

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 211**

51 Int. Cl.:

C08F 290/06 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61L 27/16 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/EP2012/054178**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120139**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12707631 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2683753**

54 Título: **Polímero biorreabsorbible implantable cargado con macromoléculas frágiles**

30 Prioridad:

09.03.2011 EP 11305253
09.03.2011 US 201161450733 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2017

73 Titular/es:

OCCLUGEL (25.0%)
12 Rue Charles de Gaulle
78350 Jouy en Josas, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(25.0%) y
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (25.0%)

72 Inventor/es:

MOINE, LAURENCE;
LAURENT, ALEXANDRE;
WASSEF, MICHEL;
BEDOUET, LAURENT;
LOUGUET, STÉPHANIE;
VERRET, VALENTIN y
SERVAIS, EMELINE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 601 211 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

Polímero biorreabsorbible implantable cargado con macromoléculas frágiles.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polímeros reticulados reabsorbibles y que pueden hincharse susceptibles de implantarse en un individuo y de administrar macromoléculas al individuo con liberación controlada.

10 Antecedentes de la técnica

Existe la necesidad, en el campo de la implantación de materiales biológicos, de partículas reabsorbibles y que pueden hincharse cargadas con fármacos bioactivos frágiles tales como macromoléculas. Sin embargo, hasta el momento sólo se han ideado disoluciones incompletas.

15 Las macromoléculas son nuevos tipos de moléculas que presentan utilidades terapéuticas particularmente interesantes. En especial, las actividades biológicas especializadas de estos tipos de fármacos proporcionan tremendas ventajas con respecto a otros tipos de compuestos farmacéuticos. Los ejemplos de macromoléculas son proteínas y ácidos nucleicos.

20 En la actualidad se comercializan más de 130 proteínas (Leader, 21-39,2008, Nature Reviews). Cada vez están utilizándose más fármacos de proteínas en ensayos clínicos debido a los avances en biotecnología que permiten la producción en masa de proteínas recombinantes. Se utilizan para tratar pacientes que padecen numerosas enfermedades: cáncer (tratamiento con anticuerpos monoclonales e interferones), enfermedad cardiovascular, fibrosis quística, enfermedad de Gaucher (tratamiento con enzimas y proteínas de la sangre), diabetes (insulina), anemia (eritropoyetina), defectos óseos (proteínas morfogenéticas óseas) y hemofilia (factores de coagulación).

30 Los ácidos nucleicos también son macromoléculas con aplicaciones médicas. Estos agentes terapéuticos incluyen plásmidos que contienen transgenes, oligonucleótidos, aptámeros, ribozimas, ADNzimas y ARN de interferencia pequeños. Estos fármacos pueden utilizarse para mitigar enfermedades o bien profilácticamente o bien en un estadio muy temprano, impidiendo la progresión de la enfermedad y sus complicaciones

35 Este tipo de moléculas es muy frágil y debe evitarse el contacto con disolventes orgánicos, la utilización de alta temperatura, tensión de corte o entorno ácido. Por tanto, la administración de macromoléculas en el organismo constituye un reto.

40 De hecho, debido a su naturaleza, las macromoléculas no pueden administrarse por vía oral. Estos productos tienden a degradarse rápidamente el tracto gastrointestinal, en particular debido al entorno ácido y a la presencia de enzimas en el mismo. Además, macromoléculas presentan vidas cortas *in vivo*.

Además, en mayor medida, las macromoléculas no pueden atravesar las barreras endoteliales, epiteliales e intestinales, debido a su tamaño y, generalmente, a su carácter polar.

45 Por estos motivos, las macromoléculas tienen que llevarse al sistema por vía parenteral, es decir mediante inyección. Sin embargo, el perfil farmacocinético de estos productos es de manera que la inyección del producto requiere una administración frecuente. En ocasiones se requieren incluso múltiples inyecciones diarias o infusiones continuas para que el fármaco de proteínas presente un efecto terapéutico deseado. Resultará evidente que esto es incómodo para los pacientes que requieren estos fármacos. Además, este tipo de aplicación a menudo requiere hospitalización y/o supervisión médica y presenta inconvenientes logísticos.

50 Además, parece que al menos para determinadas clases de macromoléculas farmacéuticas, tales como citocinas que se utilizan actualmente por ejemplo en tratamientos contra el cáncer, la eficacia terapéutica es fuertemente dependiente de la administración eficaz en el sitio en que se necesita. En tales casos, las macromoléculas deben dirigirse a los sitios en los que se necesita su actividad durante un periodo de tiempo prolongado.

55 Por tanto, existe la necesidad de sistemas de administración que presenten la capacidad de liberación controlada. En la técnica, se han propuesto sistemas de administración que consisten en redes poliméricas en las que se cargan las macromoléculas tales como proteínas y de las que se liberan gradualmente.

60 La administración local de macromoléculas constituye un reto. El principal inconveniente de este enfoque es la necesidad de una etapa de solubilización de polímero utilizando un disolvente, tal como cloruro de metileno o isopropanol, alta temperatura, espumación, que pueden poner en peligro la estabilidad de las macromoléculas. La administración local de ácido nucleico en micropartículas presenta varias limitaciones, similares a las de proteínas. Estos problemas incluyen daño al ADN durante la microencapsulación, baja eficacia de encapsulación y liberación inicial mínima del compuesto atrapado (O'Hagan, 10-19, 2006, Methods).

65

Una de las diferencias más importantes que afectan a la eficacia biológica y de administración de las macromoléculas, en particular de las proteínas, es la complejidad de la estructura de las proteínas, la estrecha relación entre la eficacia de las proteínas y la estructura molecular tridimensional. Resulta esencial mantener la integridad estructural a través de todas las etapas de formulación del sistema de administración local. El método de encapsulación de proteínas en un sistema de administración es una etapa crítica que puede conducir a la inactivación de las proteínas (Sinha y Trehan, 261-280, 2003, Journal of Controlled Release). Los métodos utilizados más comúnmente para la encapsulación de fármacos de proteínas en micropartículas poliméricas incluyen evaporación o extracción con disolvente a partir de una dispersión de tipo W1/O/W2, coacervación y secado por pulverización (Dai, 117-120, 2005, Colloids and Surface B, Freitas, 313-332, 2005, Journal of Controlled Release; Sinha y Trehan, 261-280, 2003, Journal of Controlled Release; Tamber, 357-376, 2005, Advanced Drug Delivery Reviews). Se asocian muchas desventajas con estos métodos que podrían producir la desnaturalización y la inestabilidad de las proteínas durante el procedimiento de encapsulación y liberación. El método de emulsión doble presenta las limitaciones de exposición a disolventes orgánicos, alta tensión de corte y superficies de contacto orgánicas acuosas. El secado por pulverización funciona a temperatura elevada y no es aconsejable utilizarlo para compuestos sensibles a alta temperatura tales como proteínas y ácidos nucleicos terapéuticos.

Brevemente, las proteínas presentan cuatro niveles de organización estructural: la estructura primaria de la cadena lineal de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica, la estructura secundaria formada por el plegamiento local de los aminoácidos en una región de la cadena polipeptídica en hélices o láminas, la estructura terciaria compuesta por una disposición estable en el espacio de las hélices y las láminas. La estructura cuaternaria es una disposición de subunidades de estas proteínas, consistiendo la activa en varias subunidades, tales como hemoglobina o anticuerpos (ensamblaje de cuatro cadenas proteicas mediante puentes disulfuro establecidos entre 2 cisteínas). La estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas depende de uniones débiles (de hidrógeno, hidrófobos, iónicos) establecidos entre residuos de aminoácido de cadenas polipeptídicas. Estas uniones no covalentes son frágiles y pueden romperse en determinadas condiciones conduciendo al desplegamiento de la proteína. La función biológica de una proteína depende de su estructura, no pudiendo realizar su función una proteína desnaturalizada. Los principales factores que producen desnaturalización de proteínas son el calor que rompe las uniones de hidrógeno débiles, el pH (demasiado ácido o demasiado alcalino) y la fuerza iónica. También se produce desplegamiento de una proteína en presencia de disolventes orgánicos, donde las regiones hidrófobas de las proteínas plegadas se giran hacia fuera mientras que las regiones hidrófilas se reunirán en el centro de la molécula. Durante la preparación de microesferas, las proteínas pueden exponerse tanto a alta temperatura como a disolventes orgánicos tales como diclorometano (disolvente de PLGA) y pueden desnaturalizarse (Raghuvanshi, 269-276, 1998, Pharm Dev Technol).

Con mayor detalle, en la actualidad, pueden distinguirse dos tipos principales de sistemas de administración poliméricos: polímeros biodegradables e hidrogeles no biodegradables.

Los polímeros biodegradables, por ejemplo poli(ácido láctico) (PLA) y copolímeros de PLA con ácido glicólico (PLGA), se utilizan frecuentemente como sistemas de administración para macromoléculas tales como proteínas.

Pueden incorporarse macromoléculas en sistemas de administración farmacéuticos, por ejemplo microesferas, mediante una variedad de procedimientos. *In vitro* e *in vivo*, habitualmente se observa un perfil de liberación bifásico: una ráfaga inicial seguida por una liberación más gradual. La ráfaga se produce por las macromoléculas presentes en o cerca de la superficie de las microesferas y por las macromoléculas presentes en los poros. La liberación gradual se atribuye a una combinación de difusión de las macromoléculas a través de la matriz y degradación de la matriz. Especialmente para las macromoléculas más grandes, la difusión en estas matrices es insignificante, de modo que la liberación depende de la degradación del polímero. La degradación puede resultar influida por la composición del (co)polímero. Una estrategia bien conocida para aumentar la velocidad de degradación de PLA es la copolimerización con ácido glicólico.

Aunque los sistemas de administración basados en polímeros biodegradables son interesantes, resulta muy difícil controlar la liberación de la macromolécula incorporada. Esto dificulta la aplicabilidad de estos sistemas, especialmente para macromoléculas con una estrecha ventana terapéutica, tales como citocinas y hormonas. Además, han de utilizarse disolventes orgánicos para la encapsulación de las macromoléculas en estos sistemas poliméricos. La exposición de las macromoléculas a disolventes orgánicos generalmente conduce a desnaturalización, lo que afectará a la actividad biológica de las macromoléculas. Además, los requisitos muy estrictos de las autoridades de registro con respecto a posibles trazas de sustancias perjudiciales puede prohibir la utilización de tales formulaciones de fármacos terapéuticos en pacientes humanos.

Además, la hidrólisis de PLGA en el núcleo de las microesferas produce acidificación local. Se midió el pH utilizando sondas orgánicas sensibles al pH y se obtuvieron valores de entre 1,5 – 3 (Fu, 100-106, 2000, Pharmaceutical Research; Li y Schwendeman, 163-173, 2005, Journal of Controlled Release). La disminución del pH dentro de la matriz de polímero de las microesferas puede inducir diferentes alteraciones de proteínas encapsuladas en la matriz de PLGA. Las reacciones adversas más documentadas que afectan a las proteínas encapsuladas son desamidación, acilación e hidrólisis del enlace peptídico (Murty, 50-61, 2005, International Journal of Pharmaceutics; Abbas Ibrahim, 241-252, 2005, Journal of Controlled Release, Houchin y Topp, 2395-2404, 2008, Journal of Pharmaceutical Sciences). La desamidación de proteínas es una reacción catalizada por ácido en la que los

aminoácidos asparagina y glutamina se degradan para dar ácido aspártico y ácido glutámico. Se observó una desamidación significativa para insulina encapsulada (Uchida, 234-236, 1996, Chem Pharm Bull, Shao y Bailey, 623-632, 1999, Pharm Dev Technol). La acilación es otra alteración de las proteínas atrapadas dentro de microesferas de PLGA. Durante la reabsorción de microesferas, las proteínas pueden acilarse con aductos de ácido glicólico o ácido láctico. Esta reacción secundaria se observó *in vivo* para el péptido octreotida implantado por vía subcutánea en micropartículas de PLGA (Murty, 50-61, 2005, International Journal of Pharmaceutics) e *in vitro* para calcitonina de salmón (Lucke, 175 - 181, 2002, Pharmaceutical Research). Se produce acilación en varios aminoácidos: amina libre del aminoácido N-terminal de la proteína, lisina, tirosina o serina ubicada a lo largo de la cadena peptídica. La acidez local dentro de las microesferas puede producir hidrólisis de la cadena peptídica, particularmente a nivel del ácido aspártico, la unión Asp-Pro se considera frágil. Durante un experimento de liberación *in vitro*, se liberó más del 50% de anhidrasa carbónica tras una semana de microesferas de PLGA (1-3 micrómetros) correspondiente a fragmentos (Sandor, 63-74, 2002, Biochimica y Biophysica Acta).

Las microesferas de PLGA cargadas se cargan por sí mismas sobre un hidrogel de alginato para controlar la liberación durante periodos de tiempo prolongados (Lee, Journal of Controlled Release 137, 196-202, 2009). El compuesto bioactivo todavía se incorpora en la microesfera de PLGA lo que puede desnaturalizar su estructura durante la degradación.

Los hidrogeles también se utilizan frecuentemente como sistemas de administración para proteínas y péptidos. Los hidrogeles pueden obtenerse reticulando un polímero soluble en agua produciendo una red tridimensional que puede contener grandes cantidades de agua. Pueden cargarse proteínas en el gel añadiendo la proteína al polímero antes de que se lleve a cabo la reacción de reticulación o sumergiendo un hidrogel preformado en una disolución de proteínas. Por tanto, no tienen que utilizarse disolventes orgánicos (agresivos) para cargar los hidrogeles con moléculas de proteínas.

A diferencia de los polímeros biodegradables, la liberación de proteínas de hidrogeles puede controlarse y manipularse fácilmente variando las características del hidrogel, tales como el contenido en agua y la densidad de reticulación del gel. Sin embargo, una desventaja principal de los sistemas de administración de hidrogel utilizados actualmente es que no son biodegradables. Esto necesita extracción quirúrgica del gel del paciente tras la liberación de la proteína con el fin de impedir complicaciones de inclusión del material de hidrogel vacío (con frecuencia se forma tejido herido).

Se han utilizado hidrogeles biodegradables en la preparación de sistemas de administración para fármacos de proteínas. Uno de estos sistemas comprende dextranos reticulados obtenidos acoplando metacrilato de glicidilo (GMA) a dextrano, seguido por la polimerización por radicales de una disolución acuosa de dextrano derivatizado con GMA (dex-GMA) (Hennink, Pharmaceutical Research, vol 15, nº.4, 1998). Pero el tamaño de las microesferas obtenidas es bastante pequeño (aproximadamente 100 µm).

Pueden encapsularse proteínas en los hidrogeles añadiendo proteínas a una disolución de dextrano derivatizado con GMA antes de la reacción de reticulación. Parece que la liberación de las proteínas de estos hidrogeles depende de y puede controlarse por el grado de reticulación y el contenido en agua del gel (Hennink et al., J. Contr. Rel. 39, (1996), 47-57).

Aunque se esperaba que los hidrogeles de dextrano reticulados descritos fueran biodegradables, estos hidrogeles son bastante estables en condiciones fisiológicas.

Para resolver este problema, el documento US2008/131512 propone añadir un polímero reabsorbible sintético (PLA o PGA) entre el dextrano y el doble enlace metacrílico para facilitar la degradación de la red por hidrólisis. Sin embargo, debido a su naturaleza química, el dextrano es bastante difícil de modificar con el fin de introducir grupos funcionales específicos en la estructura. Estos grupos funcionales pueden ayudar a favorecer la incorporación de las macromoléculas y/o a controlar la liberación.

Pueden obtenerse microesferas con polímero natural (gelatina o colágeno). Sin embargo, la liberación es rápida (en una semana tras la implantación en la cavidad articular de conejos) (Inoue, 264-270, 2006, Arthritis & Rheumatism) y excluyendo su utilización para la administración de fármacos controlada y a largo plazo. También debe señalarse que el colágeno es de origen bovino y se observan reacciones alérgicas a las proteínas bovinas en aproximadamente el 2% de los pacientes.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es resolver los problemas anteriores, en particular para evitar la inestabilidad de la macromolécula, tal como proteína, durante la preparación de las microesferas, las interacciones no específicas con los polímeros, la acidez local dentro de la matriz de polímero en degradación y para obtener una previsibilidad y un control mejores de la liberación de la microesfera con un efecto de ráfaga limitado.

Sumario de la invención

La presente invención surge del hallazgo inesperado de los inventores de que la presencia de (met)acrilatos neutros

en un polímero reticulado mediante copolímeros de bloque basados en PLGA, PEG y/o PLA biorreabsorbibles puede influir en la velocidad de degradación de un polímero de este tipo mientras que también permite controlar el hinchamiento del polímero. Además, este tipo de polímero es particularmente adecuado para administrar a su sitio de acción en el organismo. De hecho, es posible utilizar un procedimiento para cargar el polímero con las macromoléculas que preserva la frágil conformación y por tanto la actividad de las macromoléculas. Además, cuando el polímero se proporciona como una partícula esférica, puede mantenerse la esfericidad incluso con hinchamiento. Este tipo de polímero se describe en la solicitud de patente n.º PCT/EP 2010/063227. Resulta particularmente interesante puesto que proporciona una liberación controlada de las macromoléculas cargadas. Al contrario del dispositivo de PLGA puro, la red de polímero según la presente invención no sólo está compuesta por PLGA sino que también posee PEG y cadenas de metacrilato. Durante la degradación de la red, se diluirán los productos de degradación ácida de PLGA dentro del hidrogel y pueden difundir fuera de la estructura.

Además, el solicitante también demostró que en experimentos con animales realizados en articulaciones de hombro de ovejas, a diferencia de las microesferas de la técnica anterior, las microesferas basadas en el polímero de la invención se incorporaron rápidamente en el tejido sinovial y que su tiempo de residencia en la membrana sinovial fue al menos de varias semanas (1 mes), lo que hace que las microesferas de la invención sean adecuadas para administrar fármacos en la membrana sinovial durante varias semanas o meses.

La presente invención se refiere por tanto a un polímero reticulado biorreabsorbible cargado con macromoléculas. El polímero es el descrito en la solicitud de patente n.º PCT/EP 2010/063227.

Por tanto, este polímero puede obtenerse a partir de la polimerización de:

(i) al menos un monómero de fórmula (I)



en la que:

- K representa O-Z o NH-Z, representando Z $(\text{CR}_2\text{R}_3)_m\text{-CH}_3$, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-H}$, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-CH}_3$, $(\text{CH}_2)_m\text{-NR}_4\text{R}_5$ representando m un número entero desde 1 hasta 30;
- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan independientemente H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$; y

(ii) al menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible.

Ventajosamente según la invención, el polímero definido anteriormente puede obtenerse a partir de la polimerización del al menos un monómero de fórmula (I), dicho por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible, y (iii) adicionalmente al menos un agente de transferencia de cadena.

A menudo, las especies activas utilizadas para iniciar la polimerización son altamente reactivas y pueden conducir en algunos casos a reacciones secundarias indeseables tales como transferencia de cadena. Esto puede conducir a la producción de ramificaciones cortas o largas o incluso lo que es más problemático, a la formación de reticulación no reabsorbible (Scorah 2006, Polim. Bull. 57, 157-167). Estos cambios estructurales pueden tener efectos adversos sobre la biocompatibilidad del material. Para evitar estas reacciones secundarias, pueden añadirse niveles apropiados de agentes de transferencia de cadena a la disolución de monómero sin afectar a la formación de red. Estas moléculas con alta reactividad de transferencia, también denominadas "moléculas reguladoras", son muy eficaces incluso a concentraciones pequeñas. Además, la utilización de al menos un agente de transferencia es una forma adicional de reducir / controlar el peso molecular del residuo de cadena polimérica (Loubat 2001, Polim. Int. 50, 375-380; Odian, G. "Principles of polymerization" 3ª ed., J. Wiley, New York 1991).

Ventajosamente, dicho por lo menos un agente de transferencia de cadena se selecciona del grupo que consiste en complejos, sales de metales de transición, haluros de alquilo o tioles monofuncionales o polifuncionales y otros compuestos que se sabe que son activos en procedimientos de transferencia de cadena por radicales libres tales como 2,4-difenil-4-metil-1-penteno.

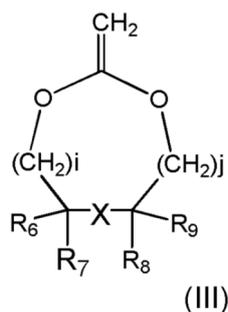
De manera particularmente ventajosa, dicho por lo menos un agente de transferencia de cadena es un tiol cicloalifático o preferentemente alifático, que presenta normalmente desde 2 hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, y que presenta o no un grupo funcional adicional seleccionado de amino, hidroxilo y carboxilo.

Los ejemplos de agentes de transferencia de cadena particularmente preferidos son ácido tioglicólico, 2-mercaptobutanol, dodecanotiol y hexanotiol.

Según la invención, dicho por lo menos un agente de transferencia de cadena puede estar presente en la mezcla de reacción en una cantidad de, por ejemplo, desde el 0,1 hasta el 10%, preferentemente desde el 1 hasta el 4 %, y en particular desde el 1,5 hasta el 3,5 % en moles, en relación con el número de moles de monómeros

monofuncionales.

5 Ventajosamente según la invención, el polímero definido anteriormente puede obtenerse a partir de la polimerización del al menos un monómero de fórmula (I), dicho por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible, (iii) opcionalmente al menos un agente de transferencia de cadena tal como se definió anteriormente, y (iv) adicionalmente al menos un monómero cíclico que presenta un grupo exo-metileno de fórmula (III):



10 en la que:

- R_6 , R_7 , R_8 y R_9 representan independientemente H o un grupo arilo C_5-C_7 o R_6 y R_9 están ausentes y R_7 y R_8 forman junto con el átomo de carbono en que se unen un grupo arilo C_5-C_7 ;
- i y j representan independientemente un número entero elegido entre 0 y 2, ventajosamente i y j se eligen entre 0 y 1, más ventajosamente $i=j$, todavía más ventajosamente, $i=j=1$; y
- X representa o bien O o bien X no está presente y en este último caso, CR_6R_7 y CR_8R_9 se unen a través de un enlace sencillo C-C.

25 Ventajosamente, la presencia de un monómero cíclico que presenta un grupo exo-metileno durante la polimerización del polímero descrita en la patente n.º PCT/EP 2010/063227, puede reducir el peso molecular del residuo obtenido tras la degradación del polímero sin modificar las propiedades mecánicas del polímero.

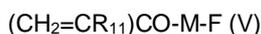
La utilización de este tipo de monómero durante la polimerización aumentará el número de puntos lábiles en la cadena principal de la red de polímero y por tanto reducirá el peso molecular del residuo obtenido tras la degradación hidrófoba. Esta característica evitará por tanto la acumulación no deseada de polímeros en los riñones

30 De hecho, la introducción de la unión éster en la red de polímero mediante la utilización de monómeros cíclicos que presentan un grupo exo-metileno proporcionará una mayor flexibilidad sobre el control de degradación de la red de polímero.

35 Preferentemente según la invención, el monómero cíclico que presenta un grupo exo-metileno de fórmula (III) se selecciona del grupo que consiste en 2-metilen-1,3-dioxolano, 2-metilen-1,3-dioxano, 2-metilen-1,3-dioxepano, 2-metilen-1,3,6-trioxocano, y derivados de los mismos, en particular benzoderivados y derivados fenil-sustituídos, ventajosamente del grupo que consiste en 2-metilen-1,3-dioxolano, 2-metilen-1,3-dioxano, 2-metilen-1,3-dioxepano, 2-metilen-4-fenil-1,3-dioxolano, 2-metilen-1,3,6-trioxocano y 5,6-benzo-2-metilen-1,3-dioxepano, más ventajosamente del grupo que consiste en 2-metilen-1,3-dioxepano, 5,6-benzo-2-metilen-1,3-dioxepano, 2-metilen-1,3,6-trioxocano y 2-metilen-1,3,6-trioxocano.

45 Ventajosamente, el polímero según la presente invención se obtiene utilizando entre el 0,1 y el 50% en moles, más ventajosamente entre el 0,1 y el 20% en moles, normalmente entre el 1 y el 10% en moles, del monómero cíclico mencionado anteriormente basado en la cantidad total del monómero.

50 En una forma de realización de la invención, el polímero definido anteriormente puede obtenerse a partir de la polimerización del al menos un monómero, dicho por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible, opcionalmente al menos un agente de transferencia de cadena tal como se definió anteriormente, opcionalmente al menos un monómero cíclico que presenta un grupo exo-metileno tal como se definió anteriormente y al menos un monómero adicional que es un monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo de la siguiente fórmula (V):



55 en la que:

- R₁₁ representa H o un alquilo C₁-C₆;
- M representa un enlace sencillo o un resto de unión que presenta desde 1 hasta 20 átomos de carbono;
- F representa un grupo cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo que presenta 100 átomos como máximo.

Estas formas de realización son ventajosas porque cuando el polímero de la invención se polimeriza a partir de un monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo tal como se definió anteriormente, el polímero puede presentarse con diversas características fisicoquímicas de superficie que permiten la carga, es decir, la adsorción no covalente, de las macromoléculas que van a administrarse. La macromolécula que se carga en el polímero según la presente invención se elige del grupo que consiste en proteínas y ácidos nucleicos.

La presente invención también se refiere a al menos un polímero tal como se definió anteriormente para su utilización como especialidad farmacéutica.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un polímero tal como se definió anteriormente, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a al menos un polímero tal como se definió anteriormente para su utilización como especialidad farmacéutica destinada ventajosamente para la corrección del envejecimiento de la piel y/o para la cicatrización de heridas y/o para la reconstitución tisular y/o para la reparación de tejidos blandos, y/o para el tratamiento de la inflamación, tumores benignos y malignos, malformaciones arteriovenosas, sangrado gastrointestinal, epistaxis, hemorragia posparto primaria y/o hemorragia quirúrgica y/o para regenerar tejido en un ser humano o un animal, o ingeniería tisular en cultivo celular.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un polímero tal como se definió anteriormente, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable, destinada ventajosamente para la administración mediante inyección.

En particular, se refiere a una composición farmacéutica inyectable que comprende

- (a) un polímero tal como se describió anteriormente que presenta una conformación esférica de un diámetro de entre 50 y 500 μm y un tiempo de reabsorción de entre 2 días y 3 semanas;
- (b) un polímero tal como se describió anteriormente que presenta una conformación esférica de un diámetro de entre 50 y 500 μm y un tiempo de reabsorción de entre uno y 3 meses; y
- (c) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable,

en la que al menos uno del polímero (a) o (b) está cargado con una macromolécula tal como se describió anteriormente.

Ventajosamente, en la composición según la presente invención, las partículas esféricas de los polímeros (a) y (b) no presentan el mismo diámetro, ventajosamente el diámetro de las partículas esféricas del polímero (a) es de entre 100 y 300 μm y el diámetro de las partículas esféricas del polímero (b) es de entre 300 y 500 μm .

La presente invención también se refiere a un implante que contiene al menos un polímero tal como se definió anteriormente o la composición tal como se definió anteriormente.

Descripción detallada de la invención

Copolímero de bloque biorreabsorbible

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "biorreabsorbible" significa que el copolímero de bloque se degrada o escinde cuando se administra a un organismo vivo, preferentemente un organismo mamífero, en particular un ser humano. Tal como se prevé en la presente memoria "biorreabsorbible" indica que el copolímero de bloque puede hidrolizarse.

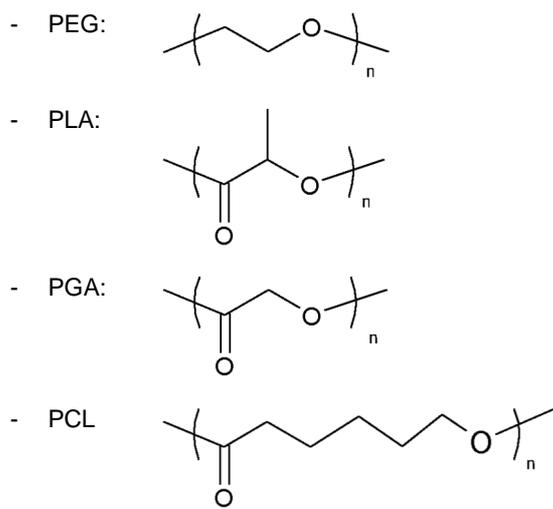
Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente de reticulación de copolímero" se pretende que signifique que el copolímero contiene un grupo funcional en al menos dos de sus extremidades con el fin de unir entre sí varias cadenas poliméricas. Ventajosamente, este grupo funcional contiene un doble enlace.

Preferentemente, el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible tal como se definió anteriormente es lineal y ventajosamente presenta grupos (CH₂=(CR₆))- en ambas de sus extremidades, en los que R₆ representan independientemente un H o un alquilo C₁-C₆. Preferentemente también, el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible es un copolímero de dibloque o tribloque. Los agentes de reticulación de

copolímero de bloque son más ventajosos que los copolímeros estadísticos puesto que, en particular si uno del bloque contiene PEG, tienen tendencia a atraer más moléculas de agua y por tanto son más fácilmente hidrolizables. Además, es fácil cambiar el tamaño del bloque y por tanto adaptar la velocidad de biodegradabilidad del polímero según la presente invención en función de su utilización pretendida.

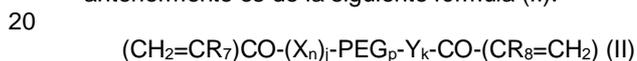
5 También se prefiere que el bloque del agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible tal como se definió anteriormente se seleccione de los grupos que consisten en polietilenglicol (PEG), poli(ácido láctico) (también denominado polilactida) (PLA), poli(ácido glicólico) (también denominado poliglicolida) (PGA), poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA) y poli(caprolactona) (PCL).

10 Tal como conoce bien un experto en la materia, PEG, PLA, PGA y PCL pueden representarse tal como sigue, representando n su grado de polimerización:



15 Para PLGA que comprende tanto unidades de lactida como de glicolida, el grado de polimerización es la suma del número de unidades de lactida y glicolida.

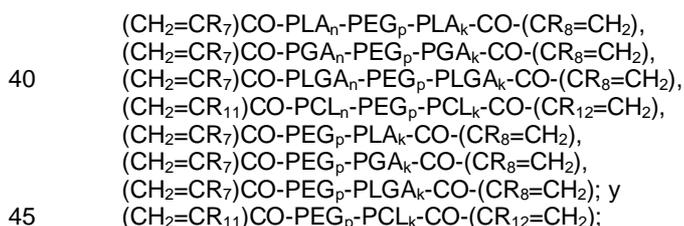
Más preferentemente, el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible tal como se definió anteriormente es de la siguiente fórmula (II):



en la que:

- 25 - R_7 y R_8 representan independientemente H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;
- X e Y representan independientemente PLA, PGA, PLGA o PCL;
- 30 - n, p y k representan respectivamente el grado de polimerización de X, PEG e Y, siendo n y k independientemente números enteros desde 1 hasta 150, y siendo p un número entero desde 1 hasta 100;
- j representa 0 o 1.

35 Todavía más preferentemente, el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible tal como se definió anteriormente es de una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



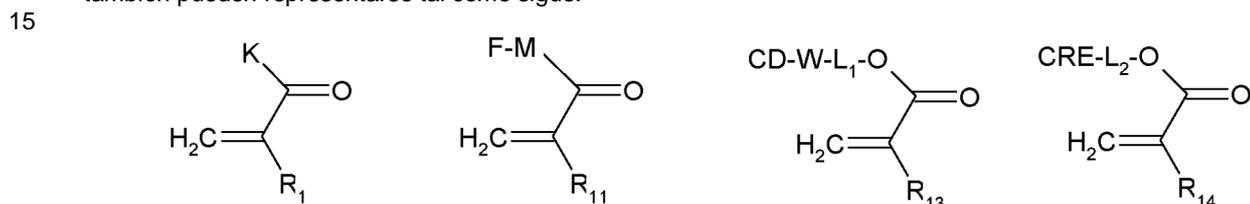
en las que R_7 , R_8 , n, p y k son tal como se definió anteriormente.

Polímeros

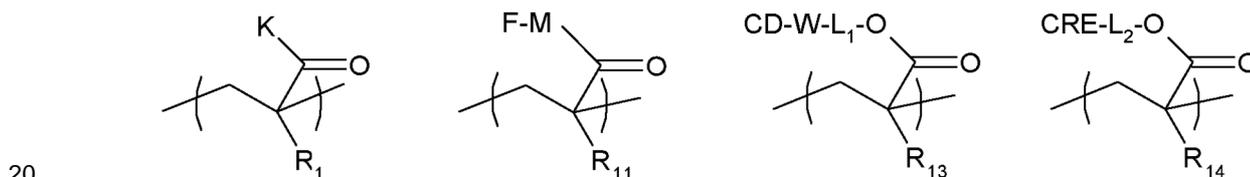
5 Tal como resulta evidente para un experto en la materia, el polímero de la invención es un polímero reticulado biorreabsorbible (es decir, hidrolizable). En particular, el polímero de la invención está constituido por al menos una cadena de monómeros polimerizados tal como se definió anteriormente, en el que al menos una cadena está reticulada mediante los agentes de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbibles tal como se definió anteriormente.

10 Ventajosamente, el polímero de la invención puede hincharse, es decir presente la capacidad para absorber líquidos, en particular agua. Por tanto, este tipo de polímero se denomina hidrogel.

Tal como resulta evidente para un experto en la materia, y a modo de ejemplo, los monómeros de la invención también pueden representarse tal como sigue:



Tras la polimerización, los monómeros de la invención pueden representarse entonces tal como sigue:



25 Preferentemente, el monómero de fórmula (I) tal como se definió anteriormente se selecciona del grupo que consiste en acrilato de sec-butilo, acrilato de n-butilo, acrilato de t-butilo, metacrilato de t-butilo, metacrilato de metilo, N-dimetil-aminoetil(metil)acrilato, (met)acrilato de N,N-dimetilaminopropilo, (met)acrilato de t-butilaminoetilo, acrilato de N,N-dietilamino, poli(óxido de etileno) terminado en acrilato, poli(óxido de etileno) terminado en metacrilato, metacrilato de metoxi-poli(óxido de etileno), metacrilato de butoxi-poli(óxido de etileno), polietilenglicol terminado en acrilato, polietilenglicol terminado en metacrilato, metacrilato de metoxipolietilenglicol, metacrilato de butoxipolietilenglicol.

30 Todavía más preferentemente, el monómero de fórmula (I) tal como se definió anteriormente es metacrilato de metil éter de polietilenglicol.

35 Además, se prefiere que F se seleccione del grupo constituido por COOH, COO⁻, SO₃H, SO₃⁻, PO₄H₂, PO₄H⁻, PO₄²⁻, NR₉R₁₀, NR₉R₁₂R₁₀⁺, representando R₉, R₁₀ y R₁₂ independientemente H o un alquilo C₁-C₆, un grupo alquilo C₁-C₂₀, un grupo arilo C₅-C₂₀, un grupo heteroarilo de 5-30 miembros que contiene un heteroátomo elegido del grupo que consiste en O, N o S, un grupo O-arilo C₅-C₂₀ y un grupo O-heteroarilo de 5-30 miembros, un éter corona y una ciclodextrina.

40 Preferentemente, el monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo es un monómero catiónico, seleccionado ventajosamente del grupo que consiste en (metacrililoxi)etil-fosforilcolina, (met)acrilato de 2-(dimetilamino)etilo, (met)acrilato de 2-(dietilamino)etilo y cloruro de 2-((met)acrililoxi)etil]trimetilamonio. Más ventajosamente, el monómero catiónico es (met)acrilato de (dietilamino)etilo. Ventajosamente, el polímero según la presente invención puede obtenerse utilizando entre el 1 y el 30% en moles del monómero catiónico mencionado anteriormente basado en la cantidad total del monómero, más ventajosamente entre el 10 y el 15% en moles.

45 En otra forma de realización ventajosa, el monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo es un monómero aniónico seleccionado ventajosamente del grupo que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de 2-carboxietilo, oligómeros de acrilato de 2-carboxietilo, sal de potasio de (met)acrilato de 3-sulfopropilo e hidróxido de 2-(metacrililoxi)etil]dimetil-(3-sulfopropil)amonio. Ventajosamente, el polímero según la presente invención puede obtenerse utilizando entre el 1 y el 30% en moles del monómero aniónico mencionado anteriormente basado en la cantidad total del monómero, más ventajosamente entre el 10 y el 15% en moles.

50 En una forma de realización ventajosa, F es una ciclodextrina y el monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo presenta la siguiente fórmula (VI):

55



en la que:

- 5 - R₁₃ representa H o un alquilo C₁-C₆;
- L₁ representa un resto de unión que presenta desde 1 hasta 20 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con un grupo hidroxilo;
- 10 - W representa un grupo -NH-, -CO-, -NH-R₁₉-NH-, -CO-R₁₉-CO- o -triazolil-R₂₀ en el que R₁₉ y R₂₀ representan independientemente entre sí un grupo alquilo C₁-C₆;
- CD representa una ciclodextrina.

15 Ventajosamente, el polímero según la presente invención puede obtenerse utilizando entre el 1 y el 40% en moles, normalmente entre el 1 y el 20% en moles del monómero de fórmula (VI) mencionado anteriormente basado en la cantidad total del monómero.

20 En la presente invención, la ciclodextrina puede ser cualquier ciclodextrina conocida, seleccionada en particular del grupo que consiste en beta-ciclodextrina, metil-beta-ciclodextrina, gamma-ciclodextrina o hidroxipropil-gamma-ciclodextrina. Ventajosamente, es beta- ciclodextrina.

25 Los ejemplos de estructuras (met)acrílicas que portan residuo de ciclodextrina se proponen en las siguientes referencias: Macromol Chem Phys 2009, 210, 2107; Macromol Chem Phys 2010, 211, 245; J polim Sci 2009, 47, 4267.

En otra forma de realización ventajosa, F es un éter corona y el monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo presenta la siguiente fórmula (VII):



en la que:

- 35 - R₁₄ representa H o un alquilo C₁-C₆;
- L₂ representa un resto de unión que presenta desde 1 hasta 20 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con un grupo hidroxilo, elegido ventajosamente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆ y alquil C₁-C₆(O-alquilo C₁-C₆) estando el grupo alquilo opcionalmente sustituido por un grupo hidroxilo;
- 40 - CRE representa un éter corona.

45 Ventajosamente, el polímero según la presente invención puede obtenerse utilizando entre el 1 y el 50% en moles, normalmente entre el 1 y el 20% en moles del monómero de fórmula (VII) mencionado anteriormente basado en la cantidad total del monómero.

Los ejemplos de estructuras (met)acrílicas que portan un residuo de éter corona se proponen en las siguientes referencias: Polymer 2004, 45, 1467; Macromolecules 2003, 36, 1514.

50 En todavía otra forma de realización ventajosa, F se selecciona del grupo constituido por un grupo arilo C₅-C₂₀, un grupo heteroarilo de 5-30 miembros que contiene un heteroátomo elegido del grupo que consiste en O, N o S, un grupo O-arilo C₅-C₂₀ y un grupo O-heteroarilo de 5-30 miembros y el monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo presenta la siguiente fórmula (VIII):



en la que:

- R₂₂ representa H o un alquilo C₁-C₆;
- 60 - L₄ representa un resto de unión que presenta desde 1 hasta 20 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con un grupo hidroxilo, elegido ventajosamente del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆ y alquil C₁-C₆(O-alquilo C₁-C₆), estando el grupo alquilo opcionalmente sustituidos con un grupo hidroxilo;
- 65 - Ar representa un arilo C₅-C₂₀, heteroarilo de 5-30 miembros que contiene un heteroátomo elegido del grupo que consiste en O, N o S, O-arilo C₅-C₂₀ o grupo O-heteroarilo de 5-30 miembros que contiene un heteroátomo elegido del grupo que consiste en O, N o S.

Ventajosamente, el polímero según la presente invención se obtiene utilizando entre el 1 y el 50% en moles, normalmente entre el 1 y el 30% en moles del monómero de fórmula (VIII) mencionado anteriormente basado en la cantidad total del monómero, más ventajosamente entre el 5 y el 15% en moles.

Ventajosamente, el monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo de fórmula (VIII) tal como se definió anteriormente se selecciona del grupo que consiste en (met)acrilato de 2-(4-benzoil-3-hidroxifenoxi)etilo, (met)acrilato de 2-hidroxi-3-fenoxipropilo, (met)acrilato de fenil éter de etilenglicol, metacrilato de bencilo, metacrilato de 9H-carbazol-9-etilo.

También se prefiere que L_1 , L_2 y M sean de la siguiente fórmula:



en la que T y T' , idénticos o diferentes, representan una cadena de alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituida por uno o más grupos hidroxilo, oxo o amino, U representa una función hidrolizable, tal como una función éster, amida, disulfuro, amino-oxilo o anhídrido, y q representa un número entero desde 0 hasta 2 para M y desde 1 hasta 2 para L_1 y L_2 .

El polímero de la invención puede sintetizarse fácilmente mediante numerosos métodos bien conocidos por un experto en la materia si las macromoléculas se cargan tras su preparación. A modo de ejemplo, los polímeros de la invención pueden obtenerse mediante polimerización por suspensión utilizando un procedimiento o bien directo o bien inverso tal como se describe a continuación y en los ejemplos.

Una suspensión directa puede transcurrir tal como sigue: (a) remover o agitar una mezcla que comprende (i) al menos un monómero tal como se definió anteriormente, y al menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible; (ii) un iniciador de polimerización presente en cantidades que oscilan entre 0,1 y aproximadamente 2 partes en peso por 100 partes en peso de los monómeros; (iii) un tensioactivo en una cantidad no mayor de aproximadamente 5 partes en peso por 100 partes en peso de los monómeros, preferentemente no mayor de aproximadamente 3 partes en peso y todavía más preferentemente en el intervalo de 0,5 a 1,5 partes en peso; y (iv) agua para formar una suspensión de aceite en agua; y (b) polimerizar el(los) monómero(s) y el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible.

Una suspensión inversa puede transcurrir tal como sigue: (a) remover o agitar una mezcla que comprende: (i) al menos un monómero tal como se definió anteriormente, y al menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible; (ii) un iniciador de polimerización presente en cantidades que oscilan entre 0,1 y aproximadamente 2 partes en peso por 100 partes en peso de los monómeros; (iii) un tensioactivo en una cantidad no mayor de aproximadamente 5 partes en peso por 100 partes en peso de los monómeros, preferentemente no mayor de aproximadamente 3 partes en peso y todavía más preferentemente en el intervalo de 0,5 a 1,5 partes en peso; y (iv) aceite para formar una suspensión de agua en aceite; y (b) polimerizar los monómeros y el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible.

Por tanto, en este caso, el procedimiento de preparación del polímero cargado con macromoléculas según la presente invención comprende la impregnación del polímero preformado con las macromoléculas. Por ejemplo, se hace que el polímero en forma seca se hinche en una disolución que contiene una cantidad predeterminada de la macromolécula durante de 1 h a 24 h dependiendo de la macromolécula.

El tamaño de malla del polímero descrito anteriormente debe ser suficiente para permitir una penetración de la macromolécula dentro de la red polimérica. En cualquier caso, debido al gran tamaño de la macromolécula, sólo de adsorberá sobre la superficie y se observará una ráfaga inicial o rápida liberación de macromoléculas. Un tamaño de malla de este tipo puede obtenerse eligiendo con particular atención la cantidad de agente de reticulación utilizada.

Para las macromoléculas iónicas, la adsorción puede favorecerse por la presencia de cargas opuestas sobre la estructura de hidrogel según la presente invención, en particular debido a la utilización de monómeros de fórmula (V) para lograr altas eficacias de complejación.

El procedimiento para la preparación del polímero cargado con macromoléculas según la presente invención también puede ser diferente. Comprende la etapa de mezclar de las macromoléculas con una disolución que contiene los monómeros y el agente de reticulación tal como se describió anteriormente antes de la reacción de reticulación. Este tipo de procedimiento es más ventajoso puesto que permite eficacias de incorporación superiores, un mejor control de la liberación y evita el efecto de ráfaga.

El procedimiento debe diseñarse para evitar cualquier contacto con disolventes orgánicos y calor. De esta forma, la formulación del polímero que va a cargarse se realiza con monómeros solubles en agua y agentes de reticulación que pueden polimerizar a temperatura ambiente o hasta 40°C.

Un segundo aspecto importante es la liberación controlada de la macromolécula. La liberación se producirá durante la reabsorción de la red de polímero por lo que debe controlarse a través de diversos parámetros como el grado de reticulación, la naturaleza del agente de reticulación hidrolizable y la presencia de comonomeros específicos tal como se describe en la patente n.º PCT/EP 2010/063227. Además, la red de polímero debe permitir la difusión de los productos de degradación con el fin de mantener un pH adecuado dentro del polímero para la macromolécula.

Ventajosamente, cuando la reacción de reticulación se lleva a cabo mediante polimerización por suspensión inversa, la disolución es una disolución acuosa.

De hecho, la reticulación de las cadenas poliméricas puede lograrse mediante varios métodos:

- Polimerización por suspensión inversa: en este procedimiento, la polimerización se produce en gotitas de agua suspendidas en una fase oleosa. La macromolécula podría mezclarse con monómeros hidrófilos y el agente de reticulación reabsorbible en agua antes de la polimerización. La reacción puede iniciarse por un iniciador soluble en agua tal como persulfato de potasio o amonio en presencia de TEMED como catalizador a temperatura ambiental (Cha, Adv. Funct. Mater., 3056-3062, 2009). Para evitar la utilización de tales compuestos, la polimerización también puede realizarse bajo irradiación gamma (fotopolimerización) (Van Tomme, International Journal of Pharmaceutics, 355, 1-18, 2008).
- En lugar de trabajar en un reactor para realizar la polimerización por suspensión inversa, pueden formarse microesferas mediante un procedimiento gota a gota. En este caso, una disolución acuosa compuesta por la macromolécula, monómeros hidrófilos y el agente de reticulación reabsorbible en agua desciende a través de una boquilla sobre un medio oleoso y entonces se polimeriza a través de polimerización térmica o fotopolimerización durante su descenso. (Tokuyama, Reactive & Functional Polymers, 70, 967-971, 2010).
- También puede contemplarse la reticulación de grupos (met)acrilato a través de la reacción de adición de tipo Michael. Esta reacción puede realizarse en condiciones fisiológicas.
- Un procedimiento relativamente nuevo utilizando una técnica de emulsión en membrana desarrollada por SPG Technology Co permite la formación de microesferas de tamaño uniforme. Este método puede adaptarse para la incorporación de compuestos bioactivos gracias a la emulsión doble W/O/W. Sin embargo, actualmente, el tamaño de las microesferas está limitado a 100 µm.
- Otro método consiste en incorporar en primer lugar el compuesto bioactivo en una nanocápsula con el fin de proteger el fármaco. Entonces, las nanocápsulas cargadas se cargan ellas mismas sobre el implante reabsorbible preferentemente en forma de microesferas.

Las nanocápsulas presentan un tamaño promedio inferior a 1 µm cuando se miden mediante dispersión de la luz. La incorporación de los fármacos en las nanocápsulas se realiza durante la preparación de las nanopartículas que se preparan ellas mismas mediante el método de emulsión doble (Pharm Res 15(2): 270-5 1998, J Control Release 75(1-2): 211-24, 2001, Crit Rev Ther Drug Portador Syst. 2002; 19(2):99-134).

El polímero del que están compuestas las nanopartículas se elige preferentemente entre poli(ácido láctico) (polilactida), poli(ácido glicólico)poliglicolida, copolímeros de lactida-glicolida, copolímeros de lactida-glicolida-poli(etilenglicol), poli(ortoésteres), polianhídridos, copolímeros de bloque biodegradables, poli(ésteres), poli(butirilactona), poli(valerolactona), poli(ácido málico) y generalmente polilactonas y los copolímeros de cada uno o más de estos polímeros.

Macromoléculas

Tal como está prevista en la presente memoria, la macromolécula tal como se definió anteriormente puede ser de cualquier tipo del grupo seleccionado de proteínas y ácidos nucleicos y está prevista para la prevención o el tratamiento de cualquier enfermedad o alteración.

Tal como se indicó anteriormente, en particular cuando el polímero de la invención se obtiene a partir de la polimerización de al menos un monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo, la macromolécula se carga sobre el polímero que se adsorbe sobre el polímero mediante interacciones no covalentes. Entonces no se impone ningún requisito particular sobre las macromoléculas que van a cargarse.

En particular, la macromolécula se elige del grupo que consiste en enzimas, anticuerpos, citocinas, factor de crecimiento, factores de coagulación, hormonas, en particular hormona de crecimiento, plásmidos, oligonucleótidos antisentido, ARNip, ribozimas, ADNzimas, aptámeros, ventajosamente del grupo que consiste en proteínas antiinflamatorias tales como infliximab y riloncept, proteínas morfogenéticas óseas, factores angiogénicos tales como factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento endoteliales vasculares y TGF-beta, inhibidores de angiogénesis tales como bevacizumab o pegaptanib. Entre los péptidos y las proteínas preferidos

están las eritropoyetinas, tales como epoetina alfa, epoetina beta, darbepoetina, hemoglobina rafímero, y análogos o derivados de las mismas; interferones, tales como interferón alfa, interferón alfa-2b, PEG-interferón alfa-2b, interferón alfa-2a, interferón beta, interferón beta-1a e interferón gamma; insulinas; anticuerpos, tales como rituximab, infliximab, trastuzumab, adalimumab, omalizumab, tositumomab, efalizumab y cetuximab; factores sanguíneos tales como alteplasa, tenecteplasa, factor VII(a), factor VIII; factores estimulantes de colonias tales como filgrastim, pegfilgrastim; hormonas de crecimiento tales como factor de crecimiento humano o somatropina; interleucinas tales como interleucina-2 e interleucina-12; factores de crecimiento tales como beclaperrina, trafermina, anacetism, factor de crecimiento de queratinocito; análogos de LHRH tales como leuprorelina goserelina, triptorelina, buserelina, nafarelina; vacunas, etanercept, imiglucerasa, drotrecogina alfa.

Ventajosamente, los anticuerpos se seleccionan del siguiente grupo: anticuerpo anti-CD3 tal como muromonab (en particular Othoclone OKT3® de J & J-Ortho Biotech), anticuerpo anti-GPIIb/IIIa tal como abciximab (en particular Reopro® de Centocor Lilly), anticuerpo anti-CD20 tal como rituximab (en particular Rituxan® de Idec-Genentech) o ibritumomab (en particular Zevalin® de Biogen Idec) o tositumomab-1131 (en particular Bexxar® de Corixam-GSK), anticuerpo anti-CD25 tal como daclizimab (en particular Zenapax® de Roche) o basilixamab (en particular Simulect® de Novartis), anticuerpo anti-RSV tal como palivizumab (en particular Synagis® de MedImmune), anticuerpo anti-TNF α tal como infliximab (en particular Remicade® de Centocor) o adalimumab (en particular Humira® de Abbott), anticuerpo anti-HER $_2$ tal como trastuzumab (en particular Herceptin® de Genentech), inmunotoxina tal como gemtuzumab (en particular Mylotarg® de Wyeth), anticuerpo anti-CD52 tal como alemtuzumab (en particular Campath®R-1H de Millennium-ILEX), anticuerpo anti-IgE tal como omalizumab (en particular Xolair® de Genentech), anticuerpo anti-CD11a tal como efalizumab (en particular Raptiva® de Genentech), anticuerpo anti-EGFR tal como cetuximab (en particular Erbitux® de Imclone Systems), anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab (en particular Avastin® de Genentech) y anticuerpo anti-4a-integrina tal como natalizumab (en particular Tysabri® de Biogen Idec).

Ventajosamente, las hormonas se seleccionan del siguiente grupo: somatropina tal como Norditropin® de Novo Nordisk Inc, lutropina alfa tal como Luveris® de Serono, Inc., folitropina alfa tal como Gonal-f® de Serono, Inc, acetato de sermorelina tal como Geref® de Serono, Inc., epoetina alfa tal como Epogen® de Amgen, Inc., y pegvisomant tal como Somavert® de, Sensus Corporation.

Ventajosamente, las citocinas se seleccionan del siguiente grupo: interferón gamma-1b tal como Actimmune® de InterMune, Inc., interferón beta-1a tal como Avonex® de Biogen idec, interferón alfa-2a tal como Roferon-A® de Hoffmann-La Roche, Inc, interferón beta-1b tal como Betaseron® de Chiron Corp. & Berlex Laboratories, interferón alfa-2b tal como Intron®A de Schering Corporation, interferón alfa-n1 tal como Wellferon® de Glaxo Wellcome Inc., peginterferón alfa-2a tal como Pegasys® de Hoffman-La Roche Inc. y GM-CSF recombinante humano tal como Leucomax ® de Novartis.

Ventajosamente, las citocinas se seleccionan del siguiente grupo de proteínas morfogenéticas óseas (BMP): BMP-2, -3, -3b, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -13, -14, con preferencia por BMP-2, -4, -6, -7 y -9 como inductores de hueso y cartílago para fines de ingeniería tisular (Bessa, 1-13, 2008, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Bessa, 81-96, 2008, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine).

Ventajosamente, los factores proangiogénicos se seleccionan del grupo que consiste en angiopoyetinas, angiogeninas, efrinas, E-selectina, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (FGF ácido, FGF básico, FGF3-9), factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombospondina, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF) (VEGFA-121, -145, -165, -189, -206, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, factor de crecimiento de la placenta) (Lei, 121-132, 2004, Basic Research in Cardiology).

Los ácidos nucleicos son macromoléculas con aplicaciones médicas. Estos agentes terapéuticos incluyen plásmidos que contienen transgenes, oligonucleótidos, aptámeros, ribozimas, ADNzimas y ARN de interferencia pequeños. Estos fármacos pueden utilizarse para mitigar la enfermedad o bien profilácticamente o bien en un estadio muy temprano, impidiendo la progresión de la enfermedad y sus complicaciones. Entre los ácidos nucleicos terapéuticos pueden distinguirse esquemáticamente plásmidos, que son ADN circular bicatenario de alto peso molecular (> 1000 pares de bases). Actualmente, sólo se comercializa un plásmido (Gendicine) en China desde 2004, que codifica para la proteína p53 supresora de tumores. Este plásmido se transfirió a células humanas utilizando un portador de adenovirus. Los oligonucleótidos antisentido son ADN monocatenario con una longitud de 12-28 nucleótidos. Sólo se comercializa un oligonucleótido antisentido con el nombre Vitravene (fomivirsén sódico) con indicación para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus inducida en pacientes con sida. Los ARN de interferencia (ARNi) son segmentos de ARN bicatenario de 21 a 23 nucleótidos complementarios con una región de un ARN mensajero que va a degradarse en el citoplasma de la célula. Actualmente, no hay tal ARN en el mercado pese a los ensayos clínicos alentadores para el producto bevasiranib (Opko Health, Inc., Miami, FL, EE.UU.; fase III) y ALN-RSV01 (Alnylam, Cambridge, MA, EE.UU., fase II).

Los aptámeros son ARN o ADN monocatenarios o bicatenarios que interactúan específicamente con una proteína para inactivarla. Se comercializa un aptámero (Macugen, pegaptanib, Eyetech/Pfizer), que actúa como inhibidor de VEGF en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad. Los aptámeros son moléculas frágiles,

por ejemplo un aptámero no modificado dirigido contra trombina presenta una semivida *in vivo* de 108 segundos (Ng *et al.*, 2006). Las modificaciones químicas aumentan su estabilidad hacia las nucleasas. Se obtienen aptámeros resistentes mediante la modificación del grupo hidroxilo de 2'-ribosa con flúor, el grupo amino, metilo o añadiendo una molécula de polietilenglicol. El aptámero Macugen modificado con estas sustituciones presenta una semivida de 18 horas en plasma humano (Ng, 123-132, 2006, Nature Reviews). En comparación con los anticuerpos, la síntesis de aptámeros es más simple y por tanto más económica a diferencia de los anticuerpos que requieren una infraestructura compleja basada en sistemas de expresión de proteínas. Los aptámeros pueden considerarse "anticuerpos químicos", que combinan las ventajas de los anticuerpos (especificidad de reconocimiento de antígeno) con una fabricación económica.

Todos estos tipos diferentes de ácidos nucleicos podrían cargarse en el polímero según la presente invención.

En una forma de realización particular, el polímero reabsorbible se combina de manera no covalente durante su síntesis con polímeros catiónicos para la carga de ácido nucleico tales como poli(clorhidrato de alilamina), polidialildimetilamonio, polietilenimina, poli(L-lisina), polidopamina, quitosano y dendrímeros de poliamidoamina. Antes de su utilización, el polímero se carga con ácidos nucleicos que se absorben mediante un mecanismo iónico.

El implante reabsorbible comprende un marcador tal como un colorante para controlar su administración a partir de la jeringa hacia el cilindro del catéter o aguja, o un agente de obtención de imágenes para su visibilidad en el organismo durante o tras la inyección (sulfato de bario, polvo de tungsteno o titanio, compuestos yodados, compuestos paramagnéticos tales como partículas de dextrano-magnetita, derivados de gadolinio, un radionúclido).

Forma del polímero

Preferentemente, el polímero de la invención está en forma de una película, una espuma, una partícula, un grupo, una hebra o una esponja, y todavía más preferentemente está en forma de una partícula esférica. La partícula esférica es preferentemente una microesfera, es decir presenta un diámetro tras el hinchamiento (es decir tras la hidratación), que oscila entre 1 y 5000 μm , más preferentemente que oscila entre 50 y 2500 μm , normalmente entre 50 y 1000 μm (que ya no se fagocita y pasa fácilmente a través de agujas pequeñas), más ventajosamente que oscila entre 100 y 300 μm o entre 300 y 500 μm o entre 500 y 700 μm , o entre 700 y 900 μm , o entre 900 y 1200 μm . Las partículas esféricas deben presentar un diámetro suficientemente pequeño para inyectarse mediante agujas o un catéter, en particular agujas de diámetro pequeño pero suficientemente grandes como para evitar que las envuelvan los macrófagos. Las partículas esféricas pueden inyectarse tras hincharse y por tanto su diámetro en este caso podría ser de entre 100 y 300 μm . Su hinchamiento también podría limitarse, por ejemplo a aproximadamente el 50% de su capacidad total de absorción de fluidos, antes de la inyección, con el fin de que se hinchen principalmente tras la implantación absorbiendo fluidos fisiológicos tales como el fluido de las heridas, del medio intersticial y de los fluidos sanguíneos.

Con el fin de hincharse, el polímero de la invención puede absorber, preferentemente de manera controlada, líquidos, tales como agua, en particular de disoluciones utilizadas comúnmente, tales como solución salina fisiológica, disolución tamponada, disolución de glucosa, plasma, medios de contraste yodados iónicos o no iónicos, medios de contraste basados en óxido de hierro para obtención de imágenes por resonancia magnética, disoluciones de fármacos, o cualquier líquido apirógeno estéril que pueda inyectarse en el cuerpo humano o animal. El polímero de la invención absorbe una cantidad de agua definida y limitada, lo que permite prever de ese modo, cuando el polímero es una partícula esférica, el diámetro tras el hinchamiento.

Utilización farmacéutica y terapéutica del polímero

Ventajosamente además, la resorción del polímero de la invención depende de la hidrólisis y no de un mecanismo enzimático. Por tanto, puede controlarse fácilmente la velocidad de resorción modulando el tipo y la cantidad de agente de reticulación biorreabsorbible y monómero tal como se definió anteriormente.

La reabsorción igualmente ventajosa del polímero de la invención puede oscilar entre algunas horas y algunas semanas o incluso algunos meses dependiendo del tipo y de la cantidad de agente de reticulación biorreabsorbible y el monómero tal como se definió anteriormente. Además, el polímero de la invención desarrolla sólo una respuesta inflamatoria local limitada tras la implantación, puesto que los productos de degradación del polímero no son tóxicos y se eliminan rápidamente.

La composición farmacéutica así definida contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable, destinado ventajosamente para la administración mediante inyección.

Los ejemplos de vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero sin limitarse a, agua para inyección, solución salina, almidón, hidrogel, polivinilpirrolidona, polisacárido, éster de ácido hialurónico y plasma. La composición farmacéutica también puede contener un agente de contraste para obtención de imágenes por rayos X, RM o US, un agente de tamponamiento, un conservante, un agente de gelificación, un tensioactivo. Ventajosamente, el portador farmacéuticamente aceptable es solución salina o agua para inyección.

La composición farmacéutica debe presentar una viscosidad aceptable para inyección. En particular, puede ser de entre 10 y 100 cP, más ventajosamente de entre 20 y 30 cP cuando se mide a 25°C con un viscosímetro Couette.

5 En particular, la composición farmacéutica inyectable comprende

- (a) un polímero según la presente invención cargado o no con la macromolécula que presenta una conformación esférica de un diámetro de entre 50 y 500 μm tras hincharse de manera total o limitada y un tiempo de reabsorción de entre dos días y 3 semanas;

10 - (b) un polímero según la presente invención cargado o no con la macromolécula que presenta una conformación esférica de un diámetro de entre 50 y 500 μm tras hincharse de manera total o limitada y un tiempo de reabsorción de entre uno y 3 meses; y

15 - (c) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;

en la que al menos uno del polímero (a) o (b) está cargado con una macromolécula, ventajosamente el polímero (a) está cargado con la macromolécula. Ambos polímeros (a) y (b) podrían cargarse con una macromolécula, siendo las macromoléculas idénticas o diferentes.

20 En particular, los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser un hidrogel, por ejemplo que presenta un tiempo de reabsorción de cómo máximo 1 semana.

Ventajosamente, las partículas del polímero (a) y del polímero (b) presentan la misma densidad.

25 En una forma de realización ventajosa particular, las partículas esféricas de los polímeros (a) y (b) presentan todas el mismo diámetro tras hincharse de manera total o limitada, en particular seleccionado en el intervalo de 100 a 300 μm o en el intervalo de 300 a 500 μm , más ventajosamente en el intervalo de 100 a 300 μm .

30 La proporción de polímero (a) y (b) en la composición farmacéutica puede ser de entre el 20 y el 80% en peso, ventajosamente de entre el 40 y el 70% en peso, todavía más ventajosamente del 60% en peso.

En otra forma de realización ventajosa, la proporción del polímero (a) es idéntica a la proporción del polímero (b) en la composición farmacéutica.

35 En otra forma de realización ventajosa, sus proporciones son diferentes. Por ejemplo en este caso, su razón respectiva es: polímero (a) entre el 60 y el 80%, ventajosamente el 70% en peso, y polímero (b) entre el 20 y el 40%, ventajosamente el 30% en peso de la cantidad total de polímero (a) + (b).

40 En una forma de realización particular, las partículas esféricas de los polímeros (a) y (b) no presentan el mismo diámetro. Ventajosamente, el diámetro de las partículas esféricas del polímero (a) es de entre 100 y 300 μm y el diámetro de las partículas esféricas del polímero (b) es de entre 300 y 500 μm .

45 En otra forma de realización ventajosa, las partículas esféricas del polímero (a) no presentan todas el mismo diámetro. Algunas de ellas presentan un diámetro de entre 100 y 300 μm y las otras un diámetro de entre 300 y 500 μm , ventajosamente la mitad de ellas presentan un diámetro de entre 100 y 300 μm y la otra mitad un diámetro de entre 300 y 500 μm .

50 En una composición particular según la presente invención, las partículas esféricas del polímero (a) y las partículas esféricas del polímero (b) presentan todas un diámetro de entre 100 y 300 μm , siendo la proporción de partículas del polímero (a) del 70% en peso mientras que la proporción de partículas del polímero (b) es del 30% en peso.

55 En otra composición particular según la presente invención, las partículas esféricas del polímero (a) y las partículas esféricas del polímero (b) presentan todas un diámetro de entre 300 y 500 μm , siendo la proporción de partículas del polímero (a) del 70% en peso mientras que la proporción de partículas del polímero (b) es del 30% en peso.

60 En una composición particular adicional según la presente invención, las partículas esféricas del polímero (a) presentan todas un diámetro de entre 100 y 300 μm , y las partículas esféricas del polímero (b) presentan todas un diámetro de entre 300 y 500 μm , siendo la proporción de partículas del polímero (a) del 50% en peso mientras que la proporción de partículas del polímero (b) es del 50% en peso.

65 Todavía en una composición particular adicional según la presente invención, la mitad de las partículas esféricas del polímero (a) presentan todas un diámetro de entre 100 y 300 μm , teniendo la otra mitad todas un diámetro de entre 300 y 500 μm y las partículas esféricas del polímero (b) presentan todas un diámetro de entre 300 y 500 μm , siendo la proporción de partículas del polímero (a) del 50% en peso mientras que la proporción de partículas del polímero

(b) es del 50% en peso.

Tras la inyección, esta composición farmacéutica forma un depósito en el sitio de inyección.

5 Estas composiciones son particularmente útiles para el llenado y/o el camuflaje y/o la corrección de arrugas, líneas finas, grietas de la piel, depresiones cutáneas, lipodistrofias, hemiatropía facial y/o cicatrices, en particular cicatrices de acné y/o el alisado de irregularidades de la piel y/o como matriz para cultivo celular y/o para ingeniería tisular. De hecho, una gran parte de las partículas del polímero (a) se reabsorbe rápidamente *in situ* para promover la penetración de tejidos en el depósito. En particular, con el fin de aumentar la penetración de tejidos, la
10 macromolécula cargada se elige del grupo que consiste en factores de crecimiento (VEGF, bFGF, TGF- β , PDGF, insulina, angiopoyetina).

La reabsorción es progresiva y se desarrolla en tres fases para ayudar al organismo a considerar el depósito como matriz y no como un cuerpo extraño.

15 Tras la inyección hay varias fases: Durante la fase aguda (algunos días), la composición presenta un efecto de aumento de volumen. Hay admisión de agua (controlada) de la composición debido al hinchamiento de las partículas del polímero (a) y en menor grado del polímero (b). También hay adsorción de proteínas y adhesión celular sobre la composición implantada según la presente invención. Durante la segunda fase (que dura semanas o meses) se produce la reabsorción de las partículas del polímero (a), lo que crea una porosidad de la masa facilitando su penetración en las células (fibroblastos por ejemplo), comenzando el depósito de colágeno y la fibrosis (primera estructura de red). Las partículas del polímero (a) se reemplazan por fase de ácido hialurónico o colágeno. Estas partículas están diseñadas para ser muy flexibles y se comportan como un gel viscoso lo que facilita la inyección y la estabilidad de las partículas del polímero (b). La proporción de estas partículas se mantendrá relativamente baja con el fin de evitar una respuesta inflamatoria global dirigida hacia el depósito. En una tercera fase, durante los
20 siguientes meses, se produce una reabsorción de las partículas del polímero (b) que abrirán nuevos canales para un reemplazo total por tejido tisular y su vascularización (penetración fibrovascular).

Debido a este tipo de composición, la porosidad del depósito obtenido tras la inyección aumenta a lo largo del tiempo además de la reabsorción del polímero según la presente invención. La velocidad y la importancia de la reabsorción se controlan por el polímero utilizado para la preparación de la composición y por tanto por su tiempo de reabsorción. El tiempo de reabsorción depende del tipo de monómero utilizado para la preparación del polímero y en particular del tipo y de la cantidad del agente de reticulación.

35 Por tanto, el polímero según la presente invención permite la obtención de suspensión inyectable de una combinación de microesferas reabsorbibles que presentan diversos tamaños y tiempos de reabsorción para producir de manera controlada *in situ* tras la implantación de una estructura de soporte o matriz tisular, que se transforma mediante reabsorción en una estructura porosa diseñada para colonizarse por una penetración de tejido, aumentando la penetración de tejido por la liberación controlada de la macromolécula cargada en el polímero. Con el fin de aumentar la penetración de tejido, el polímero según la presente invención puede cargarse con macromoléculas tal como se describió anteriormente. Esta liberación puede controlarse en lo que se refiere a la velocidad de administración según la velocidad de reabsorción del polímero que las contiene. Puede utilizarse una combinación de varios polímeros que contienen diferente macromoléculas para obtener una secuencia de administración de macromoléculas. Por ejemplo, una composición para apósito de heridas garantizaría una
40 administración de VEGF durante la primera semana y una administración de TGF- β , PDGF o bFGF durante las siguientes semanas.

Las propiedades de la estructura porosa (conexión y tamaño de poro, tiempo de aparición) están diseñadas para controlar varios factores: la naturaleza de las microesferas reabsorbibles, las proporciones de las diferentes microesferas reabsorbibles asociadas en la suspensión, los tamaños de las diferentes microesferas reabsorbibles.

La presente invención también se refiere a un implante, en particular para su implantación en la piel, u otros tejidos y órganos, en particular órganos profundos tales como riñón o hígado, cerebro, médula espinal, defectos óseos, espacios anatómicos internos, tales como peritoneo y espacios meníngeos, cavidades corporales, conductos y vasos. El implante se implanta donde es necesario el tratamiento con la macromolécula que se carga en el polímero.

La terapia local mediante la utilización de este tipo de implante se refiere a órganos que difieren en su ubicación, desde la superficie del organismo como la piel, menos accesible como los huesos, u órganos profundos tales como el riñón o el hígado. La accesibilidad a los órganos es diferente, muy accesible para la piel cuando se requiere un apósito para heridas ayudado con una macromolécula tal como bFGF, VEGF o EGF, más invasivo para la administración de proteínas con el fin de ayudar a la consolidación de huesos, y requiriendo procedimientos quirúrgicos complejos para suministrar de manera local agentes citotóxicos o antiangiogénicos en el entorno de un tumor en un órgano interno (hígado, pulmón). Por lo tanto, las propiedades del polímero (conformación, composición, capacidad de degradación, rendimientos de liberación) serán diferentes y estarán adaptadas a un
65 tratamiento específico.

Dependiendo del tipo de aplicación terapéutica o cosmética deseada, el sitio de aplicación es diferente. Si la aplicación deseada se refiere a la cara, el implante se inyecta en el tejido blando, en particular por vía subcutánea o intradérmica.

5 Si el implante se inyecta en el tejido, puede aumentar el volumen tisular.

En una forma de realización particular, la composición farmacéutica comprende el polímero de la invención en forma seca, tal como en forma liofilizada.

10 La composición farmacéutica de la invención se utilizará preferentemente en el marco de la embolización, en particular para embolización de las arterias uterinas (EAU), o para la hemostasia. También puede utilizarse en el tratamiento de tumores benignos o malignos, malformaciones arteriovenosas, sangrado gastrointestinal, epistaxis, hemorragia posparto primaria y/o hemorragia quirúrgica.

15 La composición farmacéutica de la invención también se utiliza preferentemente para tratar cáncer. En este caso, el tratamiento puede producirse mediante la administración de macromoléculas anticancerosas cargadas en el polímero de la invención y posiblemente mediante embolización, en particular mediante embolización repetida. En particular, el cáncer de interés se selecciona del grupo que consiste en lesiones hepáticas, normalmente carcinoma hepatocelular (CHC), lesiones renales y/o fibroides uterinos.

20 La presente invención también se refiere a la utilización del implante tal como se describió anteriormente, del polímero según la presente invención o de la composición tal como se describió anteriormente para el llenado y/o el camuflaje y/o la corrección de arrugas, líneas finas, grietas de la piel, depresiones cutáneas, lipodistrofias, hemiatropía facial y/o cicatrices, en particular cicatrices de acné y/o el alisado de irregularidades de la piel y/o como matriz para cultivo celular y/o para ingeniería tisular.

25 En un aspecto particular de la invención, es posible utilizar el polímero y/o la composición y/o el implante según la invención como matriz para cultivo celular, con aplicaciones en particular en cirugía cosmética, dermatología, reumatología y gastroenterología. En realidad, el polímero reabsorbible según la invención, en particular en forma de la composición tal como se describió anteriormente, es un buen sustrato tridimensional para soportar el crecimiento de diversos tipos de células.

En cirugía cosmética, es posible citar aplicaciones para implantes para el llenado en arrugas o huecos.

35 En dermatología, puede utilizarse para cicatrizar heridas crónicas: como matriz, posibilita el desarrollo tangencial del procedimiento de cicatrización y la prevención de gemación en caso de cicatrización hipertrófica.

40 En reumatología y ortopedia, la utilización del polímero y/o la composición y/o el implante según la invención como matriz para el cultivo celular es particularmente adecuada para la reparación del cartílago por condroinducción.

En relación con las aplicaciones del polímero y/o la composición y/o el implante como sustrato tridimensional, para el crecimiento celular de células autólogas para preparar estructuras de soporte implantables obtenidas mediante ingeniería tisular para la reconstrucción de hueso, cartílago, piel y otros órganos.

45 El polímero y/o la composición y/o el implante según la presente invención también pueden utilizarse para una variedad de procedimientos de aumento y reparación de tejidos blandos, en particular en el tejido facial tal como por ejemplo camuflaje de cicatrices, llenado de depresiones, alisado de irregularidades, corrección de asimetría en hemiatropía facial, lipodistrofia facial y camuflaje de arrugas relacionadas con la edad. Puede utilizarse en cirugía reconstructiva para restablecer la forma y/o la función a tejidos blandos alterados por edad, traumatismo, enfermedad u otros defectos. También puede reemplazar la pérdida de grasa facial (lipoatrofia), por ejemplo, para proporcionar volumen en zonas de los tejidos blandos del paciente que padecen de pérdida de grasa, colágeno o músculo por motivos de vejez o enfermedad.

Definiciones

55 Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente saturado lineal o ramificado, que presenta el número de átomos de carbono tal como se indica. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₆" incluye grupos alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ y C₆. A modo de ejemplo no limitativo, los grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, pentilo y hexilo. En un aspecto de la presente invención, la variedad de grupos alquilo es: alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₅, alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₃ y alquilo C₁₋₂.

65 Tal como se usa en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un radical carbocíclico aromático insaturado monovalente que presenta uno, dos o tres anillos, que pueden estar condensados o ser bicíclicos. En un aspecto de la presente invención, el término "arilo" se refiere a un anillo monocíclico aromático que contiene 5 ó 6 átomos de carbono, un sistema de anillos condensado o bicíclico aromático que contiene 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono, o un sistema de anillos tricíclico aromático que contiene hasta 10 átomos de carbono. A título de ejemplo no limitativo, los

grupos arilo adecuado incluyen fenilo, bifenilo, antraceno, tiofenilo. En un aspecto de la presente invención, la variedad de grupos arilo es: arilo C₅₋₂₀, arilo C₅₋₁₀, arilo C₅₋₈ y arilo C₆₋₇.

El término "heteroarilo de 5-30 miembros" se refiere a radicales heterocíclicos aromáticos insaturados monovalentes que contienen de 5 a 30 miembros que presentan uno, dos, tres o más anillos que contienen al menos un heteroátomo, en particular O, N o S, ventajosamente dos heteroátomos, en particular 3 heteroátomos, que pueden estar condensados o ser bicíclicos. De manera adecuada, el término "heteroarilo" comprende restos heteroarilo que son sistemas de anillos monocíclicos aromáticos que contienen cinco miembros de los que al menos un miembro es un átomo de N, O o S y que contienen opcionalmente uno, dos o tres átomos de N adicionales, un anillo monocíclico aromático que presenta seis miembros de los que uno, dos o tres miembros son un átomo de N, anillos condensados o bicíclicos aromáticos que presentan nueve miembros de los que al menos un miembro es un átomo de N, O o S y que contienen opcionalmente uno, dos o tres átomos de N adicionales o anillos bicíclicos aromáticos que presentan diez miembros de los cuales uno, dos o tres miembros son un átomo de N. A título de ejemplo no limitativo, los grupos heteroarilo adecuados incluyen furanilo, piridilo, ftalimido, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, pironilo, pirazinilo, tetrazolilo, tionaftilo, benzofuranilo, indolilo, oxiindolilo, isoindolilo, indazolilo, indolinilo, azaindolilo, benzopirano, cumarino, isocumarino, quinolilo, isoquinolilo, cinolinilo, quinazolinilo, benzoxazinilo, cromo, cromano, isocromano, tiazolilo, isoxazolilo, isoxazonilo, isotiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazol-carbazol, porfirina, trifenileno y piridazilo, ventajosamente piridina, carbazol, porfirina, trifenileno.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Síntesis del agente de reticulación biorreabsorbible mediante el método de HEMA/PEGMA:

- Primera etapa: En un recipiente Schlenk seco que contiene una barra de agitación magnética, se disolvieron lactida (2,22 g; 0,0154 mol) y metacrilato de hidroxietilo (0,75 ml; 0,0062 mol) en 5 ml de tolueno bajo nitrógeno. Se inició la reacción introduciendo una disolución en tolueno de Sn(Oct)₂ (8 mg) en el sistema anterior. Tras 20 h a 90°C, se añadieron 5 ml de cloroformo para diluir la mezcla de reacción y se purificó el polímero formado mediante precipitación en un gran volumen de éter de petróleo. Rendimiento del 94%.

¹H RMN en CD₃COCD₃: 1,53 (m, CH₃, PLA), 1,91 (s, CH₃, metacrilato), 4,38 (m, CH₂, HEMA), 5,17 (m, CH, PLA), 5,65-6,10 (m, CH₂=C).

- Segunda etapa: Se modificó adicionalmente el polímero formado en la primera etapa a través del grupo hidroxilo en el extremo de la cadena de PLA haciéndolo reaccionar con cloruro de metacrilato. Se disolvió el polímero preformado (1,07 mmol de grupo OH, 1 eq.) en CH₂Cl₂ anhidro (2,5 ml) en un matraz de tres bocas equipado con un agitador magnético y un embudo de goteo. Se enfrió el contenido del matraz hasta 0°C y se añadió trietilamina (1,5 eq.; 0,0016 mol). Se agitó la disolución y entonces se añadió cloruro de metacrilato (1,5 eq.; 0,0016 mol) en CH₂Cl₂ (2,5 ml) gota a gota a la disolución. Se continuó con la agitación durante 1 h a 0°C y luego durante una noche a temperatura ambiente. Se retiró por filtración la sal de trietilamina y se precipitó el polímero en un gran volumen de éter de petróleo. Rendimiento: el 95%.

¹H RMN en CD₃COCD₃: 1,53 (m, CH₃, PLA), 1,91 (m, CH₃, metacrilato), 4,39 (m, CH₂, HEMA), 5,17 (m, CH, PLA), 5,65-6,16 (m, CH₂=C).

2. Síntesis del agente de reticulación biorreabsorbible mediante el método de PEG:

- Primera etapa: En un recipiente Schlenk seco que contiene una barra de agitación magnética, se hizo reaccionar PEG600 (10 g; 0,0167 mol) con D,L-lactida (7,2 g; 0,05 mol) y glicolida (5,8 g; 0,05 mol) durante 20 h a 115°C utilizando octoato estannoso como catalizador (114 mg) bajo argón. Entonces, se disolvió el polímero en cloroformo, se precipitó en un gran volumen de éter de petróleo / dietil éter (50/50), luego en éter de petróleo puro.

¹H RMN en CDCl₃: 1,55 (m, CH₃, PLA), 3,64 (m, CH₂, PEG), 4,25 (m, CH₂, PEG), 4,80 (m, CH₂, PGA), 5,20 (m, CH, PLA)

- Segunda etapa: Se modificó adicionalmente el polímero formado en la primera etapa a través de grupos hidroxilo en el extremo de PLGA haciéndolo reaccionar con anhídrido metacrílico. En una reacción típica, se disolvió el polímero preformado (4,91 g) en acetato de etilo desgasificado (25 ml) en un tubo Schlenk seco provisto de un agitador magnético. Se enfrió el contenido del matraz hasta 0°C y se añadió anhídrido metacrílico (3,3 ml.; 0,022 mol) gota a gota a la disolución bajo un flujo de argón. Se continuó con la agitación durante 1 h a 0°C y luego durante 6 h a 80°C. Tras enfriar, se precipitó el polímero tres veces en un gran volumen de éter de petróleo.

¹H RMN en CDCl₃: 1,56 (m, CH₃, PLA), 1,94 (m, CH₃, metacrilato), 3,63 (m, CH₂, PEG), 4,29 (m, CH₂, PEG), 4,80 (m, CH₂, PGA), 5,20 (m, CH, PLA), 5,64-6,15 (m, CH₂=C)

Se ha sintetizado una serie de agentes de reticulación biorreabsorbibles variando el peso molecular del PEG, y la longitud y la composición química del segmento reabsorbible (tabla 1).

Tabla 1. Agentes de reticulación reabsorbibles

Código	PEG (g.mol ⁻¹)	Lact./glic. (% en moles)	GP _{segmento reabs*}
EG-PLGA ₁₂	44	50/50	12
TEG-PLGA ₁₂	176	50/50	12
TEG-PLGA ₂₀	176	50/50	20
TEG-PLA ₁₂	176	100/0	12
PEG ₁₃ PLGA ₁₂	600	50/50	12
PEG ₁₃ PLA ₁₂	600	100/0	12
PEG ₂₂ PLGA ₁₂	1000	50/50	12
PEG ₂₂ PLGA ₈	1000	50/50	8
PEG ₁₃ PLA ₁₂	1000	100/0	12
PEG ₁₃ PCL ₆	600	PCL100	6

*: grado de polimerización del segmento reabsorbible de agentes de reticulación reabsorbibles.

Ejemplo 2: Síntesis de hidrogeles reabsorbibles:

1. En disolvente orgánico G n.º 1

Se disolvió el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂PLGA₁₂ (5% en moles) en 1 ml de tolueno y se desgasificó bajo nitrógeno. A esto se le añadió metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 300 (95% en moles) y hexanotiol (3% en moles/mol de PEGMA). Se disolvió el 1% en moles de AIBN en 1 ml de tolueno y se añadió a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 80°C durante 8 h. Tras enfriar, se lavó el polímero dos veces con acetona y luego con agua destilada. Discos de hidrogel (7 mm de grosor y 21 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 50 ml de NaOH 0,1 N a 37°C con agitación se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 10 min.

2. En disolvente acuoso G n.º 2

Se disolvió el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂PLGA₈ (0,33 g, 0,2 mmol) en 3 ml de agua destilada y se desgasificó. A esto se le añadió metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 475 (1,9 g, 4 mmol), tetrametilendiamina (12 µl) y ácido tioglicólico (10 mg). Se disolvieron 180 mg de peroxodisulfato de amonio en 0,2 ml de agua destilada y se añadieron a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 40°C durante 30 min. Tras enfriar, se lavó el polímero con agua destilada y se liofilizó.

Unos discos de hidrogel (4 mm de grosor y 10 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 10 ml de NaOH 0,1 N se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 10 min.

Ejemplo 3: Microesferas reabsorbibles mediante polimerización por suspensión directa

1. Preparación de microesferas reabsorbibles

Se introdujo un 0,5% de disolución acuosa de poli(alcohol vinílico) hidrolizado al 88% (120 ml) que contenía NaCl al 3% en un reactor de 250 ml y se dejó permanecer bajo una atmósfera de nitrógeno durante 15 min. Se desgasificó la fase de monómeros que contenía metacrilato de metil éter de polietilenglicol, agente de reticulación reabsorbible, agente de transferencia de cadena (3% en moles/mol de PEGMA) y el 1% en moles de AIBN solubilizado en 7,5 ml de tolueno burbujeando nitrógeno a través de la disolución durante 15 min. Se añadió la fase de monómeros a la fase acuosa a 80°C y se agitó durante 8 h. Se filtró la mezcla en caliente y se lavó con acetona y agua. Entonces, se liofilizaron las perlas.

Se ha sintetizado una serie de microesferas reabsorbibles variando la naturaleza del agente de reticulación y el monómero de PEG (tabla 2).

Tabla 2. Microesferas reabsorbibles: Velocidad de degradación

	Agente de reticulación (% en moles)	PEGMA (% en moles)	MDO (% en moles)	Pérdida de peso ^{a,b}	Mn (kDa) ^c
MS n.º 1	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ (3%)	DEGMA - 97%	0	23% a 1 mes, 100% a los 4	

				meses	
MS n.º 2	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 95%	0	20% a las 8 h, 80% a las 24 h	
MS n.º 3	PEG ₁₃ PLA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 95%	0	80% a los 4 días, 100% a los 7 días	
MS n.º 4	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 95%	0	26% a las 8 h, 100% a las 24 h	55
MS n.º 5	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 90%	5	100% a las 24 h	
MS n.º 6	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 85%	10	100% a las 24 h	
MS n.º 7	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 75%	20	100% a las 24 h	27
MS n.º 8	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	PEGMA300 - 65%	30	100% a las 48 h	15

^a PBS, pH 7,4 a 37°C

5 ^b Pérdida de peso (%) = $(W_0 - W_t)/W_0 \times 100$ donde W_0 y W_t son el peso seco de la muestra antes y después de la degradación, respectivamente.

^c Peso molecular de las cadenas poliméricas tras la degradación

10 La velocidad de degradación de estas microesferas puede adaptarse variando la composición química del agente de reticulación y/o la naturaleza del monómero de PEG desde menos de 1 día hasta 4 meses. Por ejemplo, la degradación de microesferas que contienen DEGMA (MS n.º 1) fue más lenta que la de microesferas compuestas por PEGMA300 (MS n.º 2). Los segmentos reabsorbibles compuestos por PLA (MS n.º 3) ralentizaron la degradación de las microesferas en comparación con el agente de reticulación que contenía PLGA (MS n.º 2). La longitud de PEG en el agente de reticulación reabsorbible modificó el destino de las microesferas: se produce una degradación
15 más rápida con PEG22 (MS n.º 4) en comparación con PEG13 (MS n.º 2).

El monómero cíclico no modifica notablemente la velocidad de reabsorción. Además, el monómero cíclico reduce el peso molecular de la cadena polimérica residual tras la degradación.

20 2. Control del tamaño

Es completamente posible lograr distribuciones de tamaño definidas a través de un intervalo considerable de tamaños de partícula variando simplemente la velocidad de agitación, la razón de agua con respecto a la fase de monómeros, y la concentración del estabilizador de poli(alcohol vinílico). Se determinó la distribución del tamaño de partícula mediante difracción de láser en un aparato Mastersizer S (Malvern Instrument Ltd.) a 25°C. Se dispersaron perlas secas en agua y se dejó que se hincharan durante 15 min antes de la medición. Se analizó cada inyección 3 veces.

30 La combinación de estos factores permite la preparación de intervalos de tamaño que oscilan entre 220 µm (260 rpm, O/W = 1/11), y 317 µm (215 rpm, O/W = 1/8), y 614 µm (160 rpm, O/W = 1/6) y 1144 µm (120 rpm, O/W = 1/6).

35 **Ejemplo 4: Preparación de microesferas reabsorbibles mediante polimerización por suspensión inversa, MS n.º 9**

Se introdujo una disolución de Span80® (0,2% en peso) disuelta en 88 ml de aceite de parafina en un reactor de 250 ml reactor y se dejó estar bajo una atmósfera de nitrógeno durante 15 min. Se desgasificó la fase de monómeros que contenía metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 475 (4,47 g, 95% en moles), agente de reticulación PEG₂₂-PLGA₈ (0,86 g, 5% en moles), mercaptobutanol (29 µl, 3% en moles/mol de PEGMA) y peróxido-disulfato de amonio al 1% en peso solubilizado en 7,5 ml de agua burbujeando nitrógeno a través de la disolución durante 15 min. Se añadió la fase de monómeros a la fase orgánica a 70°C y se agitó durante 2 h. Se filtró la mezcla en caliente y se lavó con agua y acetona. Entonces, se liofilizaron las perlas.

45 **Ejemplo 5: Síntesis de microesferas reabsorbibles iónicas**

Se usó el mismo procedimiento mediante polimerización por suspensión directa que en el ejemplo 3, pero se añadió un monómero iónico en la fase de tolueno (tabla 3).

Tabla 3. Microesferas reabsorbibles iónicas: Velocidad de degradación

	Monómero iónico	% en moles de monómero iónico	Agente de reticulación ^a / monómero	MDO (% en moles)	Pérdida de peso ^{b,c}
MS n.º 10	Acrilato de β-carboxietilo	10	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ /PEGMA300	0	100% a las 24 h
MS n.º 11	Ácido metacrílico	10	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ /DEGMA	0	98% a los 14 días
MS n.º 12	Ácido metacrílico	10	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ /PEGMA300	0	100% a los 7 días
MS n.º 13	Ácido metacrílico	10	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ /PEGMA300	0	100% a los 7 días
MS n.º 14	Ácido metacrílico	10	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ /PEGMA300	0	95% a las 24 h
MS n.º 15	Ácido metacrílico	20	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ /PEGMA300	2,5	100% a las 24 h
MS n.º 16	Ácido metacrílico	50	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ /PEGMA300	5	100% a las 12 h

5 ^a Microesferas preparadas con agente de reticulación al 3 o al 5% en moles

^bPBS, pH 7,4 a 37°C

10 ^c Pérdida de peso (%) = $(W_0 - W_t)/W_0 \times 100$ donde W_0 y W_t son el peso seco de la muestra antes y después de la degradación, respectivamente.

15 Se han sintetizado satisfactoriamente microesferas que contienen diversas cantidades de MDO y diferentes monómeros aniónicos. Su velocidad de degradación en tampón salino no resultó influida por la cantidad de MDO pero resultó influida por la cantidad de monómero iónico, que resulta de una composición hidrófila superior de la matriz de polímero.

Ejemplo 6: Síntesis de hidrogeles reabsorbibles que contienen ciclodextrinas.

Preparación de monometacrilato de β-ciclodextrina

20 Se sintetizó el monómero de manera similar a un método descrito anteriormente (Ren *et al.* Journal of polymer science, parte A 2009, 4267-4278).

25 Etapa 1. Rendimiento = el 51%. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): 7,74 (d, 2H, tosilo), 7,45 (d, 2H, tosilo), 4,84-4,77 (m, 7H, O-CH-O), 3,70-3,45 (m, 28H), 3,40-3,20 (m, 14H), 2,43 (s, 3H, Ph-CH₃)

Etapa 2. Rendimiento = el 69% ¹H RMN (300 MHz, D₂O): 9,26 (s, CHO), 5,20-5,10 (m, 7H, O-CH-O), 4,04-3,90 (m, 26H), 3,73-3,60 (m, 14H)

30 Etapa 3. Rendimiento = el 71%. ¹H RMN (300 MHz, D₂O): 6,22 (s, =CH), 5,89 (s, =CH), 5,11 (d, 7H, O-CH-O), 4,04-3,88 (m, 28H), 3,71-3,59 (m, 14H), 3,05 (s, 2H, CH₂-OCO), 2,90 (s, 2H, CH₂-NH), 2,04 (s, 3H, CH₃-C=)

2. Preparación de hidrogeles reabsorbibles con monometacrilato de β-ciclodextrina. G n.º 3

35 En primer lugar se solubilizó el monometacrilato de β-ciclodextrina en 4,5 ml de agua destilada/DMSO (3/1 en vol.). A esto se le añadió en este orden, el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂-PLGA₈ (0,33 g, 0,2 mmol), metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 475 (1,71 g, 3,6 mmol), 2-metilen-1,3-dioxepano (0,023 g, 0,2 mmol), tetrametilendiamina (12 μl) y ácido tioglicólico (10 mg). Se disolvieron 180 mg de peroxodisulfato de amonio en 40 0,5 ml de agua destilada y se añadieron a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 40°C durante 30 min. Tras enfriar, se lavó el polímero con agua destilada y se liofilizó.

45 Discos de hidrogel G n.º 3 (4 mm de grosor y 10 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 10 ml de NaOH 0,1 N se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 10 min.

Ejemplo 7: Síntesis de hidrogeles reabsorbibles que contienen éter corona

1. Preparación de 18-corona-6-metacrilato

50 Se disolvió 2-hidroximetil-18-corona-6 (1 mmol) en CH₂Cl₂ desgasificado (10 ml) en un tubo Schlenk equipado con agitador magnético. Se enfrió el contenido del matraz hasta 0°C y se añadió trietilamina (3 mmol). Se agitó la disolución y entonces se añadió cloruro de metacrilato (3 mmol) gota a gota a la disolución. Se continuó con la agitación 2 h a 0°C y luego durante la noche a temperatura ambiente. Se extrajo la mezcla de reacción con

disolución de HCl 1 M, se lavó con agua, luego con disolución saturada de Na₂CO₃ y se secó sobre MgSO₄. Tras la filtración y evaporación del disolvente, se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluyente CHCl₃/MeOH 9/1) para obtener 194 mg (rendimiento del 54%) de 2-metacrilato de metilo-18-corona-6. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 6,11 (s, 1H, =CH₂), 5,57 (s, 1H, =CH₂), 4,32-4,15 (m, 2H, CH₂-OCO), 3,81-3,68 (m, 23H, CH₂-O), 1,95 (s, 3H, CH₃)

2. Preparación de hidrogeles reabsorbibles con éter corona G n.º4

Se disolvió el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂-PLGA₁₂ (0,22 g, 0,125 mmol) en 0,8 ml de tolueno y se desgasificó bajo nitrógeno. A esto se le añadió metacrilato de éter corona (0,27 g, 0,75 mmol), metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 300 (0,49 g, 1,62 mmol), 2-metilen-1,3-dioxepano (14,3 mg, 0,125 mmol) y hexanotiol (7 µl). Se disolvió el 2% en moles de AIBN en 0,2 ml de tolueno y se añadió a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 80°C durante 8 h. Tras enfriar, se lavó el polímero dos veces con acetona y luego con agua destilada.

Unos discos de hidrogel (4 mm de grosor y 10 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 10 ml de NaOH 0,1 N se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 12 h.

Ejemplo 8: Síntesis de hidrogeles reabsorbibles que contienen PEI

Se disolvió el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂PLGA₈ (5% en moles) en 3 ml de agua destilada y se desgasificó bajo nitrógeno. A esto se le añadió polietilenoimina (PEI), metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 475 (95% en moles), tetrametilendiamina (7 µl) y ácido tioglicólico (12 µl). Se disolvió el 1,5% en moles de peroxodisulfato de amonio en 0,5 ml de agua destilada y se añadió a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 40°C durante 30 min. Tras enfriar, se lavó el polímero con agua destilada.

Unos discos de hidrogel (4 mm de grosor y 10 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 10 ml de NaOH 0,1 N se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 2 min.

Se ha sintetizado una serie de geles con cantidad creciente de PEI (tabla 4).

Tabla 4. Hidrogeles reabsorbibles que contienen PEI

	Agente de reticulación PEG ₂₂ -PLGA ₈ (% en moles)	PEG475MA (% en moles)	PEI (peso/peso de monómeros)
G n.º 5	5	95	1/500
G n.º 6	5	95	1/250
G n.º 7	5	95	1/100
G n.º 8	5	95	1/50

Ejemplo 9: Síntesis de hidrogeles reabsorbibles que contienen tripsina

Se disolvió el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂PLGA₈ (5% en moles) en 11,5 ml de agua destilada y se desgasificó bajo nitrógeno. A esto se le añadió tripsina, metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 475 (95% en moles), tetrametilendiamina (30 µl) y ácido tioglicólico (26 mg). Se disolvió el 1,5% en moles de peroxodisulfato de amonio en 0,5 ml de agua destilada y se añadió a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 40°C durante 30 min. Tras enfriar, se lavó el polímero con agua destilada.

Unos discos de hidrogel (4 mm de grosor y 10 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 10 ml de NaOH 0,1 N se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 2 min.

Se ha sintetizado una serie de geles con cantidad creciente de tripsina (tabla 5).

Tabla 5. Hidrogeles reabsorbibles que contienen tripsina

	Agente de reticulación PEG ₂₂ -PLGA ₈ (% en moles)	PEG475MA (% en moles)	Tripsina (mg)
G n.º 9	5	95	0
G n.º 10	5	95	5
G n.º 11	5	95	10

Ejemplo 10: Síntesis de hidrogeles reabsorbibles que contienen bFGF

Se disolvió el agente de reticulación reabsorbible PEG₂₂PLGA₈ (5% en moles) en 14 ml de agua destilada y se desgasificó bajo nitrógeno. A esto se le añadió bFGF, metacrilato de metil éter de polietilenglicol, Mw 475 (95% en

moles), tetrametiletilendiamina (30 µl) y ácido tioglicólico (30 mg). Se disolvió el 1,5% en moles de peroxodisulfato de amonio en 0,5 ml de agua destilada y se añadió a la disolución de monómeros. Se calentó la mezcla a 40°C durante 30 min. Tras enfriar, se lavó el polímero con agua destilada.

- 5 Unos discos de hidrogel (4 mm de grosor y 10 mm de diámetro) colocados en un vial de vidrio que contenía 10 ml de NaOH 0,1 N se degradaron totalmente (ausencia de residuo visible) en 10 min.

Se ha sintetizado una serie de geles con cantidad creciente de bFGF (tabla 6).

10 Tabla 6. Hidrogeles reabsorbibles que contienen bFGF

	Agente de reticulación PEG ₂₂ -PLGA ₈ (% en moles)	PEG475MA (% en moles)	bFGF (µg)
G n.º 12	5	95	10
G n.º 13	5	95	50
G n.º 14	5	95	100

Ejemplo 11: Carga de Avastin® en microesferas reabsorbibles

- 15 Bevacizumab (Avastin®) es un anticuerpo IgG monoclonal humanizado, cuyos valores de punto isoeléctrico (pI) aparente de las isoformas respectivas son 8,26, 8,45 y 8,59 (Vlckova *et al.*, 2008 J. Chromatogr. A, 1181: 145-152). A pH 7, el anticuerpo está cargado positivamente y podría inmovilizarse sobre microesferas aniónicas.

20 1- Carga del anticuerpo

- En agua, se mezclaron 100 µl de microesferas esterilizadas descritas en los ejemplos 3 y 5 (100-300 µm) con 1 ml de agua a pH 7 antes de la adición de la disolución de anticuerpo (Avastin® 25 mg/ml, Roche). Tras el mezclado, se incubaron los tubos de ensayo horizontalmente a 37°C con agitación durante 1 h. Se determinó el anticuerpo residual en agua usando el método de ácido bicinconínico (BCA protein Reagent, Sigma) con BSA como patrón de proteína (tabla 7).

25 Tabla 7. Porcentaje de carga de anticuerpo obtenido a pH 7 con 100 µl de gránulos de microesferas en 1 ml de medio

	MS n.º 3	MS n.º 12	MS n.º 2	MS n.º 14	Control de microesfera*
Naturaleza de las microesferas	PLA	PLA	PLGA	PLGA	
% de MA	0	10	0	10	-
Avastin® (300 µg)	5	100	12	100	92
Avastin® (600 µg)	0,6	97	9	100	100
Avastin® (1300 µg)	0,3	45	0	100	100

- 30 * HepaSphere™/ QuadraSphere™ (BioSphere Medical)

- 35 Se produjo la unión del anticuerpo sobre las microesferas que contenían ácido metacrílico (MS n.º 12 y 14) lo que sugiere que se forman uniones electrostáticas entre el anticuerpo cargado positivamente y las funciones de ácido carboxílico de la MS aniónica. Por el contrario, se observó muy baja o ninguna inmovilización de anticuerpo con MS que no contenían ácido metacrílico (MS n.º 2 y 3). La unión iónica de bevacizumab a las microesferas aniónicas se demostró con partículas de embolización de referencia, HepaSphere™/ QuadraSphere™. Resulta interesante que las microesferas aniónicas reabsorbibles construidas con agentes de reticulación reabsorbibles de PLGA parecen ser más eficaces para la inmovilización de bevacizumab.

40 2- Evaluación de la liberación del anticuerpo de las microesferas

- 45 Se retiró el medio de carga y se reemplazó por el mismo volumen de tampón fosfato salino. Se mezclaron los gránulos y se retiró el medio a intervalos regulares y se reemplazó por PBS reciente. La liberación del anticuerpo se realizó a 37°C con agitación. Se determinó la cantidad de bevacizumab liberada en el medio utilizando el método de BCA. Tras la incubación (1 h a 37°C), se midió la absorbancia a 550 - 570 nm y se obtuvo la cantidad de anticuerpo libre mediante extrapolación de la curva patrón utilizando albúmina sérica bovina (tabla 8).

Tabla 8. Liberación de bevacizumab en tampón salino (37°C). Cantidad de proteínas medida en el medio de liberación para carga de Avastin® (1300 µg de proteínas) realizada en 100 µl de gránulos de microesferas.

	MS n.º 12	MS n.º 14	Control de microesfera*
Naturaleza de las microesferas	PLA	PLGA	-
% de MA	10	10	-
5 min en PBS (µg de proteínas)	5,4	39,7	571,5
1 h en PBS (µg de proteínas)	179,2	348,2	329,4
2 h en PBS (µg de proteínas)	80,7	168	31,6
4 h en PBS (µg de proteínas)	89,6	204	0
24 h en PBS (µg de proteínas)	192,7	164,8	0
48 h en PBS (µg de proteínas)	48,2	70,3	0
Cantidad total de anticuerpo liberado (µg) (% de carga inicial)	595 (100%)	995 (81%)	932 (70%)

5 * HepaSphere™/ QuadraSphere™ (BioSphere Medical)

Se produjo una liberación sostenida de bevacizumab de las microesferas reabsorbibles aniónicas durante 48 h de incubación en PBS sin ráfaga inicial. Por el contrario, se observó una ráfaga de liberación de anticuerpo para el producto de quimioembolización de referencia, HepaSphere™/ QuadraSphere™, que liberó aproximadamente el 70% de la dosis inicial del anticuerpo inmovilizado en la primera hora.

3- Actividad *in vitro* del anticuerpo liberado: inhibición de proliferación de HUVEC

Se sembraron células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) en placas de 96 pocillos (Nunc) a una densidad de 5000 células por pocillo en medio EGM-2 completo (Lonza) con todos los aportes complementarios de cultivo celular. El día posterior a la siembra, se mezclaron las fracciones liberadas recogidas durante experimentos de liberación *in vitro* con medio EBM-2 que contenía 50 ng/ml de VEGF de ratón (R&D) y se cultivaron las células HUVEC durante 3 días hasta el análisis de la lisis celular. La cantidad de bevacizumab liberado añadido a las células fue de 100 y 500 ng/ml. Como control positivo, se trataron las células con diluciones de Avastin®. Se determinó la lisis celular midiendo la densidad óptica (DO) de la actividad lactato deshidrogenasa (Promega) en medio de cultivo celular al final del cultivo (tabla 9).

Tabla 9. Eficacia *in vitro* de fracciones liberadas recogidas de microesferas reabsorbibles cargadas con bevacizumab. La neutralización de VEGF con bevacizumab aumentó la lisis de HUVEC

	MS n.º 12							
	Avastina libre (ng/ml)				100 ng/ml		500 ng/ml	
	Control 0	100	500	1000	1 h de liberación	24 h de liberación	1 h de liberación	24 h de liberación
Actividad LDH en medio de cultivo celular (DO 450 nm)	0,203 ± 0,011	0,191 ± 0,024	0,286 ± 0,055	0,417 ± 0,065	0,204 ± 0,019	0,197 ± 0,028	0,331 ± 0,055	0,305 ± 0,064
p ^a		NS	0,0039	0,0039	NS	NS	0,0039	0,0039
p ^b							NS	NS
p ^c							0,0370	0,0370

	MS n.º 14							
	Avastina libre (ng/ml)				100 ng/ml		500 ng/ml	
	Control 0	100	500	1000	1 h de liberación	24 h de liberación	1 h de liberación	24 h de liberación
Actividad LDH en medio de cultivo celular (DO 450 nm)	0,203 ± 0,011	0,191 ± 0,024	0,286 ± 0,055	0,417 ± 0,065	0,215 ± 0,024	0,191 ± 0,024	0,38 ± 0,104	0,412 ± 0,084
p ^a		NS	0,0039	0,0039	NS	NS	0,0039	0,0039
p ^b							NS	0,0104
p ^c							NS	NS

a: Se realizaron comparaciones entre los tratamientos con control (sin bevacizumab) y con bevacizumab (fracciones de Avastin® libre y de liberación) según la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. La significación se fijó a p < 0,05. NS: no significativo

b: Comparaciones entre 500 ng de anticuerpo liberado (1 h y 24 h) y bevacizumab libre a 500 ng/ml (prueba de Mann-Whitney no paramétrica, la significación se fijó a p < 0,05).

c: Comparaciones entre 500 ng de anticuerpo liberado (1 h y 24 h) y bevacizumab libre a 1000 ng/ml (prueba de Mann-Whitney no paramétrica, la significación se fijó $p < 0,05$).

5 Durante el ensayo basado en células, bevacizumab control (Avastin® 25 mg/ml, Roche) a 0,5 y 1 µg/ml aumentó ($p < 0,05$) la liberación de la lactato deshidrogenasa intracelular en el medio de cultivo celular lo que indica acontecimientos de muerte celular.

10 Se observó significativamente ($p < 0,05$) un aumento del escape de la lactato deshidrogenasa de las HUVEC con fracciones recogidas tras 1 h y 24 h de incubación de MS n.º 12 y 14 reabsorbibles iónicas en PBS en comparación con control sin tratamiento con anticuerpo. El anticuerpo liberado de MS n.º 12 (500 ng/ml) redujo la viabilidad celular tal como se mide con la misma dosis de control con Avastin®. El anticuerpo liberado de MS n.º 14 fue equivalente a la actividad biológica inducida con 1 µg/ml de anticuerpo control.

15 Estos resultados indican que se conservó la actividad biológica de bevacizumab eluido de microesferas degradables. En conclusión, las microesferas iónicas reabsorbibles liberan el anticuerpo bevacizumab no desnaturalizado funcional.

20 Ejemplo 12: Carga de bFGF en microesferas

1- Carga de citocina

25 Se retiró el agua por aspiración de 100 µl de microesferas esterilizadas (100-300 µm) hidratadas previamente. Se disolvió el factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano liofilizado (rh-bFGF) (Fiblast, Trafermin, Kaken Pharmaceutical Co., Inc (Tokio, Japón)) en agua estéril ajustada a pH 7 (0,33 µg de bFGF/µl). A los gránulos de microesferas, se añadieron 50 µl de disolución Fiblast, y tras mezclar suavemente mediante inversión, se logró la unión de la citocina a las partículas durante la noche a 4°C (tabla 10).

30 Tabla 10. Carga de Fiblast (en % de dosis inicial) obtenida a pH 7 (4°C, durante la noche) con 100 µl de gránulos de microesferas

	MS n.º 3	MS n.º 12	MS n.º 2	MS n.º 14	DCBeads 700-900 µm
Naturaleza de las microesferas	PLA	PLA	PLGA	PLGA	-
% de MA	0	10	0	10	-
% de carga de Fiblast	75	49	66	23	88
Cantidad de citocina inmovilizada (µg)	12,3	8	10,9	3,8	14,5

35 La carga de citocinas sobre microesferas reabsorbibles aniónicas es eficaz tal como se obtiene con CD beads aniónicas de referencia. La unión a microesferas reabsorbibles sin ácido metacrílico parece ser más eficaz (MS n.º 3 y MS n.º 2) que la observada con microesferas que contienen ácido metacrílico (MS n.º 12 y MS n.º 14). Las proteínas básicas fuertes (pI próximo a 10) probablemente interaccionan fuertemente con algunas cargas negativas de la matriz de polímero de microesferas reabsorbibles sin necesidad de ácido metacrílico.

40 2- Evaluación de liberación de bFGF de las microesferas

45 Se añadió solución salina tamponada con fosfato (200 µl) a gránulos de microesferas y se retiró el medio a intervalos regulares y se reemplazó con PBS reciente. La liberación de citocinas se realizó a 37°C con agitación. La retirada del sobrenadante se realizó a los 5 min, 1 h, 24 h y 48 h. Se determinó la cantidad de liberación de bFGF en el medio usando el método de BCA. Tras la incubación (1 h a 37°C), se midió la absorbancia a 550 - 570 nm y se obtuvo la cantidad de citocina libre mediante extrapolación de la curva patrón utilizando albúmina sérica bovina (tabla 11). Se trataron microesferas en blanco de la misma forma sin bFGF con el fin de evaluar las sustancias liberadas de las microesferas que podrían interferir con el ensayo de BCA.

50 Tabla 11. Liberación de Fiblast en PBS a 37°C. Se detectó la cantidad de proteínas en el medio de liberación según el ensayo de BCA.

	MS n.º 3	MS n.º 12	MS n.º 2	MS n.º 14	DCbeads 700-900 µm
Naturaleza de las microesferas	PLA	PLA	PLGA	PLGA	-
% de MA	0	10	0	10	-
5 min de liberación (µg de proteínas)	0,7	4,2	6,2	1,36	3,1
1 h de liberación (µg de proteínas)	0,04	0,6	1,1	0,12	1,3
24 horas de liberación (µg de proteínas)	1,2	1	0,95	0	0,8

48 horas de liberación (µg de proteínas)	1,2	1,3	0,7	0,7	1,1
Cantidad total de citocinas liberadas (µg) (% de carga inicial)	3,1 (25%)	7,1 (87%)	8,9 (82%)	2,1 (57%)	6,3 (43%)

Se midió una liberación sostenida de bFGF para cada microesfera, microesferas reabsorbibles iónicas y no iónicas. La cantidad (en µg) de bFGF liberada de MS n.º 12 y MS n.º 2 fue similar a la elución lograda para DCbeads.

5 3- Actividad *in vitro* actividad de citocinas liberadas

10 Se sembraron células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) en placas de 96 pocillos (Nunc) a una densidad de 5000 células por pocillo en medio EGM-2 completo (Lonza) con todos los aportes complementarios de cultivo celular. El día posterior a la siembra, se mezclaron las fracciones recogidas durante los experimentos de liberación *in vitro* con medio EBM-2 sin ninguna citocina (de 5 a 8 pocillos por condición). Se cultivaron las HUVEC durante 4 días hasta el análisis de la proliferación celular. Como control positivo de la proliferación celular, se trataron las células con disolución de Fiblast (100 ng de bFGF/ml). Se determinó la proliferación celular midiendo la proteína celular total usando el ensayo de BCA (tabla 12).

15 Tabla 12. Eficacia *in vitro* de Fiblast liberado recogido de microesferas reabsorbibles (MS n.º 12) y DC beads no reabsorbibles. Tras 4 días de cultivo, se determinó la proliferación de HUVEC según el ensayo de proteínas totales.

	Periodo de liberación	Microesferas cargadas con Fiblast				Microesferas en blanco				Control de cultivo celular	Disolución control de Fiblast (100 ng/ml)
		5 min	1 h	24 h	48 h	5 min	1 h	24 h	48 h	-	
MS n.º 12	Proteínas celulares totales (µg)	4,67 ± 1	7,12 ± 0,9	7,91 ± 0,36	8,43 ± 1	5,23 ± 0,96	4,87 ± 0,76	5,05 ± 0,78	5,86 ± 0,95	4,69 ± 0,65	7,67 ± 0,77
	p ^a	0,9585	0,0039	0,0019	0,0019						0,0062
	p ^b	0,4008	0,0027	0,0008	0,0143						
	p ^c	0,0034	0,5642	0,2416	0,1432						
DC-Beads	Proteínas celulares totales (µg)	4,32 ± 1	3,32 ± 0,34	4,19 ± 1,5	5,16 ± 0,22	3,58 ± 0,39	3,59 ± 0,35	3,10 ± 0,24	3,41 ± 0,3	3,3 ± 0,35	6,48 ± 0,52
	p ^a	0,0609	0,6973	0,6056	0,0201						0,0062
	p ^b	0,0585	0,1146	0,1031	0,0339						
	p ^c	0,0043	0,0033	0,0281	0,0253						

20 a: Se realizó una comparación entre tratamientos con Fiblast (microesferas cargadas con Fiblast y disolución control de Fiblast) y el control de cultivo celular según la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. La significación se fijó a p < 0,05

25 b: Comparación entre Fiblast eluido de microesferas con microesferas en blanco en cada momento de toma de muestras (prueba de Mann-Whitney, la significación se fijó a p < 0,05)

c: Comparación entre Fiblast eluido de microesferas con disolución de Fiblast control (100 ng/ml) (prueba de Mann-Whitney, la significación se fijó a p < 0,05)

30 Cuando se cultivaron HUVEC con diluciones de fracciones de liberación (1 h, 24 h y 48 h) obtenidas a partir de MS n.º 12 cargadas previamente con bFGF, se mejoró significativamente (p<0,05) la proliferación celular desde la primera hora en comparación con el control de cultivo celular (sin Fiblast) y las fracciones recuperadas de las microesferas en blanco (sin carga de bFGF). La proliferación celular inducida con bFGF eluido de MS n.º 12 (1 h, 24 h y 48 h) fue equivalente a la respuesta celular observada durante el cultivo con el control de Fiblast (100 ng/ml).

35 Por el contrario, en fracciones recogidas de DC beads cargadas con bFGF, no se midió inducción de proliferación celular significativa (p > 0,05) (5 min, 1 h, 24 h) tal como se observa tras la comparación con control de cultivo celular y las microesferas en blanco. Se observó una baja actividad proliferativa con la última fracción recogida (48 h), que es significativamente menor que la proliferación inducida con la disolución de control de Fiblast (100 ng/ml).

40 En conclusión, bFGF adsorbido sobre microesferas degradables mantienen su actividad biológica lo que no es el caso para las DC beads pese a una mejor inmovilización de bFGF.

Ejemplo 13: Carga de poliplexos en microesferas1- Formación de poliplexos

5 Se condensó ADN con polietilimina (PEI) ramificada de 25 kDa a una razón molar de nitrógeno de PEI con respecto a fosfato de ADN (razón N/P) de 5. Se prepararon poliplexos de ADN/PEI a una concentración de ADN final de 400 µg/ml mediante el mezclado en un dispositivo Flashmix de ADN de esperma de salmón lineal (Sigma) con PEI en agua que contenía glucosa al 5%. Se dejaron estar los poliplexos durante al menos 20 min a temperatura ambiente antes de la utilización.

2- Carga de microesferas (100 - 300 µm) con poliplexos

15 En agua, se mezclaron 100 µl de gránulos de microesferas esterilizados con disolución de poliplexos. Tras el mezclado suave, se incubaron los tubos de ensayo horizontalmente en un horno a 37°C con agitación durante 1 h. Se cuantificó la unión de los poliplexos sobre las microesferas midiendo la absorbancia del sobrenadante a 260 nm. Como control, se trataron las microesferas en blanco de la misma forma sin ADN (tabla 13).

3- Evaluación de la liberación de poliplexos de las microesferas

20 Se desechó el medio de carga y se añadió tampón fosfato salino (200 µl) a las microesferas. Se realizó la liberación de ADN a 37°C con agitación, se retiró el medio de PBS a los 5 min, 1 h y 24 h. Se determinó la cantidad de liberación de ADN midiendo la absorbancia a 260 nm (tabla 13).

Tabla 13. Carga de poliplexos sobre microesferas reabsorbibles y liberación

	MS n.º 3	MS n.º 12	MS n.º 2	MS n.º 14	DCBeads 700-900 µm
Naturaleza de las microesferas	PLA	PLA	PLGA	PLGA	-
% de MA	0	10	0	10	-
µg de ADN cargado en las microesferas a 1 h	200	214	212	232	31
% de carga de ADN (1 h)	76	77	77	78	11
Liberación de ADN a los 5 min (µg)	34	44	62	118	26
Liberación de ADN a 1 h (µg)	20	46	45	42	6
Liberación de ADN a las 24 h (µg)	8	10	11	7	0
Cantidad total de ADN liberado (µg)	62 (31% de la carga inicial)	100 (46% de la carga inicial)	118 (55% de la carga inicial)	167 (71% de la carga inicial)	32 (100% de la carga inicial)

30 Se observó una unión baja de poliplexos a DC Beads, mientras que la carga de poliplexos sobre microesferas reabsorbibles fue superior (6 veces). La carga de poliplexos parece independiente de la carta de partículas, la carga que se produce sobre microesferas degradables que contienen ácido metacrílico (MS n.º 12 y MS n.º 14) y sobre microesferas sin ácido metacrílico (MS n.º 3 y MS n.º 2).

35 La liberación del ADN de las DC beads se produjo según un perfil de ráfaga, mientras que se midió una liberación sustancial de DNA con microesferas reabsorbibles. La liberación pareció ser más rápida con microesferas reabsorbibles aniónicas que contienen el agente de reticulación PLGA. Para las otras microesferas reabsorbibles, se eluyó aproximadamente la mitad del ADN cargado durante 24 h de incubación en tampón salino. Estas partículas podrían ser portadores eficaces para la administración local de ADN.

Ejemplo 14: Geles degradables que contienen polietilenimina de 25 kDa ramificada para adsorción de ADN1- Carga de gel con ADN

Utilizando un punzón de biopsia, se prepararon tapones de 6 mm de diámetro a partir de geles que contenían diversas cantidades de PEI. Se lavaron los tapones de gel húmedo (aproximadamente 100 mg) con agua hasta que la absorbancia a 260 nm fue próxima a cero. Se añadió un ml de ADN lineal de esperma de salmón (125 µg en 1 ml de agua) a los tapones de gel lavados (por duplicado). Se realizó la carga de ADN a 37°C con agitación y se monitorizó la absorción de ADN midiendo la absorbancia del sobrenadante a 260 nm tras 2 h de incubación.

2- Evaluación de la liberación de ADN de las microesferas

A los tapones de gel, se añadió 1 ml de tampón fosfato salino y se realizó la incubación a 37°C con agitación. Se determinó la liberación de ADN midiendo la absorbancia del medio a 260 nm. Como control, se trataron tapones de gel con ADN en las mismas condiciones para determinar la liberación de sustancias de geles que interfieren con la medición del ADN a 260 nm (tabla 14).

Tabla 14. Carga de ADN sobre geles reabsorbibles que contienen polietilenimina e intentos de liberación de ADN

	G n.º 6	G n.º 7	G n.º 2
PEI/PEG475ma (p/p)	1/250	1/100	0
Carga de ADN a las 2 h (µg)	88	116	5
% de carga de ADN (2 h)	70	92	4
Liberación de ADN (µG) en PBS (30 min)	48	1,5	5
Liberación de ADN (µG) en PBS (24 h)	5	2,5	0
Cantidad total de ADN liberado (µg)	53 (75% de carga inicial)	4 (4% de carga inicial)	5 (100% de carga inicial)

Se logró una buena eficacia de inmovilización de ADN con geles que contenían PEI (G n.º 6 y G n.º 7) en comparación con gel sin PEI (G n.º 2).

Los experimentos de liberación en tampón salino neutro muestran una ráfaga para el gel que contiene la concentración de PEI inferior (G n.º 6) mientras se logró una liberación de ADN más sostenida con el gel que contenía más PEI (1%, p/p) (G n.º 7).

La ráfaga rápida observada con G n.º 6 puede corresponder a la elución del ADN unido al gel a través de interacciones electrostáticas, mientras que en el gel que contenía más PEI (G n.º 7) se había producido probablemente compactación de ADN con PEI lo que conduce a la formación de poliplexos. La liberación de los poliplexos probablemente fue más lenta que la elución del ADN desnudo. En conclusión, variando la concentración de PEI en geles reabsorbibles, podrían obtenerse diferentes patrones de liberación de ADN.

Ejemplo 15: Incorporación de proteínas sin desnaturalización en geles degradables. Tripsina bovina como proteína modelo.Evaluación de la liberación de tripsina de geles degradables

Utilizando un punzón de biopsia, se prepararon tapones de 6 mm de diámetro (200 - 300 mg) a partir de los geles. A los tapones de gel húmedo (por duplicado), se les añadió 1 ml de PBS (tampón fosfato 10 mM, NaCl al 0,9%, pH 7,2) y se produjo la incubación a 37°C con agitación. Se determinó la actividad de la tripsina mediante la adición de 80 µl de sustrato sintético de tripsina (clorhidrato de benzoil-DL-arginina-4-nitroalínida 1 mM en bicarbonato de sodio 50 mM) a 20 µl de medio de PBS retirado tras 5 min, 1 h, 3 h y 24 h de incubación. Se midió la actividad de la tripsina en el medio de liberación a 405 nm tras una hora de incubación a 37°C. Se normalizó la actividad de la tripsina en el medio de liberación (DO 405 nm) con la masa de gel húmedo (DO 405 nm para 100 mg de gel) (tabla 15).

Tabla 15. Liberación de proteína activa de hidrogel degradable durante la incubación en tampón salino

	Tripsina (mg/g de gel)	Actividad de la tripsina (DO 45 nm para 100 mg de gel) medida en PBS durante experimentos de liberación			
		5 min	1 h	3 h	24 h
G n.º 10	0,9	0,11 ± 0,006	0,22 ± 0,014	0,21 ± 0,009	0,042 ± 0,003
G n.º 11	1,8	0,27 ± 0,019 (p = 0,202)*	0,34 ± 0,03 (p = 0,029)	0,303 ± 0,029 (p = 0,0209)	0,096 ± 0,014 (p = 0,0209)

5 * Se realizaron comparaciones entre G n.º 11 y G n.º 10 según la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. (La significación se fijó a p < 0,05).

10 La incubación de geles reabsorbibles que contienen tripsina en tampón conduce a la liberación de moléculas de tripsina activas hasta 24 h. La liberación de tripsina en el medio fue proporcional a la cantidad de enzima incorporada en los geles. La medición de la actividad enzimática en los diferentes tiempos de toma de muestras (5 min, 1 h, 3 h, 24 h) mostró que puede lograrse la preparación de geles reabsorbibles cargados con tripsina y que la carga no inactiva a las proteínas.

15 **Ejemplo 16: Análisis de citotoxicidad *in vitro* (tabla 16)**

20 Se analizó la citotoxicidad de las microesferas utilizando extractos de microesferas preparados en medio cultivo celular. Brevemente, se mantuvieron cultivos de fibroblastos de ratón (L929) en medio DMEM con alta cantidad de glucosa con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, estreptomycin 50 µg/ml, 50 unidades/ml de penicilina en un incubador de CO₂ a 37°C. Se realizó la recogida de las células L929 utilizando tripsina-EDTA (Lonza) y comenzaron los subcultivos en placas de 96 pocillos (NUNC) a densidades de 5,10³ células/pocillo. Se prepararon extractos de microesferas en tubos estériles, se añadieron 500 µl de gránulos de microesferas en DMEM y se completó el volumen hasta 3 ml con medio de cultivo celular. Se incubaron las muestras a 37°C con agitación hasta la degradación completa de las microesferas. La concentración del material fue de aproximadamente 25 mg/ml en los extractos de microesferas. Se utilizaron fragmentos de guantes quirúrgicos (látex) como control positivo de la citotoxicidad. El día tras la siembra de las células, se completaron los extractos de microesferas en medio de cultivo celular con suero bovino y se ajustó el pH (aproximadamente pH 7) antes de la adición hasta obtener fibroblastos no confluentes (de 6 a 8 pocillos/condición). Los extractos obtenidos con guantes quirúrgicos también se añadieron a los fibroblastos de ratón. Tras 72 h de cultivo (37°C, 5% de CO₂), se retiró el medio, se lavaron las células con 100 µL de PBS, antes de la adición de 100 µL de disolución de ácido bicínico (BCA protein Reagent, Sigma) que contiene CuSO₄ al 0,08% (p/v) y Triton-X-100 al 0,05%. Tras la incubación (1 h a 37°C), se midió la absorbancia a 570 nm y se obtuvo la cantidad de proteínas mediante extrapolación de la curva patrón utilizando albúmina sérica bovina (tabla 16).

35 **Tabla 16. Citotoxicidad de microesferas reabsorbibles**

Código	Agente de reticulación (% en moles)	MDO (% en moles)	Comonomero (% en moles)	Proteínas de células L929 totales (% de control)	Estado citotóxico
Medio de cultivo celular (control no citotóxico)	-	-	-	100	No citotóxico
Látex (control citotóxico)	-	-	-	22,73 +/- 5,74	Citotóxico
MS n.º 2	PEG ₁₃ PLGA ₁₂ (5%)	0	-	71,36 +/- 6,14 * p = 0,0003	No citotóxico
MS n.º 3	PEG ₁₃ PLA ₁₂ (5%)	0	-	83,80 +/- 3,99 * p = 0,0003	No citotóxico
MS n.º 4	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	0	-	85,09 +/- 4,5 * p = 0,0003	No citotóxico
MS n.º 10	PEG ₁₃ -PLGA ₁₂ (5%)	0	Acrilato de β-carboxietilo (10%)	61,59 +/- 7,7 * p = 0,0008	Levemente citotóxico
MS n.º 12	PEG ₁₃ -PLA ₁₂ (5%)	0	Ácido metacrílico (10%)	74,94 +/- 7,04 * p = 0,0003	No citotóxico
MS n.º 14	PEG ₁₃ -PLGA ₁₂ (5%)	0	Ácido metacrílico (10%)	72,34 +/- 4,26 * p = 0,0003	No citotóxico

ES 2 601 211 T3

MS n.º 5	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	5	-	86,31 +/- 4,44 * p = 0,0039	No citotóxico
MS n.º 6	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	10	-	88,46 +/-7,67 * p = 0,0007	No citotóxico
MS n.º 8	PEG ₂₂ PLGA ₁₂ (5%)	30	-	73,65 +/- 5,16 * p = 0,0039	No citotóxico
MS n.º 16	PEG ₂₂ -PLGA ₁₂ /	5	Ácido metacrílico (50%)	22,79 +/- 3,32 * p = 0,0039	Citotóxico

*: comparación entre microesferas y látex (prueba de Mann-Whitney no paramétrica). La significación se fijó a $p < 0,05$.

5 Se definió citotoxicidad significativa como un efecto que conduce a una inhibición del crecimiento celular de más del 30% en comparación con los cultivos control (Lin *et al* 2009 Colloid Surface B, 70: 132-41).

10 La adición de 2-metilen-1,3-dioxepano (MDO) dentro de la matriz de polímero (desde el 5 hasta el 30%) no indujo citotoxicidad durante el periodo de cultivo. En conclusión, la adición de MDO en microesferas reduce el peso molecular de los productos de degradación sin inducción de citotoxicidad.

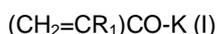
15 El ácido metacrílico al 10% en moles (MS n.º 12 y MS n.º 14) en microesferas reabsorbibles no fue citotóxico en comparación con microesferas preparadas sin ácido metacrílico (MS n.º 3 y MS n.º 2). Por el contrario, la incorporación de un alto contenido de ácido metacrílico (50% en moles) dentro de las microesfera (MS n.º 16) generó toxicidad, atribuible a una rápida reabsorción dando una alta liberación de protones (el pH disminuyó por debajo de 7) que puso en peligro la supervivencia de la célula.

20 La adición de acrilato de β -carboxietilo (10% en moles) en microesferas (MS n.º 10) indujo una toxicidad limitada; la inhibición del crecimiento fue próxima al valor umbral para la citotoxicidad (70%). El ácido metacrílico parece ser un comonomero aniónico mejor en comparación con el acrilato de β -carboxietilo para la preparación de microesferas aniónicas con respecto a los resultados de toxicidad. A excepción de MS n.º 10 y MS n.º 16, los valores de proliferación celular obtenidos con las microesferas reabsorbibles enumeradas en la tabla 12 fueron superiores al 70%, por tanto se consideran no citotóxicas hacia las células cultivadas.

REIVINDICACIONES

1. Polímero reticulado biorreabsorbible cargado con macromoléculas en el que el polímero puede obtenerse a partir de la polimerización de:

(i) por lo menos un monómero de fórmula (I)



en el que:

- K representa O-Z o NH-Z, representando Z $(\text{CR}_2\text{R}_3)_m\text{-CH}_3$, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-H}$, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-CH}_3$, $(\text{CH}_2)_m\text{-NR}_4\text{R}_5$ representando m un número entero desde 1 hasta 30;

- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan independientemente H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;

y

(ii) por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible,

en el que el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible es lineal y presenta unos grupos $(\text{CH}_2=(\text{CR}_6))\text{-}$ en ambas de sus extremidades, en el que R_6 representa independientemente H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$,

y en el que la macromolécula se selecciona de entre el grupo que consiste en proteínas y ácidos nucleicos.

2. Polímero según la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible es de la fórmula (II) siguiente:



en el que:

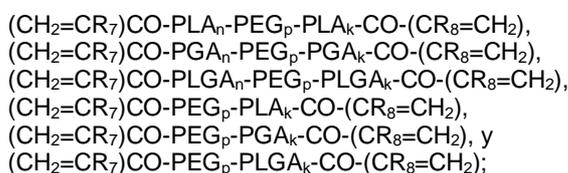
- R_7 y R_8 representan independientemente H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;

- X e Y representan independientemente poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-glicólico) (PLGA), o poli(caprolactona) (PCL);

- n, p y k representan respectivamente el grado de polimerización de X, PEG e Y, siendo n y k independientemente unos números enteros desde 1 hasta 150, y siendo p un número entero desde 1 hasta 100;

- j representa 0 o 1.

3. Polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible es de una fórmula seleccionada de entre el grupo que consiste en:



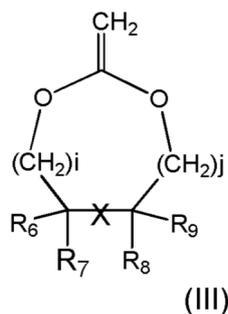
en el que R_7 , R_8 , n, p y k son como se definió en la reivindicación 2.

4. Polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el monómero de fórmula (I) se selecciona de entre el grupo que consiste en acrilato de sec-butilo, acrilato de n-butilo, acrilato de t-butilo, metacrilato de t-butilo, metacrilato de metilo, acrilato de N-dimetil-aminoetil(metilo), (met)acrilato de N,N-dimetilaminopropilo, (met)acrilato de t-butilaminoetilo, acrilato de N,N-dietilamino, poli(óxido de etileno) terminado en acrilato, poli(óxido de etileno) terminado en metacrilato, metacrilato de metoxi-poli(óxido de etileno), metacrilato de butoxi-poli(óxido de etileno), poli(etilenglicol) terminado en acrilato, poli(etilenglicol) terminado en metacrilato, metacrilato de metoxipoli(etilenglicol), metacrilato de butoxipoli(etilenglicol), ventajosamente, el monómero de fórmula (I) es metacrilato de metil éter de poli(etilenglicol).

5. Polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que puede obtenerse a partir de la polimerización de

dicho por lo menos un monómero de fórmula (I), dicho por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible, y además por lo menos un agente de transferencia de cadena que es ventajosamente un tiol cicloalifático o alifático que presenta típicamente desde 2 hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, y que presenta opcionalmente un grupo funcional adicional seleccionado de entre los grupos amino, hidroxí y carboxi.

6. Polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que puede obtenerse a partir de la polimerización de dicho por lo menos un monómero de fórmula (I), dicho por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible, (iii) opcionalmente al menos un agente de transferencia de cadena como se define en la reivindicación 5, y (iv) adicionalmente por lo menos un monómero cíclico que presenta un grupo exo-metileno de fórmula (III):

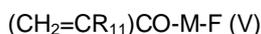


en la que:

- R₆, R₇, R₈ y R₉ representan independientemente H o un grupo arilo C₅-C₇ o R₆ y R₉ están ausentes y R₇ y R₈ forman junto con el átomo de carbono sobre el que se unen un grupo arilo C₅-C₇;
- i y j representan independientemente un número entero seleccionado entre 0 y 2, ventajosamente i y j se seleccionan entre 0 y 1, más ventajosamente i=j, todavía más ventajosamente, i=j=1; y
- X representa o bien O o bien X no está presente y en este último caso, CR₆R₇ y CR₈R₉ se unen a través de un enlace sencillo C-C,

seleccionándose ventajosamente dicho por lo menos un monómero cíclico de fórmula (III) de entre el grupo que consiste en 2-metilen-1,3-dioxolano, 2-metilen-1,3-dioxano, 2-metilen-4-fenil-1,3-dioxolano, 2-metilen-1,3-dioxepano, 5,6-benzo-2-metilen-1,3-dioxepano y 2-metilen-1,3,6-trioxocano, ventajosamente de entre el grupo que consiste en 2-metilen-1,3-dioxepano, 5,6-benzo-2-metilen-1,3-dioxepano y 2-metilen-1,3,6-trioxocano.

7. Polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, obtenido a partir de la polimerización de dicho por lo menos un monómero, dicho por lo menos un agente de reticulación de copolímero de bloque biorreabsorbible, opcionalmente por lo menos un agente de transferencia de cadena como se define en la reivindicación 5, opcionalmente por lo menos un monómero cíclico que presenta un grupo exo-metileno como se define en la reivindicación 6 y por lo menos un monómero adicional que es un monómero cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo de la fórmula (V) siguiente:



en la que:

- R₁₁ representa H o un alquilo C₁-C₆;
- M representa un enlace sencillo o un resto de unión que presenta desde 1 hasta 20 átomos de carbono;
- F representa un grupo cargado, ionizable, hidrófilo o hidrófobo que presenta 100 átomos a lo sumo, seleccionándose F ventajosamente de entre el grupo constituido por COOH, COO⁻, SO₃H, SO₃⁻, PO₄H₂, PO₄H⁻, PO₄²⁻, NR₉R₁₀, NR₉R₁₂R₁₀⁺, representando R₉, R₁₂ y R₁₀ independientemente H o un alquilo C₁-C₆, un grupo alquilo C₁-C₂₀, un grupo arilo C₅-C₂₀, un grupo heteroarilo (de 5-30 miembros) que contiene un heteroátomo seleccionado de entre el grupo que consiste en O, N o S, un grupo O-arilo C₅-C₂₀ y un grupo O-heteroarilo (de 5-30 miembros), un éter en corona y una ciclodextrina.

8. Polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la macromolécula se selecciona en el grupo que consiste en enzimas, anticuerpos, citocinas, factor de crecimiento, factores de coagulación, hormonas, en particular hormonas de crecimiento, plásmidos, oligonucleótidos antisentido, ARNip, ribozimas, ADNzimas, aptámeros, polímeros catiónicos para la carga de ácido nucleico tal como poli(clorhidrato de alilamina), polidialildimetilamonio, polietilenimina, poli(L-lisina), polidopamina, quitosano y dendrímeros de poliamidoamina,

ventajosamente de entre el grupo que consiste en proteínas antiinflamatorias tales como infliximab y rilonacept, proteínas morfogenéticas óseas, factores angiogénicos tales como factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento endoteliales vasculares y TGF-beta, inhibidores de la angiogénesis tales como bevacizumab o pegaptanib.

5 9. Procedimiento para la preparación del polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que comprende la etapa de impregnación del polímero preformado con la macromolécula.

10 10. Procedimiento para la preparación del polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que comprende la etapa de mezclar la macromolécula con una disolución que contiene los monómeros y el agente de reticulación como se describe en las reivindicaciones 1 a 8 antes de la reacción de reticulación.

15 11. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, destinada ventajosamente a la administración mediante inyección.

12. Composición farmacéutica inyectable que comprende

20 - (a) un polímero que puede obtenerse como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que presenta una forma esférica de un diámetro de entre 50 y 500 μm y un tiempo de reabsorción de entre 2 días y 3 semanas;

25 - (b) un polímero que puede obtenerse como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que presenta una forma esférica de un diámetro de entre 50 y 500 μm y un tiempo de reabsorción de entre uno y 3 meses; y

- (c) por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable

30 en la que por lo menos uno del polímero (a) o (b) está cargado con una macromolécula como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

35 en la que típicamente las partículas esféricas de los polímeros (a) y (b) no presentan el mismo diámetro, siendo ventajosamente el diámetro de las partículas esféricas del polímero (a) de entre 100 y 300 μm y el diámetro de las partículas esféricas del polímero (b) de entre 300 y 500 μm .

13. Implante que contiene el polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, para su implantación en tejidos, cerebro, médula espinal, defectos óseos, espacios anatómicos internos, cavidades corporales, conductos y vasos.

40 14. Utilización del implante según la reivindicación 13, del polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, para el llenado y/o el camuflaje y/o la corrección de arrugas, líneas finas, grietas de la piel, depresiones cutáneas, lipodistrofias, hemiatrofia facial y/o cicatrices, en particular cicatrices de acné y/o el alisado de irregularidades de la piel y/o como una matriz para el cultivo celular y/o para ingeniería tisular, y/o para la corrección del envejecimiento de la piel.

45 15. Implante según la reivindicación 13 o polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 para su utilización como especialidad farmacéutica, destinada ventajosamente a la cicatrización de heridas y/o para la reconstrucción tisular y/o para la reparación de tejidos blandos, y/o para el tratamiento de la inflamación, tumores benignos o malignos, malformaciones arteriovenosas, sangrado gastrointestinal, epistaxis, hemorragia posparto primaria y/o hemorragia quirúrgica y/o para regenerar tejido en un ser humano o un animal.