

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 253**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2011 E 11754490 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2598180**

54 Título: **Hidrogel basado en ácido hialurónico y uso del mismo en cirugía**

30 Prioridad:

30.07.2010 IT MI20101451

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

21.03.2016

73 Titular/es:

**NOVAGENT S.R.L. (50.0%)
Via Trento 115/117
38017 Mezzolombardo (TN), IT y
MERO S.R.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIAMMONA, GAETANO;
PITARRESI, GIOVANNA;
PALUMBO, FABIO;
ROMANO', CARLO LUCA;
MEANI, ENZO y
CREMASCOLI, EDGARDO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 253 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 basado en ácido hialurónico y uso del mismo en cirugía

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un hidrogel obtenido a partir de derivados del ácido hialurónico útiles como vehículos de compuestos bioactivos y a su uso en diversos campos de la cirugía tales como, por ejemplo, cirugía cosmética, cirugía maxilofacial, cirugía abdominal, cirugía general y en particular en el campo ortopédico; en el campo ortopédico, el gel de la invención es útil para la producción de recubrimientos de prótesis para implantar en el cuerpo humano o animal. En una realización preferida, la invención se refiere a un hidrogel cargado con compuestos bioactivos.

15 Estado de la técnica

Se conocen composiciones basadas en ácido hialurónico o sus derivados, por ejemplo en forma de hidrogel, para usar en diversos campos de la cirugía.

El ácido hialurónico se usa en cirugía cosmética solo (como bio-revitalizante) o derivatizado con diversas moléculas (uso como relleno); este uso se describe, por ejemplo, en los artículos "Hyaluronic acid: biological role and clinical applications", P. Brun et al., J Plastic Dermatol. 2005; 1:21, "Il recupero dell'elasticità e del turgore cutaneo mediante iniezione intradermica di acido ialuronico (Ial-System®) con tecnica cross-linked", A. Di Pietro et al., Giornale It. Dermatol. Venereol. 2001; 136:187; y "Facial wrinkles correction and skin rejuvenation (biostimulation) by auto-cross-linked hyaluronic acid", A. Di Pietro et al., Journal of Plastic Dermatology Vol. 3, n.º 2 mayo-agosto de 2007. Los productos comerciales basados en sistemas de ácido hialurónico son, por ejemplo, aquellos conocidos como Ial System® o Ial System Acp® (marcas registradas de Fidia Farmaceutici S.p.A.), Restylane® y Perlane® (marcas registradas de HA North American Sales AB) y similares.

El uso de ácido hialurónico o sus derivados, por ejemplo en forma de gel o productos similares, es más y más frecuente también en la cirugía abdominal; en este caso, estos productos tienen el objeto de prevenir la formación de adhesiones abdominales post-quirúrgicas. Las adhesiones son complicaciones posibles que pueden surgir en un plazo de cinco días después de las operaciones, debido a una respuesta natural del cuerpo a un traumatismo abdominal o ginecológico. Estas son bandas de fibromatosis hechas de tejido de cicatriz que conecta órganos y tejidos normalmente separados entre sí. Todos los órganos abdominales/pélvicos están cubiertos por una membrana delgada llamada peritoneo. Cualquier lesión de esta membrana es la fase inicial para la formación de adhesiones. De hecho cualquier lesión se sigue por un proceso de reparación. Si, sin embargo, la superficie peritoneal dañada está en contacto con otra superficie, tiene lugar un proceso de re-epitelialización que, en cierto sentido, "une" las dos superficies creando una adhesión. La formación de adhesiones es una consecuencia normal de las operaciones, debido al proceso regenerativo del cuerpo produciendo una respuesta de cicatriz que va más allá del nivel necesario, creando condiciones clínicas posiblemente invalidantes.

La aparición de las adhesiones de ninguna manera es infrecuente: se desarrollan en aproximadamente el 93 % de los pacientes sometidos a cirugía abdominal o pélvica, tales como operaciones para tratar hernias abdominales, operaciones ginecológicas, operaciones colo-rectales y muchas otras. Las adhesiones pueden provocar complicaciones serias, entre ellas, obstrucción del intestino delgado, infertilidad femenina, dolor crónico debilitante y dificultad para llevar a cabo nuevas operaciones en sitios ya tratados. De hecho las adhesiones post-quirúrgicas provocan el 74 % de las obstrucciones intestinales y son responsables del 20-50 % de los casos de dolor pélvico crónico. Además, las adhesiones son una de las causas principales de la infertilidad femenina, siendo responsables del 15-20 % de los casos.

Por otra parte, la presencia de adhesiones hace difícil una nueva intervención en un sitio ya tratado quirúrgicamente. Es realmente necesario retirar el tejido cicatrizante en exceso para tener acceso al sitio a tratarse (denominado adhesiolisis). Aunque las adhesiones son muy frecuentes y comunes, hasta la fecha el conocimiento del problema y, en particular de las formas de evitarlo, es aún pobre. El único remedio eficaz hasta la fecha para tratar las patologías de adhesión es la cirugía, llevada a cabo de forma laparoscópica y tradicional: no hay fármacos conocidos capaces de eliminar la adhesión una vez que se ha formado; la tasa de reaparición después de una operación sin embargo es alta, por lo que ha de recurrirse a la intervención solamente en caso de necesidad real, por ejemplo complicaciones obstructivas o sintomatología dolorosa recurrente.

El uso de derivados de ácido hialurónico para prevenir estas complicaciones post-quirúrgicas se describe por ejemplo en la Patente de EE.UU. N.º 6.723.709 B1 (productos basados en ácido hialurónico reticulado) o en los artículos "Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioreabsorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study", J. M. Becker, et. al., J. Am. Coll. Surg., oct. de 1996, 183 (4), páginas 297-306, que describe una membrana basada en ácido hialurónico y carboximetilcelulosa, y "Prevention of Postsurgical Adhesions with an Autocrosslinked Hyaluronan Derivative Gel", C. Belluco et. Al., Journal of Surgical Research, Vol. 100 (2), oct. de 2001, páginas 217-221, que describe el uso del ácido hialurónico

reticulado. Los productos basados en estos sistemas se comercializan por ejemplo por la compañía Genzyme Biosurgery y por la compañía Fidia Farmaceutici, que han desarrollado productos basados en ácido hialurónico (Fidia), combinados con carboximetilcelulosa (Genzyme). Los productos en el mercado para este fin se basan en ácido hialurónico reticulado solo (Hyalobarrier; Hyaloglide) o en combinación con otros polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa (Seprafilm; Sepragel) y en forma de películas, tales como SurgiWrap, una película de ácido poliláctico.

Las técnicas y los productos desarrollados para la cirugía cosmética y abdominal también tienen uso en la cirugía general, por ejemplo en ginecología.

Finalmente, otro sector importante de aplicación del ácido hialurónico y sus derivados en el campo médico es la ortopedia.

La ortopedia es la rama de la cirugía que aborda la fijación, la reparación o la reconstrucción de huesos dañados, aplicada también en campos como la traumatología, la neurocirugía y la cirugía maxilofacial.

Una técnica comúnmente usada en la ortopedia es la inserción de implantes en el cuerpo para la fijación o la reconstrucción de huesos y sus partes. Los implantes están hechos generalmente de metales biocompatibles (en particular titanio, cobalto-cromo, etc.), polímeros, cerámica, hidroxiapatita o sus combinaciones (por ejemplo metales recubiertos con una capa de hidroxiapatita). La técnica se usa generalmente en osteosíntesis, reemplazamientos de articulaciones, reconstrucción ósea ortopédica y traumatológica, cirugía espinal y aplicaciones maxilofaciales y odontológicas. Los implantes pueden usarse para reemplazar, al menos parcialmente, los huesos, las articulaciones o los dientes dañados; o pueden ser medios de ayuda para fijar partes óseas o para ayudar a estos a mantener la relación espacial correcta; en este segundo caso los implantes pueden ser placas de fijación ósea (por ejemplo, craneofacial, maxilofacial, ortopédica, esquelética y similares), clavos, tornillos, andamiajes y similares. El término "prótesis" sería más apropiado para dispositivos del primer tipo, pero según se usa en la presente invención, se entenderá que significa tanto una prótesis actual como cualquier otro medio de ayuda a insertarse en el cuerpo humano o animal para las aplicaciones citadas anteriormente. Otra técnica adoptada en la ortopedia es la inyección de materiales biocompatibles en partes dañadas de los huesos, tales como fracturas o agujeros; los últimos pueden resultar de la retirada de implantes temporales de los huesos, tales como tornillos. El material biocompatible en este caso cumple la función de reemplazar temporalmente los tejidos óseos, para mantener la resistencia mecánica, durante el periodo necesario para que tales tejidos crezcan y rellenen el área o el espacio dañados.

El área del cuerpo implicada en una operación quirúrgica ortopédica puede someterse a problemas post-operatorios; o, incluso si tales problemas no aparecen y el transcurso postoperatorio es suave, puede requerir la administración local de agentes que faciliten la recuperación de la operación.

Un primer problema posible en la cirugía ortopédica es el de las infecciones bacterianas. Por ejemplo, aproximadamente un 4,3 % de los implantes ortopédicos realizados en los EE.UU. dio lugar a infecciones bacterianas (E. M. Hetrick et al, "Reducing implant-related infections: active release strategies", Chem. Soc. Rev. 2006, 35, 780-789).

Muchos estudios han documentado la transferencia de organismos desde el personal en la sala de operaciones hacia el paciente durante las intervenciones quirúrgicas; véase, por ejemplo, Bather C. J. et al, "The effects of 'in-use' surgical handwashing on the pre- and postoperative fingertip flora during cardiothoracic and orthopaedic surgery", Journal of Hospital Infection, (1995) 30, 283-293.

Las infecciones osteomielíticas agudas o crónicas pueden desarrollarse también en muchos casos de osteosíntesis después de fracturas óseas. En situaciones en las que un cuerpo extraño inerte se implanta en un tejido ya dañado y debilitado, se desarrolla una competición por la colonización de las superficies del implante entre las bacterias (tales como *Staphylococcus aureus*, que se ha encontrado normalmente en casos de fracturas óseas contaminadas) y las células del sistema inmune. Sin embargo, las bacterias tienen las ventajas sobre las células del sistema inmune de procesos reproductivos más rápidos y una flexibilidad extrema para adaptarse al medio. Además, los estudios indican que los procedimientos para implantar una prótesis y la presencia de la propia prótesis en el sitio de la fractura ósea, dañan la respuesta del sistema inmune local con el resultado de que el número de bacterias requeridas para producir una infección puede caer por un factor de incluso 10.000 (Flückiger U. et al, "Factors influencing antimicrobial therapy of surface adhering microorganisms", Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents Chemother, (2000) 4, 165-175).

Una técnica de implantación convencional para prótesis y osteosíntesis consiste en la retirada extensiva del tejido necrótico y dañado, limpiar la cavidad, implantar una prótesis y una profilaxis parenteral sistémica con antibióticos. Los procedimientos similares se adoptan en caso de la inyección de biomateriales fluidos en fracturas o cavidades óseas. La liberación sistémica de antibióticos implica ciertos inconvenientes tales como la toxicidad sistémica, la absorción reducida en los tejidos isquémicos o necróticos y la hospitalización prolongada para monitorizar los niveles de los fármacos y sus efectos. En casos en los que la colonización bacteriana de la parte tratada no se evite de forma eficaz por la profilaxis sistémica, puede requerirse una nueva intervención quirúrgica (especialmente en el

caso de que el remplazamiento de la prótesis se vuelva necesaria) y una terapia antibiótica sistémica a largo plazo, posiblemente con una extensión del periodo de hospitalización, dando como resultado una incomodidad adicional para el paciente.

5 Para evitar que se establezcan colonias bacterianas, puede hacerse uso de agentes antibacterianos, más comúnmente antibióticos pero también pueden ser de otros tipos. Otro problema inevitablemente conectado a la cirugía ortopédica es el dolor post-operatorio. Los pacientes siempre sienten el dolor cuando los anestésicos desaparecen, generalmente unas pocas horas después de la cirugía, y es más intenso aproximadamente 2-3 días después de la operación.

10 Para hacer frente a este problema, es conocido recurrir a analgésicos, que pueden pertenecer a diversas clases, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos opioideos o anestésicos de uso local.

15 Finalmente, puede ser deseable proporcionar en el sitio de la operación agentes que favorezcan la recuperación de la propia operación y de sus consecuencias; estos agentes se denominan generalmente factores de crecimiento.

20 Con el fin de la brevedad, todas las sustancias recordadas anteriormente, que tienen una actividad biológica o farmacológica y se usan en prácticas postoperatorias, se denominan simplemente de forma acumulativa "compuestos bioactivos" en la presente descripción, salvo en casos en que se nombren individualmente.

25 Varios investigadores han propuesto adoptar en la cirugía ortopédica materiales capaces de actuar como vehículos, directamente en el sitio de la operación, de compuestos bioactivos. Los requerimientos funcionales de estos materiales son que deben ser biocompatibles (o bioinertes) y posiblemente bioreabsorbibles después del periodo de actividad de los compuestos bioactivos; no deben degradarse fácilmente por los fluidos corporales; por supuesto no deben ser por sí mismos propensos a la colonización por bacterias, una propiedad indicada en el campo como "anti-incrustación"; deben preferentemente ser capaces de liberar un principio activo inmediatamente después de la intervención y al menos durante las siguientes 6 horas, preferentemente hasta 48-72 horas, de tal manera que cubra la parte del periodo postoperatorio que es más crítica al menos con respecto a la acción antibacteriana y el control del dolor; y, en el caso de los implantes, estos materiales deben tener propiedades reológicas y de adhesión sobre las prótesis tales como que el material se mantenga sobre la prótesis y no se retire completamente por los estreses de cizalla inducidos por la inserción en las cavidades preparadas para los mismos (para ejercer su mejor acción, una prótesis de hecho debe hacer un contacto ajustado con las superficies del asiento proporcionado para ella en los huesos).

35 Las necesidades señaladas anteriormente para la ortopedia son la mayoría válidas también para la cirugía maxilofacial.

40 Se han desarrollado y usado diversos vehículos para la liberación local de fármacos, tales como lechos de polimetilmetacrilato (PMMA) en los que se carga el fármaco. Estos materiales sin embargo no se reabsorben y requieren posterior intervención para su retirada. Además la baja porosidad de los lechos de PMMA inhibe la liberación de fármacos un 25-50 %, reduciendo de esta manera la cantidad de fármaco liberada y aumentando el riesgo de selección de mutantes bacterianos resistentes al principio activo.

45 Los materiales biodegradables ofrecen las ventajas de la bioreabsorción, que evita la posterior intervención para retirarlos, reduce las reacciones inducidas por cuerpos extraños y aumenta la liberación total del fármaco localmente; además, las cinéticas de la liberación de fármacos desde la matriz pueden modularse controlando los procesos de degradación de la matriz.

50 Un polímero biodegradable y bioreabsorbible conocido es el ácido hialurónico. El ácido hialurónico (también indicado como HA en el resto de la descripción) es un nombre genérico para los polímeros de heteroglucano derivados de la repetición de una unidad básica que comprende ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El HA, en las formas que se dan de forma natural en muchos tejidos animales, puede tener un peso molecular (PM) que varía de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20 millones de Dalton (Da) y las propiedades de una muestra específica del compuesto pueden variar dependiendo de su PM actual. El HA es un componente fundamental de la matriz extracelular (ECM) y es esencial para el buen funcionamiento de numerosos tejidos corporales tales como los tejidos conjuntivos o epiteliales y en los fluidos del oído interno, en el humor vítreo de los ojos y también en el líquido esencial para las articulaciones (líquido sinovial). Es un polímero altamente biocompatible y biodegradable con propiedades anti-adhesivas y de lubricidad bien conocidas, la última explotada en la Solicitud de patente internacional n.º WO 2004/014303 A2. Sin embargo, el HA como tal no es tan adecuado para la inyección o para el recubrimiento de las prótesis, debido a su rápida degeneración por las hialuronidasas, enzimas de origen natural en el cuerpo humano y animal; como consecuencia de tal degradación rápida, la liberación de fármaco durante el periodo requerido puede no garantizarse. Además, debido a su alta hidrofiliidad, un recubrimiento producido con HA no tendría suficiente estabilidad mecánica cuando se implanta una prótesis en el cuerpo, esto es, un medio esencialmente basado en agua.

65 Se han estudiado derivados de HA en vista de diversas posibles aplicaciones médicas.

La Solicitud de patente internacional n.º WO 2006/069578 A1 describe copolímeros de HA con polímeros de ácidos alfa hidroxilo u otros polímeros, para usos diferentes en el campo cosmético o médico; este documento no cita el uso de estos copolímeros basados en HA para la inyección en el cuerpo o para el tratamiento de las prótesis.

5 La Patente n.º EP 1773399 B1 describe composiciones obtenidas reticulando HA con una polihidrazida; estas composiciones forman hidrogeles cuando se ponen en contacto con agua. La Solicitud de patente internacional n.º WO 2010/061005 A1 describe copolímeros de HA obtenidos a través de procesos de dos etapas, en los que en la primera etapa al menos un grupo hidroxilo del HA se hace reaccionar con un agente carbonilante para obtener un intermedio activado y en la segunda etapa el intermedio obtenido de esta manera se hace reaccionar con un nucleófilo reactivo que contiene al menos un grupo amino primario; el resultado es una forma de HA funcionalizado con cadenas laterales que se unen al esqueleto del ácido a través de un grupo carbámico.

10 La solicitud de patente n.º US 2004/0013626 A1 describe nanopartículas a usarse como vectores de fármacos, formados por un polímero obtenido injertando al menos una molécula de un polisacárido a un polímero biodegradable diferente del polisacárido, preferentemente un poliéster.

15 El artículo "New amphiphilic lactic acid oligomer-hyaluronan conjugates: synthesis and physicochemical characterization", Pravata L., et al, Biomacromolecules (2008) 9, 340-348, describe un derivado de HA producido injertando oligómeros de ácido láctico (OLA), de peso molecular medio alrededor de 500 Da, a los radicales hidroxilo del ácido. Estos derivados HA-OLA muestran menor hidrofiliidad que el HA y propiedades reológicas modificadas en comparación con el mismo, haciéndolos más estables en un ambiente acuoso, manteniendo buenas características de capacidad de biodegradación y bioreabsorción.

20 El artículo "New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: synthesis and characterization", Palumbo F. S. et al, Carbohydrate Polymers (2006) 66, 379-385, describe derivados de HA obtenidos injertando ácido poli-láctico (también abreviado PLA en el resto de la descripción) hasta un HA de PM medio de 266.000 Da con dos grados de sustitución diferentes, en el primer caso una relación de cadenas de PLA a unidades de repetición de HA del 1,5 %, en el segundo caso un grado de sustitución de 7,8 %; el primer compuesto es todavía algo hidrófilo, mientras que el segundo es más hidrófobo y da lugar a dispersiones parecidas a gel en el agua. Este artículo indica algunas aplicaciones posibles de los copolímeros injertados descritos en el campo biomédico, tales como el uso de sus soluciones acuosas para reducir la adhesión después de la cirugía abdominal, en procedimientos oftálmicos y para la lubricación de las articulaciones, pero no se da una pista de posibles usos en los implantes ortopédicos.

25 El artículo "Synthesis of novel graft copolymers of hyaluronan, polyetileneglicol and polylactic acid", Pitarresi G. et al, Macromolecules and Indian Journal, Vol. 3, número 2, ago. de 2007, 53-56 describe derivados de HA obtenidos injertando en la cadena de HA tanto PLA como polietilenglicol (abreviado PEG), mostrando que estos últimos son menos hidrófobos que los compuestos obtenidos por HA y PLA solos.

30 La Solicitud de patente internacional n.º WO 2005/032417 A2 describe un recubrimiento producido usando una mezcla física de HA con uno o más polímeros biocompatibles, entre ellos PLA, y se carga con un agente antimicrobiano; este documento también describe el uso de dicha mezcla para producir una película seca cargada con el agente antimicrobiano en la superficie de una prótesis, para el posterior implante. Los recubrimientos de prótesis producidos de acuerdo con este documento sin embargo padecen al menos dos inconvenientes: primero, el agente antimicrobiano, por ejemplo un antibiótico, tiene una vida limitada, de tal manera que puede no ser completamente eficaz en el momento del implante; segundo, este método no permite adaptar el recubrimiento de la prótesis a los requerimientos específicos de los diferentes casos, por ejemplo, intolerancias conocidas de un paciente a un antibiótico dado o la necesidad de adoptar un antibiótico particular o un nivel específico de dosificación del mismo, en una situación específica.

35 La Solicitud de patente EP 1666518 A1 describe vehículos de fármacos derivados de un producto de modificación de HA, en los que se injertan cadenas de poliéster (seleccionadas de ácido poliláctico, de ácido poliglucólico y de copolímeros de ácido láctico-ácido glucólico) en la cadena de HA basal. Como se indica en este documento y se muestra en todas las fórmulas mostradas en el mismo, el injerto del poliéster en la cadena de HA se da uniando, bien directamente o bien a través de espaciadores di-amino o di-hidrazida, a los grupos carboxílicos presentes en los restos de ácido glucurónico del HA. De esta manera, al menos parte de los grupos carboxílicos de HA se transforman en grupos amida; ya que los grupos carboxílicos libres son responsables de la hidrofiliidad del HA, la modificación propuesta en este documento da lugar a una reducción de dicha hidrofiliidad; de hecho, las cadenas de HA modificadas del documento EP 1666518 A1 muestran una tendencia a enrollarse sobre sí mismas, haciendo a estos productos adecuados para la producción de micro- o nanoesferas usadas como vehículos de fármacos inyectables de acuerdo con un aspecto de la invención descrito en el documento citado. Además, las composiciones descritas en este documento se dirigen y se adaptan a la liberación sostenida del fármaco, durante un periodo más largo que varios días (véase el párrafo [0007] del documento), pero esta característica no es deseable en el campo específico de la ortopedia.

40 Finalmente, el artículo "Self-assembled amphiphilic hyaluronic acid graft copolymers for targeted release of antitumoral drug", Pitarresi G. et al, Journal of Drug Targeting, 2010, Vol. 18, Número 4, 264-276, describe una forma

modificada de HA obtenida injertando en el esqueleto del HA cadenas de ácido poliláctico, solas o en combinación con cadenas de polietilenglicol, y disolviendo los copolímeros injertados obtenidos de esta manera en agua a una concentración máxima de 2,4 mg/ml (igual a 0,24 % p/v) para obtener una dispersión micelar del copolímero capaz de transportar moléculas de fármaco atrapadas (Doxorubicina ejemplificada en el artículo).

Existe una necesidad en el campo de vehículos mejorados de compuestos bioactivos para usar en la cirugía ortopédica, que no sufran los inconvenientes de la técnica anterior; de forma similar, se siente la necesidad de tener productos disponibles todavía mejores que aquellos ya presentes en el mercado para las otras cirugías citadas, esto es, cirugía cosmética, abdominal, maxilofacial y general.

Sumario de la invención

Es de esta manera un objeto de la invención proporcionar un hidrogel que comprende un derivado de ácido hialurónico para usar tanto en la ortopedia como en las cirugías cosmética, abdominal, maxilofacial y general, solo o en combinación con un compuesto bioactivo.

Es otro objeto de la invención proporcionar composiciones que contienen un hidrogel que comprende un derivado de ácido hialurónico y al menos un compuesto bioactivo.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar prótesis para implantar en el cuerpo humano o animal recubiertas con los hidrogeles anteriormente citados basados en derivados de ácido hialurónico, que contienen posiblemente un compuesto bioactivo.

Descripción detallada de la invención

En una primera realización, la invención proporciona un hidrogel que comprende agua, al menos un compuesto bioactivo seleccionado entre compuestos capaces de afectar a la estabilidad de las bacterias que protegen la biopelícula, elegidos entre cisteína y sus derivados y D-aminoácidos, AINE, anestésicos para uso local, opioides y tramadol y factores de crecimiento y un derivado de ácido hialurónico en el que:

- el derivado de ácido hialurónico comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, de peso molecular comprendido entre 50.000 y 3.500.000 Da sobre los restos de N-acetil-D-glucosamida del cual se han injertado cadenas de un poliéster biodegradable y biocompatible de peso molecular comprendido entre 3.000 y 900.000 Da, en una cantidad tal que el derivado comprenda entre 1 y 50 de dichas cadenas de poliéster por 100 unidades de repetición de ácido D-glucurónico/N-acetil-D-glucosamina del ácido hialurónico; y
- la concentración del derivado de ácido está entre un 1 y un 35 % p/v.

Los presentes inventores han descubierto que, partiendo de una clase particular de derivados de HA, es posible producir un hidrogel que es más resistente que el HA solo frente a la degradación química y enzimática y está dotado de una mezcla de propiedades químicas y mecánicas de tal manera que pueda usarse para la inyección en fracturas o cavidades óseas y para la producción de recubrimientos de prótesis. Aunque en la siguiente descripción se hace referencia al ácido hialurónico, se entiende que por este término se entienden también sales del ácido normalmente presentes en un cuerpo humano o animal, tales como sales de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+} . En particular, los presentes inventores han descubierto que injertando el poliéster biocompatible en los restos de N-acetil-D-glucosamina del HA, a través de la reacción con el grupo hidroxilo libre presente en estos restos, el derivado de HA mantiene una alta hidrofiliadad, combinada con propiedades de viscosidad y de retención de esta viscosidad con el tiempo, así como la liberación rápida del compuesto bioactivo, que hace estos derivados extremadamente muy adecuados para aplicaciones en el campo de la ortopedia. Esto es contrario a lo enseñado en el documento citado EP 1666518 A1, en el que el injerto de las cadenas laterales de poliéster tiene lugar sobre los grupos ácido carboxílico en su lugar, dando lugar a una hidrofiliadad reducida.

Todos los porcentajes en la siguiente descripción se expresan como valores en porcentaje peso/volumen (% p/v, que indica la masa del soluto, en gramos, por 100 ml de la solución o del gel resultante) salvo que se especifique de otra manera.

El componente principal del hidrogel es un derivado de ácido hialurónico, obtenido injertando cadenas de poliésteres biodegradables y biocompatibles sobre una fracción del ácido que tiene un peso molecular en un intervalo particular.

La fracción útil de HA, a usarse como material de partida en la preparación del derivado, tiene un peso molecular (PM) comprendido entre aproximadamente 50 kDa y 3,5 MDa, preferentemente entre 100 kDa y 1,5 MDa y más preferentemente de aproximadamente 200-300 kDa. Puede obtenerse el HA de PM en estos intervalos por degradación de fracciones mayores de HA en medios fuertemente ácidos, como se describe en el artículo "Disulfide crosslinked hyaluronan hydrogel", Shu X. Z. et al, Biomacromolecules (2002) 3, 1304-1311. El material de partida puede obtenerse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, crestas de gallo); de forma alternativa, puede producirse por microorganismos (como se describe por ejemplo en las patentes US 4.801.539 y EP 694616) o a partir de rutas recombinantes (como se describe por ejemplo en las solicitudes de patente n.º WO 03/054163 y n.º WO

2006/069578). Las rutas sintéticas (de microorganismos o rutas recombinantes) pueden adaptarse también para producir Ha ya en el intervalo de PM deseado, que de esta manera no necesite una etapa de degradación.

5 El otro reactivo en la producción del derivado es un poliéster biodegradable y biocompatible o una mezcla de poliésteres o copolímeros de los mismos. Los poliésteres más interesantes para los objetivos de la invención son el ácido poli-láctico, el ácido poli-glucólico, la poli-caprolactona (estos últimos también denominados en el resto de la descripción PGA y PCL, respectivamente), sus mezclas y copolímeros. Se ha descubierto que los hidrogeles de propiedades deseadas pueden prepararse con derivados de HA producidos con poliésteres que tienen un PM en el intervalo entre 3-150 kDa en el caso del PLA, en el intervalo de 1-900 kDa en el caso del PGA y en el intervalo de 3-900 kDa en el caso del PCL o de copolímeros PLA-PGA (también denominados PLGA en lo sucesivo en el presente documento) o de copolímeros que comprenden PCL. Estos compuestos están disponibles en el mercado, por ejemplo de Boehringer Ingelheim o de revendedores de químicos, tales como Fluka o Sigma-Aldrich. Para potenciar la reactividad del poliéster, es preferible activar su extremo carboxílico reaccionando con un buen grupo saliente, por ejemplo, una imida, preferentemente N-hidroxisuccinimida (NHS) o con un agente tal como carbonildiimidazol (CDI), que convierte un ácido carboxílico en la imidazolida correspondiente, la forma reactiva de un agente acilante. La formación de estos compuestos de poliéster-NHS se lleva a cabo a través de una primera reacción del grupo carboxilo libre del poliéster con diciclohexilcarbodiimida (DCC) y después funcionalizándolo con NHS; la reacción se lleva a cabo, por ejemplo, a temperatura ambiente durante 24 horas.

20 Debido al hecho de que el HA es un compuesto fuertemente hidrófilo, mientras que los poliésteres anteriores (incluso cuando se activan con NHS) son hidrófobos, es necesario hacer uno de los reactivos compatible con los disolventes adecuados para el otro reactivo. De acuerdo con la presente invención, este resultado se obtiene transformando el HA en una sal de amonio, tal como la sal de cetiltrimetilamonio (CTA) o preferentemente la de tetrabutilamonio (TBA). La formación de la sal de amonio puede llevarse a cabo sencillamente neutralizando el HA con el hidróxido del catión amonio. La reacción avanza con un rendimiento del 100 % y el producto resultante es soluble en dimetilsulfóxido (DMSO), en el que también son solubles los poliésteres y sus derivados -NHS. En el caso en que el HA esté disponible en forma de una de sus sales orgánicas (por ejemplo, la sal de sodio, la forma comercial más común de HA), es posible pasar en primer lugar una solución acuosa de la misma a través de una columna ácida de intercambio iónico o tratarla con un ácido para recuperar el HA en forma ácida.

30 El HA sustituido con amonio y el compuesto de poliéster-NHS se hacen reaccionar después en DMSO en presencia de dietilamina (DEA) como catalizador; la reacción tiene lugar por ejemplo en 24 horas a 40 °C. La reacción consiste en la condensación de la función carboxílica del poliéster (activado con NHS) con el grupo hidroxilo de las unidades de N-acetil-D-glucosamina del HA. La relación de unidades de N-acetil-D-glucosamina a las que se injerta una cadena de poliéster al número total de tales unidades presentes en el HA se define en la presente invención como "grado de derivatización". Los presentes inventores han descubierto que los hidrogeles de propiedades deseadas pueden producirse con derivados del HA en los que dicho grado de derivatización está comprendido entre el 1 y el 50 %.

40 Las propiedades (en particular la hidrofiliidad y las características de anti-incrustación) del derivado de HA pueden modularse adicionalmente a través de una segunda derivatización, en la que una parte de los grupos carboxilo del ácido D-glucurónico del HA se funcionalizan con cadenas de polietilenglicol (PEG). El PEG se conoce por ser un polímero biocompatible (está aprobado por la FDA) y se usa ampliamente en el campo farmacéutico tanto para preparar formas de dosificación convencionales como para sistemas de liberación innovadores. Los mejores resultados finales se obtienen cuando el PEG empleado tiene un PM entre 400 Da y 200 kDa, preferentemente de aproximadamente 5 kDa y el grado de derivatización del HA con PEG (es decir, la relación de unidades de ácido D-glucurónico derivatizadas con PEG al número total de tales unidades en el HA) está comprendido entre el 5 y el 20 %.

50 El PEG se pre-activa preferentemente para potenciar su reactividad, a través del intercambio del grupo -OH libre en un extremo del mismo con -NH₂ (PEG-NH₂); el último compuesto también está disponible en el mercado. El PEG-NH₂ se añade en DMSO al producto de reacción de HA amonio sustituido y poliéster-NHS, después de que el último se haya aislado por precipitación de la mezcla de reacción con un disolvente no polar (por ejemplo, éter de dietilo), filtración y lavado repetido con acetona para eliminar cualquier poliéster-NHS sin reaccionar. Los derivados de HA obtenidos de esta manera (con o sin PEG) se purifican después por medios conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, diálisis y secado por congelación y posiblemente se someten a intercambio iónico para intercambiar los iones amonio con iones Na⁺ o K⁺, más compatibles con el uso que se pretende.

60 El derivado de HA se añade después a agua, que normalmente puede ser agua bidestilada, una solución salina tamponada, una solución fisiológica estéril o agua para preparaciones inyectables, en una cantidad tal que su concentración en el hidrogel resultante esté comprendida entre el 1 y el 35 % p/v, preferentemente entre el 2 y el 10 % p/v. Funcionando como se ha descrito hasta ahora, todas las concentraciones de derivado de HA entre el 1 y el 35 % p/v dan lugar a geles viscosos transparentes uniformes. Estos hidrogeles son estables durante largos periodos y pueden almacenarse durante al menos seis meses incluso a temperatura ambiente sin alterar sus propiedades, en particular su viscosidad.

Debido a la gran adaptabilidad del hidrogel que puede obtenerse tanto con diferentes grados de derivatización como con diferentes concentraciones, mostrando siempre de todos modos las propiedades viscoelásticas requeridas, el uso del mismo es ajustable en vista del tipo de cirugía.

5 De hecho, para usar en cirugía ortopédica o abdominal la viscosidad del producto debe ser mayor para asegurar el efecto barrera contra la adhesión de células inflamatorias y/o bacterianas en el caso de que se use en la ortopedia o de obstáculo contra un proceso de re-epitelialización en el caso de la cirugía abdominal. En el caso de una operación con técnicas de laparotomía o de laparoscopia, el producto en forma de hidrogel puede asociarse a un fármaco antiinflamatorio, por ejemplo ibuprofeno, para reducir a un mínimo el riesgo de inflamación durante la
10 intervención quirúrgica debido a los procesos fibrocicatriciales.

En el caso de una operación de septoplastia o de una rinoplastia (cirugía maxilofacial), las intervenciones se efectúan dirigidas a la reducción y la remodelación del cartílago y del esqueleto óseo y el hidrogel de la presente invención se usa para sostener las estructuras nasales durante la reparación; el hidrogel debe en consecuencia
15 tener alta viscosidad, como en el caso de la cirugía ortopédica o abdominal; el producto en forma de hidrogel puede asociarse a un anestésico local para reducir a un mínimo el dolor provocado por la operación, por ejemplo ropivacaína, usada ampliamente en cirugía nasal.

Por el contrario, en el caso en que el uso se dirija a la cirugía cosmética, la viscosidad del producto es de la mayor importancia. De hecho, en este caso, el hidrogel de la presente invención debe no ser demasiado viscoso, ya que el producto ha de inyectarse por debajo de la piel con agujas muy finas (29-30 G, equivalente a un diámetro de 0,33 y 0,30 mm, respectivamente). Esta condición implica el uso de hidrogeles fácilmente extrusionables, de baja viscosidad, formados por HA derivatizado en agua bidestilada, en una solución salina tamponada, en una solución fisiológica estéril o en agua para preparaciones inyectables. Estas condiciones de uso se unen de forma ajustada a
20 la posibilidad de ajustar la viscosidad de este hidrogel, manteniéndolo en los parámetros descritos de grado de derivatización y concentración expresada en % p/v.

Finalmente, el hidrogel de la invención puede usarse en cirugía general, por ejemplo, en ginecología. Normalmente, los eventos adversos encontrados en la cirugía ginecológica se refieren a problemas relacionados con la fertilidad, a inflamaciones pélvicas crónicas o a endometriosis. En este caso también, el producto en forma de hidrogel puede asociarse a un fármaco anti-inflamatorio para reducir a un mínimo el riesgo de inflamación durante la intervención quirúrgica, tal como diclofenac, comúnmente adoptado en este tipo de cirugía y capaz de reducir considerablemente la sintomatología dolorosa.
30

Como indicaciones generales, en el caso de la cirugía cosmética se vuelve adecuado un hidrogel de la invención que tenga una viscosidad comprendida entre 5 y 20 Pa·s; en cirugía maxilofacial es posible usar un hidrogel con una viscosidad comprendida entre 50 y 100 Pa·s; en cirugía abdominal es posible usar un hidrogel con una viscosidad comprendida entre 150 y 450 Pa·s; finalmente, en cirugía general (en particular ginecológica) es posible usar un hidrogel con una viscosidad comprendida entre 60 y 140 Pa·s.
40

Preferentemente, estos hidrogeles se obtienen con una concentración del 3 % p/v en agua de un HA con un grado de derivatización del 2,7 % para usar en cirugía cosmética; con una concentración del 6 % p/v en agua de un HA con un grado de derivatización del 3,5 % para usar en cirugía maxilofacial; con una concentración del 10 % p/v en agua de un HA con un grado de derivatización del 7 % para usar en cirugía abdominal; y con una concentración del 8 % p/v en agua de un HA con un grado de derivatización del 3,5 % para usar en cirugía general y particularmente ginecológica.
45

Los hidrogeles obtenidos a partir de derivados de HA descritos anteriormente se cargan con al menos uno de los siguientes compuestos bioactivos:
50

- compuestos capaces de afectar a la estabilidad de las bacterias protectoras de la biopelícula, elegidos entre cisteína y sus derivados y D-aminoácidos;
- AINE;
- anestésicos para uso local;
- 55 - opioides y tramadol; y
- factores de crecimiento.

Un hidrogel cargado con uno o más compuestos bioactivos se denominará en el resto de la descripción un "hidrogel bioactivo", para distinguirlo de un hidrogel obtenido solamente del derivado de HA y agua bidestilada, una solución salina tamponada, una solución fisiológica estéril o agua para preparaciones inyectables (el objeto de la primera realización de la invención), que se denominará simplemente "hidrogel". Los presentes inventores han observado que los hidrogeles bioactivos de acuerdo con esta segunda realización de la invención, teniendo además propiedades químicas que los hace capaces de permanecer estables en el sitio de inyección o el implante durante al menos los primeros días después de la operación (y en el caso de los implantes, sus propiedades reológicas son de tal manera que permanezcan adheridos sobre la superficie del implante), además tengan propiedades de liberación
60
65

de los compuestos bioactivos que les hace adecuados para llevar a cabo las acciones farmacológicas o biológicas que se pretende.

5 Una primera acción posible que puede ejercerse por un hidrogel bioactivo de la invención es una acción antibacteriana. Se sabe que las colonias bacterianas, una vez establecidas en un sitio, producen una biopelícula que consiste en macromoléculas incluyendo proteínas y polisacáridos que protege la colonia bacteriana y hace a los antibióticos generales y a los tratamientos biocidas ineficaces.

10 La cisteína y sus derivados y los D-aminoácidos tienen la capacidad de interferir con las colonias protectoras de las biopelículas de las bacterias; estos compuestos también se denominan en lo sucesivo "compuestos anti-biopelículas". Un hidrogel bioactivo de la invención, cargado con cisteína o un derivado de cisteína o con un D-aminoácido, evita la formación de la biopelícula o la debilita, de tal manera que deja a las bacterias expuestas a la acción del sistema inmune del paciente que se ha sometido a la operación ortopédica o de otros agentes antibacterianos (por ejemplo antibióticos) que pueden administrarse oral, parenteral o localmente; la administración local se obtiene preferentemente cargando el agente antibacteriano en el propio hidrogel bioactivo, mezclado con los compuestos anti-biopelículas citados. Los ejemplos de compuestos adecuados relacionados con la cisteína son L-cisteína, D-cisteína, D-L cisteína, D-L homocisteína, éster metílico de L-cisteína, éster etílico de L-cisteína, cisteína de N-carbamoilo, cisteamina, N-(2-mercaptoisobutiril)-L-cisteína, N-(2-mercaptopropionil)-L-cisteína A, N-(2-mercaptopropionil)-L-cisteína B, N-(32-mercaptopropionil)-L-cisteína, clorhidrato de éster etílico de L-cisteína, clorhidrato de éster metílico de L-cisteína, nacistelina (una sal de lisina de N-acetilcisteína), N-acetilcisteína y derivados de los mismos. Entre estos, se prefiere la N-acetilcisteína, las propiedades de la cual se describen, por ejemplo, en el artículo "Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*", C. Pérez-Giraldo et al., Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1997) 39, 643-646 y se explotan por ejemplo en la patente de EE.UU. n.º 6.475.435 B1 para el recubrimiento de dispositivos médicos.

25 Los ejemplos de D-aminoácidos adecuados son D-tirosina, D-leucina, D-triptófano y D-metionina. Las propiedades de los D-aminoácidos en la disrupción de la biopelícula se describen por ejemplo en el artículo "D-Amino acids trigger biofilm disassembly", I. Kolodkin-Gal et al., Science, vol. 328, n.º 5987, mayo de 2010, 627-629.

30 Otra función importante que puede cumplirse por los hidrogeles bioactivos de la invención es el control del dolor postoperatorio.

Este resultado puede lograrse cargando el hidrogel con uno o más compuestos usados para este fin y en particular AINE, anestésicos para uso local y analgésicos opioides.

35 Los AINE útiles son, por ejemplo (pero no se limitan a), acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, benorilato, bromelaína, carprofeno, celecoxib, cinnoxamicam, ácido clamidóxico, clonixina, diclofenac, diflumidona, diflunisal, etoricoxib, fenclofenac, fendosal, fenoprofeno, ácido flufenámico, flucuzazona, flurbiprofeno, ibufenac, ibuprofeno, iguratimod, indometacina, indoprofeno, isofezolac, cetoprofeno, cetorolac, licofelona, lomoxicam, lumiracoxib, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, metamizol, naproxeno, ácido niflúmico, nimesulida, orpanoxina, oxatiaprim, parecoxib, piroxicam, robenacoxib, rofecoxib, seaprosa-S, serratiopeptidasa, sudoxicam, sulfanizolona, sulindac, suprofenol, tenoxicam, triflamizol, tomoxiprol y valdecoxib.

45 Los anestésicos útiles para uso local son, entre otros, bupivacaína, cloroprocaína, levobupivacaína, lidocaína, prilocaína, procaína, ropivacaína y carbocaína.

Los analgésicos opioides útiles son, entre otros, buprenorfina, butorfanol, dextrometorfano, fentanilo, etorfina, idromorfona, loperamida, morfina, oxicodona, petidina, sufetanilo y tramadol.

50 Finalmente, una clase adicional muy importante de compuestos funcionales que pueden cargarse en los hidrogeles bioactivos de la invención se representa por los factores de crecimiento. Estos son generalmente glucoproteínas que tienen la función de estimular mecanismos básicos implicados en la regeneración de tejidos. Una lista no exhaustiva de factores de crecimiento que pueden transportarse a y liberarse en el sitio de operación a través de los hidrogeles bioactivos de la invención comprende proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y proteína morfogenética ósea (BMP7), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor beta transformante del crecimiento (TGF-β) y factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF).

60 El hidrogel bioactivo de la invención puede cargarse con más de uno de los compuestos bioactivos listados anteriormente, incluso perteneciendo a categorías diferentes: por ejemplo, pueden estar presentes al mismo tiempo al menos un compuesto anti-biopelículas, al menos un compuesto de control del dolor y al menos un factor del crecimiento.

65 El hidrogel bioactivo tiene una concentración con respecto al derivado de HA comprendida entre el 1 y el 35 % p/v, preferentemente entre el 2 y el 10 % p/v y una concentración con respecto a los compuestos bioactivos comprendida entre el 0,001 % y el 80 % p/v, preferentemente entre el 1 y el 10 % p/v, dependiendo del compuesto o compuestos

bioactivos específicos y del uso que se pretende; en el caso de que se carguen más compuestos bioactivos (incluso perteneciendo a clases con funciones farmacológicas o biológicas diferentes) al hidrogel, la concentración anterior dada se refiere a la suma de estos compuestos.

5 Para obtener estas concentraciones finales, un método adecuado es producir separadamente el hidrogel sin compuesto o compuestos bioactivos y mezclarlo con una o más soluciones de los últimos. Los componentes de partida del hidrogel bioactivo pueden tener concentraciones en intervalos amplios y pueden mezclarse a concentraciones diferentes, como será evidente para el experto en la materia. En los casos más comunes, el volumen del hidrogel usado es mayor que el volumen de la solución de compuesto o compuestos bioactivos; por esta razón, la concentración del hidrogel de partida tendrá una concentración del derivado de HA cercana a la concentración del mismo derivado en el hidrogel bioactivo, comprendida entre el 1 y el 35 % p/v y preferentemente el 2-10 % p/v. Por el contrario, la concentración de la solución del compuesto o compuestos bioactivos de partida puede diferir mucho de la concentración de dicho compuesto o compuestos en el hidrogel bioactivo y estos compuestos incluso pueden cargarse en el hidrogel en forma pura (es decir, una concentración del 100 %).

15 De forma adecuada, al preparar el hidrogel bioactivo, el derivado de HA y la solución de compuesto o compuestos bioactivos se mezclan en una relación en volumen comprendida entre 20:1 y 1:1, preferentemente entre 10:1 y 1,5:1. Para evitar que partes del hidrogel bioactivo no estén lo suficientemente cargadas con el fármaco, la mezcla formada por los dos componentes se homogeniza preferentemente agitando o mezclando, que puede realizarse de forma sencilla manualmente o con medios automáticos.

20 El hidrogel bioactivo de la invención puede proporcionarse de esta manera en forma de kit de piezas. El kit hace posible al cirujano decidir la carga real de compuesto o compuestos bioactivos en el hidrogel bioactivo, tanto por la naturaleza de dicho compuesto o compuestos como por su o sus concentraciones, justo antes o incluso durante de la intervención quirúrgica, permitiendo la mejor adaptación del material de inyección o el recubrimiento bioactivos sobre la prótesis, en vista de las necesidades específicas de los pacientes (por ejemplo, intolerancias conocidas a compuestos bioactivos específicos) o de la intervención específica. El kit comprende una primera composición que es el hidrogel preparado con el derivado de HA solo y agua (añadida como agua bidestilada, solución tamponada o solución fisiológica) y una o más composiciones que comprenden el compuesto o compuestos bioactivos; en el caso del uso de más de un compuesto bioactivo, estos pueden añadirse en forma de una única solución o de más soluciones (por ejemplo, una solución por compuesto bioactivo).

25 En el caso del uso de un kit, el hidrogel bioactivo se produce justo antes de su uso, mezclando en la relación deseada el hidrogel del derivado de HA con el compuesto bioactivo elegido; y, en un corto plazo después de su preparación, se inyecta en el área de la fractura ósea o la cavidad o se aplica a la superficie de una prótesis a implantarse. La inyección en las partes dañadas del hueso puede realizarse con una aguja y una jeringa, bajo guía ecográfica. La aplicación del hidrogel bioactivo sobre las prótesis puede realizarse por diversos métodos, tales como inmersión de la prótesis en el hidrogel bioactivo, pulverizado, esparcimiento, pincelado y similares.

35 Los hidrogeles bioactivos de la invención tienen una velocidad de reabsorción en el cuerpo de tal manera que la liberación de los compuestos bioactivos siempre dure al menos 6 horas después de la intervención ortopédica, que son las más críticas desde el punto de vista del ataque bacteriano y normalmente tal liberación tiene lugar continuamente durante las primeras 48-72 horas después de la cirugía, de tal manera que cubra los periodos críticos después de la intervención al menos con respecto al control de las infecciones bacterianas y del dolor postoperatorio.

40 La invención se ilustrará adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, que pretenden asistir al entendimiento de la invención.

45 En los ejemplos, se han usado los siguientes materiales y equipos:

Materiales:

55 La sal de sodio de ácido hialurónico (PM 1500 kDa) se ha proporcionado por Gelphifarma (Lodi, Italia), la prótesis usada es el modelo Recta de Adler Ortho s.r.l. (Bologna, Italia); el ácido D,L-poliláctico (PLA) (PM 8 kDa) se vende por Bidachem-Boeringher Ingelheim (Milan, Italia), con el nombre RESOMER R 202; N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-hidroxisuccinimida (NHS), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH), ácido clorhídrico, la solución salina con tampón fosfato de Dulbecco (DPBS a pH 7,4), el reactivo en la solución de o-ftaldialdehído (OPA) y N-acetilcisteína se obtuvieron de Sigma Aldrich (Milan, Italia). La resina de intercambio catiónico Dowex 50Wx8-200, la dietilamina (DEA), el dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro y el O-2-aminoetil-O'-metilpolietilenglicol 5000 (PEG-NH₂) se obtuvieron de Fluka (Milan, Italia).

Equipos:

65 Los espectros de RMN ¹H se obtuvieron con un instrumento Bruker AC-300. Los espectros de FT-IR se grabaron como discos de KBr en el intervalo de 4000-400 cm⁻¹ usando un espectrofotómetro Perkin Elmer 1720 y

transformadas de Fourier, con una resolución de 1 cm^{-1} ; cada espectro se grabó después de 100 barridos. El análisis SEC se llevó a cabo usando un sistema multidetector SEC equipado con una bomba Water 600, un medidor de índice de refracción Water 410 y una columna lineal proporcionada por Water (tamaño de partícula $5 \mu\text{m}$). La curva de calibrado se determinó usando patrones de ácido hialurónico obtenidos de Hyalose (EE.UU.). Las condiciones de elución fueron las siguientes: tampón fosfato 200 mM (pH 6,5)/MeOH 90:10 (v/v), velocidad de caudal 0,6 ml/min, a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

EJEMPLO 1

El presente ejemplo es acerca de la formación de la sal de tetrabutilamonio de HA (HA-TBA). Se disuelve 1 g de HA de un peso molecular de 1500 kDa en 100 ml de una solución de HCl que tiene pH 0,5 y se deja reaccionar a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. El producto resultante tiene un PM medio de 230 kDa, según se determina por análisis SEC. A este producto, se le añade hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH) hasta que se alcanza pH 7; la mezcla de reacción se somete después a diálisis exhaustiva.

La sal de HA-TBA resultante se recupera por secado por congelación y se caracteriza por análisis de RMN- ^1H (D_2O) que confirma que el intercambio con TBA ha tenido lugar con un rendimiento del 100 %. El espectro de RMN- ^1H (D_2O) del HA-TBA muestra señales a: δ 0,97 (m, 12 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 1,40 (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 1,64 (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 2,04 (s, 3H, $-\text{NH-CO-CH}_3$); δ 3,82 (m, 8 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$).

EJEMPLO 2

El presente ejemplo es sobre la activación de un poliéster (PLA) con NHS.

La síntesis se lleva a cabo siguiendo la ruta de síntesis del derivado de ácido poliláctico-co-glucólico (PLGA) descrito en el artículo "Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles", Yoo H. S. et al, Journal of Controlled Release, (2004) 96: 273-283.

Se disuelven 2,4 g de PLA de PM medio de 8 kDa en 30 ml de diclorometano. A esta solución se añaden primero 0,25 g del agente condensador diciohexilcarbodiimida (DCC) y después 0,14 g de NHS, permitiendo que la reacción tenga lugar a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de este periodo, la mezcla de reacción se concentra por evaporación parcial del diclorometano y el producto se precipita en etanol y se lava repetidamente en el mismo disolvente. El sólido obtenido se filtra después y se seca al vacío. Se obtiene un sólido cristalino blanco, con un rendimiento que excede el 80 % en peso en la cantidad de PLA de partida. El espectro de RMN- ^1H confirma que la activación del grupo carboxilo PLA con N-hidrosuccinimida ha tenido lugar. El rendimiento de la derivatización, expresado como la relación de moles unidos de NHS a moles de una única cadena de PLA, es el 90 %.

El espectro de RMN- ^1H del producto PLA-NHS (CDCl_3) muestra señales a: δ 1,5 y δ 1,6 (d, 3H, $-\text{O-COCH}(\text{CH}_3)\text{-OH}$); δ 3,3 (m, 3H, $\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}$), δ 2,80 (m, 4H, $-\text{OC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$); δ 4,3 y δ 5,2 (m, 1 H, $-\text{O-COCH}(\text{CH}_3)\text{-OH}$; m, 1 H, $-\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}$).

EJEMPLO 3

El presente ejemplo es sobre la síntesis de un derivado de HA-PLA.

El HA-TBA preparado como se describe en el Ejemplo 1 y el PLA-NHS preparado como se describe en el Ejemplo 2 se hacen reaccionar en tres relaciones diferentes, para obtener productos de diferente grado de derivatización de PLA. Se obtienen tres soluciones de HA-TBA de la misma concentración disolviendo para cada solución 600 mg de HA-TBA en 48 ml de DMSO anhidro en presencia de 576 μl del catalizador dietilamina (DEA). Aparte, se preparan tres soluciones de diferente concentración de PLA-NHS disolviendo, respectivamente, 1,5, 3,6 y 7,2 g de PLA-NHS en 6 ml de DMSO anhidro. Las tres soluciones de PLA-NHS se añaden gota a gota durante un periodo de una hora a las soluciones de HA-TBA; la relación nominal de moles de PLA-NHS a moles de unidades de N-acetil-D-glucosamina del HA en las tres mezclas de reacción es 0,2, 0,5 y 1,0, respectivamente. Los tres diferentes derivados se denominan a continuación HA-PLA_(A), HA-PLA_(B) y HA-PLA_(C).

Después de 24 horas en una atmósfera de argón anhidro a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, cada mezcla de reacción se pasa a través de una resina de intercambio de sodio Dowex para intercambiar el TBA por Na^+ . El eluato se coloca después en diálisis frente a agua destilada para eliminar el DMSO, después se congela y se seca por secado por congelación. El sólido se lava repetidamente en acetona y se seca otra vez.

El espectro FT-IR de los derivados de HA-PLA obtenidos muestra una banda a 3540 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{OH} + \nu_{\text{as}} \text{NH}$ de HA), bandas a 1757 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{COO}$ de PLA), 1623 cm^{-1} (amida I de HA), 1456 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ de PLA), 1382 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_3$ de PLA), 1189 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{C-O-C}$ de los grupos éster de PLA), 1089 cm^{-1} y 1048 cm^{-1} ($\nu \text{C-O}$ alcohólico y etérico de HA).

El espectro de RMN¹H de los derivados de HA_{LMW}-PLA obtenidos (DMSO-d₆/D₂O 90:10) muestra: δ 1,25 y δ 1,45 (2d, -O-CO-CH(CH₃)-O- de PLA); δ 1,85 (s, 3H, -NH-CO-CH₃ de HA) δ 5,1 ppm (m, -O-CO-CH(CH₃)- de PLA).

5 El grado de derivatización (DD, %) en el PLA de los derivados de PLA se calcula evaluando el número de cadenas de PLA a partir de las integrales de los dos picos con respecto a los protones a δ 1,25 y δ 1,45 (atribuibles a los grupos metilo de la cadena de PLA) y el número de N-acetil-D-glucosamina presente en el HA a partir de la integral con respecto a los protones a δ 1,85 atribuible al grupo -NHCOCH₃ y después aplicando la fórmula:

$$DD = (N.^{\circ} \text{ de moles de PLA} / N.^{\circ} \text{ de moles de unidades de glucosamina}) \times 100,$$

10 Los resultados del grado de derivatización para las tres mezclas de reacción diferentes son como se da en la Tabla 1:

Tabla 1

Muestra	DD (%) en el PLA
HA-PLA _(A)	2,7
HA-PLA _(B)	3,5
HA-PLA _(C)	7

15 EJEMPLO 4

El presente ejemplo es sobre la síntesis de un derivado de PEG-HA-PLA.

20 Se repite la preparación de derivados de HA-PLA descrita en el Ejemplo 3, con las diferencias de que en este caso se usan tres soluciones obtenidas disolviendo en 6 ml de DMSO, respectivamente, 5,2, 7,2 y 14,0 g de PLA-NHS (que corresponden a las relaciones nominales de moles de PLA-NHS a moles de unidades de N-acetil-D-glucosamina del HA de 0,7, 1,0 y 2,0, respectivamente) y que no se lleva a cabo intercambio de iones TBA al final de la reacción. El producto sólido se recupera por filtración y se lava repetidamente en acetona y el producto se seca al vacío.

25 Se disuelven 300 mg de cada producto de HA-PLA preparado usando 5,2, 7,2 y 14,0 g de PLA-NHS en 24 ml de DMSO anhidro en argón, obteniendo tres soluciones. Aparte se preparan tres soluciones de diferente concentración de PEG-NH₂, obtenidas disolviendo en 6 ml de DMSO anhidro, respectivamente, 0,42, 0,43 y 0,84 g de PEG-NH₂ de peso molecular medio de 5000 Da. A cada una de las tres soluciones se añade una solución gota a gota. Las tres soluciones de PEG-NH₂ se añaden gota a gota a las soluciones de HA-PLA, con la condición de que las soluciones de PEG-NH₂ de mayor concentración se añaden a las soluciones de productos de HA-PLA obtenidas con la mayor cantidad de PLA-NHS. La reacción se lleva a cabo en presencia de activadores DCC y NHS añadidos en cantidades equimolares al PEG-NH₂ usado. Después de 24 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lleva a 5 °C durante 10 min para facilitar la precipitación de la dicitohexilurea (DCU) formada, que se retira después de la mezcla de reacción por filtración. Posteriormente, la mezcla de reacción filtrada se eluye en una resina de sodio Dowex 50W x 8-200 para retirar el TBA y el eluato se dializa de nuevo contra agua usando una membrana de diálisis Spectra/por Tubing con un corte de 3,5 kDa, para retirar completamente el DMSO. El producto recuperado después de secar por congelación se disuelve en agua y se eluye en una resina ácida Dowex 50W x 8-200; el eluato se purifica finalmente por diálisis contra soluciones de NaCl concentrado (5 % p/v) durante tres días y contra agua bidestilada durante los dos últimos días, usando una membrana de diálisis Spectra/por Tubing de 12000/14000 Da. La solución se seca finalmente por secado por congelación y el derivado de PEG-HA-PLA obtenido muestra los siguientes datos en el análisis de RMN-¹H [THF-d₈/D₂O 1/1]: δ 1,4 y 1,6 [2d, 3H, -O-CO-CH(CH₃)-O de PLA], δ 2,1 (s, 3H, -NH-CO-CH₃ de HA), δ 4,0 (m, 4H, -CH₂-CH₂- de PEG), δ 5,40 [m, 1 H, -O-COCH(CH₃)- de PLA].

45 Los tres derivados diferentes obtenidos se denominan en lo sucesivo PEG-HA-PLA_(D), PEG-HA-PLA_(E) y PEG-HA-PLA_(F). El grado de derivatización (DD, %) en el PEG de los derivados de PEG-HA-PLA se obtiene comparando las integrales de los dos picos con respecto a los protones atribuibles a la porción -CH₂-CH₂- del PEG-NH₂ (δ 4,0) con la integral con respecto a los protones (δ 2,1) atribuibles al grupo -NHCOCH₃ que pertenece a los restos de N-acetilglucosamina del HA y después aplicando la fórmula:

$$DD = (N.^{\circ} \text{ de moles de PEG} / N.^{\circ} \text{ de moles de unidades de glucosamina}) \times 100.$$

Los resultados del grado de derivatización para las tres mezclas de reacción diferentes son como se da en la Tabla 2:

55

Tabla 1

Muestra	DD (%) en el PLA	DD (%) en el PEG
PEG-HA-PLA _(D)	5	9
PEG-HA-PLA _(E)	7,2	9
PEG-HA-PLA _(F)	13,9	17,9

EJEMPLO 5

El presente ejemplo es sobre la implantación de unan prótesis de titanio recubierta con un hidrogel de la invención.

5 Se obtiene un fémur humano liofilizado a partir de un banco óseo y su cabeza se elimina, como se conoce comúnmente en la cirugía de reemplazamiento total de cadera. Se prepara un asiento para la prótesis en el eje del fémur de una forma que es muy conocida por los expertos en estas aplicaciones de cirugía. Un asiento para la prótesis se obtiene en la diáfisis del hueso de una forma que es muy conocida por los expertos en la materia. El eje del fémur se abre longitudinalmente cortando a lo largo de un plano esencialmente paralelo a este eje, en una longitud ligeramente mayor que la longitud de la prótesis y después cortando perpendicularmente a dicho eje, de tal manera que se retire uno de los dos "dientes" largos producidos por el primer corte. De esta manera, el canal medular se expone en las partes en las que la prótesis se acomodará después, tanto en la parte que se mantiene conectada al cuerpo principal del fémur tanto como en el "diente" separado. Después estos se reúnen y se mantienen juntos firmemente por medio de elementos de fijación de metal y de plástico. Aparte, se prepara la prótesis. La prótesis usada es el modelo Recta de Adler Ortho s.r.l. de Bologna, Italia. Antes de la inserción en el asiento obtenido en el fémur, la superficie exterior de la superficie (aparte de la parte superficie superior, para conectarse con un cuello modular de la misma compañía en la cirugía actual) se recubre por pincelado manual con un hidrogel preparado con un derivado de HA producido según se describe en el Ejemplo 3. La preparación del hidrogel bioactivo es brevemente como sigue: a 3 ml de hidrogel, preparado al 10 % p/v HA-PLA (DD = 7 %) en agua para inyectables, se añaden 2 ml de una solución de N-acetilcisteína en agua inyectable y se mezclan durante 60 segundos, para obtener un hidrogel que tiene un 6 % de carga de HA y un 4 % de carga de N-acetilcisteína. El hidrogel se carga con 0,5 % de azul metileno, para hacer la presencia y la distribución del hidrogel más visible en posteriores inspecciones tanto en la prótesis como en el asiento en el fémur. La prótesis se inserta después por ajuste de presión en el asiento previamente obtenido en el fémur. Después de 3 minutos, se retiran los elementos de fijación, el fémur se abre y se inspecciona visualmente la distribución del hidrogel en la superficie internas de la cavidad medular ósea y sobre las superficies de la prótesis.

Como resultado de la inspección visual, al final del procedimiento el hidrogel se adhiere de forma ajustada a la superficie de la prótesis, así como se distribuye uniformemente dentro del asiento de la prótesis en el hueso. Este resultado confirma que el hidrogel de la invención tiene propiedades reológicas adecuadas para usar como recubrimientos de implantes, en que no se retira de la superficie de la prótesis a pesar de la fuerza de cizalla fuerte que experimenta la prótesis durante la inserción en su asiento de implante. Esto proporciona la presencia de una fuente de agentes en el sitio del implante durante un periodo suficiente para evitar el establecimiento de una colonia bacteriana.

EJEMPLO 6

El presente ejemplo es sobre el uso de un hidrogel de la invención en la cirugía cosmética.

40 Se prepara un producto siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3, con referencia particular al derivado llamado HA-PLA_(A). Se hidratan 0,150 g del derivado HA-PLA_(A) con 5 ml de solución fisiológica estéril, obteniendo un hidrogel de concentración del 3 % p/v. Tras completarse la hidratación, el producto hidratado se distribuye en cinco jeringas de vidrio de 1 ml proporcionadas con ajuste Luer-lock, para permitir la inserción de una aguja de 29 o 30 G antes de usar. Las jeringas rellenas con el producto hidratado se esterilizan con vapor. El producto obtenido de esta manera puede usarse como relleno bio-revitalizante o reabsorbible.

EJEMPLO 7

50 El presente ejemplo es sobre el uso de un hidrogel de la invención en la cirugía maxilofacial. Se prepara un hidrogel siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3, con referencia particular al derivado llamado HA-PLA_(B). Se hidratan 0,300 g del derivado HA-PLA_(B) con 5 ml de agua para preparaciones inyectables, obteniendo un hidrogel de concentración del 6 % p/v. El producto hidratado se distribuye en cinco jeringas de vidrio de 1 ml proporcionadas con ajuste Luer-lock, para permitir la inserción de una cánula antes de usar. Las jeringas rellenas con el producto hidratado se esterilizan con vapor.

EJEMPLO 8

60 El presente ejemplo es sobre el uso de un hidrogel de la invención en cirugía abdominal. Como se indica anteriormente, un hidrogel para usar en este tipo de cirugía debe tener una viscosidad mayor para llevar a cabo eficazmente una acción de anti-adhesión.

65 Se prepara un hidrogel siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3, con referencia particular al derivado llamado HA-PLA_(C). Se hidratan 0,500 g del derivado HA-PLA_(C) con 5 ml de agua para preparaciones inyectables, obteniendo un hidrogel de concentración del 10 % p/v. El producto hidratado se distribuye en cinco jeringas de vidrio de 1 ml proporcionadas con ajuste Luer-lock, para permitir la inserción de una cánula antes de usar. Las jeringas rellenas con el producto hidratado se esterilizan con vapor.

EJEMPLO 9

El presente ejemplo es sobre el uso de un hidrogel de la invención en cirugía general.

- 5 Se prepara un hidrogel siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3, con referencia particular al derivado llamado HA-PLA_(B). Se hidratan 0,400 g del derivado HA-PLA_(B) con 5 ml de solución fisiológica estéril, obteniendo un hidrogel de concentración del 8 % p/v. El producto hidratado se distribuye en cinco jeringas de vidrio de 1 ml proporcionadas con ajuste Luer-lock, para permitir la inserción de una cánula antes de usar. Las jeringas rellenas con el producto hidratado se esterilizan con vapor.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición que consiste en un hidrogel y al menos un compuesto bioactivo, en la que:

5 - dicho hidrogel comprende agua y un derivado de ácido hialurónico, en el que el derivado de ácido hialurónico comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, de peso molecular comprendido entre 50.000 y 3.500.000 Da y cadenas de un poliéster biodegradable y biocompatible de peso molecular comprendido entre 3.000 y 900.000 Da injertados en los restos de N-acetil-D-glucosamina solamente de dicho ácido hialurónico o sal del mismo, en una cantidad tal que el derivado comprende entre 1 y 50 de dichas cadenas de poliéster por 100 unidades de repetición de ácido D-glucurónico/N-acetil-D-glucosamina del ácido hialurónico; y la concentración de dicho derivado de ácido hialurónico o sal del mismo está comprendida entre el 1 y el 35 % p/v;

y

15 - dicho compuesto bioactivo se selecciona entre: compuestos capaces de afectar a la estabilidad de las bacterias protectoras de la biopelícula, elegidos entre cisteína y sus derivados y D-aminoácidos; AINE; anestésicos para uso local; opioides y tramadol; y factores de crecimiento.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho poliéster se selecciona entre ácido poliláctico de peso molecular en el intervalo entre 3.000 y 150.000 Da, ácido poli-glucólico de peso molecular en el intervalo de 3.000 y 900.000 Da, poli-caprolactona de peso molecular en el intervalo entre 3.000 y 900.000 Da, mezclas y copolímeros de los mismos.

3. Un método para la preparación de la composición 1, caracterizado por que dicha composición se produce mezclando en la relación deseada dicho hidrogel con el compuesto o compuestos bioactivos elegidos, y dicha mezcla tiene lugar a corto plazo antes de la inyección de la composición en el área de una fractura o una cavidad ósea o antes de la aplicación de la composición a la superficie de una prótesis que va a implantarse.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en cirugía cosmética, en la que dicho hidrogel tiene una viscosidad comprendida entre 5 y 20 Pa·s.

30 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en cirugía maxilofacial, en la que dicho hidrogel tiene una viscosidad comprendida entre 50 y 100 Pa·s.

35 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en cirugía abdominal, en la que dicho hidrogel tiene una viscosidad comprendida entre 150 y 450 Pa·s.

7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en cirugía general y ginecológica, en la que dicho hidrogel tiene una viscosidad comprendida entre 60 y 140 Pa·s.

40 8. Un kit para su uso en el método de la reivindicación 3, que comprende al menos dos componentes, siendo el primero un hidrogel formado por el derivado de HA y agua que tiene una concentración del derivado de HA comprendida entre el 1 y el 35 % p/v, siendo el segundo o los adicionales una o más composiciones que comprenden uno o más compuestos bioactivos.

45 9. Una prótesis para implante en el cuerpo de un ser humano o animal recubierta con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.