

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 742**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2014 PCT/IB2014/058784**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14122580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2014 E 14708662 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2953656**

54 Título: **Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico y el procedimiento de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

06.02.2013 IT MI20130162

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

01.06.2017

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**CAMPISI, MONICA;
DE LUCCHI, OTTORINO;
BENINATTO, RICCARDO y
BORSATO, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 614 742 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

Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico y el procedimiento de preparación y uso de los mismos

Sumario de la invención

5 La presente invención desvela derivados del ácido hialurónico (AH) fotorreticulados que consisten en AH, un espaciador bifuncional de polietilenglicol (PEG) que es trietilenglicol y un compuesto fotorreactivo seleccionado de un derivado de cumarina.

Antecedentes técnicos

10 Los hidrogeles y las esponjas son redes de polímeros que se caracterizan por una estructura tridimensional, que es compacta en el caso de los hidrogeles y que tiene poros interconectados en el caso de las esponjas. Las esponjas normalmente absorben una gran cantidad de agua, aunque esta característica ("hinchamiento") puede ser menos marcada en los hidrogeles, dependiendo de la compacidad del hidrogel; un gel muy compacto absorbe menos agua que una que no es muy compacto.

15 Estos tipos de materiales se han estudiado durante algún tiempo; por ejemplo, los hidrogeles se utilizan en los campos de la administración de fármacos, relleno de tejidos blandos y trastornos articulares que se benefician de la inserción en la articulación de "cojinetes" que absorben las tensiones y los choques. Las esponjas se utilizan en particular en el campo de la ingeniería de tejidos, sobre todo por su capacidad para ser colonizadas por células. Las aplicaciones obviamente dependen totalmente de la naturaleza del polímero de partida usado. Específicamente en el caso de la presente invención, el polímero elegido es un polisacárido, es decir, ácido hialurónico (AH), un heteropolisacárido que consiste en residuos alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Es un polímero de cadena lineal con un peso molecular de hasta 13×10^6 Da, dependiendo de la fuente de la que se obtiene y los procedimientos de preparación utilizados. Está ubicuamente presente y juega un papel importante en el organismo biológico, especialmente como un soporte mecánico para las células de muchos tejidos, tales como piel, tendones, músculos y cartílago. También modula muchos procedimientos diferentes relativos a la fisiología y biología celular, tales como la proliferación celular, la migración y la diferenciación y la angiogénesis (Weigel P. et al., J Theoretical Biol, 1986:219-234; Abatangelo G. et al., J Surg Res, 1983, 35:410-416; Goa K. et al., Drugs, 1994, 47:536-566) y también realiza otras funciones, como la hidratación de los tejidos y la lubricación de las articulaciones. En las articulaciones, el ácido hialurónico contenido en el líquido sinovial actúa como un lubricante viscoso durante los movimientos lentos, mientras que durante los movimientos rápidos, debido a sus propiedades elásticas, absorbe cualquier traumatismo o microtraumatismo que afecte a la articulación (Balazs EA. et al, J Rheumatol Suppl, 1993, 12:75-82; Belcher C. et al., Annals of the Rheumatic Diseases, 1997, 56:299-307). La combinación de estas propiedades, que son ampliamente reconocidas, ha sido explotada durante algún tiempo en la preparación de apósitos utilizados en el tratamiento de heridas, úlceras y lesiones de la piel de diversos orígenes y en dispositivos médicos diseñados para su aplicación intra-articular para el tratamiento de la artrosis, la degeneración del cartílago, etc.

35 Se usan numerosos procedimientos para obtener hidrogeles con características específicas a partir de diversos polisacáridos; el más importante utilizado con éxito en el ácido hialurónico incluye la reticulación química, el uso de moléculas (divinil sulfona, BDDE) que reaccionan específicamente con los grupos funcionales dados, o la polimerización por radicales libres. Estos procedimientos, que suponen una modificación química del AH que los hace adecuados para la reticulación posterior o reacción de polimerización (derivatización), dan lugar a hidrogeles con buenas características de compacidad, resistencia química y mecánica e hidratabilidad; sin embargo, como la derivatización y la reticulación se llevan a cabo de forma simultánea, los residuos reactivos pueden conservar su estructura durante la formación del gel, y son muy a menudo tóxicos, ya que son difíciles de eliminar.

45 Otro sistema para la obtención de la formación de una reticulación del polímero es el uso de radiación UV en polisacáridos previamente derivatizados con grupos funcionales adecuados para hacerlos fotorreactivos. La derivatización implica la unión a las sustancias de polisacáridos que, cuando se activa por la radiación UV, se unen entre sí, reticulando las diferentes cadenas de polímero y creando de este modo la red. Dicho procedimiento es particularmente ventajoso porque permite la eliminación fácil y eficaz de residuos de reacción indeseables o productos intermedios durante la etapa de derivatización y por lo tanto ayuda a que el producto final sea más seguro. Se pueden utilizar numerosas sustancias fotorreactivas; por ejemplo, se conocen hidrogeles (EP0554898; US6602859) y esponjas (EP1666503) obtenidos a partir de AH derivatizado con ácido cinámico o timina. En estos casos, el ácido hialurónico está unido al ácido cinámico o al residuo de timina y luego se irradia para obtener el hidrogel; en el caso de la esponjas, el hidrogel se seca por congelación o se congela y después se somete a un segundo ciclo de irradiación. Una sustancia fotorreactiva adicional que se puede utilizar es la propiofenona; se conocen geles obtenidos a partir de ácido hialurónico o derivados del mismo que están unidos a través de enlaces éster a la propiofenona y que luego son irradiados (EP1519962). Otros fotorreactivos conocidos en la técnica anterior son antraceno, riboflavina, cumarina y uracilo, adecuadamente derivatizados y sustituidos, para promover la unión con el polisacárido, que normalmente es del tipo éster o amida y, por lo tanto, implica los grupos -OH, -COOH y -NH₂ que normalmente están presentes en el polisacárido. El polisacárido es a menudo derivatizado antes de la reacción, por ejemplo, para proteger algunos grupos funcionales o para promover la formación de la unión deseada.

Las características de los hidrogeles, tales como compacidad, hidratabilidad, resistencia mecánica, etc., se pueden variar mediante la modulación de los diversos parámetros (tipo de polisacárido, fotorreactivo, enlace entre las dos entidades, porcentaje de fotorreactivo en comparación con polisacárido, la intensidad y duración de la irradiación).

5 En el ámbito de la presente invención, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que el ácido hialurónico unido a un fotorreactivo particular a través de un espaciador específico produce, después de la irradiación UV adecuada, hidrogeles de excelente compacidad que son biodegradables, biocompatibles, no tóxicos y que tienen propiedades de memoria de forma; en otras palabras, dichos hidrogeles mantienen la forma del recipiente en el que se prepararon y se pueden cortar conservando su estructura, o de otro modo manipular muy fácilmente. Las mismas características también pertenecen a las esponjas reivindicadas en el presente documento y se obtienen de forma innovadora no a partir de un hidrogel, como se ha descrito hasta la fecha por la técnica anterior, sino a partir de una solución de ácido hialurónico unido al espaciador y al fotorreactivo, posterior liofilización y finalmente irradiación UV; a diferencia de las esponjas conocidas, por lo tanto, se requiere una única etapa de irradiación, lo que representa una ventaja considerable industrial. Las esponjas también poseen memoria de forma y por lo tanto pueden ser remojadas y apretadas varias veces, manteniendo las mismas características de forma y estructura, y requieren una sola irradiación UV. El solicitante ha demostrado que este conjunto de características se asocia con el uso de un espaciador en particular, lo que hace que la invención sea nueva e inventiva en comparación con la técnica anterior.

En particular, el Ejemplo 8 y la Figura 8 ilustran los datos comparativos para el grado de hinchamiento entre hidrogeles preparados de acuerdo con el Ejemplo 2 de dicha patente anterior EP 15'19962, propiedad del solicitante, y los hidrogeles preparados de acuerdo con el Ejemplo 15 de la presente solicitud de patente. Como estos últimos hidrogeles absorben menos agua, son más compactos y la reticulación es por lo tanto más eficiente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención desvela y reivindica derivados del ácido hialurónico (AH) fotorreticulados, su procedimiento de preparación por reticulación basada en la irradiación UV de los compuestos intermedios fotorreticulables adecuadamente preparados, y el uso de dichos derivados fotorreticulados en el campo médico. Los derivados fotorreticulados descritos en el presente documento adoptan la forma de hidrogeles con diferentes grados de compacidad o esponjas, es decir, estructuras tridimensionales con poros interconectados. Son biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y, sobre todo, se puede modular su grado de compacidad o porosidad. Una característica adicional de estas invenciones es la memoria de forma, es decir, la capacidad de mantener su forma incluso fuera del recipiente en el que se produjeron y, en el caso de las esponjas, después de ser remojadas y apretadas repetidamente. Los productos de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar en numerosos campos médicos y biomédicos. Los hidrogeles, por ejemplo, se puede utilizar para:

- la liberación de los principios activos encapsulados en o químicamente unidos a ellos; los diversos principios activos incluyen sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas, tales como factores tróficos, antibióticos, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, proteínas, péptidos, hormonas y extractos de plaquetas;
- objetos de revestimiento para uso médico;
- encapsular materiales sólidos tales como polvos de hueso, gránulos de coral, materiales biocerámicos e hidroxiapatita, con los cuales se pueden modelar pastas para su uso en el campo de la cirugía ortopédica, odontología, etc.;
- rellenar defectos de distintos tamaños en los tejidos blandos, tales como arrugas, cicatrices deprimidas y cavidades derivadas de la cirugía;
- actuar como andamios para el crecimiento celular y la regeneración de tejido, tal como hueso, tejido adiposo, piel, cartílago, tendones, ligamentos, músculos, tejido nervioso, tejido endotelial, tejido conjuntivo, etc. Las células, ya sea diferenciadas o indiferenciadas, pueden ser insertadas en el andamio antes de la implantación y convenientemente cultivadas; opcionalmente, el andamio puede ser insertado en la lesión a tratar y se deja que sea colonizado por las células fisiológicamente presentes en el sitio de la lesión. Para este tipo de aplicación puede ser particularmente útil mezclar el ácido hialurónico antes de la irradiación con colágeno, el cual, al permanecer físicamente atrapado en la malla de hidrogel formada, da al hidrogel mayor elasticidad y mejora su capacidad estructural y la adaptación al sitio donde será colocado;
- actuar como una barrera mecánica postoperatoria contra adherencias y proteger a los tejidos contra el daño inflamatorio;
- tratar la artrosis y/o daño del cartílago por inyección intra-articular. Una vez más, el hidrogel puede contener células diferenciadas o no diferenciadas y/o sustancias farmacológicas o biológicamente activas, como se describe anteriormente.

55 Las esponjas son especialmente útiles en el campo de la ingeniería de tejidos (por ejemplo para la piel, hueso, cartílago, tejido adiposo, tendones, ligamentos, músculos, nervios, endotelio y tejido conjuntivo) debido a su capacidad para alojar células en sus poros; como en el caso de los hidrogeles, las células, ya sea diferenciadas o indiferenciadas, pueden ser insertadas en el andamio antes de la implantación, y convenientemente cultivadas; opcionalmente, el andamio puede ser insertado en la lesión a tratar y dejar que sea colonizado por las células fisiológicamente presentes en el sitio de la lesión. Debido a su estructura, las esponjas son particularmente adecuadas para la reconstrucción de tejido en las lesiones cavitadas y profundas, tales como las formadas después

de la cirugía ablativa mayor (eliminación total y parcial de mama, melanoma o nevos de profundidad).

Las esponjas se pueden utilizar también, como los hidrogeles, como material de relleno para lesiones óseas o dentales, combinadas opcionalmente con sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas, y, finalmente, para el tratamiento intra-articular de la artrosis y el daño del cartílago. La adición de colágeno a las esponjas antes de la liofilización (que precede a la irradiación) de nuevo les confiere mejores características estructurales de estabilidad y elasticidad y las hace particularmente adaptables a la forma y el tamaño del sitio en el que se van a utilizar.

Los derivados a los que se refiere esta invención consisten en:

- ácido hialurónico;
- el espaciador de PEG bifuncional específico;
- un fotorreactivo, seleccionado de derivados de cumarina

los cuales, unidos como se describe a continuación, forman intermedios fotorreticulables, que a su vez, después de la irradiación UV, dan lugar a derivados fotorreticulados en forma de los hidrogeles y esponjas descritos y reivindicados en el presente documento. Como se ha indicado, los derivados pueden contener opcionalmente colágeno, para los fines descritos anteriormente.

Más específicamente, un primer objeto de la presente invención son derivados fotorreticulados de ácido hialurónico (AH) que consiste en AH, un espaciador bifuncional de polietilenglicol (PEG) que es trietilenglicol y un compuesto fotorreactivo seleccionado de derivados de cumarina.

Como se ha indicado, el polisacárido utilizado es el ácido hialurónico, cuyas características principales ya se han descrito. En detalle, el AH utilizado en el presente documento puede derivar de cualquier fuente, tal como por extracción de crestas de gallo (EP 138572), fermentación (de *Streptococcus equi* o *zooepidemicus*) o biosíntesis (de *Bacillus*) y tienen un peso molecular medio que varía entre 10 kDa y 1.000 kDa, preferentemente entre 40k Da y 700 kDa, e incluso más preferentemente entre 160 kDa y 220 kDa; esta última fracción se abreviará en lo sucesivo como "AH con un PM medio de 200 kDa". Cabe destacar que en la presente memoria, "peso molecular medio" significa el peso molecular promedio en peso, calculado por el procedimiento de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-377).

En cuanto a espaciadores, el polietilenglicol (PEG) es adecuado para los fines de la presente invención. El PEG se obtiene por polimerización de óxido de etileno; consiste en una cadena lineal, y es ampliamente utilizado en la industria química y farmacéutica por su versatilidad, y sobre todo por su falta de toxicidad. También es un espaciador bifuncional, que puede unirse a diferentes moléculas en cada uno de los dos extremos de su cadena. Se puede tener un PM extremadamente variable, dependiendo del grado de polimerización; para los fines de la presente invención, el PEG utilizado es trietilenglicol, que tiene un PM de 150 Da; por lo tanto, es una cadena formada sustancialmente por tres residuos.

Por lo que respecta a los fotorreactivos, entre los diversos tipos de derivados de cumarina disponibles (umbeliferona, esculetina, escopoletina, psoralenos, furanocumarina y dicumarol), se prefiere particularmente la 7-hidroxi cumarina, también conocida como umbeliferona.

Finalmente, con respecto al colágeno, se puede utilizar el colágeno nativo y/o colágeno hidrolizado (gelatina) que deriva de la extracción de todos los tipos de tejido, en particular, de tendón y piel equino, porcino, bovino y ovino. Además de los colágenos extraídos, no deben descartarse los diversos tipos de colágeno producidos por biotecnología (fermentativa o enzimática). La relación entre AH fotorreticulable y el colágeno puede oscilar entre 5:1 y 1:5 peso/peso, dependiendo del tipo de la estructura final a obtener; se prefiere particularmente el colágeno de tendón equino, en una proporción de AH fotorreticulable/colágeno que varía entre 1:1 y 1:4.

Un objeto adicional de la presente invención es el intermedio de reacción que consiste en la solución isotónica reticulable que comprende ácido hialurónico (AH), un espaciador bifuncional de polietilenglicol (PEG) que es trietilenglicol y un compuesto fotorreactivo seleccionado de derivados de cumarina, en los que el enlace entre el espaciador bifuncional y el AH es un enlace éster o amida y el enlace entre el compuesto fotorreactivo y el espaciador bifuncional es un enlace éter.

La presente invención también se refiere a un dispositivo médico que contiene al menos un derivado de ácido hialurónico fotorreticulado acuerdo con la presente invención.

La presente invención también se refiere al procedimiento para la preparación de derivados en la forma de hidrogeles con memoria de forma, que comprende las etapas siguientes:

- a) formar un enlace éter entre el PEG y el derivado de cumarina;
- b) formar un enlace éster o amida entre el producto obtenido en la etapa a) y el AH, con un grado de derivatización final del AH que varía de 5 a 80 % en moles en el caso del enlace éster y con un grado de derivatización final del AH que varía de 1 a 50 % en moles en el caso del enlace amida;

c) solubilizar el producto obtenido en la etapa b) e irradiar la solución acuosa isotónica obtenida con rayos UV a una longitud de onda de entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 horas.

5 El procedimiento para la preparación de derivados de acuerdo con la presente invención en la forma de esponjas con memoria de forma comprende las etapas siguientes:

a) formar un enlace éter entre el PEG y el derivado de cumarina;
 b) formar un enlace éster o amida entre el producto obtenido en la etapa a) y el AH, con un grado de derivatización final del AH que varía de 5 a 80 % en moles en el caso del enlace éster y con un grado de derivatización final del AH que varía de 1 a 50 % en moles en el caso del enlace amida;

10 b') solubilizar el producto obtenido en la etapa b) en una solución acuosa isotónica y liofilizar la solución acuosa isotónica así obtenida;

c) irradiar el producto obtenido en la etapa b') con rayos UV a una longitud de onda de entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 horas.

15 El procedimiento por el que los geles y las esponjas de acuerdo con la presente invención se obtienen comprende, por lo tanto, un número de etapas, que se pueden describir esquemáticamente de la siguiente manera:

– para hidrogeles:

a) el fotorreactivo está unido al espaciador bifuncional a través de un enlace éter para formar un grupo fotorreticulable, capaz de reaccionar en una etapa posterior con AH;

20 b) el producto obtenido en la etapa a) se une al AH mediante un enlace éster o amida, que implica el carboxilo libre del residuo de ácido glucurónico; el grado final de derivatización del AH varía entre 5 y 80 % en moles para el enlace éster y entre 1 y 50 % en moles para el enlace amida. El precipitado resultante es soluble en agua y/o solución acuosa y esterilizable después de la solubilización por filtración a través de un filtro de 0,22 µm;

25 c) el producto obtenido en la etapa b) se disuelve en solución acuosa isotónica y se irradia con rayos UV a una longitud de onda de entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante entre 1 minuto y 24 horas y la sustancia resultante es el producto fotorreticulado final;

– para esponjas:

b) el producto obtenido en la etapa a) se une al AH mediante un enlace éster o amida, que implica el carboxilo libre del residuo de ácido glucurónico; el grado final de derivatización del AH oscila entre 5 y 80 % en moles para el enlace éster y entre 1 y 50 % en moles para el enlace amida;

30 b') el producto obtenido en la etapa precedente b) se disuelve en solución acuosa isotónica, y la solución resultante se somete al procedimiento de liofilización, que consiste en tres etapas separadas: congelación; sublimación (o secado primario); y desorción (o secado secundario);

35 c) el liofilizado obtenido de este modo se irradia con rayos UV a una longitud de onda de entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante entre 1 minuto y 24 horas;

La etapa más compleja de todo el procedimiento es, naturalmente, la etapa b), porque la unión entre el AH y el espaciador-fotorreactivo puede ser del tipo éster o amida, implicando por lo tanto diferentes funciones y que requieren diferentes condiciones; los geles y esponjas resultantes tendrán diferentes características, dependiendo de la naturaleza del enlace.

40 En detalle, el solicitante presenta una ilustración esquemática de la etapa b), en relación con el tipo de enlace que se cree:

Preparación de un derivado de éster (A) de AH y el grupo fotorreticulable

– Preparación de una sal de amonio cuaternario de AH, a partir de la sal de sodio de AH que tiene un peso molecular que varía entre 40 kDa y 700 kDa, preferentemente entre 160 y 220 kDa.

45 – Reacción de la sal de amonio cuaternario de AH en un disolvente aprótico polar (DMSO, DMF o NMP, preferentemente DMSO), a una concentración de 1 a 200 mg/ml, con derivados de haluro (yoduros, bromuros o cloruros, preferentemente yoduros) de grupos fotorreticulables adecuadamente preparados y en una proporción molar de haluro/AH que varía entre 0,05 y 0,8, preferentemente entre 0,2 y 0,5, a una T que varía entre 20 °C y 50 °C, más preferentemente entre 35 °C y 45 °C, durante un tiempo comprendido que varía entre 4 y 72 horas, preferentemente entre 18 h 48 h.

50 – Aislamiento y purificación del derivado de AH (A) esterificado con grupos fotorreticulables y en forma de sal de sodio por precipitación y lavado en disolvente orgánico (etanol, acetato de etilo, acetona); el grado final de derivatización del AH oscila entre 5 y 80 % en moles:

Preparación de un derivado de amida (B) de AH y el grupo fotorreticulable

- Preparación de una sal de amonio cuaternario de AH a partir de sal de sodio de AH que tiene un peso molecular que varía entre 40 kDa y 700 kDa, preferentemente entre 160 y 220 kDa.
- 5 – Activación de la sal de amonio cuaternario de AH en un disolvente polar aprótico (DMSO, DMF o NMP, preferentemente DMSO) con un agente activante (CDI, CMPJ, EDC, HOBT o NHS, preferentemente CDI), en una relación molar agente activante/AH que varía entre 0,01 y 0,5, durante un tiempo comprendido entre 0,1 h y 3 h, a una T que varía entre 35 °C y 45 °C.
- 10 – La reacción de AH activada con derivados de amina de los grupos fotorreticulables preparados adecuadamente en un disolvente aprótico polar (DMSO, DMF o NMP, preferentemente DMSO) en una relación molar amina/AH que varía entre 0,01 y 1,5, a una T que varía entre 35 y 45 °C, durante un tiempo que varía entre 4 h y 30 h (preferentemente entre 12 h y 24 h). El grado de derivatización final del AH varía entre 1 y 50 % en moles.
- Aislamiento y purificación del derivado de AH (B) amidado con grupos fotorreticulables y en la forma de una sal de sodio por precipitación y lavado en disolvente orgánico (etanol, acetato de etilo, acetona).

15 En cuanto a los hidrogeles y esponjas, las etapas de los procedimientos de producción correspondientes se muestran esquemáticamente a continuación:

Preparación de un hidrogel a base de derivado de AH (A) esterificado con grupos fotorreticulables:

- Preparación de una solución acuosa isotónica de (A) en tampón fosfato, acetato o solución salina (preferentemente solución salina), en una concentración comprendida entre 5 y 70 mg/ml
- Esterilización por filtración a través de filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm
- 20 – Alojamiento de la solución estéril en recipientes transparentes a los rayos UV (por ejemplo, polietileno)
- Irradiación de la solución con una lámpara de Wood y un haz de luz a una longitud de onda que varía entre 300 y 450 nm, más preferentemente entre 320 nm a 380, durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 24 h;

Preparación de un hidrogel a base de un derivado de AH (B) amidado con grupos fotorreticulables

- 25 – Preparación de una solución acuosa isotónica de (B) en tampón fosfato, acetato o solución salina (preferentemente tampón fosfato) a una concentración que varía entre 1 y 40 mg/ml
- Esterilización por autolavado o filtración a través de filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm
- Alojamiento de la solución estéril en recipientes transparentes a los rayos UV (por ejemplo, polietileno)
- Irradiación de la solución con una lámpara de Wood y un haz de luz a una longitud de onda que varía entre 300 y 370 nm, más preferentemente entre 320 nm a 365, durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 24 h;

30 Preparación de una esponja:

- Preparación de una solución acuosa isotónica (que contiene NaCl 0,9 % o manitol que varía de 1 a 20 % peso/volumen o isopropanol que varía de 1 a 20 % volumen/volumen o glucosa que varía de 1 a 20 % peso/volumen), preferentemente solo agua, de un éster o un derivado de AH de amida con un grupo fotorreticulable a una concentración que varía entre 1 y 70 mg/ml.
- 35 – Liofilización en las siguientes etapas:
 - congelación: la solución se vierte en bandejas adecuadas (para dar un espesor de entre 0,5 y 20 mm, preferentemente entre 2 y 7 mm) que descansa sobre las placas de liofilización y la T de enfriamiento de las placas se ajusta a -3 °C y se mantiene a esa temperatura hasta que la solución alcanza 2 °C (entre 1 y 8 horas, preferentemente entre 4 y 5 horas). La T de las placas se reduce a -30 °C, y se mantiene el tiempo necesario hasta que la solución alcanza una T de al menos -20 °C (entre 3 y 10 horas, preferentemente entre 4 y 7 horas);
 - 40 • sublimación (o secado primario): el condensador del aparato se ajusta a una T de al menos -30 °C, y con la bomba de vacío, la presión en la cámara de liofilización se reduce a un valor que varía entre 8×10^{-1} y 5×10^{-3} mbar, preferentemente entre 8×10^{-2} y 2×10^{-2} mbar. Las placas se calientan luego gradualmente (en un tiempo que varía entre 1 y 3 horas) a una T de entre -10 °C y 10 °C, preferentemente 0 °C; la T se mantiene estable durante al menos 12 horas, o hasta que el producto llega a la misma T que las placas, en igualdad de presión;
 - 45 • desorción (o secado secundario): las placas se calientan gradualmente (en un tiempo que varía entre 1 y 3 horas) a una T de entre 15 °C y 55 °C, preferentemente 25 °C, sin variar la presión aplicada. La T se

mantiene estable durante al menos 8 horas, o hasta que el producto llega a la misma T que las placas. Después de asegurarse de que la desorción es completa, la presión se restablece en la cámara de liofilizador mediante la inyección de nitrógeno deshidratado, microfiltrado;

- 5 – La irradiación del sólido liofilizado obtenido de la etapa anterior con un haz de luz que tiene una longitud de onda que varía entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 h.

Para esponjas, como para los hidrogeles, la duración de la irradiación es muy variable, estando fuertemente influenciada por la selectividad de la longitud de onda, la intensidad de la emisión de la lámpara UV, el espesor del material y los procedimientos de irradiación. Este último puede variar de acuerdo con el tipo de lámpara utilizado; si se utiliza una única lámpara, la muestra se gira de manera que la totalidad de su superficie se expone a los rayos UV. No se requiere rotación si se utiliza un multilámpara, ya que al mismo tiempo irradia toda la superficie expuesta. También hay que señalar que mediante la modulación de los parámetros que intervienen (concentración de la solución inicial, el tipo de disolvente utilizado, las condiciones de liofilización y las condiciones de irradiación), puede establecerse *a priori* el grado de porosidad de las esponjas y la compacidad del hidrogel. Este aspecto es de vital importancia teniendo en cuenta que las esponjas en particular, pero también los hidrogeles, son colonizables por las células. Las células, ya sean diferenciadas o indiferenciadas, se pueden insertar en la esponja o hidrogel antes de la implantación y ser adecuadamente cultivadas; opcionalmente, la esponja o el hidrogel se pueden implantar en la lesión a tratar, lo que le permite ser colonizadas por las células fisiológicamente presentes en el sitio de la lesión.

Como se ha indicado, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que las características específicas de los hidrogeles y esponjas reivindicados en el presente documento dependen en una medida decisiva de la longitud de la cadena del espaciador utilizado (PEG), así como de su naturaleza química. Se ha demostrado a través de numerosas pruebas que los espaciadores con cadenas largas impiden la gelificación homogénea y compacta del material, el cual ya no se puede definir más como "memoria de forma"; un resultado similar se obtiene eliminando el espaciador. Estas características también se encuentran en las esponjas, las cuales se vuelven muy frágiles y totalmente incapaces de mantener su forma, no solo después de haber sido empapadas y exprimidas, sino también después de ser simplemente colocadas en solución acuosa. En particular, el solicitante ha encontrado inesperadamente que una cadena de PEG que consiste en tres residuos de los materiales descritos en el presente documento con las características ya discutidas. En vista de todos estos factores, el solicitante también ha sintetizado algunos derivados fotorreticulables similares sin separadores, para comparar los productos resultantes.

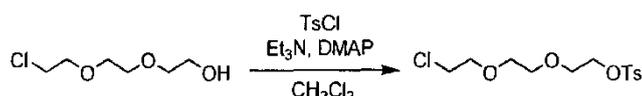
Algunos ejemplos de preparación de los hidrogeles y esponjas descritos y reivindicados en el presente documento se exponen a continuación de acuerdo con los procedimientos ilustrados.

Los fotorreactivos utilizados son 7-hidroxycumarina (umbeliferona) o propiofenona (por comparación), los cuales deben ser tratados de manera adecuada para que se unan al espaciador bifuncional (trietilenglicol) o reaccionen directamente con AH, para dar los productos de comparación. Los ejemplos siguen el esquema que figura a continuación:

- 35 – Ejemplos 1, 2 y 3: umbeliferona-trietilenglicol que se une a AH mediante un enlace éster;
 – Ejemplo 4: umbeliferona derivatizada que se une a AH con un enlace éster (directo);
 – Ejemplos 5 y 6: umbeliferona-trietilenglicol que se une a AH a través de un enlace amida;
 – Ejemplos 7 y 8: propiofenona-trietilenglicol que se une a AH con un enlace éster (indirecto; para la comparación).

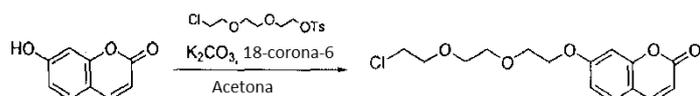
Ejemplo 1: Síntesis de 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etilo (1).

40 Se introducen 180 ml de CH_2Cl_2 anhidro, 10,0 ml de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol, 10,55 ml de trietilamina (Et_3N) y 16,8 g de N,N'-dimetilaminopiridina (DMAP) en un matraz de dos bocas, equipado con agitación magnética, flujo de argón y baño de hielo. A continuación se añaden 14,43 g de cloruro de tosilo (TsCl), disuelto en 60 ml de CH_2Cl_2 anhidro, manteniendo la T a 0 °C bajo un flujo de argón. La reacción se dejó transcurrir a 0 °C durante 1 h 30 min, y luego a temperatura ambiente durante 3 h 30 min. La fase orgánica se lava con agua, HCl 1 N, NaHCO_3 acuoso saturado y NaCl acuoso saturado y se secó sobre MgSO_4 y el disolvente se elimina a continuación a baja presión. El análisis de RMN de ^1H detecta la presencia del producto deseado, que no requiere más purificación.



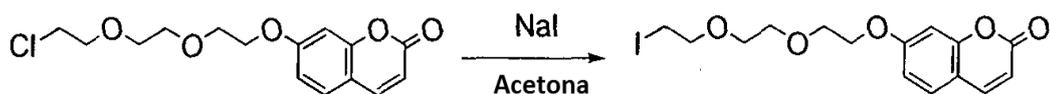
Ejemplo 2: Síntesis de 7-(2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (2).

50 Se introducen 18,3 g de umbeliferona, 200 ml de acetona y 39,0 g de 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etilo (1), extraído con acetona (600 ml), 93,6 g de K_2CO_3 y 18-corona-6 en cantidad catalítica, en un matraz de dos bocas, equipado con agitación magnética, baño de aceite, refrigerante y flujo de argón. La reacción se deja proceder a reflujo bajo agitación durante 24 h; la mezcla de reacción enfriada se filtra a continuación a través de un embudo de Gooch con celite, y el disolvente se elimina a baja presión. La naturaleza del producto obtenido se confirmó por análisis de RMN de ^1H (sólido blanco cristalino).



Ejemplo 3: Síntesis de 7-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (3).

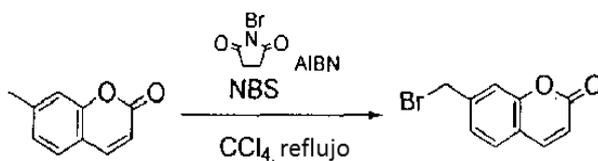
Se introducen 2,5 g de 7-(2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etoxi)-2H cromen-2-ona (2) y acetona (50 ml) en un matraz de dos bocas, equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante. A continuación se añade yoduro de sodio (8,35 g) y la mezcla se deja proceder a reflujo bajo agitación durante 48 h. El procesamiento se lleva a cabo dejando enfriar la mezcla, filtrándola a través de un embudo de Gooch y de celite y después eliminando el disolvente a baja presión. La naturaleza del producto final se confirma por el análisis espectroscópico de RMN de ^1H (sólido blanco cristalino) descrito en la Figura 1.



En la Figura 1: RMN de ^1H de (3) en CDCl_3 , 400 MHz, δ (ppm): 7,63 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 7,37 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,89-6,84 (m, 2H), 6,26 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 4,24-4,15 (m, 2H), 3,95-3,88 (m, 2H), 3,80-3,66 (m, 6H), 3,26 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H).

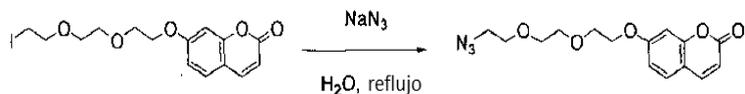
Ejemplo 4: Síntesis de 7-bromometil cumarina (4).

Se introducen 7-metil-cumarina (3,0 g), N-bromosuccinimida (3,34 g) y tetracloruro de carbono (80 ml) en un matraz de dos bocas, equipado con baño de aceite, agitación magnética y refrigerante. Se introduce AIBN (31 mg) con agitación y la mezcla se deja proceder a reflujo (106°C) bajo agitación durante 1 h 30 min. La mezcla se enfría a temperatura ambiente, se elimina el disolvente con un evaporador rotatorio y la bomba mecánica; el residuo se recoge a continuación con agua y la reacción se deja proceder durante 2 h con agitación. La mezcla se filtra a través de un embudo de Gooch y el precipitado se recoge con agua y se deja proceder bajo agitación durante una hora más. La mezcla se filtra a través de un embudo de Gooch y el disolvente se elimina a continuación con una bomba mecánica. Se obtiene el producto deseado y su naturaleza es confirmada por análisis de RMN de ^1H .



Ejemplo 5: Síntesis de 7-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (5).

Se introduce 4,0 g de 7-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (3) (obtenida como se describe en el ejemplo 3), 1,93 g de NaN_3 y 30 ml de agua destilada en un matraz de dos bocas, equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante. La reacción se deja proceder a reflujo bajo agitación durante la noche y después se extrae con CH_2Cl_2 , se seca sobre MgSO_4 y se filtra a través de un embudo de Gooch. El disolvente se elimina a baja presión. El producto se purifica por cromatografía instantánea (eluyente ciclohexano/ AcOEt 2:1). Se obtiene un aceite transparente de color amarillo pálido, cuya naturaleza se confirma por análisis de RMN de ^1H .



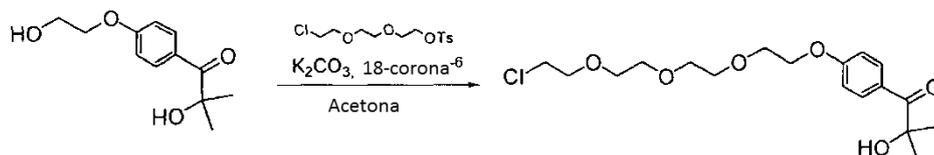
Ejemplo 6: Síntesis de 7-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (6).

Se disuelven 2,02 g de 7-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (5) en 25 ml de THF anhidro en un matraz de dos bocas, equipado con agitación magnética, baño de hielo y flujo de argón. A 0°C se introducen 1,742 g de trifetilfosfina y la reacción se deja reposar a temperatura ambiente, siempre bajo agitación, durante 18 h. Se introducen 3 ml de H_2O destilada y la reacción se deja proceder bajo agitación durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a baja presión, y el producto se purifica a continuación por cromatografía instantánea. La naturaleza del producto obtenido se confirma por análisis de RMN de ^1H . El espectro de RMN de ^1H de (6) en CDCl_3 se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 7: Síntesis de 1-(4-(2-(2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenil)-2-hidroxi-2-metil-1-ona (7).

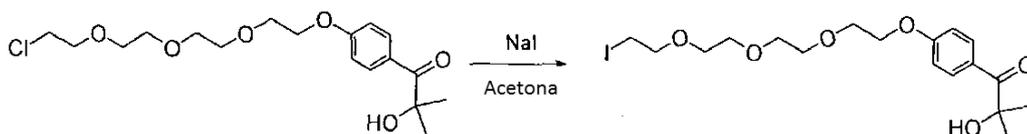
Se introducen 31,2 g de 2-hidroxi-1-(4-(2-(2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenil)-2-metilpropan-1-ona, 400 ml de acetona y 39,0 g de 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etilo, sintetizado como se indica en el ejemplo 1 y recogido con acetona (600 ml), 93,6 g de K_2CO_3 y 18-crown-6 en una cantidad catalítica, en un matraz de dos bocas equipado con agitación mecánica, baño de aceite, refrigerante y flujo de argón. La reacción se deja proceder a reflujo bajo

agitación durante 24 h; la mezcla de reacción enfriada se filtra a continuación a través de un embudo de Gooch con celite y el disolvente se elimina a baja presión. La naturaleza del producto obtenido se confirma por análisis de RMN de ^1H (sólido blanco cristalino).



5 Ejemplo 8: Síntesis de 2-hidroxi-1-(4-(2-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi) etoxi)fenil)-2-metilpropan-1-ona (8).

Se introducen 4,0 g de 1-(4-(2-(2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenil)-2-hidroxi-2-metilpropan-1-ona (7) y acetona (80 ml) en un matraz de dos bocas, equipado con agitación magnética, baño de aceite y refrigerante. A continuación se añade yoduro de sodio (8,35 g) y la mezcla se deja proceder a reflujo bajo agitación durante 48 h. El procesamiento se lleva a cabo dejando enfriar la mezcla, filtrándola a través de un embudo de Gooch y de celite y después eliminando el disolvente a baja presión. La naturaleza del producto final se confirma por análisis espectroscópico de RMN de ^1H (sólido blanco cristalino).



Los fotorreactivos obtenidos como se describe anteriormente se hacen reaccionar con AH de la siguiente manera:

- Ejemplos 9 y 10: umbeliferona-trietilenglicol que se une a AH mediante un éster;
- Ejemplos 11 y 12: umbeliferona que se une a AH con un éster;
- Ejemplos 13 y 14: umbeliferona-trietilenglicol que se une a AH a través de una amida;
- Ejemplo 15: propiofenona-trietilenglicol que se une a AH a través de un éster.

Ejemplo 9: Síntesis de un derivado de éster de AH con 7-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (9) - Funcionalización final 30 %.

En un reactor de vidrio equipado con una camisa de glicol termostatzable y agitación magnética, se disuelven 2,0 g de HATBA en 240 ml de DMSO anhidro y se añade 521 mg de 7-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (3) (521 mg), preparado como se indica en el ejemplo 3. La reacción transcurre durante 48 horas a 40 °C; se añade una solución saturada de NaBr a continuación, con agitación, y la precipitación se efectúa añadiendo gota a gota EtOH. El producto se purifica por lavado en EtOH/H₂O 95:5 y EtOH absoluto, después se seca a alto vacío. El producto así obtenido es analizado por FTIR, RP-HPLC y RMN de ^1H , mostrando una funcionalización del 32 % y un rendimiento del 92 %. La Figura 3 muestra el espectro de FTIR de (9) y la Figura 4 muestra el espectro de RMN de ^1H de (9) (línea A) en comparación con HANa (línea B) en D₂O.

Ejemplo 10: Síntesis de un derivado de éster de AH con 7-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (10) - Funcionalización final 50 %.

En un reactor de vidrio equipado con una camisa de glicol termostatzable y agitación magnética, se disuelve 2,0 g de HATBA en 240 ml de DMSO anhidro y se añade 521 mg de 7-(2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etoxi)-2H-cromen-2-ona (1,0241 g), preparado como se indica en el ejemplo 3. La reacción transcurre durante 48 horas a 40 °C; se añade una solución saturada de NaBr a continuación, con agitación, y la precipitación se efectúa añadiendo gota a gota EtOH. El producto se purifica por lavado en EtOH/H₂O 95:5 y EtOH absoluto, después se seca a alto vacío. El producto así obtenido es analizado por FTIR, RP-HPLC y RMN de ^1H , demostrando una funcionalización de 49 % y un rendimiento de 86 %.

Ejemplo 11 (comparativo): Síntesis de un derivado de éster de AH con 7-(bromometil)-2H-cromen-2-ona (11) - Funcionalización final 40 %.

Se disuelve 2,0 g de HATBA en 240 ml de DMSO en un reactor de vidrio, equipado con camisa de glicol termostatzable y agitación magnética. A continuación se añade 308 g de 7-bromometil-2H-cromen-2-ona (4), preparado como se indica en el ejemplo 4 y la reacción se deja proceder durante 72 horas a 40 °C. Se añade una solución saturada de NaBr con agitación, seguido de precipitación con EtOH al 96 %. El producto se purifica por lavado en EtOH 96 %/H₂O 8:2 y EtOH absoluto. Se obtiene un compuesto blanco en polvo, que se deja secar bajo alto vacío.

la clase (9), después de 10 o 20 minutos de la irradiación, respectivamente. El hinchamiento implica la inmersión de los hidrogeles en agua destilada durante un tiempo determinado y la comparación de los pesos iniciales con el aumento de peso con el tiempo (debido a la absorción de agua). Los valores SW se calculan según la fórmula:

$$SW = \frac{\text{Peso}_{24h} - \text{Peso}_{inicial}}{\text{Peso}_{inicial}}$$

5 La Figura 7 muestra los diagramas relacionados con el grado de hinchamiento de los hidrogeles preparados como se muestra en el Ejemplo 9, obtenidos con los valores de peso registrados. El análisis de los gráficos confirma lo que se ha indicado anteriormente, a saber, que, la concentración en igualdad de condiciones, la duración de la irradiación hace que el hidrogel sea más compacto, por lo que absorbe menos agua, y por el contrario, en igualdad de tiempos de irradiación, la compacidad del hidrogel aumenta con la concentración de la solución de partida.

10 **Ejemplo 18: Preparación de esponjas a partir de soluciones con una concentración conocida de (9).**

Se disuelve 462,3 mg de derivado de éster de AH, obtenido como se describe en el Ejemplo 9, en 23 ml de agua Milli-Q, para obtener una solución con una concentración de 20 mg/ml. Cuando la solubilización se haya completado, la solución se vierte en una bandeja de vidrio circular con un diámetro de 7,7 cm.

15 Liofilización: la bandeja se transfirió a las placas de un liofilizador, las cuales se enfrían a -3 °C. Las placas se mantienen a dicha temperatura durante 4 horas, hasta que la solución alcanza la temperatura de al menos 2 °C. Las placas se enfrían luego a -35 °C, y dicha temperatura se mantiene durante 6 horas, hasta que la solución está completamente congelada. Después de enfriar el condensador a una temperatura de menos de -35 °C, la bomba de vacío se conecta y se deja funcionando hasta que la presión en la cámara alcanza un valor inferior a 1×10^{-1} mbar. 20 Las placas se calientan gradualmente a -5 °C en un período de 2 horas. Cuando se ha alcanzado la temperatura fijada, se mantiene durante 24 horas. Después de ese tiempo, las placas se calentaron a 25 °C, y la temperatura así alcanzado se mantiene durante 6 horas. La muestra obtenida se inserta en una placa de Petri de poliestireno para proteger de la humedad.

Irradiación: la muestra se coloca bajo una lámpara de Wood con un espectro de emisión de entre 330 y 380 nm durante 12 horas. Cada 3 horas la placa se invierte para permitir la irradiación de toda la superficie de la muestra.

25 La esponja así obtenida es uniformemente porosa y carente de laminillas; cuando se sumerge en 30 ml de solución salina durante 24 horas, tanto su forma como su textura se mantienen sin cambios. La esponja se sometió también a una pluralidad de ciclos de apretado y saturación (al menos 4): incluso en esta situación de estrés, la esponja retuvo su forma, estructura, elasticidad y porosidad sin cambios y, por lo tanto, posee memoria de forma.

30 A continuación, la misma esponja se comparó con una similar preparada como se describe en el Ejemplo 18 pero sin irradiar; la esponja no irradiada se desintegró tan pronto como entró en contacto con el agua.

La importancia tanto de los ingredientes como del procedimiento seguido en la presente memoria se confirma además por el hecho de que otra esponja se preparó de acuerdo con el Ejemplo 18, pero invirtiendo las etapas de irradiación y liofilización. Por consiguiente, la solución obtenida se irradió, y el gel resultante se secó por congelación, en condiciones idénticas a las descritas en el Ejemplo 18; la esponja resultante se disuelve cuando se 35 coloca en agua, dando lugar a un gel compacto.

Al igual que en los hidrogeles, las esponjas con memoria de forma obtenidas se compararon con otras similares preparadas a partir de AH unido a umbeliferona mediante un enlace éster, es decir, sin un espaciador, como en el Ejemplo 11.

Ejemplo 19: Preparación de esponjas a partir de soluciones con una concentración conocida de (11).

40 Se disuelve 462,3 mg de derivado de éster de AH, obtenido como se describe en el Ejemplo 11, en 23 ml de agua Milli-Q para obtener una solución a la concentración de 20 mg/ml. Cuando la solubilización se haya completado, la solución se vierte en una bandeja de vidrio circular con un diámetro de 7,7 cm.

45 La solución se somete a liofilización e irradiación, exactamente como en el Ejemplo 18, y la esponja resultante se sumerge en 30 ml de solución salina; esta se disuelve después de un tiempo muy corto en contacto con la solución acuosa.

Como ya se ha indicado para los hidrogeles, también se demostró para las esponjas que sorprendentemente adquieren las propiedades de memoria de forma (estructura, elasticidad y porosidad) solo si se utiliza un espaciador para separar el AH y la umbeliferona, y solo siguiendo el esquema de procedimiento preciso detallado más arriba.

50 **Ejemplo 20: Estudios de hinchamiento de (15) en comparación con un derivado equivalente preparado como se describe en el Ejemplo 2 del documento EP1519962.**

Los ensayos de hinchamiento (SW) se llevaron a cabo en los hidrogeles preparados a partir del compuesto

5 sintetizado como se describe en el ejemplo 15, y a partir del compuesto sintetizado como se describe en el Ejemplo 2 de la patente EP1519962, a la concentración de 30 mg/ml y después de 20 minutos de irradiación. El compuesto sintetizado como se describe en el Ejemplo 2 del documento EP1519962 es un derivado en el que los grupos fotorreticulables de la propiofenona se unen directamente al AH mediante un enlace éster, en un porcentaje similar a (15), es decir, aproximadamente el 50 %.

Mediante la comparación de los pesos iniciales con el aumento de peso debido a la absorción de agua, los valores de SW se calcularon como se describe en el ejemplo 17. La Figura 8 muestra los diagramas obtenidos con los valores de peso registrados con el tiempo.

10 El análisis de la gráfica confirma que, el grado de sustitución en igualdad de condiciones, la presencia del espaciador de trietilenglicol entre el AH y el grupo fotorreticulación produce hidrogeles que absorben menos agua, y por lo tanto son más compactos; la reticulación es por lo tanto más eficiente. El producto obtenido tal como se describe en el Ejemplo 2 del documento EP1519962 ha absorbido casi 50 % más agua que (15) después de solo una hora y esa tendencia continúa en el tiempo. Por tanto, el hidrogel tiene una textura muy diferente de la obtenida usando el espaciador de trietilenglicol entre AH y el grupo de fotorreticulación, como se describe en la presente invención. En ausencia de un espaciador, no se mantienen las características de compacidad, elasticidad y resistencia mecánica capaces de resistir la compresión y corte y la memoria de forma.

Ejemplo 21: Caracterización reológica de los hidrogeles preparados a partir de (9).

20 Las mediciones reológicas se realizaron a 25 °C, en un régimen oscilante; en particular, solo se midió el módulo de elasticidad G' , que expresa la compacidad del hidrogel, y por lo tanto es el parámetro fundamental. G' (módulo de elasticidad) se midió en Pa de 0,07 a 90,0 rad/s, con un valor de fuerza del 10 %. Los valores, obtenidos a partir de muestras gelificadas después de la irradiación con una lámpara UV de baja potencia, se correlacionaron directamente con el porcentaje de reticulación, calculado por análisis de HPLC-MS, suponiendo que el porcentaje de fotopolimerización era nulo en t_0 .

25 Como se verá a partir del diagrama (Figura 9), la tendencia del módulo de elasticidad G' (expresado en Pa a 0628 rad/s), es proporcional a la del grado de reticulación; las soluciones irradiadas durante un tiempo más largo son por lo tanto más reticuladas, y por consiguiente, presentan mejores propiedades elásticas, con mayores valores de G' .

Ejemplo 22: Evaluación de la proliferación celular en cultivos de fibroblastos humanos en presencia de los hidrogeles preparados a partir de (9).

30 El protocolo estándar para la evaluación de la proliferación celular implica el uso del ensayo de MTT. En resumen, dicho ensayo mide cuantitativamente la presencia de actividad succinato deshidrogenasa en células cultivadas; dichas actividades, que están solo presentes en las mitocondrias de células viables, normalmente se utilizan como marcadores para comprobar la actividad metabólica, la viabilidad y por lo tanto el crecimiento de las células cultivadas. El ensayo se basa en la conversión del colorante azolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)bromuro de 2,5 difeniltetrazolio) de amarillo a azul, por la succinato deshidrogenasa. La cantidad de colorante azul (formazán) determinada espectrofotométricamente es proporcional a la presencia de succinato deshidrogenasa en el cultivo celular y, por lo tanto, proporcional al número de células viables.

35 Los fibroblastos humanos (FH), en suspensión en un medio de cultivo adecuado, se sembraron en placas multipocillo de 24 pocillos en presencia de (9) en solución a la concentración de 20 mg/ml o 30 mg/ml, y en concentraciones crecientes (20 , 50, 100 μ l) o, en el caso del control, con solamente el medio. Las células (FH) se incubaron con una solución de 0,5 mg/ml de MTT durante 3 horas a 37 °C. Al final de la incubación, el colorante se extrae de los FH con una solución de extracción (90 % de isopropanol, 10 % de DMSO) y se lee a la longitud de onda de 570 nm (DO, densidad óptica).

Los valores de DO a 570 nm se detectan después de 24 h (Figura 10).

45 La Figura 10 muestra que las soluciones de derivado de AH preparadas de este modo no son tóxicas, incluso en cantidades gradualmente crecientes, y mantienen la viabilidad celular.

Ejemplo 23: Evaluación de la proliferación de fibroblastos humanos en las esponjas preparadas como se describe en el Ejemplo 19.

50 Se sembraron suspensiones de fibroblastos humanos (FH) en esponjas preparadas como se describe en el ejemplo 19 y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Una hora después de la siembra, se depositó 1 ml de medio de cultivo; el ensayo de MTT se llevó a cabo después de 3 y 7 días de cultivo (Figura 11).

El control consistió en una cantidad igual de FH sembrados en placas multipocillo de 24 pocillos y se trataron con solo el medio de cultivo.

Como puede verse de la tabla (Figura 11), los fibroblastos humanos sembrados sobre las esponjas están vivos, son viables y proliferan después de 3 y 7 días de cultivo. Su viabilidad es tal como para inducir mayor proliferación que la

del control; la proliferación es mejor en términos de porcentaje después de 3 días, pero también considerable después de 7 días. Estos resultados demuestran claramente que las esponjas preparadas como se describe en la presente invención no solo no poseen toxicidad para las células, sino que en realidad promueven la proliferación celular. Debe tenerse en cuenta que durante la siembra en esponjas y posterior transferencia a los pocillos, se pierde un número de células, por lo que los valores de proliferación mostrados en la Figura 11 son aún más sorprendentes.

Ejemplo 24: Preparación de hidrogeles derivados de soluciones de (9), con la adición de colágeno en la relación p/p de 1:1.

Se disuelve 600 mg de derivado de éster de AH, obtenido como se describe en el Ejemplo 9, en 20 ml de solución salina para obtener una solución a la concentración de 30 mg/ml. Después de finalizada la solubilización, el pH se ajusta a valores débilmente ácidos (pH=4) mediante la adición gradual de HCl 0,05 M en un baño de hielo. A continuación se añade 10 ml de solución ácida de colágeno de tendón equino, pre-preparada a una concentración de 60 mg/ml. Después de finalizada la mezcla, la solución se microfiltra a través de un filtro de 0,2 µm, en un recipiente y se irradia durante un tiempo t que varía entre 3 y 15 minutos con un haz de luz que tiene una longitud de onda de 300-380 nm a temperatura ambiente.

Se obtiene un hidrogel compacto capaz de mantener su forma después del corte o la manipulación.

Ejemplo 25: Preparación de esponjas a partir de soluciones con una concentración conocida de (9), con la adición de colágeno en la relación p/p de 1:1.

Se disuelve 400,0 mg de derivado de éster de AH, obtenido como se describe en el Ejemplo 9, en 20 ml de agua Milli-Q para obtener una solución a la concentración de 20 mg/ml. Después de finalizada la solubilización, el pH se ajusta a valores débilmente ácidos (pH=4) mediante la adición gradual de HCl 0,05 M en un baño de hielo. A continuación se añade 10 ml de solución ácida de colágeno de tendón equino, pre-preparada a una concentración de 40 mg/ml. Después de finalizada la mezcla, la solución se microfiltra a través de un filtro de 0,2 µm y se vierte en una bandeja de vidrio circular con un diámetro de 5,0 cm.

La solución se liofiliza y se irradia como se describe en el Ejemplo 19. La esponja resultante, sumergida en 30 ml de solución salina, no se disuelve ni se desintegra, incluso después de un prolongado contacto (72 a 96 h) con la solución acuosa y posee propiedades de memoria de forma similares a las de las esponjas descritas en el Ejemplo 20.

Ejemplo 26: Preparación de esponjas a partir de soluciones con una concentración conocida de (9), con la adición de colágeno en la relación p/p de 1:4.

Se disuelve 400,0 mg de derivado de éster de AH, obtenido como se describe en el Ejemplo 9, en 20 ml de agua Milli-Q para obtener una solución a la concentración de 20 mg/ml. Después de finalizada la solubilización, el pH se ajusta a valores débilmente ácidos (pH=4) mediante la adición gradual de HCl 0,05 M en un baño de hielo. A continuación se añade 10 ml de solución ácida de colágeno de tendón equino, pre-preparada a una concentración de 160 mg/ml. Después de finalizada la mezcla, la solución se microfiltra a través de un filtro de 0,2 µm y se vierte en una bandeja de vidrio circular con un diámetro de 5,0 cm.

La solución se liofiliza y se irradia como se describe en el Ejemplo 19. La esponja resultante, sumergida en 30 ml de solución salina, no se disuelve ni se desintegra, incluso después de un prolongado contacto (72-96 h) con la solución acuosa.

La esponja conserva la memoria de forma de las esponjas descritas en el Ejemplo 20, conservando su estructura y elasticidad incluso después de tensiones mecánicas. En vista de los factores descritos y demostrados en el presente documento, el solicitante tiene la intención de reivindicar hidrogeles y esponjas, ambos con memoria de forma, que consisten en umbeliferona o propiofenona unido a PEG a través de un enlace éter y el producto resultante, unido a su vez al ácido hialurónico a través de un enlace éster o amida; también tienen la intención de reivindicar el procedimiento de preparación del hidrogel que implica la solubilización de los compuestos y la posterior irradiación de las soluciones obtenidas y el procedimiento de preparación de las esponjas que implica la solubilización de los compuestos de partida, la liofilización de las soluciones y la posterior irradiación. Tanto los hidrogeles como las esponjas son adecuados para su uso en los campos médico, cosmético y dermocosmético, ya sea utilizados solos o en combinación con sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas o con las células. En particular, ambos son adecuados para su uso en las siguientes aplicaciones específicas:

- tratamiento intra-articular de la artrosis y del daño del cartílago,
- liberación de principios activos,
- revestimiento de objetos de uso médico,
- relleno de tejidos blandos,
- en la prevención de adherencias postoperatorias y el relleno de lesiones cavitadas profundas después de la cirugía.

REIVINDICACIONES

1. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico (AH) que consisten en AH, un espaciador bifuncional de polietilenglicol (PEG), que es trietilenglicol, y un compuesto fotorreactivo seleccionado de derivados de cumarina.
- 5 2. Derivados de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el derivado de cumarina se selecciona de umbeliferona, esculetina, escopoletina, psoralenos, furanocumarina y dicumarol, y es preferentemente umbeliferona.
3. Derivados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el enlace entre el compuesto fotorreactivo y el espaciador bifuncional es un enlace de éter.
4. Derivados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el enlace entre el espaciador bifuncional y el AH es un enlace éster o amida.
- 10 5. Derivados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el AH tiene un PM promedio en peso de entre 40 kDa y 700 kDa, preferentemente entre 160 y 220 kDa.
6. Derivados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la forma de hidrogeles con memoria de forma o esponjas con memoria de forma.
- 15 7. Derivados de acuerdo con la reivindicación 6, que comprenden también sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas, tales como factores tróficos, antibióticos, fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, proteínas, péptidos, hormonas, extractos de plaquetas o células diferenciadas y/o no diferenciadas.
8. Derivados según la reivindicación 6, que también contienen colágeno, preferentemente colágeno nativo y/o hidrolizado.
- 20 9. Solución isotónica reticulable que comprende ácido hialurónico (AH), un espaciador bifuncional de polietilenglicol (PEG), que es trietilenglicol, y un compuesto fotorreactivo seleccionado de derivados de cumarina, en la que el enlace entre el espaciador bifuncional y el AH es un enlace éster o amida y en la que el enlace entre el compuesto fotorreactivo y el espaciador bifuncional es un enlace éter.
10. Procedimiento de preparación de derivados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la forma de hidrogeles con memoria de forma, que comprende las etapas siguientes:
 - 25 a. formar un enlace éter entre el trietilenglicol y el derivado de cumarina;
 - b. formar un enlace éster o amida entre el producto obtenido en la etapa a) y el AH, con un grado de derivatización final del AH que varía de 5 a 80 % en moles en el caso del enlace éster y con un grado de derivatización final del AH que varía de 1 a 50 % en moles en el caso del enlace amida;
 - 30 c. solubilizar el producto obtenido en la etapa b) e irradiar la solución acuosa isotónica resultante con luz UV a una longitud de onda de entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 horas.
11. Procedimiento de preparación de derivados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la forma de esponjas con memoria de forma, que comprende las etapas siguientes:
 - 35 a. formar un enlace éter entre el trietilenglicol y el derivado de cumarina;
 - b. formar un enlace éster o amida entre el producto obtenido en la etapa a) y el AH, con un grado de derivatización final del AH que varía de 5 a 80 % en moles en el caso del enlace éster y con un grado de derivatización final del AH que varía de 1 a 50 % en moles en el caso del enlace amida;
 - b') solubilizar el producto obtenido en la etapa b) en una solución acuosa isotónica y liofilizar la solución acuosa isotónica así obtenida;
 - 40 c. irradiar el producto liofilizado obtenido en la etapa b') con luz UV a una longitud de onda de entre 300 y 450 nm, preferentemente entre 320 y 380 nm, durante un tiempo de entre 1 minuto y 24 horas.
12. Procedimiento de preparación de derivados según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, que incluye además la etapa de adición de colágeno antes de la etapa de irradiación del AH.
- 45 13. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico en la forma de hidrogeles con memoria de forma de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento intra-articular de la artrosis y el daño del cartílago.
14. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico en la forma de hidrogeles con memoria de forma de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 para su uso en la liberación de principios activos, revestimiento de objetos de uso médico, relleno de tejidos blandos y prevención de adherencias postquirúrgicas.
- 50 15. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico en la forma de hidrogeles con memoria de forma como se reivindica en las reivindicaciones 1-8, para su uso en el llenado de lesiones postoperatorias cavitadas profundas.

16. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico en la forma de esponjas con memoria de forma de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento intra-articular de la artrosis y el daño del cartílago.

5 17. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico en la forma de esponjas con memoria de forma, de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, para su uso en la liberación de principios activos, revestimiento de objetos de uso médico, relleno de tejidos blandos y prevención de adherencias post-quirúrgicas.

18. Derivados fotorreticulados del ácido hialurónico en la forma de esponjas con memoria de forma como se reivindica en las reivindicaciones 1-8, para su uso en el relleno de lesiones postoperatorias cavitadas profundas.

19. Dispositivo médico que comprende al menos un derivado fotorreticulado acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10

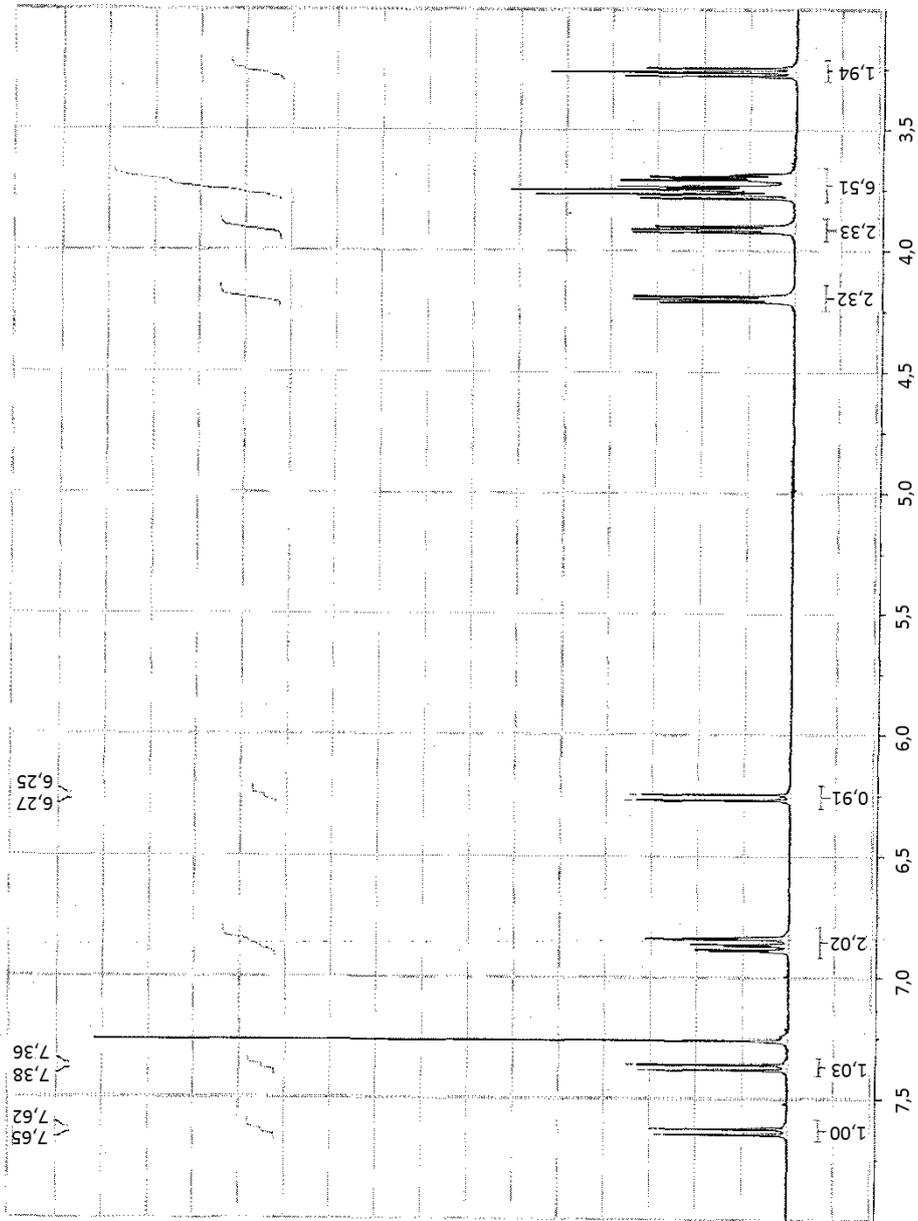


FIGURA 1

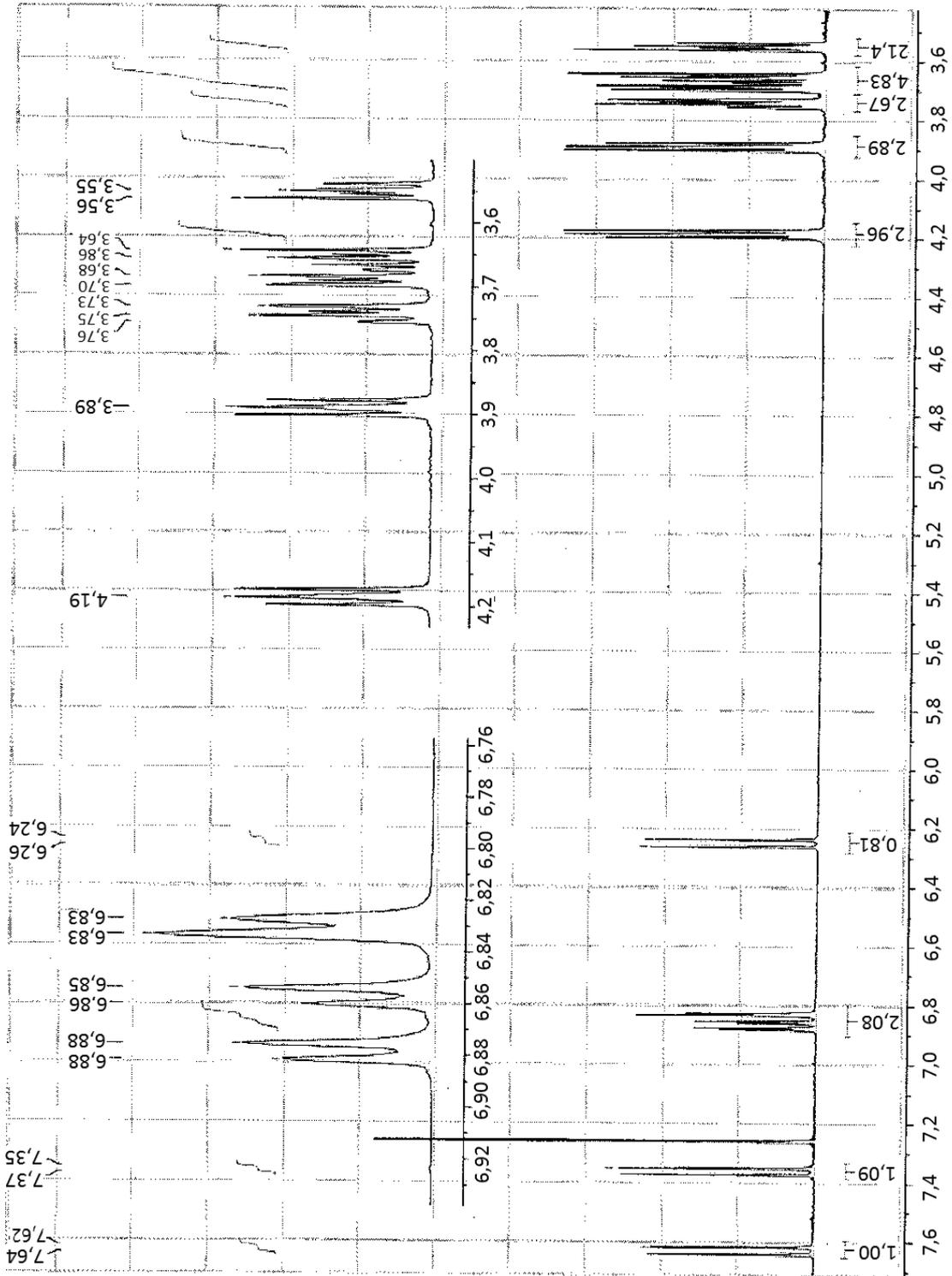


FIGURA 2

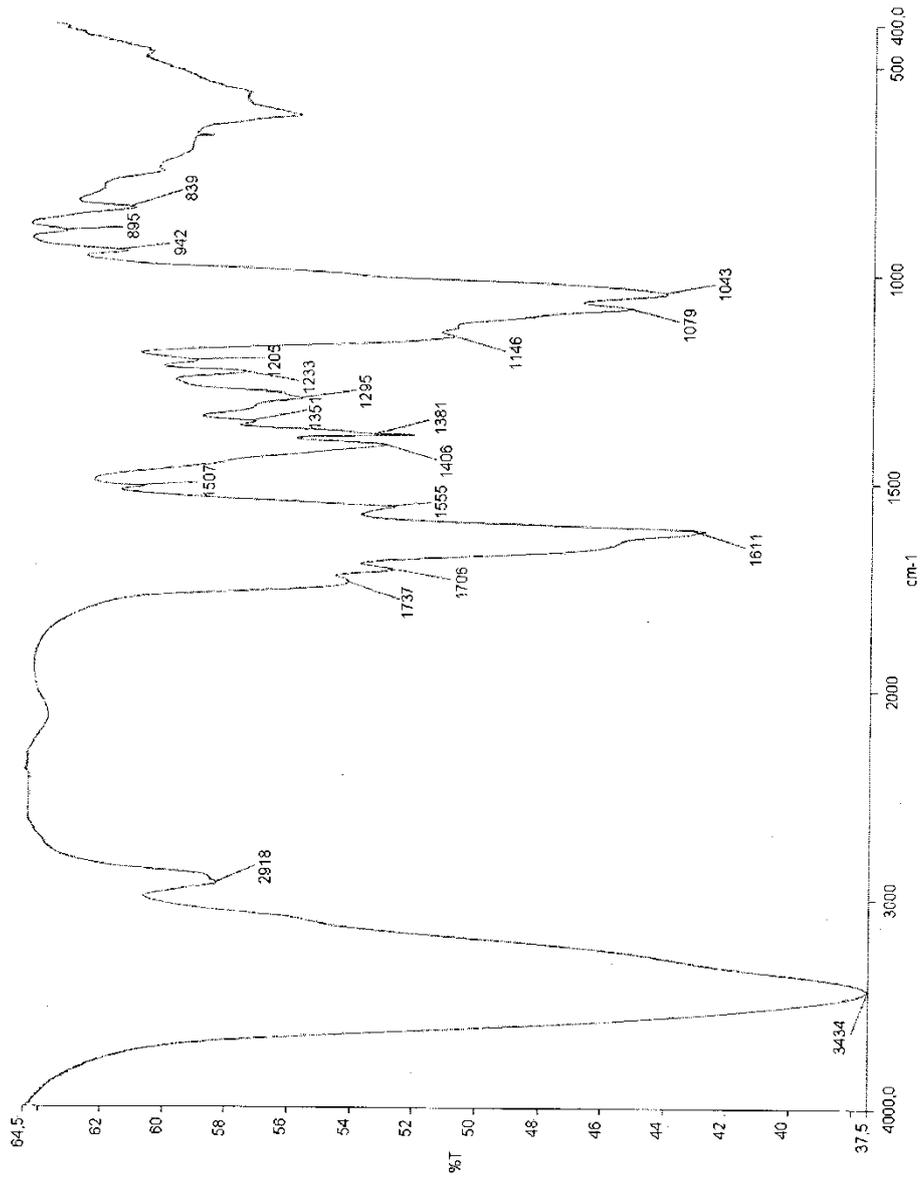


FIGURA 3

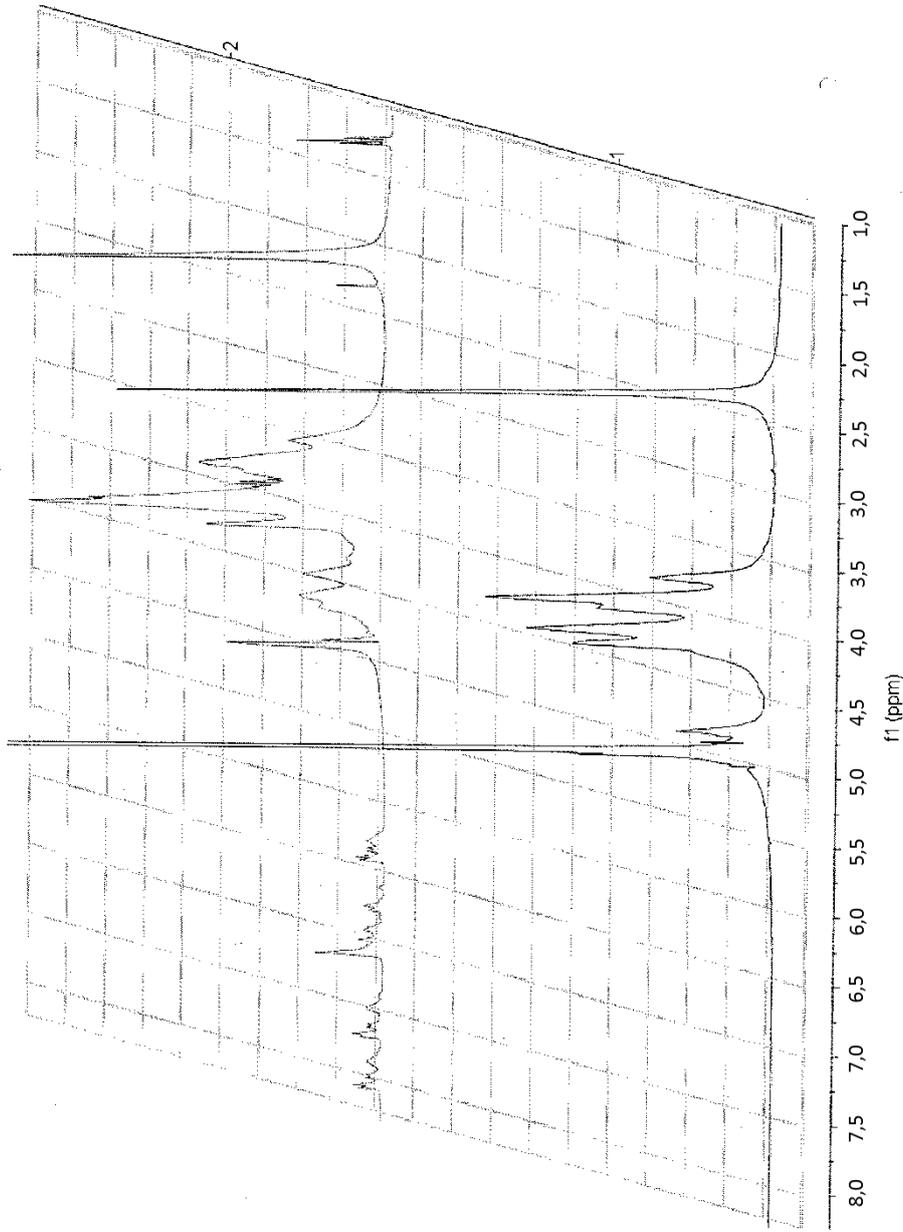


FIGURA 4

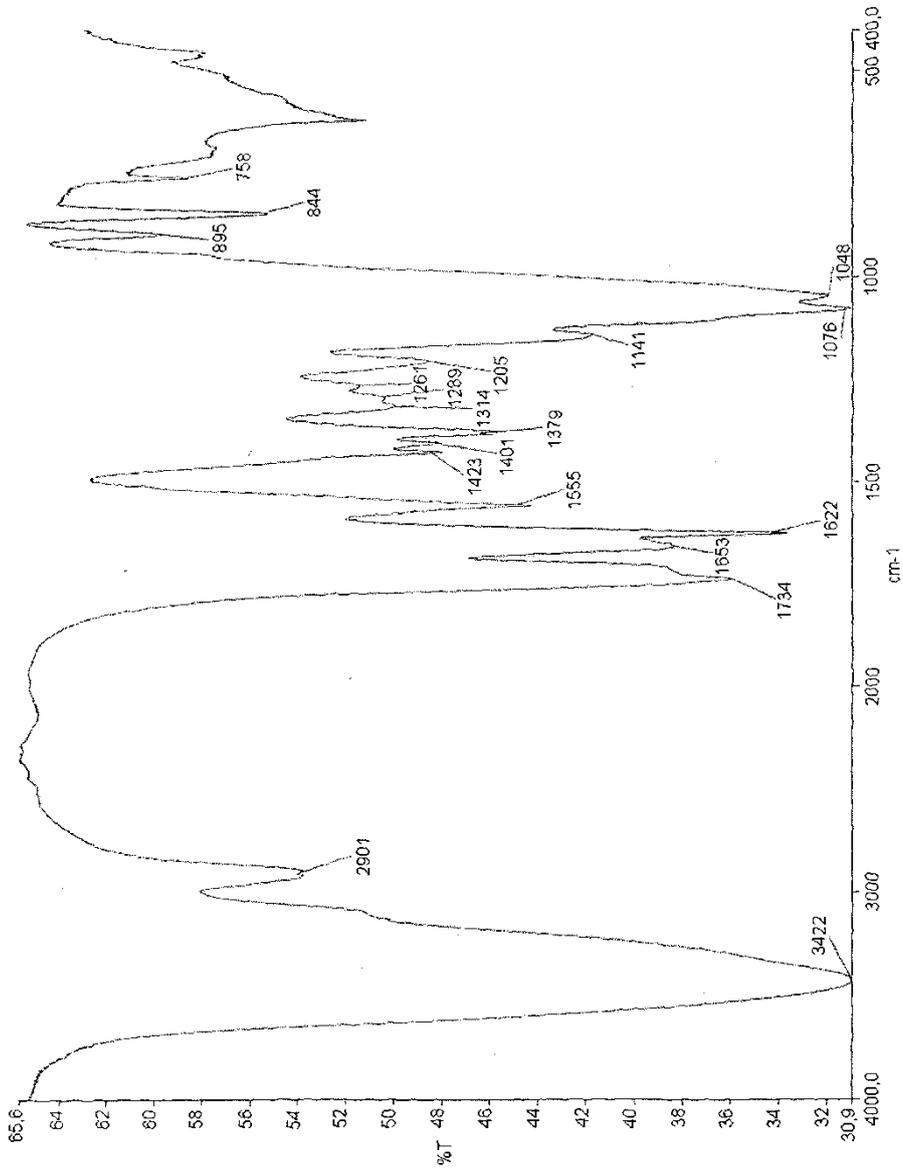


FIGURA 5

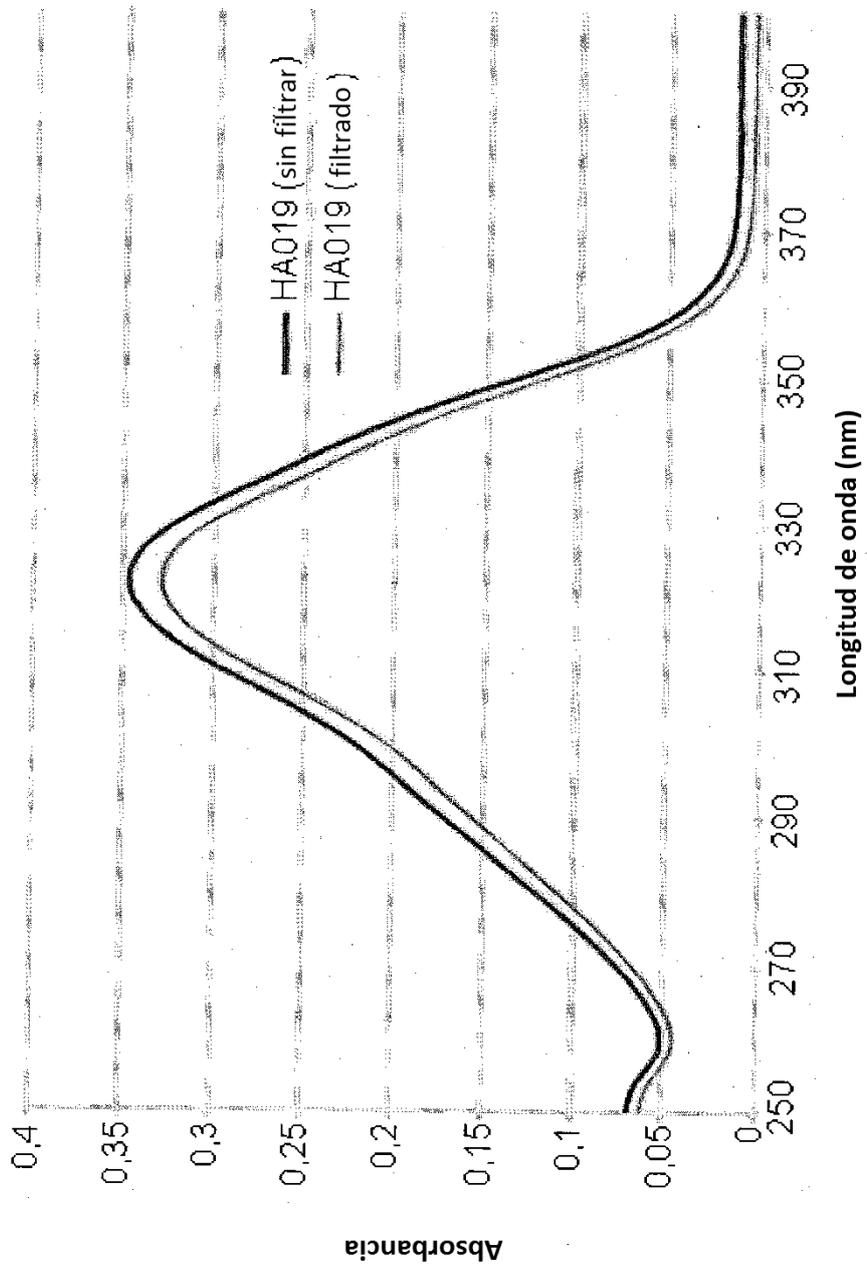


FIGURA 6

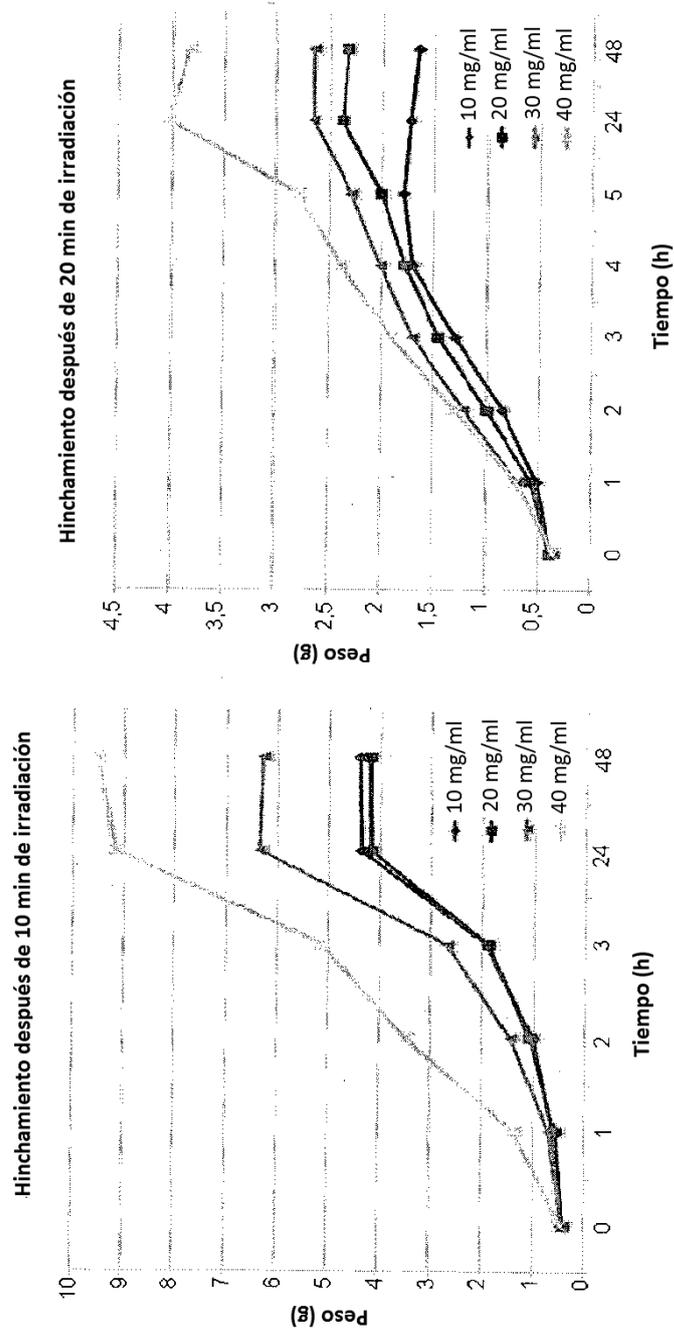


FIGURA 7

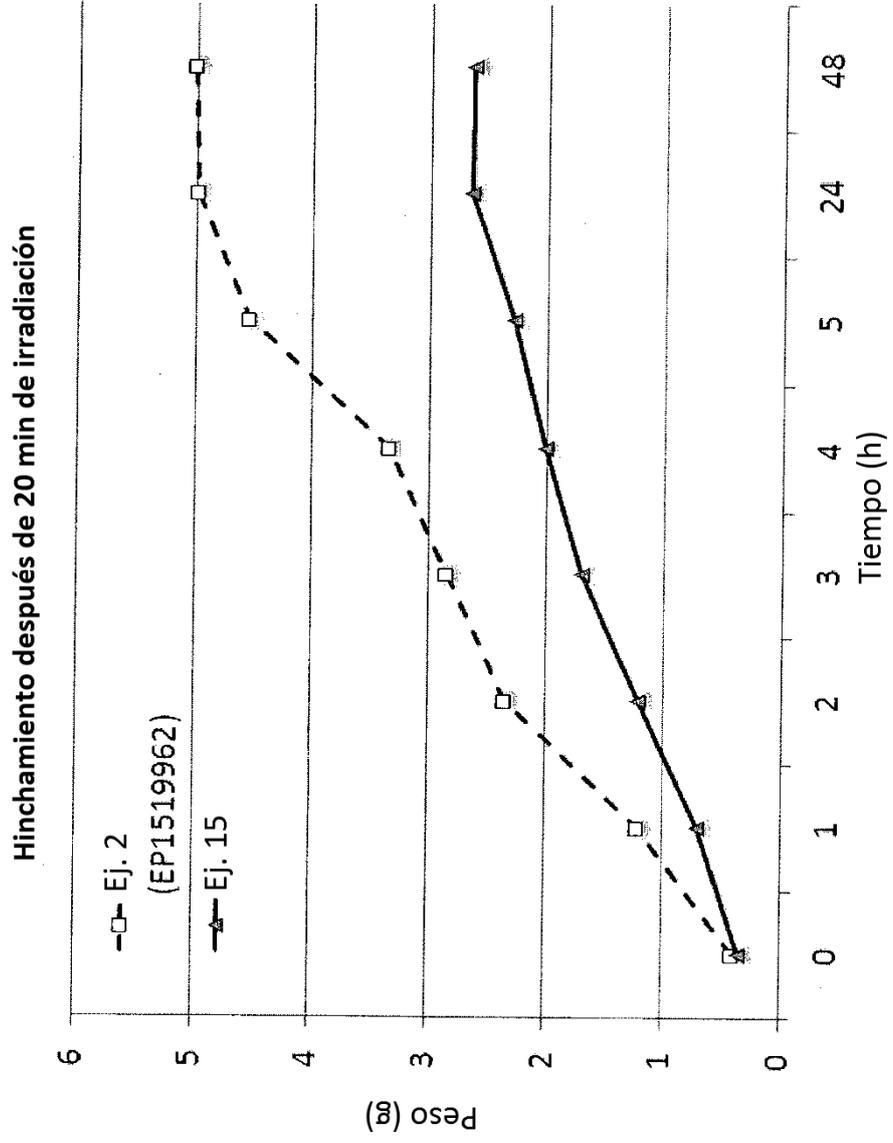


FIGURA 8 : Grado de hinchamiento de los hidrogeles preparados como en el Ejemplo 15 de la presente patente y el Ejemplo 2 de la patente EP1519962

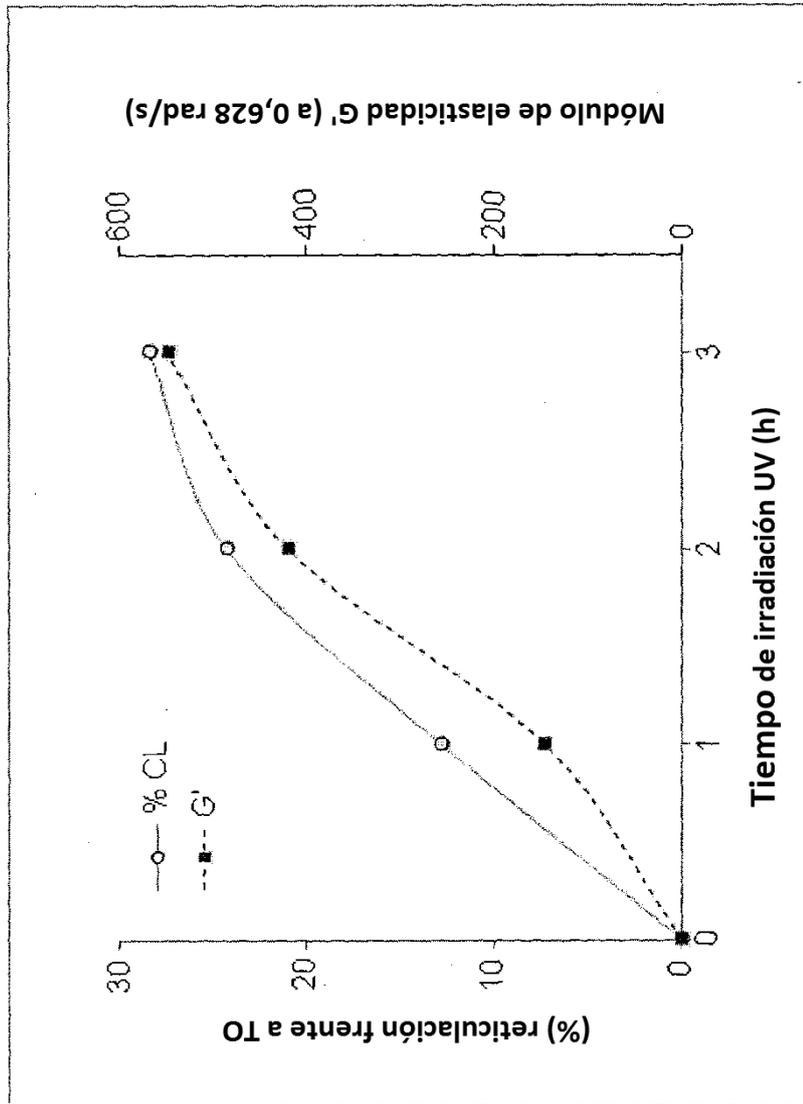


FIGURA 9: (1) Reticulación (% CL) v (2) G' de acuerdo con el tiempo de irradiación de (9)

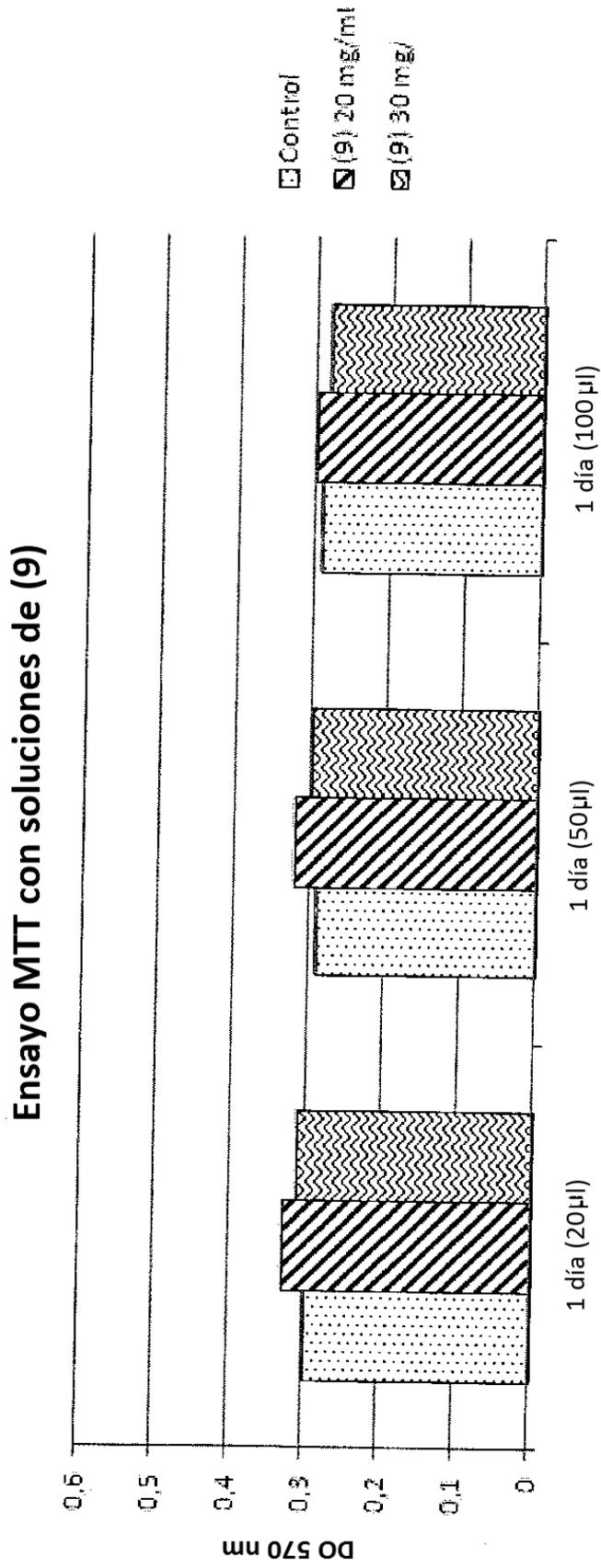


FIGURA 10: Ensayo MTT con soluciones de (9) después de un día de incubación con FH

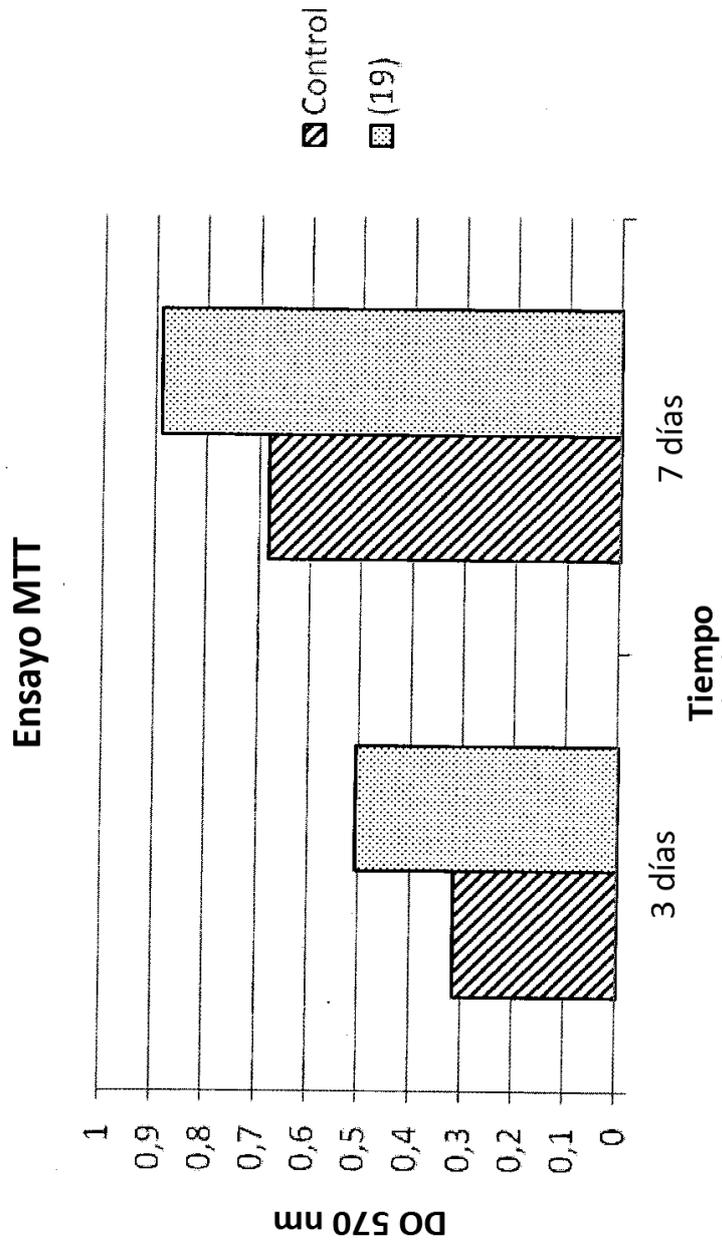


FIGURA 11: Ensayo MTT de FH sembrados en una esponja preparada como en el ejemplo 19.