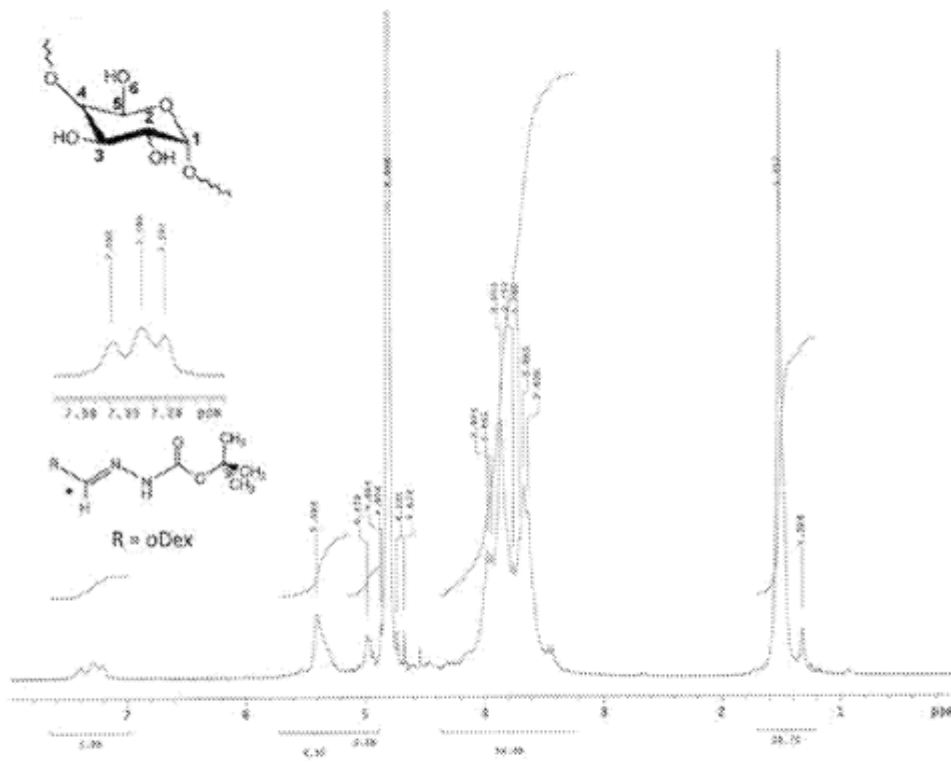


Figura 2

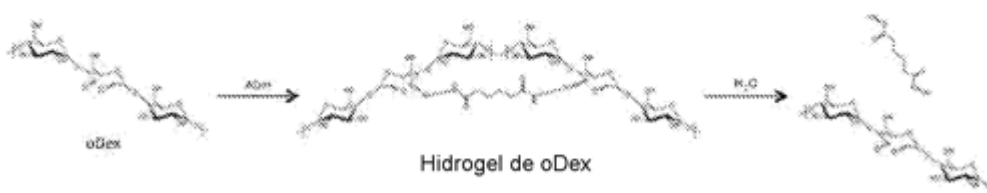


Figura 3

DO _T (%) *	ADH (%) **		
	5	15	30
25	+	+	+
32.5	++ (~30 min)	++ (~10min)	++ (~5 min)
40	++ (~2min)	+++	+++
50	+++	+++	+++

Figura 4

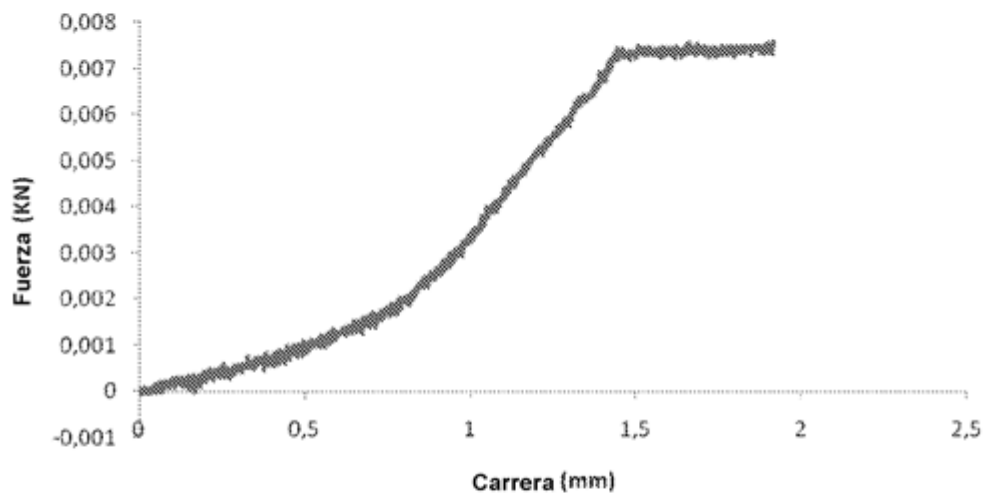


Figura 5

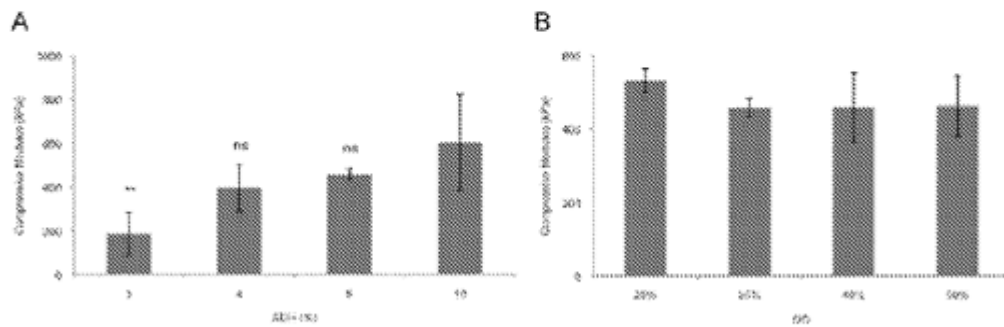


Figura 6

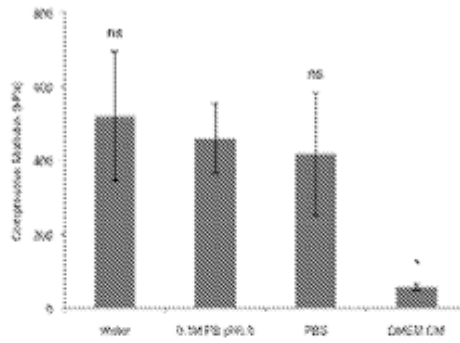


Figura 7

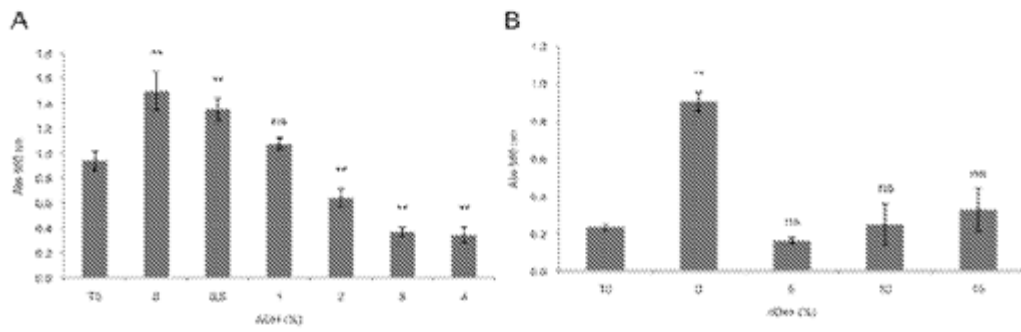


Figura 8

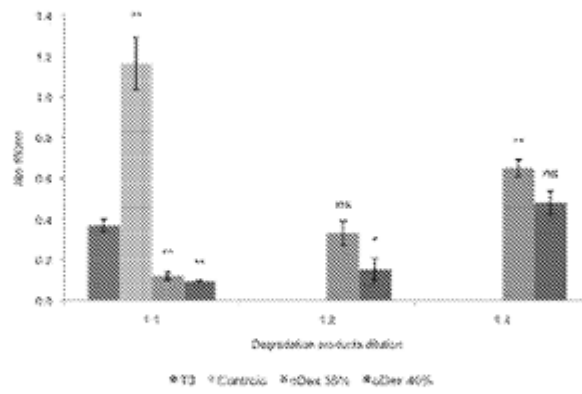


Figura 9

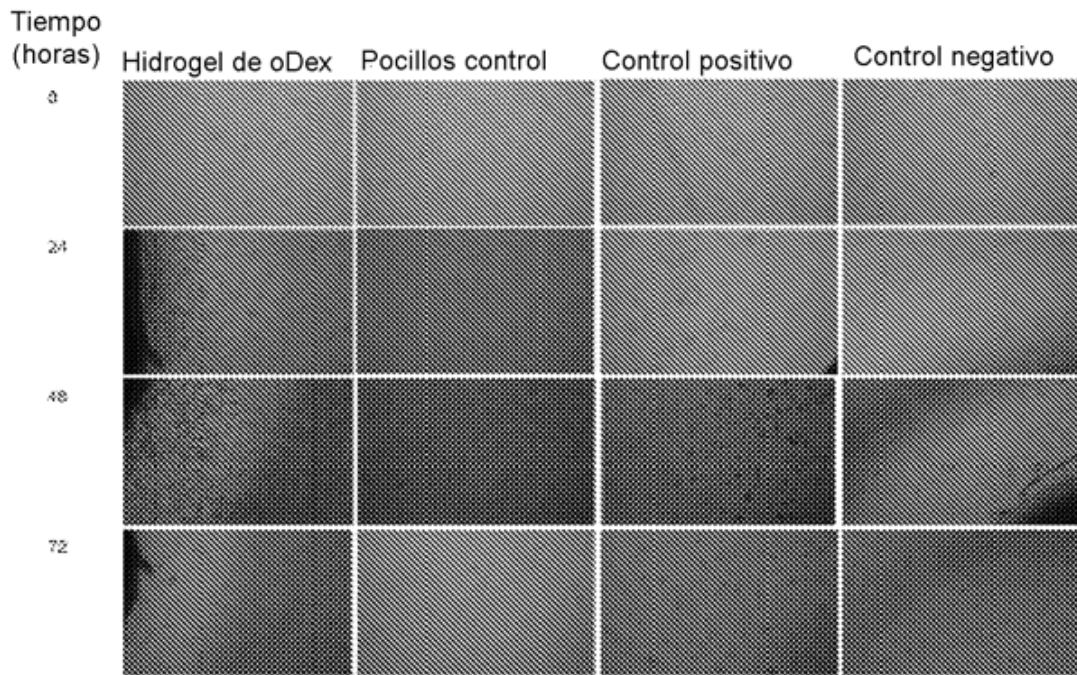


Figura 10

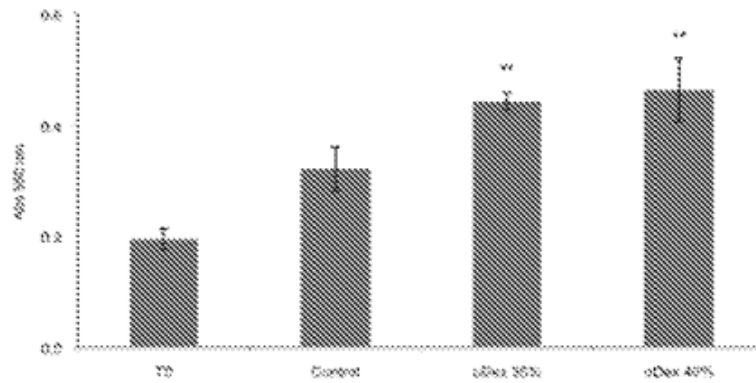


Figura 11

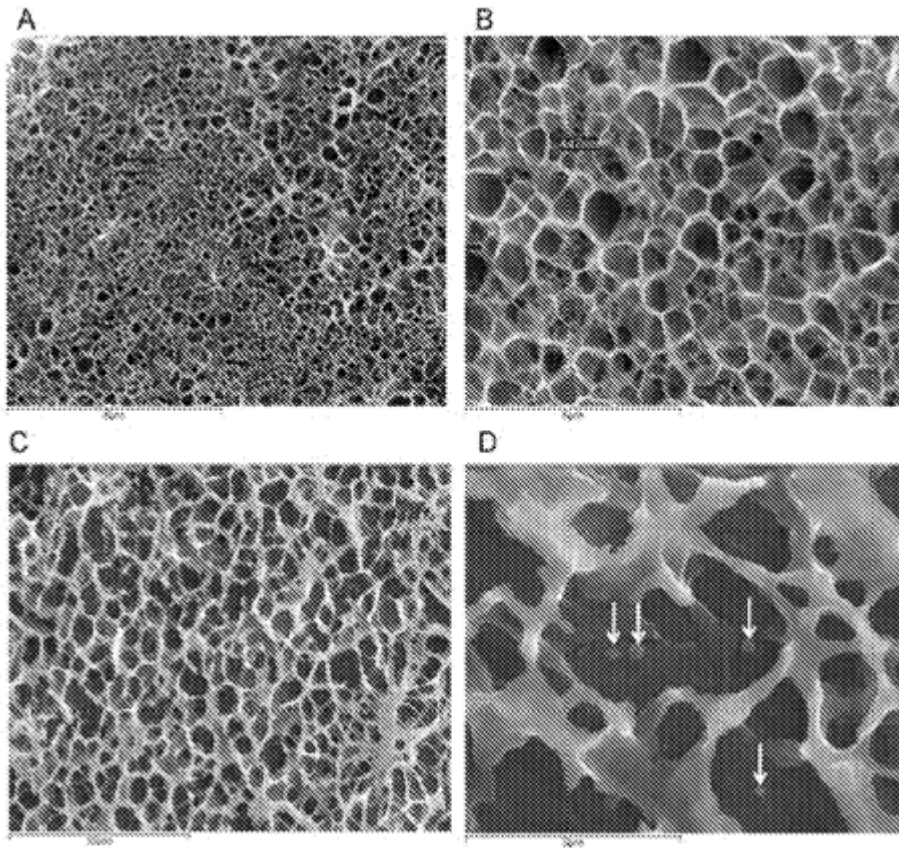


Figura 12

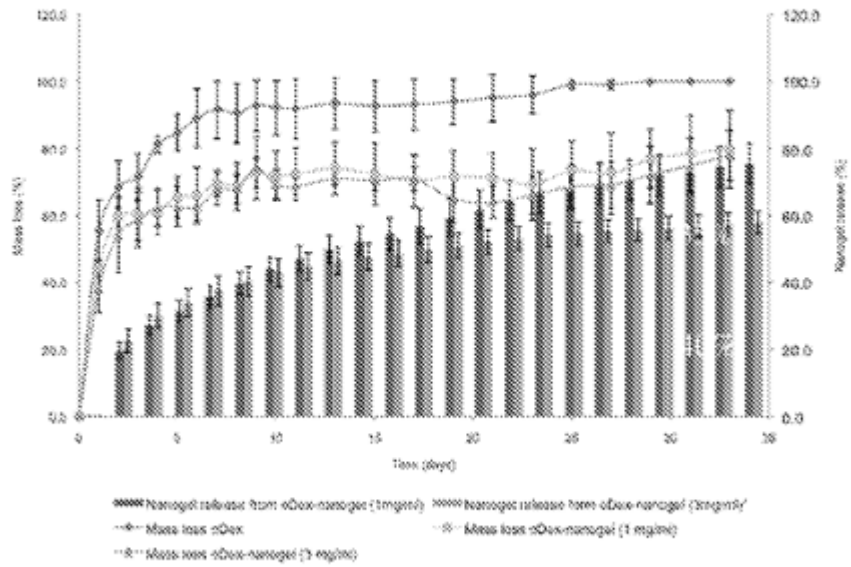


Figura 13