

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 486**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**C07F 7/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2011 PCT/EP2011/050981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11089267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2011 E 11701110 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2529226**

54 Título: **Biomoléculas sililadas**

30 Prioridad:

**25.01.2010 EP 10305079**

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

**28.07.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (25.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR;**

**UNIVERSITE DE NANTES (25.0%);**

**CHU NANTES (25.0%) y**

**INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR**

**L'EXPLOITATION DE LA MER - IFREMER (25.0%)**

72 Inventor/es:

**WEISS, PIERRE;**

**GUICHEUX, JÉROME;**

**REDERSTORFF, EMILIE;**

**LAIB, SAMIA y**

**RETHORE, GILDAS**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 627 486 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

Biomoléculas sililadas

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de sililación de biomoléculas para la preparación de hidrogeles.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 [0002] El desarrollo de técnicas quirúrgicas lo menos invasivas posible es una necesidad actual en la medicina regenerativa para reducir la morbilidad y la duración del tiempo de hospitalización. En este sentido, es necesario el desarrollo de nuevas matrices inyectables. Estas matrices deberían ser capaces de endurecer, una vez implantadas, para adquirir la forma deseada y deberían presentar propiedades mecánicas similares a las del tejido al que se van a fijar.

15

- [0003] Los hidrogeles se utilizan en muchos campos, concretamente como sustitutos de tejidos, por ejemplo, sustitutos del hueso, o para cirugía oftalmológica. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de hidrogeles que presenten propiedades interesantes en términos de inyectabilidad, autoendurecimiento y estabilidad.

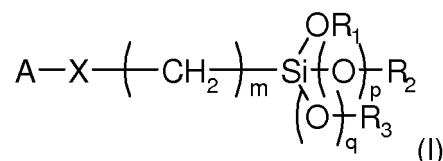
- 20 [0004] En este sentido, Bourges et al. (Advances in Colloid and Interface Science 99, 215-228, 2002) describen la preparación de un hidrogel hecho de éter de celulosa hidrosoluble sililada (HPMC). Más concretamente, la HPMC sililada se sintetizó por reacción de la HPMC con 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS). A continuación, se preparó un hidrogel mediante introducción de la HPMC sililada en un medio básico y neutralización posterior. Sin embargo, este método es un procedimiento de tres etapas (premezcla de HPMC y NaOH, reacción con GPTMS y  
25 enfriamiento rápido de la reacción con ácido acético) y requiere una alta temperatura de reacción (80-100 °C).

- [0005] Sin embargo, las células no se adhieren bien a un hidrogel a base de HPMC sililada. Por lo tanto, dicho hidrogel no es adecuado para células que requieren adhesión para su crecimiento. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos hidrogeles que puedan ser usados para todo tipo de células, en particular, hidrogeles a base  
30 de una biomolécula distinta de la HPMC. Sin embargo, la mayoría de las biomoléculas son sensibles a la temperatura y se destruirían o desnaturarían con el uso del procedimiento a base de GPTMS descrito anteriormente, que requiere una temperatura de reacción elevada. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de otras biomoléculas sililadas que permitan la producción de hidrogeles.

## 35 Resumen de la invención

- [0006] En el presente documento se describen biomoléculas sililadas útiles para la preparación de un hidrogel.

- 40 [0007] Según un primer aspecto, se describe una biomolécula sililada que tiene la fórmula (I) siguiente:



donde:

45

- A es una biomolécula seleccionada de entre una proteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, pectina, quitosano, ácido hialurónico y un glicolípido,
- m es un número entero que varía de 1 a 6,
- p y q son independientemente 0 o 1,
- 50 - X es un grupo seleccionado de entre -NHCONH-, -OCONH- y -CONH-, y
- R1, R2 y R3 representan independientemente cada uno un grupo alquilo C1-C6.

- [0008] Según un segundo aspecto, se describe el procedimiento de preparación de dicha biomolécula sililada.

**[0009]** Según un tercer aspecto, se describe el uso de una biomolécula sililada para funcionalizar la superficie de un soporte.

5 **[0010]** Según un cuarto aspecto, la invención se ocupa de un procedimiento de preparación de un hidrogel que comprende las etapas de:

- 10 a) poner en contacto una biomolécula sililada, tal y como se define en el presente documento, con una base o un ácido en un medio acuoso;
- b) ajustar el pH del medio acuoso de la etapa a) a un pH de entre 3,5 y 12,4, en el cual las biomoléculas sililadas autocondensan por formación de enlaces covalentes -Si-O-Si- y, opcionalmente, recuperar el hidrogel.

15 **[0011]** Según un quinto aspecto, la invención se refiere al hidrogel obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

**[0012]** Según un sexto aspecto, la invención se ocupa del hidrogel como sustituto de un tejido biológico.

20 **[0013]** Según un séptimo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un hidrogel como el descrito anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0014]** Según un octavo aspecto, la invención se ocupa de dicha composición para la liberación de principio activo.

## 25 Descripción detallada de la invención

**[0015]** Estos y otros objetivos, características y ventajas de la invención se describirán en la descripción detallada siguiente.

30 **[0016]** Tal y como se ha utilizado anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, los términos siguientes, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los significados siguientes:

35 **[0017]** Tal y como se usa en el presente documento, el término "sililación" significa introducción de una función sililo en dicha biomolécula, más concretamente una función alcoxisilano.

**[0018]** Tal y como se usa en el presente documento, y excepto si se define de otra manera, el término "biomolécula" significa cualquier molécula orgánica que es producida por un organismo vivo o que es un derivado de la misma, incluyendo moléculas poliméricas grandes tales como proteínas (naturales o sintéticas), polisacáridos (naturales o sintéticos) y ácidos nucleicos, así como moléculas pequeñas tales como metabolitos primarios, 40 metabolitos secundarios y productos naturales. Como ejemplos de biomoléculas, cabe hacer mención a:

- derivados de lípidos tales como fosfolípidos, glicolípidos y esteroides, mensajeros químicos tales como hormonas y neurotransmisores,
- vitaminas,
- 45 - derivados del azúcar tales como carbohidratos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (celulosa incluida),
- proteínas (dichas proteínas contienen aminoácidos naturales y/o no estándar),
- derivados de nucleótidos tales como nucleótidos y polímeros biológicos tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN),
- 50 - biopolímeros tales como lignina, proteínas, ADN, ARN, oligosacáridos y polisacáridos.

**[0019]** Preferentemente, la biomolécula es un polisacárido o una proteína.

55 **[0020]** Tal y como se usa en el presente documento, el término "polisacárido" significa un polímero formado por muchos monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos. Se incluyen los polisacáridos naturales y sintéticos. Ejemplos de polisacáridos son la celulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la hidroxietilcelulosa (HEC), la carboximetilcelulosa (CMC), la pectina, el quitosano y el ácido hialurónico.

**[0021]** Tal y como se usa en el presente documento, el término "proteína" significa un polímero hecho de

aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos mediante enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. Se incluyen las glicoproteínas y las proteínas que contienen aminoácidos naturales y/o no estándar. La albúmina, laminina, gelatina, fibronectina, vitronectina y el colágeno son ejemplos de proteínas.

5

**[0022]** Tal y como se usa en el presente documento, el término "péptido" significa también un polímero hecho de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. Se incluyen los péptidos que contienen aminoácidos naturales y/o no estándar. Generalmente, los péptidos contienen menos de 50 aminoácidos, mientras que las proteínas contienen

10

**[0023]** Tal y como se usa en el presente documento, un alquilo es una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono.

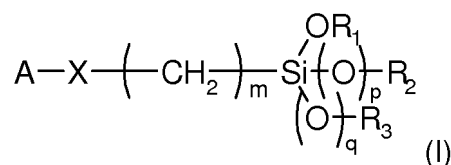
15 **[0024]**

Tal y como se usa en el presente documento, el término "hidrogel" significa una red de cadenas poliméricas que son insolubles en agua, en las cuales el agua es el medio de dispersión.

**[0025]** Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "medio acuoso" significa un medio donde el agua es el solvente principal.

20

**[0026]** Según un primer aspecto, se describe una biomolécula sililada que tiene la fórmula (I) siguiente:



25 donde:

- A es una biomolécula seleccionada de entre una proteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, pectina, quitosano, ácido hialurónico y un glicolípido,
- m es un número entero que varía de 1 a 6,
- p y q son independientemente 0 o 1,
- X es un grupo seleccionado de entre -NHCONH-, -OCONH- y -CONH-, y
- R1, R2 y R3 representan independientemente cada uno un grupo alquilo C1-C6.

30

**[0027]** En una realización, A de la biomolécula sililada se selecciona de entre un oligopéptido, una proteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, pectina, ácido hialurónico y un glicolípido. De hecho, estas biomoléculas son sensibles a la temperatura.

35

**[0028]** En una realización preferida, A de la biomolécula sililada se selecciona de entre el grupo ácido hialurónico, pectina, colágeno, gelatina y quitosano.

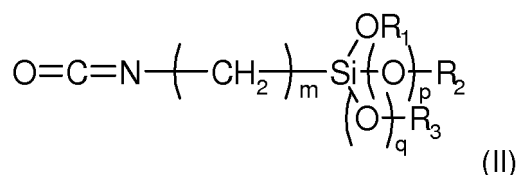
40

**[0029]** Según un segundo aspecto, se describe un procedimiento de preparación de una biomolécula sililada como la descrita anteriormente. En el presente documento se describen dos procedimientos, dependiendo de si la biomolécula usada como material de partida lleva una función amina o una función alcohol por una parte (procedimiento 1), o una función ácido carboxílico por otra parte (procedimiento 2).

45

**[0030]** Se describe un procedimiento 1 de preparación de una biomolécula sililada de fórmula (I) como la descrita anteriormente, que comprende la etapa de hacer reaccionar una biomolécula que lleva una función amina o alcohol, preferentemente seleccionada de entre una proteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, pectina, quitosano, ácido hialurónico y un glicolípido con un agente de sililación que tiene la fórmula (II) siguiente:

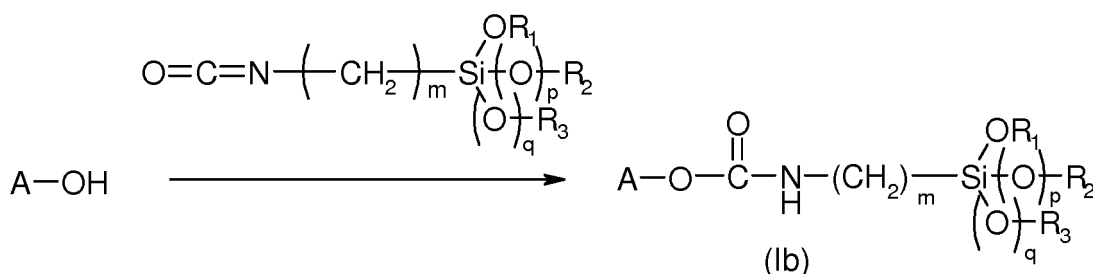
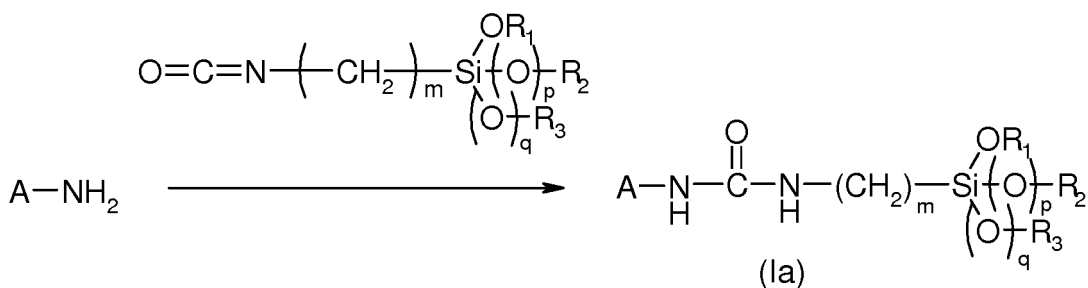
50



donde:

- 5
- m es un número entero que varía de 1 a 6,
  - p y q son independientemente 0 o 1 y
  - R1, R2 y R3 representan independientemente cada uno un grupo alquilo C1-C6.

10 **[0031]** Las biomoléculas sililadas de fórmula (I), donde X es un grupo -NHCONH- o -OCONH-, se obtienen mediante el procedimiento 1. Durante el procedimiento, la función amina o alcohol de la biomolécula reaccionan con la función isocianato del agente de sililación de fórmula (II), llevando a la formación de un enlace urea (-NHCONH-) (si la biomolécula lleva una función amina) o un enlace carbamato (-OCONH-) (si la biomolécula lleva una función alcohol) según el esquema siguiente:



20 **[0032]** En una realización del procedimiento 1, la biomolécula lleva una función alcohol y se selecciona preferentemente de entre un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, pectina, quitosano, ácido hialurónico, un glicolípido y, opcionalmente, una proteína, donde dicha proteína comprende un grupo (por ejemplo, un aminoácido) que lleva una función alcohol.

25 **[0033]** En otra realización del procedimiento 1, la biomolécula lleva una función amina y se selecciona preferentemente de entre una proteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico y quitosano. La biomolécula usada en el procedimiento también puede llevar tanto una función alcohol como una función amina, por ejemplo cuando la molécula es el quitosano.

30 **[0034]** En una realización preferida del procedimiento 1, el agente de sililación usado en el procedimiento es el 3-isocianatopropiltrietoxisilano.

**[0035]** Preferentemente, cuando la molécula lleva funciones amina, parte de dichas funciones amina no están protonadas en el medio de reacción. De hecho, el par solitario de la amina tiene que estar disponible para atacar a la función isocianato.

35

**[0036]** La temperatura de la reacción del procedimiento 1 no es crítica y puede variar en un amplio rango.

Generalmente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura de -15 °C a 40 °C, preferentemente de 0 °C a 30 °C, más preferentemente de 15 °C a 25 °C, lo cual es ventajoso, ya que no se produce desnaturalización de la biomolécula. Preferentemente, el procedimiento 1 se lleva a cabo en atmósfera inerte, por ejemplo, de argón o nitrógeno.

5

**[0037]** Normalmente, el tiempo de reacción es de una hora a una semana, preferentemente de doce horas a cinco días, más preferentemente de uno a tres días.

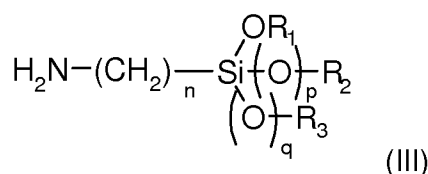
**[0038]** Generalmente, el procedimiento 1 se lleva a cabo en un solvente. No hay ninguna restricción particular sobre la naturaleza del solvente que se debe usar, siempre y cuando no tenga un efecto adverso sobre la reacción o sobre los reactivos implicados. Se prefieren solventes orgánicos o mezclas de solventes orgánicos con una solución acuosa, habitualmente agua. Entre los ejemplos de solventes orgánicos adecuados se incluyen, entre otros, el acetonitrilo, la acetona, la dimetilformamida y el dimetilsulfóxido.

**[0039]** En una realización, el procedimiento 1 se lleva a cabo en un solvente anhidro, tal como acetonitrilo anhidro, acetona anhidra, dimetilformamida anhidra o dimetilsulfóxido anhidro, y en presencia de una base, preferentemente una base orgánica, normalmente una base orgánica que contiene un átomo de nitrógeno que se puede protonar, por ejemplo, trietilamina, piridina o trimetilamina.

**[0040]** En otra realización, el procedimiento 1 se lleva a cabo en una mezcla que comprende una solución acuosa y un solvente miscible en agua, tal como acetonitrilo, acetona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido. La mezcla es preferentemente una mezcla de agua y dimetilsulfóxido. No se requiere ninguna base para esta realización.

**[0041]** En el presente documento se describe un segundo procedimiento, cuando la biomolécula usada como material de partida lleva una función ácido carboxílico o carboxilato (procedimiento 2). Por tanto, se describe un procedimiento de preparación de una biomolécula siliilada de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas que consisten en:

a) hacer reaccionar una biomolécula que lleva una función ácido carboxílico o carboxilato, seleccionada preferentemente de entre una proteína, pectina y ácido hialurónico con clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC.HCl) o con 1,1'- carbonildiimidazol (CDI) y, a continuación,  
b) añadir al medio de reacción obtenido en la etapa a) un agente de sililación que tiene la fórmula (III) siguiente:



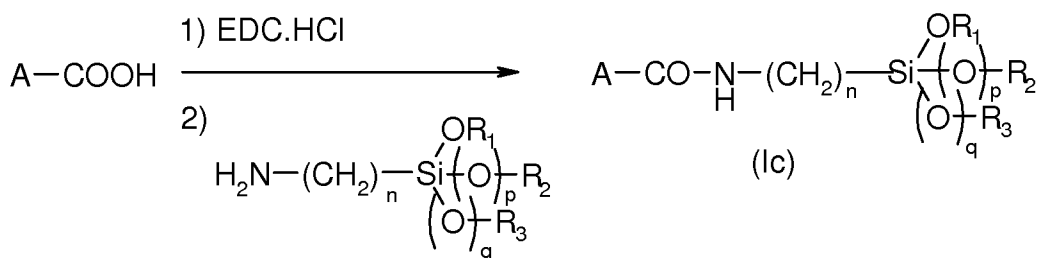
35

donde,

- n es un número entero que varía de 1 a 6,
- p y q son independientemente 0 o 1 y
- R1, R2 y R3 representan independientemente cada uno un grupo alquilo C1-C6.

**[0042]** Las biomoléculas siliiladas de fórmula (I), donde X es un grupo -CONH-, se obtienen mediante el procedimiento 2. Durante el procedimiento 2, la función carboxílica de la biomolécula se activa con EDC.HCl en la etapa a) y, a continuación, reacciona con la función amina del agente de sililación de fórmula (III), llevando a la formación de un enlace amida (-CONH-) según el esquema siguiente:

45



**[0043]** Las biomoléculas preferidas para su uso como material de partida en la etapa a) del procedimiento 2 son un oligopéptido, una proteína, pectina y ácido hialurónico.

5

**[0044]** La etapa a) del procedimiento 2 se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador, tal como N-hidroxisuccinimida.

**[0045]** El agente de sililación usado en la etapa b) del procedimiento 2 es preferentemente (3-aminopropil)trióxosilano.

10

**[0046]** Cuando se usa EDC.HCl, las etapas a) y b) del procedimiento 2 generalmente se llevan a cabo en una solución acuosa, cuyo pH es preferentemente de 4 a 6, más preferentemente de 4,7 a 5,3, preferentemente en agua. Cuando se usa CDI, las etapas a) y b) del procedimiento 2 generalmente se llevan a cabo en diclorometano o acetonitrilo.

15

**[0047]** Las etapas a) y b) del procedimiento 2 generalmente se llevan a cabo a una temperatura de -15 °C a 40 °C, preferentemente de 0 °C a 30 °C, más preferentemente de 15 °C a 25 °C, lo cual es ventajoso ya que no se produce desnaturalización de la biomolécula.

20

**[0048]** La etapa a) del procedimiento 2 normalmente dura de 4 h a 24 h, preferentemente de 12 h a 18 h, y la etapa b) del procedimiento 2 normalmente dura de 4 h a 24 h, preferentemente de 12 h a 18 h.

**[0049]** Ambos procedimientos 1 y 2 llevan a la formación de un enlace covalente fuerte entre el agente de sililación y la biomolécula.

25

**[0050]** La concentración en peso de la biomolécula usada como material de partida en el solvente de los procedimientos 1 y 2 es generalmente del 0,01 al 30 %, preferentemente del 0,1 al 20 % y más preferentemente del 0,5 al 15 %.

30

**[0051]** Ventajosamente, los procedimientos 1 y 2 se llevan a cabo sin catalizador metálico alguno, más particularmente catalizador a base de estaño.

**[0052]** Cuando se lleva a cabo el procedimiento 2, donde se usa EDC.HCl, el medio de reacción es generalmente homogéneo. Cuando se llevan a cabo el procedimiento 1 o el procedimiento 2, donde se usa CDI, el medio de reacción es generalmente heterogéneo. Generalmente, se observa una suspensión de la biomolécula en el solvente, la cual se puede aislar fácilmente de la mezcla de reacción, por ejemplo mediante sedimentación o centrifugación.

35

**[0053]** Según un tercer aspecto, se describe el uso de dicha biomolécula sililada para funcionalizar la superficie de un soporte.

40

**[0054]** Las funciones alcóxosilano OR<sub>1</sub>, OR<sub>2</sub> y OR<sub>3</sub> de la biomolécula sililada se pueden utilizar ventajosamente para anclar la biomolécula sililada a la superficie de un soporte. La superficie puede ser cualquier superficie de un soporte capaz de reaccionar con una función alcóxosilano, por ejemplo una superficie metálica tal como una superficie de titanio o una superficie de vidrio.

45

**[0055]** Según un cuarto aspecto, la invención se ocupa de un procedimiento de preparación de un hidrogel que comprende las etapas de:

50

a) poner en contacto una biomolécula sililada tal y como se ha definido anteriormente con una base o un

ácido en un medio acuoso;

b) ajustar el pH del medio acuoso de la etapa a) a un pH de entre 3,5 y 12,4, en el cual las biomoléculas sililadas autocondensan por formación de enlaces covalentes -Si-O-Si- y, opcionalmente recuperar el hidrogel.

5

**[0056]** El medio acuoso de la etapa a) comprende una solución acuosa y la biomolécula sililada, que puede ser soluble o no en la solución acuosa.

**[0057]** Hay dos realizaciones posibles para la etapa a), dependiendo de si se usa un ácido o una base.

10

**[0058]** Cuando la biomolécula sililada se pone en contacto con una base en un medio acuoso durante la etapa a), la función alcoxisilano de la biomolécula sililada se hidroliza y se convierte en una función silanolato. El ajuste del pH de la mezcla así obtenida lleva a una protonación de la función silanolato para dar una función silanol, que reacciona inherentemente con otra función silanol, llevando a la condensación de las biomoléculas sililadas por formación de un enlace covalente -Si-O-Si- y, por consiguiente, a la formación del hidrogel. Preferentemente, en la etapa a) se utiliza una base inorgánica, más preferentemente un hidróxido de un metal alcalino o alcalinotérreo, tal como el hidróxido potásico o sódico. En una realización del procedimiento, el pH del medio acuoso durante la etapa a) es de 12 a 14, preferentemente de 12,3 a 12,9.

20

**[0059]** Según una segunda realización, la biomolécula sililada se pone en contacto con un ácido en un medio acuoso durante la etapa a), habitualmente en un medio acuoso cuyo pH es de 1 a 3, preferentemente aproximadamente 2, por ejemplo en una solución de HCl o en una solución de HEPES. En estas condiciones, la función alcoxisilano de la biomolécula sililada se hidroliza y se convierte en una función silanol, que reaccionará inherentemente con otra función silanol, llevando a la condensación de las biomoléculas sililadas por formación de un enlace covalente -Si-O-Si- y, por consiguiente, a la formación del hidrogel. Esta realización es particularmente adecuada para biomolécula sililada, donde la biomolécula es una proteína o ácido hialurónico.

25

**[0060]** El procedimiento de preparación de un hidrogel se basa, ventajosamente, en la autocondensación de las funciones silanol simplemente mediante ajuste del pH, sin necesitar la adición de reactivos tóxicos.

30

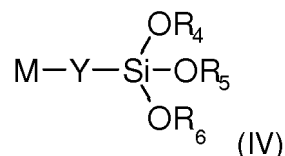
**[0061]** Para llevar a cabo la etapa a) del procedimiento de preparación de un hidrogel se prefieren las realizaciones siguientes.

35

**[0062]** Generalmente, la etapa a) dura de 10 minutos a tres días, preferentemente de 1 hora a 36 horas y más preferentemente de 12 horas a 24 horas. Normalmente, la etapa a) se lleva a cabo hasta que se obtiene un medio de reacción homogéneo.

40

**[0063]** En una realización, en la etapa a), la biomolécula sililada y la base o el ácido se ponen además en contacto con una segunda biomolécula sililada de diferente naturaleza. Se produce condensación entre dos biomoléculas sililadas de diferente naturaleza, llevando a un hidrogel que comprende dos biomoléculas diferentes. Generalmente, dicha segunda biomolécula sililada lleva una función alcoxisilano. Habitualmente, dicha segunda biomolécula sililada tiene la fórmula (IV) siguiente:



45

donde:

M es una biomolécula,

Y es un grupo de enlace entre la biomolécula y el silano,

50 R4, R5 y R6 representan independientemente cada uno un grupo alquilo C1-C6.

**[0064]** Preferentemente, la segunda biomolécula sililada es un polisacárido sililado, en particular un derivado de la celulosa sililado, tal como la celulosa sililada, la hidroxietilcelulosa (HEC) sililada o la HPMC sililada.



**[0065]** La proporción de las dos biomoléculas sililadas puede variar en gran medida, por ejemplo, en la etapa a) se pueden usar 100 partes en peso de una primera biomolécula sililada por 1 parte en peso de una segunda biomolécula sililada o el mismo peso de ambas biomoléculas sililadas. Variando las proporciones y la naturaleza de las dos biomoléculas sililadas, la estructura y naturaleza del hidrogel se pueden modificar y adaptar fácilmente dependiendo del uso ulterior que se quiera dar al hidrogel y de las propiedades biofísicas, biológicas, físicas y químicas necesarias para ese uso.

**[0066]** En una realización, en la etapa a), la biomolécula sililada es una proteína sililada y la segunda biomolécula sililada está basada en cualquier biomolécula. En una realización preferida, la biomolécula sililada es una proteína sililada y la segunda biomolécula sililada es un polisacárido sililado, en particular un derivado de la celulosa sililado, tal como la celulosa sililada o la HPMC sililada.

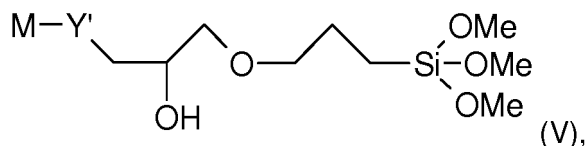
**[0067]** En realizaciones preferidas, la etapa a) comprende la puesta en contacto de:

- 15 - colágeno sililado con HPMC sililada (como segunda biomolécula sililada) (llevando a un hidrogel que contiene HPMC y colágeno),
- ácido hialurónico sililado con HPMC sililada (como segunda biomolécula sililada) (llevando a un hidrogel que contiene HPMC y ácido hialurónico),
- 20 - pectina sililada con ácido hialurónico sililado (como segunda biomolécula sililada) (llevando a un hidrogel que contiene pectina y ácido hialurónico).

**[0068]** En una realización, la segunda biomolécula sililada se ha preparado según el procedimiento 1 o 2, donde la biomolécula de la segunda biomolécula sililada es de cualquier naturaleza (por ejemplo, la HPMC sililada puede ser la segunda biomolécula sililada, aunque se siga el método del procedimiento 1 o 2).

**[0069]** En otra realización, la segunda biomolécula sililada no se ha preparado según los procedimientos definidos anteriormente. Por ejemplo, la segunda biomolécula sililada se ha preparado a partir de 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS), tal y como se describe en Bourges et al. *Advances in Colloid and Interface Science* 99, 215-228, 2002, y la segunda biomolécula sililada tiene la fórmula (V) siguiente:

30



donde M es una biomolécula e Y' es -O-, -NH- o -(CO)O-. Antes de su reacción con el GPTMS, cuando la biomolécula llevaba una función alcohol, amina o ácido carboxílico, Y' es -O-, -NH- o -(CO)O- respectivamente.

35

**[0070]** En una realización, en la etapa a), la biomolécula sililada y la base se ponen además en contacto con otras dos o más biomoléculas sililadas de diferente naturaleza. Así, se obtiene un hidrogel que comprende al menos tres biomoléculas.

40 **[0071]** Para llevar a cabo la etapa b) del procedimiento de preparación de un hidrogel se prefieren las realizaciones siguientes.

**[0072]** Normalmente, la etapa b) dura de 1 min a 3 días, preferentemente de 20 min a 24 horas. Generalmente, la etapa b) se lleva a cabo hasta que el medio de reacción es incapaz de fluir. Se pueden llevar a cabo experimentos reológicos para determinar con exactitud el tiempo de gelificación.

45

**[0073]** Preferentemente, durante la etapa b) se añade un agente tampón o una solución isotónica, por ejemplo el ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES). El uso del agente tampón o la solución isotónica lleva a un medio de reacción cuyo pH es de aproximadamente 7,4, es decir, el pH fisiológico.

50

**[0074]** En una realización, en la etapa b), el pH del medio acuoso se ajusta a un pH de entre 4 y 11, preferentemente de 5 a 10, más preferentemente de 6 a 8 y más preferentemente de 7 a 7,4.

**[0075]** Además, antes de que se produzca la gelificación y mientras el medio es capaz de fluir (normalmente en la primera hora de la etapa b)), se pueden incorporar células al medio. Por tanto, en una realización del

55

procedimiento, se añaden las células durante la etapa b). Ventajosamente, se puede obtener un hidrogel que comprende células.

5 **[0076]** Antes de que se produzca la gelificación y mientras el medio es capaz de fluir, también se puede incorporar al medio un principio activo. Por tanto, en una realización del procedimiento, se añade un principio activo durante la etapa b). Ventajosamente, se puede obtener un hidrogel, que comprende un principio activo, que será capaz de liberar dicho principio activo.

10 **[0077]** Preferentemente, las etapas a) y b) del procedimiento de preparación de un hidrogel se llevan a cabo en condiciones estériles, en particular, cuando el uso ulterior que se pretende dar al hidrogel es para aplicaciones *in vivo* o *in vitro*, en particular aplicaciones *in vivo*.

15 **[0078]** Según un quinto aspecto, la invención se refiere al hidrogel obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

**[0079]** Ventajosamente, las propiedades biofísicas, biológicas, físicas y químicas del hidrogel se pueden modular variando la proporción y la naturaleza de la biomolécula sililada comprendida en el mismo.

20 **[0080]** Generalmente, resulta ventajoso que el hidrogel se pueda inyectar fácilmente mediante jeringas.

**[0081]** Generalmente, el hidrogel es de autoendurecimiento. Preferentemente, el hidrogel reticula por sí mismo al pH fisiológico y se puede usar, por lo tanto, en ingeniería de tejidos.

25 **[0082]** Con una elección sensata de la biomolécula en la que se basa el hidrogel, el hidrogel también es biodegradable, en particular mediante métodos enzimáticos. Por ejemplo, un hidrogel que contiene ácido hialurónico se puede degradar mediante hialuronidasa y un hidrogel que contiene colágeno se puede degradar mediante colagenasa.

30 **[0083]** Normalmente, el gel obtenido favorece a adhesión celular. Los hidrogeles que contienen HPMC y otra biomolécula favorecen una mejor adhesión celular que un hidrogel a base de HPMC.

**[0084]** Se prefieren particularmente los hidrogeles que contienen dos biomoléculas diferentes. El hidrogel preferido son los que comprenden la asociación de biomoléculas siguiente:

- 35
- HPMC y colágeno,
  - HPMC y ácido hialurónico,
  - HPMC y RGDS,
  - pectina y ácido hialurónico.

40 **[0085]** Según un sexto aspecto, la invención se ocupa del hidrogel como sustituto de un tejido biológico, por ejemplo como sustituto de tejido cartilaginoso, sustituto óseo, sustituto de tejido del corazón o piel. También son objeto de la presente invención el hidrogel para su uso como sustituto de un tejido biológico, el uso del hidrogel para la preparación de un sustituto de tejidos y el método de tratamiento terapéutico que comprende el uso del hidrogel como sustituto de tejidos.

45 **[0086]** Según un séptimo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un hidrogel tal y como se ha descrito anteriormente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, la composición también puede comprender un principio activo.

50 **[0087]** Según un octavo aspecto, la invención se ocupa del uso de dicha composición para la liberación de un principio activo. También son objeto de la presente invención la composición para su uso en la liberación de un principio activo, el uso de la composición para la preparación de un fármaco que libera un principio activo y el método de tratamiento terapéutico que comprende el uso de la liberación del principio activo para liberar principios activos.

55 **EJEMPLOS**

*Abreviaturas:*

**[0088]**

HPMC-Si: HPMC sililada

Coll-Si: colágeno sililado

5 HA-Si: ácido hialurónico sililado

Pec-Si: pectina sililada

HBSS: solución salina tamponada de Hank

C: colagenasa

H: hialuronidasa

10

**EJEMPLO 1: Protocolo de silanización en condiciones anhidras y heterogéneas (procedimiento 1)**

15 **[0089]** La poliosa, proteína o péptido liofilizado deseado se suspendieron en acetonitrilo anhidro con una proporción en peso total del 10-15 %, 3-4 % y 0,5-1,5 % respectivamente. Se añadió a la suspensión al menos un equivalente de trietilamina por función que se debía modificar (OH o NH<sub>2</sub>). Se aplicó agitación mecánica y burbujeo de nitrógeno (o argón) durante al menos 20 min antes de la adición del reactivo sililado, que podía contener al menos un grupo alcoxisilano y una función isocianato (por ejemplo, 3-isocianatopropiltrietoxisilano). La circulación de gas inerte y la agitación se mantuvieron a temperatura ambiente (20-25 °C) durante varios días, dependiendo de la cantidad de los materiales de partida (por ejemplo, 3 días para 8 g de biomolécula). Tras su sedimentación o centrifugación, se retiró el sobrenadante y se lavó el sólido o pasta residual al menos 3 veces con gran cantidad de etanol puro y, a continuación, se secó a temperatura ambiente o bajo vacío. También se puede recoger y lavar el sólido mediante filtración en una membrana de nylon de 0.2 µm.

25 **[0090]** La presencia del grupo alcoxisilano en la macromolécula modificada se detectó mediante RMN MAS <sup>29</sup>Si en estado sólido (2,5 kHz a 500 Mhz).

**EJEMPLO 2: Preparación de hidrogeles**

30 Etapa 1: preparación de la solución básica

**[0091]**

35 Método A: se vertieron uno o más de los compuestos sililados deseados obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente en una solución de hidróxido sódico 0,2 M con un porcentaje total en peso de 1 a 6. Tras una noche de agitación mecánica, la solución o suspensión viscosa resultante se transfirió a un tubo de diálisis de celulosa regenerada 6-8000 de MWCO previamente enjuagado con una solución de hidróxido sódico 0,09 M. La solución/suspensión básica se lavó con 19 volúmenes de una solución de hidróxido sódico 0,09 M durante 18 horas y, a continuación, con 20 volúmenes de una nueva solución de hidróxido sódico 0,09 M durante 2 horas. El pH final de las soluciones de macromolécula sililada fue de 12,4. También se pueden juntar una o más de estas soluciones en diferentes proporciones. Un ejemplo clásico fue el de mezclar 3 volúmenes de una solución de biomolécula sililada al 3 % en peso con 1 volumen de una solución de una segunda biomolécula sililada del 1 al 6 % en peso.

45 Método B: El segundo y los compuestos sililados adicionales se añadieron directamente en estado sólido a una solución básica de macromolécula preparada como se indicó anteriormente (habitualmente 10-40 mg de una segunda macrobiomolécula sililada por ml de solución de biomolécula sililada al 3 % en peso).

**[0092]** La solución básica se puede esterilizar bajo radiación UV de 254 nm durante 15min.

50 Etapa 2: adición del tampón ácido

**[0093]**

55 Se añadieron 0,5 volúmenes de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) de pH 3,6 esterilizado al vapor a la solución básica deseada preparada en la etapa 1. Se homogeneizó la mezcla usando jeringas Luer-Lock y conectores Luer-Lock. El pH final de los hidrogeles fue de 7,4 y el tiempo de gelificación varió entre 10 min y 24 h.

**[0094]** Las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles se evaluaron mediante mediciones reológicas.

**EJEMPLO 3: Ensayos de degradación enzimática de hidrogeles preparados a partir de biomoléculas sililadas obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente.**

**[0095]** A 1,5 ml del hidrogel preparado como se indica anteriormente se añadieron o 1,5 ml de HBSS (solución salina tamponada de Hank) por sí sola, o 1,5 ml de HBSS que contenía 3 mg de colagenasa, o 1,5 ml de HBSS que contenía 1,5 mg de hialuronidasa. Las mezclas se incubaron a 37 °C.

**[0096]** La siguiente tabla muestra si se obtiene degradación por adición de colagenasa (C) o hialuronidasa (H) al hidrogel.

10

Naturaleza del hidrogel	HPMC-Si 3 % en peso + Coll-Si 1 % en peso (3:1) + HEPES	HPMC-Si 3 % en peso + HA-Si 6 % en peso (3:1) + HEPES	HPMC-Si 3 % en peso + Pec-Si 4 % en peso (3:1) + HEPES	Pec-Si 4 % en peso + HA-Si 6 % en peso (3:1) + HEPES	Pec-Si 4 % en peso + HEPES
Solución añadida	C	H	H	H	H
Degradación enzimática	sí	sí	sí	sí	sí

**EJEMPLO 4: Ensayos de degradación enzimática de hidrogeles preparados a partir de una biomolécula sililada obtenida mediante un procedimiento según la bibliografía y, opcionalmente, a partir de otra biomolécula sililada obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente.**

15

**[0097]** Ejemplos de hidrogeles hechos con la HPMC sililada obtenida mediante un protocolo de silanización precedente (véase Bourges et al. (Advances in Colloid and Interface Science 99, 215-228, 2002) que fue básicamente como sigue: heptano/1-propanol, lentejas de NaOH, 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano, calentamiento a 80 °C durante 3 horas, enfriamiento rápido con ácido acético glacial, lavado con agua/acetona y liofilización. Se obtuvieron Coll-Si, HA-Si y Pec-Si mediante el procedimiento descrito anteriormente, tal y como se ilustra en el ejemplo 1.

20

**[0098]** La siguiente tabla muestra si se obtiene degradación por adición de colagenasa (C) o hialuronidasa (H) al hidrogel.

25

Naturaleza del hidrogel	HPMC-Si 3 % en peso + HEPES (ejemplo comparativo)	HPMC-Si 3 % en peso + HEPES (ejemplo comparativo)	HPMC-Si 3 % en peso + Coll-Si 1 % en peso (3:1) + HEPES	HPMC-Si 3 % en peso + HA-Si 6 % en peso (3:1) + HEPES	HPMC-Si 3 % en peso + Pec-Si 4 % en peso (3:1) + HEPES
Solución añadida	C	H	C	H	H
Degradación enzimática	No	No	Sí	Sí	sí

30

**[0099]** Los ejemplos 3 y 4 muestran que la presencia de biomoléculas tales como colágeno, ácido hialurónico o pectina (enlace  $\alpha$  1-4 glicosídico) en hidrogeles a base de HPMC (enlace  $\beta$  1-4 glicosídico) induce propiedades de degradación enzimática.

**EJEMPLO 5: Ensayos in vitro: morfología y adhesión celular**

35

• Ejemplo de protocolo para un cultivo 2D:

**[0100]** Se prepararon los hidrogeles tal y como se ha descrito anteriormente y, antes de alcanzar su tiempo de gelificación, se vertieron 0,3 ml de cada mezcla directamente en un pocillo de una placa multipocillo de 24 pocillos con superficie de adherencia ultrabaja. Una vez que los hidrogeles estaban bien reticulados, se añadieron

40

0,5 ml de un medio de cultivo clásico a cada pocillo y se dejaron al menos una noche para que pudieran difundir al hidrogel. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo de cada pocillo por 0,5 ml de medio de cultivo que contenía aproximadamente 20 000 células (por ejemplo, MC3T3). Se evaluó la morfología y viabilidad de las células mediante ensayos "live/dead" y análisis por microscopía óptica (células vivas en verde y células muertas en rojo). El medio de cultivo se cambió cada 2 días y las observaciones se produjeron, generalmente, a las 5 h, 24 h, 48 h, 7 días y a veces más.

**[0101]** No se observó adhesión celular al hidrogel de HPMC sililado, independientemente del protocolo de silanización utilizado, el de Bourges et al. (Advances in Colloid and Interface Science 99, 215-228, 2002) o el protocolo según la invención. Aunque la HPMC-Si obtenida con los dos procedimientos distintos presenta propiedades físico-químicas diferentes, su respuesta biológica es similar.

**[0102]** Pero cuando el hidrogel se mezcla con algún colágeno o ácido hialurónico sililado, las células tienden a estirarse y pegarse a la superficie del hidrogel tras la renovación del medio de cultivo. Al contrario que el hidrogel de HPMC sililada, la pectina sililada favoreció la adhesión celular y, cuando se combinaba con algún ácido hialurónico sililado, esta propiedad parecía aumentar.

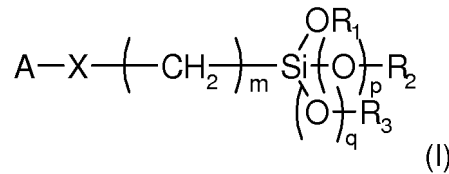
• Ejemplos de protocolo para un cultivo 3D:

**[0103]** Se prepararon los hidrogeles tal y como se ha descrito previamente y, antes de alcanzar su tiempo de gelificación, la cantidad de hidrogel se dividió a partes iguales entre las 2 jeringas usadas para hacer la mezcla. Se introdujeron con una pipeta unos pocos  $\mu\text{l}$  del medio de cultivo que contenía las células en una de las jeringas. Las células se dispersaron al hidrogel mediante conexión de las 2 jeringas con un conector Luer-Lock. La concentración final de células fue de aproximadamente  $1 \cdot 10^6$  células por ml de hidrogel. Una vez homogeneizada, se vertieron 0,3 ml de la mezcla en un pocillo de un plato de 24 pocillos y, una o dos horas después, se añadieron 0,5 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo se cambió cada dos días y se evaluó la morfología y viabilidad de las células del mismo modo que con los cultivos 2D.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de un hidrogel que comprende las etapas de:

5 a) poner en contacto una biomolécula sililada que tiene la fórmula (I) siguiente:



donde:

10

- A es una biomolécula seleccionada de entre una proteína, un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, pectina, quitosano, ácido hialurónico y un glicolípido,
- m es un número entero que varía de 1 a 6,
- p y q son independientemente 0 o 1,
- 15 - X es un grupo seleccionado de entre -NHCONH-, -OCONH- y -CONH- y
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan independientemente cada uno un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> con una base o un ácido en un medio acuoso;

b) ajustar el pH del medio acuoso de la etapa a) a un pH de entre 3,5 y 12,4 en el cual las biomoléculas sililadas autocondensan por formación de enlaces covalentes -Si-O-Si-, y opcionalmente recuperar el hidrogel.

20

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde A se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, pectina, colágeno, gelatina y quitosano.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde en la etapa a), la biomolécula sililada y la base o el ácido se ponen además en contacto con una segunda biomolécula sililada de diferente naturaleza.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde la segunda biomolécula sililada es un polisacárido sililado.

30

5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde el segundo polisacárido sililado es celulosa sililada, hidroxietilcelulosa sililada o hidroxipropilmetilcelulosa sililada.

6. Procedimiento según la reivindicación 3, donde la segunda biomolécula sililada es una biomolécula sililada tal y como se define en la reivindicación 1.

35

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde se añaden células durante la etapa b).

40 8. Hidrogel obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Hidrogel según la reivindicación 8 como sustituto de un tejido biológico.

10. Composición que comprende un hidrogel según la reivindicación 9 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

11. Uso de una composición según la reivindicación 10 para la liberación de un principio activo.