

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 971**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06 (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61J 1/20 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2013** **PCT/IB2013/051536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013** **WO13128373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2013** **E 13720033 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2819647**

54 Título: **Asociación de poli(N-acrilóil glicinamida) con al menos un principio activo**

30 Prioridad:

27.02.2012 FR 1251765

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR;
INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE
MONTPELLIER (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BOUSTTA, MAHFOUD;
COLOMBO, PIERRE-EMMANUEL y
VERT, MICHEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 645 971 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

Asociación de poli(N-acrilóil glicinamida) con al menos un principio activo

La presente invención se refiere a formulaciones galénicas formadas a partir de polímeros inteligentes, y más particularmente de polímeros termorreactivos que poseen, en solución acuosa, una temperatura crítica superior de solubilidad o TCSS (UCST o Upper Critical Solution Temperature en inglés) compatible con la formación reversible de una fase gelificada (gel) por enfriamiento de una solución caliente cuando se ponen en contacto con el cuerpo humano o animal, en particular durante la fase de enfriamiento.

Por "polímero inteligente" o "polímero adaptativo" o "polímero reactivo", se entiende un polímero capaz de responder a un estímulo exterior mediante un cambio de propiedades. Este estímulo exterior puede, por ejemplo, ser la temperatura, la presión, el pH, la fuerza iónica, la luz o un estímulo mecánico, eléctrico o magnético. En inglés, tal tipo de polímero se denomina también habitualmente "stimuli-responsive polymer" o "Smart polymer". Generalmente, las cadenas poliméricas ven su conformación modificarse en respuesta al estímulo, confiriendo el cambio de propiedades. Esta modificación de conformación se combina generalmente con una modificación química, siendo estas dos modificaciones simultáneas, reversibles (asociación por unión de hidrógeno, iónica o dipolar, solvatación o desolvatación) o irreversible (isomería química), y generalmente de carácter cooperativo.

Se conoce utilizar o, más generalmente, sólo proponer, la utilización de algunos de estos polímeros inteligentes en el campo biomédico. Se puede por ejemplo hacer referencia al artículo "Smart Polymers and Their Applications as Biomaterials", Aguilar *et al.*, Topics in Tissue Engineering, 2007, Vol. 3.

Entre dichos polímeros inteligentes ya empleados en el campo de la liberación de principios activos, se han descrito en particular unos polímeros sensibles a los cambios de pH ("pH-sensitive polymers"). Se han descrito también unos polímeros sensibles a los cambios de temperatura ("temperature sensitive polymers") y más particularmente los polímeros que están sujetos a un fenómeno de temperatura crítica inferior de solubilidad o TCIS, (LCST o Lower Critical Solution Temperature en inglés) que corresponde a una fase de solución a baja temperatura por debajo de la TCIS y a una fase condensada más o menos sólida por encima.

Existen también unos sistemas de tipo TCSS, caracterizados por una fase condensada más o menos sólida a baja temperatura, por debajo de la TCSS y a una fase líquida por encima. En estos sistemas, la fase condensada está constituida de un gel hidrófilo e hinchado de agua, contrariamente a las fases condensadas de tipo TCIS que son ampliamente desolvatadas con un carácter hidrogel (presencia de agua interna) mucho menos importante por encima de la TCIS.

Entre los sistemas de tipo TCIS, aparecen las poli(N-isopropil acrilamida), conocidas bajo las abreviaturas PNIPAM, PNIPAAm o poliNIPAM, o también los copolímeros de bloques de tipo dibloque (A-B) o tribloque (A-B-A o B-A-B) en los que A es un segmento poli(óxido de etileno) y B un segmento poli(ácido láctico), o también los copolímeros dibloque o tribloque en los que A es un segmento poli(óxido de etileno) y B un segmento de poli(óxido de propileno). Entre los compuestos de tipo TCIS, la poli(N-isopropil acrilamida) ha sido particularmente estudiada para aplicaciones biomédicas.

La poli(N-isopropil acrilamida) presenta una temperatura de transición sol-gel reversible a aproximadamente 32°C en solución acuosa compatible con los organismos animales y humanos. Esta temperatura variable se puede modificar por copolimerización con unos co-monómeros, en particular los que introducen unas entidades hidrófobas o iónicas o también hidrófilas.

Se conoce, por otro lado, la poli(N-acrilóil glicinamida), conocida bajo las abreviaturas PAG y PNAG, que se ha descrito en primer lugar por Haas en los años 60 en una serie de publicaciones entre 1964 ("Thermally reversible homopolymer gel systems", Hass *et al.*, Journal of Polymer Science, Parte B, 1964, Vol. 2, 12:1095) y 1970 ("Differential thermal analysis of thermally reversible gels", Haas *et al.*, Anal. Calorimetry, Proc. Symp., 1970, 2:211). Además, se conoce por el documento US 2009/0053276 una composición inyectable que contiene unas partículas de hidrogel termosensible, incluso unas partículas formadas a partir de polímeros que presentan una TCSS (UCST). Sin embargo, no se describen las poli(N-acrilóil glicinamida) y el único fenómeno buscado es la expansión de las partículas por calentamiento a la temperatura del cuerpo humano.

Se conoce también por Kuilin Deng *et al.* (Iranian Polymer Journal, 2011, Vol.20, 3:185) un polímero que presenta una TCSS (UCST) y por lo tanto inyectable en solución. Sin embargo, tampoco se describen ahí las poli(N-acrilóil glicinamida) y la utilidad del polímero descrito para el suministro de principio activo por inyección no está adaptada a las condiciones térmicas de la vía parenteral.

Algunos autores han publicado también las propiedades de PAG obtenidas por el método de polimerización "Reversible Addition-Fragmentatio Transfer" (RAFT). Sin embargo, los PAG obtenidos por este método de polimerización no poseen una temperatura de transición gel-sol. La ausencia de transición gel-sol para unos PAG obtenidos por polimerización RAFT se subraya de hecho en el artículo "Well-defined uncharged polymers with a

sharp UCST in water and in physiological milieu", Glatzel S. *et al.*, *Macromolecules*, 2011, 44:413.

Los inventores han puesto en evidencia que la utilización de la poli(N-acrilóil glicinamida) que posee una temperatura de transición gel-sol en una formulación galénica que comprende un principio activo con un objetivo de aplicación tópica para una liberación y una difusión de dicho principio activo localmente, presenta numerosas ventajas, mientras que la poli(N-acrilóil glicinamida) no se había propuesto nunca en esta aplicación.

Así, la presente invención describe la asociación de poli(N-acrilóil glicinamida) con al menos un principio activo y/o al menos un producto visible en procesamiento de imágenes médico, en un medio acuoso fisiológicamente aceptable.

La presente invención tiene así por objeto la asociación de poli(N-acrilóil glicinamida) con al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, en un medio acuoso fisiológicamente aceptable, presentando dicha asociación una temperatura de transición gel-sol comprendida entre 30 y 60°C, y estando en forma líquida por encima de la temperatura de transición gel-sol y en forma de gel por debajo de la temperatura de transición gel-sol, para su utilización en el tratamiento local post-operatorio o pre-operatorio, para su utilización en el tratamiento de heridas, caracterizada por que se aplica directamente sobre la herida o por medio de cualquier dispositivo de protección, o para su utilización en el seguimiento post-operatorio por procesamiento de imágenes médico.

Tiene también por objeto la asociación tal como la definida anteriormente, en la que dicha poli(N-acrilóil glicinamida) presenta una masa molar media comprendida entre 10000 y 1000000 g/mol, en particular 30000 y 600000 g/mol, incluso entre 40000 y 200000 g/mol.

La asociación según la invención presenta una temperatura de transición gel-sol comprendida entre 30 y 60°C, y preferentemente entre 38 y 50°C, por ejemplo medida por el método del tubo invertido.

La asociación según la invención está en forma líquida por encima de la temperatura de transición gel-sol y en forma de gel por debajo de la temperatura de transición gel-sol.

Más particularmente, según el sitio de aplicación considerado, se elige una asociación que presenta una temperatura de transición gel-sol superior a la temperatura del sitio de aplicación. Por ejemplo, si el sitio de aplicación considerado es la cavidad intraperitoneal, se elegirá una asociación que posee una temperatura de transición gel-sol superior a 37°C. Asimismo, se elegirá una asociación que posee una temperatura de transición gel-sol superior a 30°C si el sitio de aplicación considerado es la piel.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere también a la asociación tal como se define anteriormente, para su utilización en el suministro de principios activos.

Según también otro aspecto, la presente invención describe la utilización de la poli(N-acrilóil glicinamida) que presenta una masa molar media comprendida entre 10000 y 1000000 g/mol, en particular entre 30000 y 600000 g/mol, incluso entre 40000 y 200000 g/mol, para la preparación de una solución acuosa gelificable que comprende un principio activo y/o un producto visible por procesamiento de imágenes médico.

Frente a las propiedades de la asociación en forma de gel conforme a la presente invención y en particular de su buena adherencia a los tejidos, una de las aplicaciones más particularmente consideradas en el ámbito de la presente invención se refiere al suministro de principios activos destinados al tratamiento antitumoral local post-operatorio, en particular complementario de una cirugía de reducción tumoral, por ejemplo de un cáncer abdominal en carcinomatosis peritoneal.

En efecto, esta aplicación particular responde a la necesidad del cirujano oncológico de disponer de un tratamiento post-operatorio fiable. En efecto, cuando el cirujano acaba de proceder a la ablación de un tumor, se encuentra enfrentado al riesgo de haber dejado algunas células tumorales susceptibles de regenerar el tumor, o peor, migrar para dispersar unas metástasis dispersas. Actualmente, el cirujano oncológico introduce una solución de un agente antitumoral en la cavidad intraperitoneal que llena. Al cierre del sitio operado, el líquido puede derramarse, lo que es un inconveniente mayor. Para evitar el derramamiento del líquido, el cirujano lo aspira frecuentemente después de un tiempo relativamente corto.

La utilización de la poli(N-acrilóil glicinamida) permite resolver los inconvenientes antes citados y en particular obtener un sistema de liberación suficientemente adherente a los tejidos. Por otro lado, la utilización de una solución acuosa gelificable, conforme a la presente invención, presenta la ventaja de permitir revestir o impregnar un tumor o unos órganos tales como los órganos de la cavidad intraperitoneal, en particular durante una operación quirúrgica.

Así, la presente invención tiene más particularmente por objeto la asociación de poli(N-acrilóil glicinamida) con al menos un agente antitumoral, en un medio acuoso fisiológicamente aceptable.

Tiene también por objeto la asociación tal como se ha definido anteriormente, útil para el tratamiento antitumoral

local per-operatorio de los pacientes que han sufrido una cirugía de reducción tumoral. Por ejemplo, se puede citar la ablación de un tumor de la cavidad intraperitoneal.

La presente invención tiene también por objeto la asociación según la invención, para su utilización en el tratamiento de heridas, caracterizada por que se aplica directamente sobre la herida o por medio de cualquier dispositivo de protección, en particular un vendaje, por ejemplo por impregnación de dicho dispositivo de protección por un gel formado a partir de una solución caliente.

La asociación según la invención es útil para el tratamiento de los animales, y en particular para el tratamiento de los humanos.

En particular, la asociación según la invención es útil en el campo veterinario.

La presente invención presenta además la ventaja de proporcionar un sistema que puede reticularse *in situ*, sin necesitar reacciones químicas covalentes.

La asociación según la invención puede inyectarse así en forma líquida y gelificable *in situ* en un tiempo corto a fin de no permitir ninguna difusión o dispersión más allá del sitio de administración. Así, la gelificación aparece casi instantáneamente.

En particular, la asociación según la invención gelifica en un tiempo inferior a 5 minutos, preferentemente inferior a 3 minutos y mejor inferior a 2 minutos.

La temperatura de gelificación de una asociación según la invención es insensible a la presencia de sal, en particular de NaCl 0,15N, y por lo tanto a la fuerza iónica que puede imponerse por un medio parenteral.

La inyección de la asociación puede realizarse con la ayuda de una jeringa convencional y de agujas de pequeña abertura.

Por otro lado, la forma gel de la asociación según la invención es biocompatible y esterilizable.

Así, la asociación conforme a la presente invención presenta también la ventaja de ser estable en el tiempo y permitir su almacenamiento hasta su aplicación.

El almacenamiento puede así efectuarse en forma de gel y después calentarse para su puesta en solución antes de la inyección.

La composición puede entonces ventajosamente almacenarse en el refrigerador, en el congelador o también en forma liofilizada.

Por otro lado, la esterilización puede llevarse a cabo por ultrafiltración de las formas de solución a través de los ultrafiltros esterilizantes (por ejemplo 0,22 μm).

Por otro lado, la asociación según la presente invención es particularmente ventajosa ya que el hidrogel, una vez constituido con el medio acuoso, permanece estable si se añade un exceso de medio acuoso. Esta estabilidad es importante más particularmente en el suministro de principios activos destinados al tratamiento antitumoral local per-operatorio, en particular después de una cirugía de reducción tumoral ya que, *in situ*, el hidrogel se somete a los fluidos y exudados próximos post-operatorios, más o menos abundantes según el sitio.

Como aparece de manera más detallada a continuación en la descripción, la realización de la invención presenta también una ventaja en el plano de la extensión de las formulaciones galénicas posibles.

Figuras

La figura 1, en relación con el ejemplo 1, representa la variación del grado de polimerización medio en número DP_n de los PAG obtenidos en función de diferentes concentraciones en 2-propanol (agente de transferencia: AT) con una concentración en monómero M constante.

La figura 2, en relación con el ejemplo 1, describe el intervalo de temperaturas críticas según la concentración en poli(N-acrilóil glicinamida).

Más precisamente, la figura 2 representa una variación de las temperaturas de separación de fase (transición gel-sol) en función de la concentración reducida en PAG observada para unos PAG de diferentes masas molares medias (desde arriba hacia abajo: masas decrecientes).

La figura 3, en relación con el ejemplo 1, representa el intervalo de temperaturas críticas según la masa molar media

de poli(N-acrilóil glicinamida).

Más precisamente, la figura 3 representa una variación de las temperaturas de separación de fase (transición gel-sol) en función de la masa molecular M_n viscosimétrica de los PAG para diferentes concentraciones en poli(N-acrilóil glicinamida).

La figura 4, en relación con el ejemplo 6, representa la curva de liberación de acetato de cobalto en la poli(N-acrilóil glicinamida) de masa molar media igual a 170000 g/mol, en función del tiempo.

La figura 5, en relación con el ejemplo 6, representa la curva de liberación del poli(acrilato de sodio) en la poli(N-acrilóil glicinamida) de masa molar media igual a 170000 g/mol, en función del tiempo.

La figura 6, en relación con el ejemplo 6, representa la curva de liberación del oligómero de poli(tirosina-formaldehído) en la poli(N-acrilóil glicinamida) de masa molar media igual a 170000 g/mol, en función del tiempo.

Definiciones

Por “gel-sol” se entiende una contracción de los términos “gelificación-solución”.

Por “hidrogel” se entiende una matriz tridimensional (reticulada física o químicamente) hinchada por agua en medio acuoso.

Por “biodegradable” se entiende una sustancia o un material que se descompone bajo la acción de células vivas aisladas o implicadas en un tejido o en un órgano.

Por “bioreabsorbible” se entiende una sustancia o un material que se degrada enzimáticamente o hidrolíticamente y para el cual se demuestra que los productos de degradación se integran como biomasa y/o se eliminan del organismo por la vía aérea después de la metabolización y/o por filtración renal.

Por “cantidad suficiente” se entiende una cantidad mínima necesaria para lograr el efecto esperado, por ejemplo, la reconstrucción de una mezcla que presenta las propiedades consideradas para la aplicación considerada.

Por “soporte galénico para aplicación tópica” se entiende un soporte capaz de transportar y/o aplicar un principio activo sobre un sitio a tratar, por ejemplo por formación de un gel que alberga temporalmente dicho principio activo.

Por “UCST” o “TCSS” o “temperatura crítica superior de solubilidad”, se entiende la temperatura máxima por encima de la cual un sistema polímero-medio acuoso se presenta en forma de una fase líquida homogénea. Los sistemas polímero-medio acuoso que presentan una temperatura crítica superior de solubilidad (TCSS) están en forma gelatinosa bajo la TCSS que desaparece cuando se sube la temperatura por encima de esta temperatura crítica. Estos polímeros deben su insolubilidad, a temperatura inferior a su TCSS, a la presencia de interacciones intra- e inter-moleculares reversibles, tales como iónicas o electroestáticas asociadas.

Más precisamente, la temperatura crítica superior de solubilidad (TCSS) de una mezcla de polímero-disolvente es la temperatura por encima de la cual los componentes son miscibles y el sistema es una fase líquida homogénea a simple vista, sea cual sea la composición de la mezcla. En la práctica, tal sistema polímero-disolvente se puede caracterizar por una transición de fase gel-sol reversible que depende de la presión, de la masa molar media y de la polimolecularidad o distribución de las macromoléculas de masas molares diferentes (“Pure and Applied Chemistry”, 2004, 76:1985; Definition of terms related to polymer blends, composites, and multiphase polymeric materials, IUPAC Recommendations, 2004, página 1999).

Por “temperatura de transición gel-sol” se entiende la temperatura por encima de la cual un polímero dado que presenta una TCSS en solución acuosa pasa reversiblemente de una fase hidrogel (gel hinchado con más o menos agua) a una fase líquida y se vuelve por lo tanto soluble en el medio acuoso. La temperatura de transición gel-sol reversible depende de las condiciones de realización, por ejemplo un ciclaje gel-sol único o múltiple, la velocidad de enfriamiento o el volumen a enfriar.

En el texto, las expresiones “comprendido entre ... y ...”, “que va de ... a ...” y “que varía de ... a ...” son equivalentes y pretenden significar que los límites están incluidos, salvo que se mencione lo contrario.

En la descripción, la expresión “al menos un ...” debe ser comprendida como “uno o varios ...”.

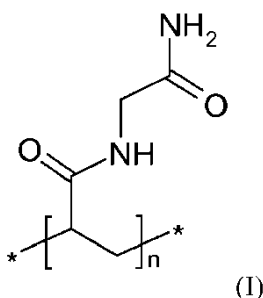
Salvo que se indique lo contrario, la expresión “que comprende/que comprende uno (una)” se debe de comprender como “que comprende/que comprende al menos uno (una)”.

Polímero

La poli(N-acrilóil glicinamida) o PAG o poli(NAGA) es conocida por sí misma, aunque aparentemente no está disponible comercialmente.

En realidad, se designa por poli(N-acrilóil glicinamida) o sus abreviaturas una familia de compuestos macromoleculares que difieren por sus masas molares medias en masa y en número, y por la dispersidad de éstas se traduce por el índice de polimolecularidad o también la polidispersidad definida por la relación de la masa molar media en masa sobre la masa molar media en número.

Las macromoléculas de tipo PAG presentan la fórmula (I) siguiente:



En el ámbito de la presente invención, la masa molar media de PAG está preferentemente comprendida entre 10000 y 1000000, más particularmente entre 30000 y 600000, incluso entre 40000 y 200000 g/mol.

Según un modo de realización particular, la masa molar media se evalúa por viscosimetría, por ejemplo como se detalla en el ejemplo 1 siguiente.

A la vista de los ejemplos, los valores viscosimétricos se pueden medir por un viscosímetro de tipo Ubbelohde.

Este polímero en solución es un polímero termosensible. En el caso de PAG, la reticulación termo-dependiente se lleva a cabo por la formación de una red de enlaces hidrógeno entre los grupos NH y C=O presentes en las cadenas colgantes de tipo glicinamida ricas en grupos funcionales interactivos. Se dice que los hidrogeles de PAG dependen de un fenómeno de temperatura crítica superior de solubilidad (TCSS o UCST o solución a alta temperatura y gel a baja temperatura).

Los hidrogeles de PAG se denominan a veces denominados "gelatina artificial".

Más particularmente, un polímero PAG, mezclado en un medio acuoso puede conducir a una solución (sol) o hidrogel (gel) según la temperatura de dicho medio.

El interés de base de este polímero como fuente de hidrogel inteligente es que, mezclado en un medio acuoso, puede conducir a una solución (sol) o a un hidrogel (gel) según la temperatura y que la transición gel-sol se puede llevar a cabo en la zona de temperatura de un organismo animal de tal manera que se administra en forma sol a una temperatura superior pero compatible con la del organismo en cuestión (humano o animal), se gelifica cuando la sol administrado vuelve a esta última temperatura.

En el ámbito de la presente invención, se pueden también considerar los copolímeros de poli(N-acrilóil glicinamida) con diversos monómeros tales como los descritos en "Synthetic thermally reversible gel systems", Haas *et al.*, Journal of Polymer Science, Polymer Physics Edition, II, 1967, Vol. 5, 5:915. Tales monómeros se pueden seleccionar en particular de tal manera que las soluciones de estos copolímeros satisfagan a las condiciones impuestas por los organismos animales y/o humanos.

El experto en la técnica es capaz de sintetizar el polímero que es conveniente para la invención según sus conocimientos generales. La polimerización (y la copolimerización eventual) se puede iniciar en masa o en solución en un disolvente orgánico por unos compuestos generadores de radicales libres. Los cebadores de tipo aniónico y catiónico se pueden utilizar también, con la condición de que sean propicios para la obtención de PAG que posee una temperatura de transición gel-sol.

Por ejemplo, el polímero que es conveniente para la invención se puede preparar según el protocolo descrito en los artículos publicados por Haas, en particular en "Synthetic thermally reversible gel systems", Haas *et al.*, Journal of Polymer Science, IV, Part A-1, Polymer Chemistry, 1970, Vol. 8, 5:1213.

En el ámbito de la presente invención, la polimerización por iniciación radicalaria por descomposiciones químicas se verá favorecida con la utilización de cebadores que generan unos radicales en temperatura tales como el peróxido de benzoilo, el peróxido de tertio-butilo, los compuestos diazoicos tales como el azo-bis-isobutironitrilo, los

compuestos peroxigenados tales como los persulfatos o el agua oxigenada, los sistemas redox tales como la oxidación de Fe^{2+} o de Ce^{4+} , las mezclas persulfato/sodio-metabisulfito, o el ácido ascórbico/agua oxigenada o también los compuestos escindibles fotoquímicamente o por radiaciones ionizantes, por ejemplo por UV o por radiaciones beta y gamma.

Según un modo de realización particular, el polímero que es conveniente para la invención se prepara mediante un método de polimerización radicalaria.

A fin de controlar las masas molares medias, como se ilustra más particularmente en el ejemplo 1, se puede utilizar un agente de transferencia.

Por ejemplo, la obtención de masas molares medias más o menos elevadas se puede realizar mediante el uso de agentes de transferencia tales como se describe en Haas *et al.*, Journal of Polymer Science, 1964, Vol. 2, 12:1095 y más recientemente en "Well-defined synthetic polymer with a protein-like gélation behavior in water", Glatzel *et al.*, Chemical Communications, 2010, 45, 4517.

El agente de transferencia tiene como objetivo detener el crecimiento de las cadenas macromoleculares durante la formación por adición de moléculas monómeras e iniciar nuevas cadenas, lo que permite limitar las masas moleculares finales, incluso controlarlas.

En el ámbito de la presente invención, un agente de transferencia se puede seleccionar más particularmente entre los tioles tales como el dodeciltiol $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$ o el ácido tioglicólico HSCH_2COOH , los derivados halogenados tales como CHCl_3 o los derivados bromados, o los alcoholes tales como el isopropanol, como se indica en el documento US 3,396,030.

Se pueden también obtener unos PAG de masas molares medias diferentes a partir de PAG por fraccionamiento en triángulo con la ayuda de una mezcla disolvente-no-disolvente, por ejemplo según un método clásico en ciencia de polímeros, bien conocido por el experto en la técnica.

Temperatura de transición gel-sol

En el ámbito de la presente invención, la temperatura de transición gel-sol se sitúa ventajosamente a una temperatura superior a la temperatura corporal y tal que el sistema esté en forma de solución (sol) a una temperatura superior a la temperatura corporal, pero inferior a la temperatura máxima que pueden soportar los tejidos, a saber 60°C, preferentemente 50°C, y bien en forma de hidrogel (gel) a la temperatura corporal del sitio de administración, generalmente 37°C en el ser humano, valor diferente en el animal y de cualquier manera entre 35°C y 42°C.

Así, la asociación según la invención presenta una temperatura de transición gel-sol comprendida entre 30 y 60°C, incluso entre 38 y 50°C, y mejor entre 35 y 45°C, por ejemplo medida mediante el método del tubo invertido.

La temperatura de transición gel-sol es fácilmente adaptable a la necesidad en materia de temperatura del sitio a tratar. En particular, es posible modular la temperatura de transición gel-sol a través de la variación de diversos parámetros.

En efecto, la temperatura de transición gel-sol de una mezcla dada que comprende un polímero dado depende de factores macromoleculares tales como la masa molar media, la distribución de las masas molares, la presencia de co-monómeros eventuales, de la concentración del polímero en la solución acuosa, de la salinidad, así como de la presencia de aditivos, en particular de compuestos hidrófobos, incluyendo los principios activos.

Por ejemplo, la temperatura de transición gel-sol depende en particular al mismo tiempo de la concentración y de la masa molar media del polímero. El hecho de aumentar una de estas dos variables de ajuste tiene como efecto incrementar las interacciones intra- e intercadenas, aumentando así la temperatura de transición gel-sol.

En la práctica, se pueden utilizar ventajosamente estos dos parámetros para obtener un polímero conforme a las exigencias en términos de temperatura de transición gel-sol, como se ilustra en el ejemplo 1.

Con respecto a la relación entre la temperatura crítica de transición gel-sol, la masa molar media y la concentración del polímero en la solución acuosa, se puede hacer referencia en particular a la figura 1 que muestra el intervalo de temperaturas de transición gel-sol según la masa molar media y la concentración en polímero.

La presencia de sal, en particular del medio que constituye el líquido fisiológico de fuerza iónica y pH compatible e impuesto con los fluidos biológicos, no altera de manera significativa el comportamiento de PAG dado que es un polímero neutro observado en agua, en particular la capacidad para formar un gel.

La presencia de un compuesto hidrófobo o hidrófilo en una formulación puede modificar la temperatura de transición

gel-sol observada en su ausencia. Sin embargo, es posible compensar el efecto jugando sobre los parámetros propios del polímero, tales como la masa molar media y la concentración.

Métodos de medición de la temperatura de transición gel-sol

El valor de la temperatura de transición gel-sol depende de la técnica utilizada para su determinación.

Por ejemplo, se puede utilizar el método del tubo invertido, el método de caída de bola o la medición de viscosidad dinámica.

En el ámbito de la presente invención, la temperatura de transición gel-sol se puede medir mediante el método del tubo invertido.

El principio del método del tubo invertido consiste en gelificar una solución a base de PAG en un tubo de vidrio equipado de un termómetro fijado por un tapón, en inclinar el tubo cabeza abajo y después subir y bajar progresivamente la temperatura del conjunto anotando las temperaturas a las que la materia empieza a fluir por simple gravedad durante el aumento y/o cuando el medio se congela durante la disminución.

Más particularmente, la poli(N-acrilóil glicinamida) seca se introduce en un tubo de vidrio de 20 cm³ con agua desionizada. La mezcla se coloca en un baño de agua a 80°C hasta la disolución total. La solución se enfría después a temperatura ambiente y se gelifica.

El sistema se vuelve a 80°C durante 5 minutos, después se enfría a 0°C a una velocidad de 40°C/min, se deja a 0°C durante 30 minutos, después se calienta a 80°C a una velocidad de 4°C/min.

Se determina una primera temperatura de transición gel-sol cuando el gel empieza a fluir a lo largo de la pared del tubo. Este ciclo se repite 3 veces para dar cuatro temperaturas gel-sol.

Después del segundo ciclo se observa generalmente una reproducibilidad de $\pm 2^\circ\text{C}$ de la temperatura de transición gel-sol.

Principio activo y producto visible por procesamiento de imágenes médico

Principios activos

A título de principios activos que pueden ser convenientes para la presente invención, se pueden citar en particular los agentes antitumorales, los antibióticos, los analgésicos, los anti-inflamatorios, los factores de crecimiento y los antisépticos.

Entre los antibióticos, son convenientes en particular para la invención los de la clase de los aminoglicósidos, tales como la gentamicina o la kanamicina; unas ansamicinas; unos carbacefems; unos carbapenems; unas cefaloesporinas de primera generación, tales como la cefadroxilo o la cefazolina; unas cefaloesporinas de segunda generación, tales como el cefaclor o el cefamandol; unas cefaloesporinas de tercera generación, tales como la cefixima; unas cefaloesporinas de cuarta generación; unas cefaloesporinas de quinta generación, tales como el ceftobiprol; unos glicopéptidos; unas lincosamidas; unos lipopéptidos; unos macrólidos; unos monobactams; unos nitrofuranos; unas penicilinas, tales como la amoxicilina o la ampicilina; unas combinaciones de penicilinas; unos polipéptidos; unas quinolonas, tales como la ciprofloxacina o la ofloxacina; unas sulfonamidas, tales como la sulfadiazina o la sulfadiazina argéntica; unas tetraciclinas, tales como la oxitetraciclina o la tetraciclina; unos antibióticos útiles contra las micobacterias; o también el metronidazol o el tiamfenicol.

Entre los analgésicos que son más particularmente convenientes para la invención, se pueden citar en particular la buprenorfina, el fentanil o el ibuprofeno.

Los antisépticos que son convenientes para la invención se pueden seleccionar más particularmente entre la hexomedina, las sales de plata y el yodo.

Entre los factores de crecimiento que son convenientes para la invención, se pueden citar muy particularmente FGFa y FGFb, VGF y GRF.

Preferentemente, se puede citar cualquier principio activo con acción antitumoral. Entre estos principios activos, se pueden citar más particularmente la doxorubicina, el paclitaxel, el topotecán y el irinotecán.

Se pueden citar también los compuestos radioactivos para la radioterapia interna, en particular los granos de Iode 125, en particular utilizados en el tratamiento del cáncer de próstata.

Por otro lado, los principios activos antes citados pueden, llegado el caso, formularse en forma de micro- o nano-

partículas preferiblemente bioreabsorbibles para ser atrapados en el gel. Asimismo, el principio activo puede presentarse en forma de conjugados polímero vector-principio activo, clásicamente denominados profármaco macromolecular.

- 5 Varios principios activos de naturaleza diferente se pueden administrar simultáneamente gracias a la solución conforme a la presente invención. Esta polivalencia es particularmente interesante para los sitios tumorales multirresistentes. El interés es fácilmente extensible a la trampa temporal de péptidos, de proteínas, de genes y de moléculas que, en general, plantean un problema debido a su solubilidad exclusiva en los medios acuosos y que, en el caso de sistemas particulares matriciales o capsulares, conllevan frecuentemente una liberación demasiado
- 10 rápida e inadecuada y movilizan generalmente una cantidad de materia ajena al medio vivo importante con respecto a la implicada en las formulaciones a base de PAG.

Productos visibles por procesamiento de imágenes médico

- 15 La asociación según la invención puede también comprender al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico.

A título de producto visible por procesamiento de imágenes médico, se pueden citar muy particularmente los opacificantes, tal como un óxido o una sal mineral, por ejemplo el sulfato de bario o el óxido de circonio para permitir

20 un seguimiento por rayos X, unas partículas magnéticas o unas nanopartículas paramagnéticas para perturbación por un campo magnético.

Se pueden citar también los agentes fluorescentes o los emisores de radiaciones ionizantes, para hacer el hidrogel visible mediante las técnicas apropiadas correspondientes.

- 25 Preferentemente, el producto visible por procesamiento de imágenes médico se selecciona entre un opacificante, un agente fluorescente o un emisor de radiaciones ionizantes.

Según una variante de realización, la asociación según la invención comprende poli(N-acrilóil glicinamida), al menos un principio activo y al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, en un medio acuoso fisiológicamente aceptable.

Medio acuoso fisiológicamente aceptable

- 35 El medio acuoso fisiológicamente aceptable según la invención se prepara preferentemente a base de un líquido fisiológico.

Un líquido fisiológico es un líquido isotónico de la sangre, es decir que presenta la misma osmolaridad que los principales fluidos corporales, en particular la sangre, es decir aproximadamente 300 mosm/l y generalmente

40 tamponado a pH = 7,4.

Tal líquido se puede denominar también solución fisiológica o suero fisiológico.

- 45 Este líquido está generalmente compuesto de agua destilada y de cloruro de sodio NaCl diluido a 9 por 1000, o bien una solución al 0,9% de peso/volumen de NaCl, o bien 9 g/l.

El líquido fisiológico puede también contener KCl, CaCl₂ o MgSO₄.

- 50 Por "medio fisiológicamente aceptable" se entiende más generalmente un medio sin toxicidad y compatible con la inyección y/o la aplicación de la asociación considerada según la invención. En particular, se entiende un medio compatible con los fluidos, tejidos y células del sitio de aplicación considerado.

Asociación según la invención

- 55 Como se ha expuesto ya anteriormente, la asociación según la invención comprende poli(N-acrilóil glicinamida) y al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, en un medio acuoso fisiológicamente aceptable.

Según un modo de realización particular, la poli(N-acrilóil glicinamida) está presente en el medio acuoso en una cantidad en materia seca comprendida entre el 0,5 y el 20% en peso con respecto al peso total de dicho medio, en particular en una cantidad comprendida entre el 1 y el 10% en peso, incluso más particularmente entre el 2 y el 8% en peso.

- 65 La asociación según la invención puede también comprender unos aditivos, en particular unos hidrofobizantes tal como un lípido, un ácido graso o una amina grasa.

Dotados de un esqueleto poliacrílico, los PAG no son intrínsecamente degradables y/o biodegradables, y aún menos biorreabsorbibles. Sin embargo, las cantidades administradas son generalmente muy bajas y los riesgos de acumulación son en sí mismos bajos, ya que los contenidos en polímero que son administrados siguen siendo muy bajos, por ejemplo entre el 2 y el 8%, en peso con respecto al peso total de la composición considerada, y esto con el fin de satisfacer el intervalo de temperatura de transición gel-sol considerado en el ámbito de la presente solicitud e impuesto por el medio vivo.

Por otro lado, es posible obtener un PAG que presente unas propiedades mejoradas de biodegradabilidad por adición de un aditivo insoluble ligeramente básico tal como MgO , CaO . Sin embargo, es posible alterar las cadenas laterales en presencia de partículas de un compuesto insoluble más o menos básico (por ejemplo CaO , $Ca(OH)_2$, MgO , $Mg(OH)_2$, etc.) capaz de hidrolizar en todo o en parte las funciones amida presentes, y minimizar así las interacciones reticulantes que son el origen de la gelificación para llegar a formas solubles.

Sin estar ligado a la teoría, se puede suponer que las bases añadidas cortan las cadenas laterales para dejar la poli(N-acrilóil glicina) y probablemente unos copolímeros (poli(ácido acrílico-co-N-acrilóil glicinamida-co-N-acrilóil glicina) o también poli(ácido acrílico-co-N-acrilóil glicina) solubles, incluso poli(ácido acrílico) en forma de sal.

Así, el ejemplo 3 siguiente acredita este fenómeno que puede aprovecharse para ajustar el tiempo de presencia deseado en el sitio en el organismo y/o en la herida.

La formación de macromoléculas solubles en el sitio es particularmente interesante si sus masas molares medias son suficientemente bajas para que puedan eliminarse por filtración glomerular a nivel de los riñones.

Como se ha mencionado anteriormente, la asociación descrita anteriormente se presenta en forma de una formulación acuosa que comprende el polímero en forma de solución (sol) cuando se encuentra a una temperatura superior a la temperatura de transición gel-sol de la mezcla considerada.

Una solución acuosa de PAG caliente a una temperatura de algunos grados superior a la temperatura del sitio de administración necesita muy poco tiempo para pasar del estado sol al estado gel cuando se pone en contacto con el cuerpo humano, en particular entre 10 segundos y 5 minutos, más particularmente entre 30 segundos y 3 minutos.

La solución se puede preparar de manera extemporánea, gelificada y esterilizada localmente por ultrafiltración en caliente después de la fluidificación por calentamiento justo antes de la aplicación si fuese necesario o preferido.

Alternativamente, la mezcla se puede preparar por adelantado en forma deshidratada después de la lipofilización de una solución caliente esterilizada o no para su conservación. Después del calentamiento, la solución que comprende el polímero y el principio activo se puede esterilizar por ultrafiltración si fuese necesario, y envasarse después de la lipofilización, por ejemplo para su conservación. La estabilidad química del polímero conforme a la presente invención ofrece una posibilidad de almacenamiento largo sin precaución particular, lo que no es el caso de los sistemas matriciales degradables a base de PLA o de copolímeros PLA-PEG en particular.

Así, la presente invención describe también un liofilizado preparado a partir de una solución acuosa de poli(N-acrilóil glicinamida) y eventualmente de al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico y eventualmente de un aditivo.

La presente invención describe también el procedimiento de preparación de un liofilizado tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende al menos las etapas siguientes:

- la preparación de una solución acuosa gelificable de poli(N-acrilóil glicinamida);
- la esterilización de dicha solución;
- la gelificación de dicha solución por enfriamiento;
- la congelación del hidrogel; y
- la sublimación del hielo en vapor de agua, al vacío.

La presente invención describe también un liofilizado preparado a partir de una solución de poli(N-acrilóil glicinamida) y de al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico.

Así, según una variante de realización, la presente invención se refiere a un liofilizado preparado a partir de una solución acuosa de poli(N-acrilóil glicinamida), y de al menos un principio activo y/o de al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, dicha asociación de la poli(N-acrilóil glicinamida) con al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico que presenta una temperatura de

transición gel-sol comprendida entre 30 y 60°C, y estando en forma líquida por encima de la temperatura de transición gel-sol y en forma de gel por debajo de la temperatura de transición gel-sol.

5 La presente invención se refiere también al procedimiento de preparación de un liofilizado tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende al menos las etapas siguientes:

- preparar una solución acuosa de poli(N-acrilóil glicinamida) y de al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico;

10 - esterilizar dicha solución;

- gelificar dicha solución por enfriamiento;

- congelar el hidrogel; y

15 - sublimar el hielo en vapor de agua, al vacío.

Aplicaciones

20 La asociación según la invención es particularmente útil para el suministro de un principio activo, en particular en terapia humana y veterinaria.

A título de aplicación considerada en el ámbito de la presente invención, se puede citar en particular el tratamiento local por suministro controlado tópico de principio activo.

25 Más particularmente, se puede citar el tratamiento local complementario de una ablación quirúrgica susceptible de dejar presente unos agentes patógenos o unas células proliferativas localmente o después de la migración, como es el caso de células tumorales residuales en algunos cánceres.

30 Así, el suministro local de principios activos a nivel del sitio tumoral a través de la cavidad intraperitoneal (ip) expone las células cancerosas residuales a dosis más importantes que las que pueden ser obtenidas por quimioterapia sistémica minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios.

35 La solución acuosa conforme a la presente invención se puede inyectar fácilmente, alternativamente a la administración intraperitoneal, directamente en o en contacto inmediato de un tumor para volver a una fase de depósito, según la voluntad del especialista usuario.

Así, en el ámbito de la presente invención, la asociación es más particularmente útil para el tratamiento local post-operatorio o per-operatorio, en particular de los pacientes que han sufrido una cirugía de reducción tumoral.

40 Más precisamente, la asociación según la invención es útil en el tratamiento antitumoral local per-operatorio después de la cirugía de reducción tumoral.

45 Por "tratamiento local per-operatorio" se entiende un tratamiento tópico aplicado alrededor de la zona del cuerpo animal, y más particularmente humano, que haya sufrido la ablación de una parte tumoral.

50 Por otro lado, en el ámbito de la presente invención, la asociación es útil para el tratamiento de heridas, en las que se puede aplicar directamente sobre la herida o bien mediante cualquier dispositivo de protección, en particular un vendaje, por ejemplo por impregnación de dicho dispositivo de protección por inmersión en la formulación acuosa en forma de solución caliente y enfriamiento que conduce a un vendaje recubierto de gel.

En caso de necesidad frente a una extracción que se hace difícil debido a una adhesión demasiado fuerte, se puede realizar un breve calentamiento de la venda reticente para volver a pasar el gel en sol, facilitando el despegado de la venda.

55 Según otro aspecto de la invención, la asociación es también útil para el seguimiento post-operatorio por procesamiento de imágenes médico.

La asociación según la invención puede ser útil para el tratamiento de los animales, en particular de los humanos.

60 La asociación según la invención puede también ser útil en otros numerosos campos en los que se explotan unas formas de liberación prolongada de compuestos activos, como en cosmética (cremas depilatorias, agente ácido de erosión cutánea, etc.) o en agricultura (tratamiento de plantas, de colmenas, etc.).

65 La administración puede utilizar una formulación galénica en forma de solución gelificable *in situ*. La misma formulación se puede administrar también en forma de polvo procedente de una liofilización, en particular tal como

se ha descrito anteriormente, hinchándose esta última por captura del agua de los fluidos biológicos locales. Es asimismo posible administrar el hidrogel en sí mismo por inyección, mientras su viscosidad lo permita.

La solución acuosa conforme a la presente invención puede ser, por ejemplo, directamente aplicada por untura.

Se puede utilizar un instrumento (pincel, espátula, peine) para extender la fase sol en el sitio, o bien inyectar la fase sol con la ayuda de una jeringa calentadora controlada, o también dispersar un polvo de liofilizado formulado.

El objeto de la presente invención se extiende a cualquier soporte galénico para la aplicación tópica que comprende una asociación conforme a la presente invención.

Kit y envasado

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit o a un conjunto de envasado, que comprende un recipiente que comprende un gel formulado al que se añadirá una cantidad de líquido fisiológico estéril dada antes del calentamiento para obtener una solución caliente.

Por "estéril" se entiende cualificar un entorno apto para garantizar la inocuidad requerida.

Alternativamente, el kit puede comprender al menos dos recipientes distintos o dos compartimientos distintos de un mismo recipiente, comprendiendo uno un liofilizado preparado a base de poli(N-acrilóil glicinamida) y comprendiendo el otro una cantidad suficiente de líquido fisiológico estéril que permite reconstituir la mezcla inicial mediante la mezcla con dicho liofilizado y calentamiento para obtener una solución caliente.

El usuario puede así reconstituir una composición según la invención, mezclando de manera extemporánea, justo antes de la aplicación, los diferentes constituyentes del kit.

Por ejemplo, según un modo de realización particular, se puede disponer de una bolsita policompartimentada, y más particularmente bicompartimentada.

Así, la bolsita puede presentar al menos dos compartimientos aislados el uno del otro por una membrana estanca pero suficientemente frágil para romperse bajo la acción de una compresión, estando cada compartimiento destinado a almacenar al menos un compuesto útil para la fabricación de una solución conforme a la invención.

Según una primera alternativa, la bolsita está bicompartimentada, comprendiendo el primer compartimiento al menos un suero fisiológico estéril, y comprendiendo el segundo compartimiento al menos un liofilizado de poli(N-acrilóil glicinamida).

Según una segunda alternativa, la bolsita está tricompartimentada, pudiendo cada compartimiento ser dedicado respectivamente al envasado del liofilizado de poli(N-acrilóil glicinamida), del suero fisiológico estéril y de al menos un principio activo a suministrar y/o de al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico.

En estos modos de realización, en los que los diferentes compuestos pueden aislarse ventajosamente el uno del otro dentro de compartimientos respectivos, una primera etapa implica entonces realizar previamente una ruptura de la membrana que separa los compartimientos, por ejemplo mediante una simple presión.

Según también otro aspecto, la presente invención se refiere a un frasco, que comprende al menos una mezcla preparada a partir de una solución acuosa de poli(N-acrilóil glicinamida) y eventualmente de al menos un principio activo y/o de al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, y que presenta un septum que permite extraer dicha mezcla después del calentamiento del frasco, por ejemplo con la ayuda de una jeringa calentadora o calentada.

Los modos de realización descritos anteriormente permiten prescindir de cualquier etapa que necesite un contacto de la composición con el entorno exterior, reduciendo por lo tanto significativamente los riesgos de contaminación.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1

Síntesis del monómero Acrilóil glicinamida (AG)

En un reactor de vidrio, sumergido en un baño de hielo, provisto de una agitación mecánica (a 500 rpm) y de un termómetro, se dispersan 113,62 gramos (1,03 mol) de clorhidrato de glicinamida en 700 ml de diclorometano.

Cuando la temperatura alcanza aproximadamente 5°C, se añaden rápidamente 100 ml de cloruro de acrilóilo (1,23 mol). Se añaden después 565 ml de una solución de carbonato de potasio 2M gota a gota de tal manera que la

temperatura no exceda 20°C. Al final de la adición, el pH de la fase acuosa es aproximadamente 7-8 (medición en papel pH). La agitación se mantiene durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente.

5 La fase acuosa se separa, se pasa sobre carbón activo, se filtra e inmediatamente se pone a liofilizar. Se recuperan 290 g de una mezcla esencialmente constituida de AG y de cloruro de potasio KCl que se trituran finamente.

El AG se extrae de esta mezcla con 16 fracciones de 500 ml de acetona, cada fracción se coloca durante 5 a 15 minutos en un recipiente de ultrasonidos.

10 En un primer experimento, se recuperan 93,7 g de AG bruto (el rendimiento bruto es del 70%) y se recrystalizan en 3 litros de acetona. Después del lavado con acetona, el AG se seca al vacío (< 0,01 mbar) a 35°C durante dos días.

El rendimiento de recrystalización es del 68%.

15 En un segundo experimento, los 93,7 g de AG bruto se recuperan (el rendimiento bruto es del 70%) y se recrystalizan en 800 ml de una mezcla acetona – metanol (9:1 en volumen). Después del lavado con acetona, el AG se seca al vacío (< 0,01 mbar) a 35°C durante dos días.

El rendimiento de recrystalización es del 20%.

20 RMN ¹H (D₂O): δ(ppm) 6,06 (2H, CH₂=C); 5,60 (1H, CH=C); 3,76 (2H, CH₂CO).

RMN ¹³C (D₂O): δ(ppm) 175,5 (CO-NH₂); 169,0 (CO-NH); 129,9 (CH₂=CH); 128,6 (CH=CH₂); 42,5 (CH₂NH).

25 Análisis calculado para C₅H₈N₂O₂: C, 46,87; H, 6,29; N, 21,86; O, 24,97.

Análisis medido para C₅H₈N₂O₂: C, 46,96; H, 6,29; N, 21,74; O, 25,01.

Punto de fusión: 126-127°C

30 Polimerización de N-acrilóil glicinamida (AG)

La polimerización radicalaria de AG en solución acuosa se realiza a concentración en monómero AG y en cebador K₂S₂O₈ constantes: [AG] = 0,5 mol/l y [K₂S₂O₈] = 5 x 10⁻⁴ mol/l. La concentración en 2-propanol (agente de transferencia = AT) varía entre 0 y 4 mol/l.

El AG, el K₂S₂O₈ (cebador redox), el AT y el agua se introducen en un tubo de vidrio de 150 ml. El medio de reacción se desgasifica haciendo circular una corriente de argón durante aproximadamente 1 hora. El tubo bajo argón se coloca en un baño de agua termostataado a 60 + 0,2°C durante 24 a 26 horas.

40 Se utilizan dos modos de recuperación del poli(acrilóil glicinamida) (PAG) en función de la concentración en AT:

1) para una concentración [AT] > 1,5 mol/l, la mezcla de reacción se dializa contra agua con la ayuda de una membrana Spectrapore (poder de corte M_w = 3500) y liofilizado;

45 2) para una concentración [AT] < 1,5 mol/l, el PAG se precipita en 6 volúmenes de metanol con la ayuda de una mezcladora (Waring Blendor), después se lava con metanol y se seca al vacío a 50°C durante 2 a 3 días.

Los rendimientos están comprendidos entre el 80 y el 90%.

50 RMN ¹H (D₂O-NaSCN 2M): δ (ppm) 4,00 (2H, CH₂-CO); 2,32 (1H, CH-C); 1,72 (2H, CH₂-C).

RMN ¹³C (D₂O-NaSCN 2M): δ (ppm) 177,8 (CO-NH₂); 174,5 (CONH); 134,0 (SCN); 42,9 (CH₂-NH); 35,9 (2C, CH₂CH).

55 Los polímeros obtenidos se caracterizan por RMN ¹H y RMN ¹³C, por ejemplo con un espectrómetro Bruker (100 MHz). Los puntos de fusión se miden sobre un banco Kofler. Las mediciones viscosimétricas se realizan a 25°C sobre un aparato automático de tipo Ubbelohde o un viscosímetro automático.

60 La tabla 1 siguiente presenta unos datos relativos a la polimerización radicalaria de AG ([AG] = 0,5 mol/l) en solución acuosa a 60°C iniciada por el persulfato de potasio ([K₂S₂O₈] = 5x10⁻⁴ mol/l) para diferentes concentraciones en agente de transferencia (2-propanol).

Tabla 1

PAG N°	[2-propanol] en mol/l	$[\eta]$ (dl/g) H ₂ O-NaSCN 2M a 25°C	Mn x 10 ⁻³
1	0	gel químico	----
2	0,16	1,12	549
3	0,30	0,91	369
4	0,43	0,69	216
5	0,69	0,62	176
6	0,98	0,42	83
7	1,20	0,40	79
8	1,66	0,28	38
9	2,00	0,26	33
10	3,33	0,20	20
11	3,99	0,18	16

5 Las síntesis de PAG n° 5, 6 y 9 se han reproducido con las mismas condiciones de realización. Los PAG obtenidos poseen las viscosidades respectivas de 0,55, 0,39 y 0,29 dl/g que corresponde respectivamente a los Mn viscosimétricos de 140, 72 y 41 x 10⁻³.

10 Estas duplicaciones muestran que las diferencias son del orden del 10 al 15%. Estos valores son tolerables teniendo en cuenta la precisión de las determinaciones de masas molares medias por viscosimetría.

Se puede utilizar la ecuación siguiente (según C.A. Barson en Comprehensive Polymer science, Vol. 3, Chain Polymerization I; Pergamon Press, New-York, 1989, p. 173) para determinar la constante de transferencia al 2-propanol:

$$1/DP_n = 1/DP_0 + C_M + C_S[S]/[M] + C_A[A]/[M] + C_{AT}[AT]/[M]$$

En la que:

20 - DP₀ representa el grado de polimerización medio en número DP_n en ausencia de reacción de transferencia;

- C_M, C_A, C_S y C_{AT} son las constantes de transferencia al monómero M, al cebador A, al disolvente S y al agente de transferencia AT;

25 - [S] = la concentración en disolvente;

- [A] = la concentración en cebador;

- [M] = la concentración en monómero; y

30 - [AT] = la concentración en agente de transferencia.

La figura 1 representa la variación del grado de polimerización medio en número DP_n de los PAG obtenidos a 60°C (□) y a 75°C (■) en función de la concentración en 2-propanol (agente de transferencia: AT). La concentración en monómero M es constante: [M] = 0,5 mol/l (□) y 0,75 mol/l (■).

40 Cuando las concentraciones en monómero M y en cebador A son constantes y se ignora la baja variación de concentración en disolvente con respecto a la concentración en AT (34,5 < [H₂O] (mol/l) < 54,5), la constante de transferencia al 2-propanol se puede estimar según la variación lineal de 1/DP_n en función de la relación [AT]/[M].

Esta variación se representa en la figura 1 en el caso de los PAG obtenidos, descritos en la tabla anterior, a 60°C y de los PAG obtenidos a 75°C.

Los DP_n se calculan a partir de las mediciones viscosimétricas en H₂O-NaSCN 2M a 25°C.

45 El NaSCN es destructor de enlaces hidrógeno, permite evitar la gelificación a temperatura ambiente, a fin de efectuar la caracterización.

Los puntos experimentales están dispersos alrededor de una recta. La media de ecuación respectiva es:

$$1/DP_n = 1,02 [AT]/[M] - 3,94 \times 10^{-1} \text{ (el coeficiente de correlación es } R^2 = 0,988) \text{ a } 60^\circ\text{C; y}$$

$$1/DP_n = 1,04 [AT]/[M] - 4,94 \times 10^{-2} \text{ (el coeficiente de correlación es } R^2 = 0,999) \text{ a } 75^\circ\text{C.}$$

La ordenada tiende en el origen hacia cero y sugiere un DP_0 muy elevado, superior a 10^5 .

5 Las pendientes de estas rectas permiten estimar la constante de transferencia del 2-propanol: $C_{AT} = 1,02 \times 10^{-3}$ a 60°C y $C_{AT} = 1,04 \times 10^{-3}$ a 75°C .

Estos valores son del mismo orden de tamaño que la constante de transferencia de 2-propanol en el caso de la polimerización radicalaria en solución acuosa a 50°C de la acrilamida: $C_{AT} = 1,9 \times 10^{-3}$.

10 La temperatura de transición gel-sol de los geles de PAG en agua se ha determinado de la siguiente manera:

partiendo del polvo de PAG seco, se preparan 10 g de suspensiones a concentraciones C del 2, 4, 6, 8 y 10% en peso en agua en unos tubos de ensayo de 20 ml.

15 El fenómeno de gelificación está sujeto a histéresis, a fin de obtener un gel reproducible, se procede por lo tanto a varios ciclos gel-sol según el procedimiento de reciclaje siguiente:

Las suspensiones se calientan a 80°C durante 2 horas, después se enfrían a temperatura ambiente.

20 La fase sol se reforma por calentamiento a 80°C durante 5 minutos.

Se determina una primera temperatura de transición gel-sol.

La sol se enfría entonces a 0°C en agua y hielo.

25 Después de un tiempo de 30 minutos, el gel se deja volver lentamente, a una velocidad de $4^\circ\text{C}/\text{min}$, a 80°C .

Se registra una nueva temperatura de transición gel-sol.

30 El gel se enfría de nuevo a 0°C durante 30 minutos.

Incurren dos nuevos ciclos similares.

35 Las cuatro temperaturas observadas se indican para cada polímero y concentración en la tabla 2. La reproducibilidad parece buena a partir del tercer ciclo, a veces a partir del segundo.

La tabla 2 siguiente presenta la influencia de ciclos caliente-frío sucesivos sobre la temperatura de transición gel-sol $T_{\text{gel/sol}}$ sobre unas formulaciones de concentración C en PAG de masa molar Mn.

40 La masa molar Mn se determina por viscosimetría a 25°C en agua en presencia de NaSCN 2M, aplicando la ley de viscosidad $[\eta] = 1,16 \times 10^{-3} \text{ Mn}^{0,52}$ según H.C. Hass, R.I. Mac Donald y A.N. Schueler, J. Polym. Sci., Part A1, 1970, 8, 1213.

Tabla 2 (sobre 4 ciclos)

45

Concentración C (% másico)	Mn = 549×10^3 ($100 \text{ cm}^3/\text{g}$)	Mn = 176×10^3 ($100 \text{ cm}^3/\text{g}$)	Mn = 79×10^3 ($100 \text{ cm}^3/\text{g}$)	Mn = 41×10^3 ($100 \text{ cm}^3/\text{g}$)
2	59/61/57/57	a)	a)	a)
4	64/75/70/70	52/57/50/50	a)	a)
6	80/80/80/80	59/64/62/62	35/50/48/49	32/36/35/35
8	b)	67/72/70/68	55/60/58/58	46/52/48/48
10	b)	70/75/75/73	60/63/64/63	52/56/55/55

a) sin formación de gel a 25°C y a 0°C

b) no determinado

50 Se puede deducir de la tabla 2 que los PAG de Mn = 549×10^3 a C = 2%, de Mn = 176×10^3 a C = 4% o 6%, de Mn = 79×10^3 a C = 6% o 8%, y de Mn = 41×10^3 a C = 6 o 8% o 10%, estarán particularmente considerados en el ámbito de la presente invención (parte en gris).

55 La figura 2 representa la variación de la temperatura de transición gel-sol $T_{\text{gel-sol}}$ en función de la concentración para los PAG de masas moleculares Mn $\times 10^{-3} = 41$ (■), 76 (◆), y 549 (●).

La figura 3 representa una variación de las temperaturas de separación de fase (transición gel-sol) en función de la

masa molecular M_n de los PAG para unas concentraciones C de 6% (■), 8% (▲) y 10% (●).

Ejemplo 2

- 5 Se han operado cuatro ratones normales 1 a 4, tratados según las reglas éticas en vigor, por apertura de la cavidad peritoneal a título preliminar y han recibido 1 ml de solución (1, 2, 3 o 4) virgen que asocia un PAG (369000 g/mol) y doxorubicina, administrada con la ayuda de jeringas calentadas con aire caliente.
- 10 Preparación de la solución 1 para el ratón 1: 100 mg de PAG nº 3 del ejemplo 1 en polvo se colocan en un matraz de Erlenmeyer, se añaden 4 ml de suero fisiológico. La mezcla se calienta progresivamente para alcanzar una temperatura de disolución con la formación de un medio homogéneo a 60-65°C. La mezcla que se enfría pero que permanece en solución, se administra en la cavidad intraperitoneal del ratón 1 y se deja gelificar *in situ* durante 2 minutos hasta la gelificación a 37°C. El abdomen del ratón se cierra mediante puntos.
- 15 Preparación de la solución 2 para el ratón 2: la solución 2 se prepara según el mismo modo de realización que la solución 1 con las cantidades siguientes: se introducen 25 mg de PAG nº 3 y 4 mg de doxorubicina clorhidrato (D_{ox}) en 4 ml de suero fisiológico después de la formación del medio homogéneo.
- 20 Preparación de la solución 3 para el ratón 3: la solución 3 se prepara según el mismo modo de realización que la solución 1 con las cantidades siguientes: se introducen 100 mg de PAG nº 3 y 4 mg de doxorubicina clorhidrato (D_{ox}) en 4 ml de suero fisiológico después de la formación del medio homogéneo.
- 25 Preparación de la solución 4 para el ratón 4: la solución 4 se prepara según el mismo modo de realización que la solución 1 con las cantidades siguientes: se introducen 100 mg de PAG nº 3 y 0,8 mg de doxorubicina clorhidrato (D_{ox}) en 4 ml de suero fisiológico después de la formación del medio homogéneo (concentración terapéutica).
- 30 Durante la administración de la mezcla no gelificante en el ratón 2, el operario constató una fuga de la solución durante el cierre de la cavidad, inconveniente bien conocido por los especialistas cuando utilizan unas soluciones de agente antitumoral.
- 35 Después de dos días, los ratones 2 y 3, vivos pero muy afectados por la fuerte dosis de Dox, se sacrificaron. La cavidad intraperitoneal del ratón 2 apareció vacía. El ratón 3 apareció casi normal con sólo unas trazas de gel en forma de pequeños trozos incrustadas en las grietas.
- 40 Parece que una amplia parte del gel ha desaparecido, por lo menos visualmente.
- Los otros dos ratones 1 y 4 vivían todavía al final de 4 días y ninguno parecía afectado por la presencia del gel o del gel-Dox.
- 45 Ejemplo 3: mezclas para ensayo de degradabilidad parcial de PAG a PAA (poli(ácido acrílico)) salificado
- Se ponen 40 mg de PAG nº 3 en presencia de 1 ml de agua en un frasco calentado a 80°C, para obtener una solución límpida, la solución se gelifica por enfriamiento y sufre dos nuevos ciclos caliente-frío (como se describe en el ejemplo 1) para obtener un gel homogéneo.
- 45 Se añaden 4,5 mg de mineral finamente pulverizado ($BaSO_4$, $Ca(OH)_2$, $Mg(OH)_2$ o Na_2CO_3) y la mezcla gel-mineral se vuelve a poner en solución en caliente y la dispersión se homogeneiza con la ayuda de un homogeneizador y se enfría bajo agitación para proporcionar una dispersión homogénea de sal en el gel después del enfriamiento.
- 50 Los diferentes frascos se colocan después en una incubadora llevada a 37°C.
- Según el mineral, se observa:
- 55 Para el $BaSO_4$ (sulfato de bario) una opacidad del gel y una estabilidad del gel durante 5 semanas;
- para el $Ca(OH)_2$ (hidróxido de calcio) que es una base débil muy poco soluble, el medio está todavía gelificado después de 5 semanas;
- para $Mg(OH)_2$ (hidróxido de magnesio) que es una base débil poco soluble, el gel pierde su viscosidad después de 4 días. Después de 2 semanas, el gel deja lugar a una solución muy viscosa; y
- 60 - para Na_2CO_3 que es una base más fuerte, el gel se licúa a partir del segundo día y deja progresivamente lugar a una solución viscosa y límpida.
- 65 Este ejemplo tiene como objetivo ilustrar la modulación que se puede utilizar para ajustar la "degradabilidad solubilizante" de los PAG considerados.

Ejemplo 4: asociación que comprende un agente opacificante.

Se utiliza el mismo protocolo que para los productos básicos del ejemplo 3 para obtener un gel cargado con el 10% en peso de sulfato de bario o de óxido de circonio.

Tal concentración de estos agentes se utiliza a fin de hacer los cementos ortopédicos opacos a los rayos X.

Los hidrogeles correspondientes son entonces detectables por rayos X, lo que permite seguir su futuro *in situ*.

Ejemplo 5: asociación que comprende unas nanopartículas paramagnéticas

Se aplica el mismo protocolo que para los ejemplos 3 y 4 a 100 μ l de sol y se introducen en la mezcla 2 mg de nanopartículas paramagnéticas (NPM= de 5 a 200 nm de tipo óxido de hierro $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, a fin de hacer la sol y el gel sensibles a las sollicitaciones magnéticas utilizables para dar una forma durante la gelificación o también modificar la liberación de un compuesto atrapado temporalmente dentro de tal gel.

Después de la homogeneización, durante la gelificación, el gel coloreado marrón anaranjado es perfectamente estable.

Después de 10 semanas, la adición de 2 ml de agua no afecta a su comportamiento paramagnético y la solución sobrenadante permanece incolora durante un mínimo 4 meses, lo que confirma el atrapado de los NPM.

Se constata que la asociación conforme a la presente invención presenta una ventaja en términos de estabilidad.

Ejemplo 6: asociación de PAG con unos principios activos

Se ha ensayado la liberación de tres compuestos ("modelos de profármaco") independientemente:

1. El acetato de cobalto;

2- el poli(acrilato de sodio) fluorescente de masa molecular igual a 2000-2500 g/mol; y

3- el oligómero de poli(tirosina-formaldehído) de masa molecular igual a 2600 g/mol.

Modo de realización de la preparación:

Se ponen 60 mg de polímero PAG de masa molecular igual a 170000 g/mol en presencia de 1 ml de suero fisiológico (6% en masa) en un pequeño frasco cilíndrico cerrado herméticamente y calentado a 60°C durante algunos minutos para obtener una solución homogénea y límpida que se gelifica por enfriamiento.

Se repite el ciclo dos veces para perfeccionar la homogeneidad del gel.

Se añaden 10 mg de compuesto seleccionado como modelo de profármaco. La mezcla se calienta para obtener una solución homogénea que se deja enfriar para obtener el sistema compuesto-gel.

El frasco se coloca en una incubadora a 37°C móvil después de haber añadido por encima del gel formado 1 ml de suero fisiológico en el que el compuesto atrapado dentro del hidrogel se difundirá progresivamente. El medio de recepción se renueva entonces a tiempos regulares y el compuesto que se ha difundido se evalúa cuantitativamente por espectrometría UV. La curva de liberación progresiva se traza en porcentaje de la cantidad inicialmente colocada en el gel.

1) Ejemplo del acetato de cobalto, sal mineral:

La figura 4 representa la curva de liberación de acetato de cobalto en la poli(N-acrilóil glicinamida) de masa molar media igual a 170000 g/mol, en función del tiempo.

Esta curva es destacable por un bajo "burst" (inferior al 15% a 1 hora) y por una liberación progresiva que va hasta el agotamiento completo. El "burst" es una liberación a muy corto plazo que se debe al paso en solución del principio activo disponible en la superficie, es decir sin retención por la matriz.

En el mismo medio sin gel, la sal de cobalto sin gel se disuelve instantáneamente en su totalidad.

2) Ejemplo de un poli(acrilato de sodio) marcado a nivel del 2% de las unidades de repetición por la fluoresceinamina acoplada de manera covalente (PAAFLU):

La figura 5 representa la curva de liberación del poli(acrilato de sodio) en la poli(N-acrilóil glicinamida) de masa molar media igual a 170000 g/mol, en función del tiempo.

Aquí también, el "burst" es muy débil (inferior al 10%) y la liberación progresiva va hasta el agotamiento.

3) Ejemplo de un oligómero de poli(tirosina-formaldehído) denominado MV, de masa molecular también igual a 2600 g/mol:

La figura 6 representa la curva de liberación del oligómero de poli(tirosina-formaldehído) en la poli(N-acrilóil glicinamida) de masa molar media igual a 170000 g/mol, en función del tiempo.

Aquí también el "burst" es débil y la liberación total.

Ejemplo 7: inyección sobre ratones con azul de metileno como modelo de profármaco antitumoral para la administración intraperitoneal

Se observa el suministro del colorante del hidrogel cargado hacia los tejidos y órganos de la cavidad intraperitoneal en el ratón.

Para ello, se introduce una solución isotónica de PAG (de masa molar igual a aproximadamente 176000 g/mol, un 6% en peso de PAG) que contiene azul de metileno (4 ml de solución (20 mg de colorante) para 16 ml de gel) formada a 60°C acondicionada, en unas jeringas calentadas para ser inyectada rápidamente a 45°C a través de una aguja de calibre 23 a fin de rellenar la cavidad intraperitoneal de los ratones.

Los ratones tratados según los procedimientos reglamentarios se han sacrificado después de 2h, 8h, 24h, 30h y 52h (dos animales por punto).

Después de la apertura del abdomen, las distribuciones del color azul a nivel del gel, de los tejidos y de los órganos se apreciaron visualmente y se compararon al mismo tiempo con las observadas para los ratones control que han recibido por inyección similar una solución isotónica de la misma concentración en azul de metileno.

En los ratones tratados, la presencia retardada del colorante se ha observado a nivel de la grasa de los tejidos intestinales y abdominales con una coloración persistente a nivel de peritoneo y de los órganos abdominales todavía detectable después de 52 horas, decolorándose el gel progresivamente. En efecto, el gel, los tejidos y los órganos, en particular el hígado, permanecieron coloreados durante al menos 52 horas.

Sobre los ratones de control, el color azul desapareció totalmente después de 24h.

Estos resultados muestran que un gel PAG inyectado da claramente lugar a un efecto retardado *in vivo* y que se puede explotar para la liberación progresiva de una molécula modelo atrapada temporalmente en la cavidad intraperitoneal.

REIVINDICACIONES

1. Asociación de poli(N-acroloil glicinamida) con al menos un principio activo y/o al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, en un medio acuoso fisiológicamente aceptable, presentando dicha asociación una temperatura de transición gel-sol comprendida entre 30 y 60°C, y estando en forma líquida por encima de la temperatura de transición gel-sol y en forma de gel por debajo de la temperatura de transición gel-sol,
5 para su utilización en el tratamiento local post-operatorio o per-operatorio,
10 para su utilización en el tratamiento de las heridas, caracteriza por que se aplica directamente sobre la herida o por medio de cualquier dispositivo de protección, o
para su utilización en el seguimiento post-operatorio por procesamiento de imágenes médico.
- 15 2. Asociación para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha poli(N-acroloil glicinamida) presenta una masa molar media comprendida entre 10000 y 1000000 g/mol, en particular entre 30000 y 600000 g/mol, incluso entre 40000 y 200000 g/mol.
- 20 3. Asociación para su utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que presenta una temperatura de transición gel-sol comprendida entre 38 y 50°C, por ejemplo medida mediante el método del tubo invertido.
- 25 4. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha poli(N-acroloil glicinamida) está presente en el medio acuoso en una cantidad de materia seca comprendida entre el 0,5 y el 20% en peso, con respecto al peso total de dicho medio, en particular en una cantidad comprendida entre el 1 y el 10% en peso, incluso entre el 2 y el 8% en peso.
5. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho medio acuoso se prepara a base de un líquido fisiológico.
- 30 6. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho principio activo se selecciona entre los agentes antitumorales, los antibióticos, los analgésicos, los antiinflamatorios, los factores de crecimiento y los antisépticos.
- 35 7. Asociación para su utilización según la reivindicación anterior, caracterizada por que dicho principio activo es un agente antitumoral, seleccionado en particular entre la doxorubicina, el paclitaxel, el topotecán, y el irinotecán.
8. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho producto visible por procesamiento de imágenes médico se selecciona entre un opacificante, un agente fluorescente o un emisor de radiaciones ionizantes.
- 40 9. Asociación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el suministro de un principio activo.
- 45 10. Asociación según la reivindicación anterior, para su utilización en el tratamiento local post-operatorio o per-operatorio de pacientes que han sufrido una cirugía de reducción tumoral.
11. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo dicho dispositivo de protección un vendaje.
- 50 12. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se aplica por impregnación de dicho dispositivo de protección.
13. Asociación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento de los animales, en particular los seres humanos.
- 55 14. Liofilizado, caracterizado por que se prepara a partir de una solución acuosa de poli(N-acroloil glicinamida), y de al menos un principio activo y/o de al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, presentando dicha poli(N-acroloil glicinamida), con al menos un principio activo y/o de al menos un producto visible por procesamiento de imágenes médico, una temperatura de transición gel-sol comprendida entre 30 y 60°C, y estando en forma líquida por encima de la temperatura de transición gel-sol y en forma de gel por debajo de la temperatura de transición gel-sol.
- 60 15. Procedimiento de preparación de un liofilizado tal como se define según la reivindicación anterior, caracterizado por que comprende al menos las etapas siguientes:
65 - preparar una solución acuosa de poli(N-acroloil glicinamida) y de al menos un principio activo y/o al menos un

producto visible por procesamiento de imágenes médico;

- esterilizar dicha solución;

5 - gelificar dicha solución por enfriamiento;

- congelar el hidrogel; y

- sublimar el hielo en vapor de agua, al vacío.

10 16. Kit o conjunto de envasado, que comprende, en al menos dos recipientes distintos o dos compartimientos distintos de un mismo recipiente, por un lado al menos un liofilizado según la reivindicación 14 y, por otro lado al menos una cantidad suficiente de líquido fisiológico.

15

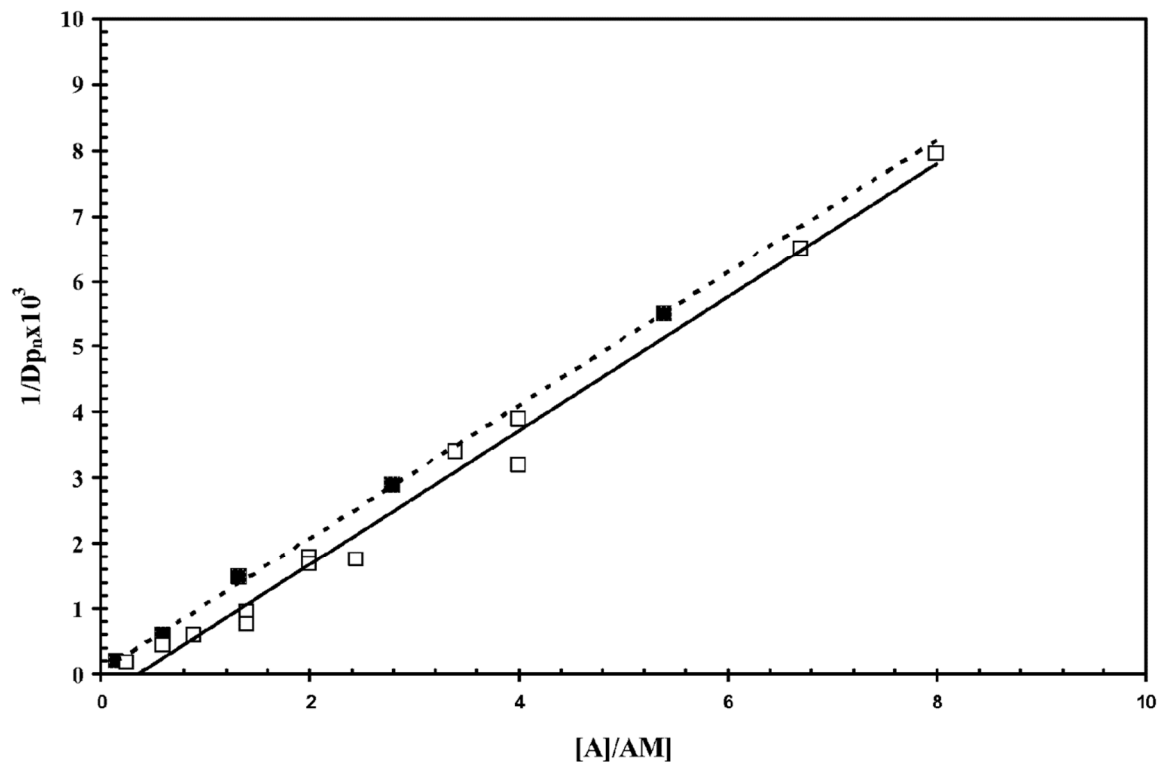


Figura 1

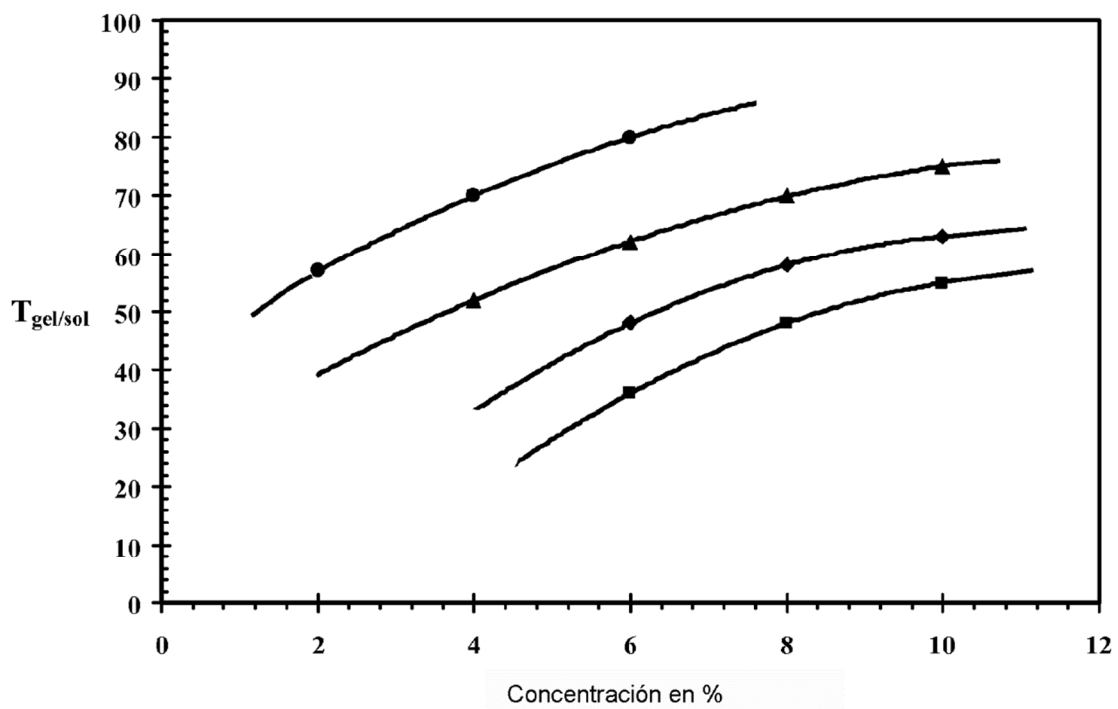


Figura 2

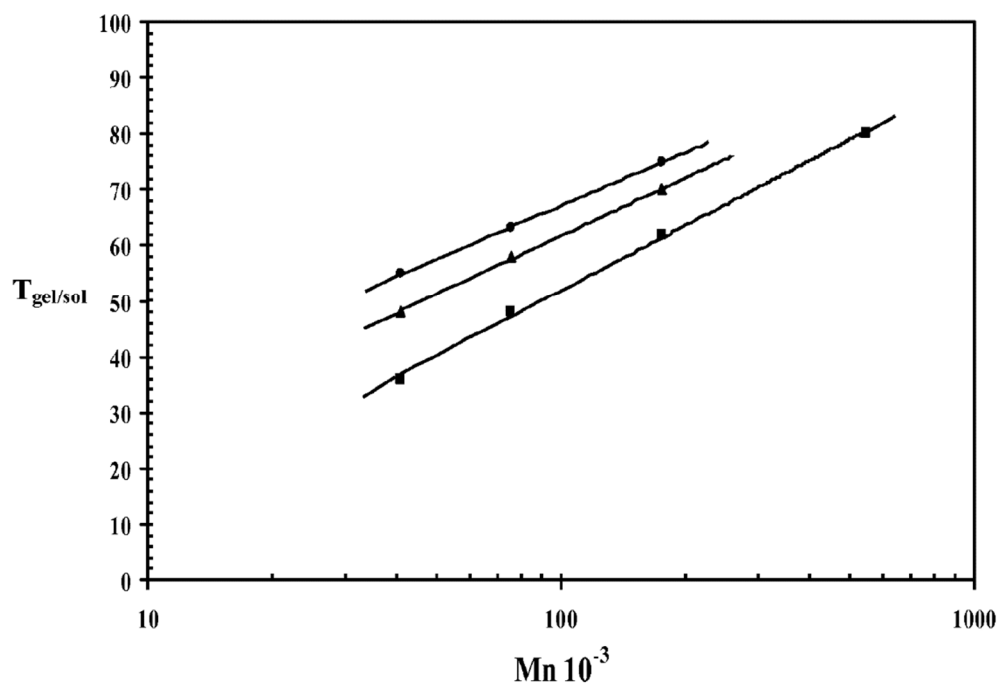


Figura 3

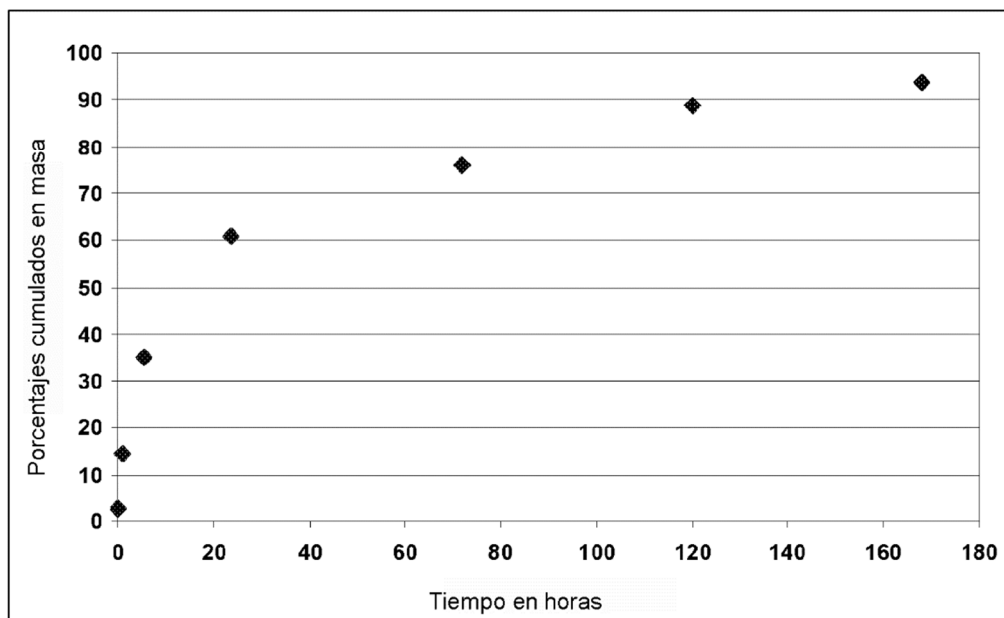


Figura 4

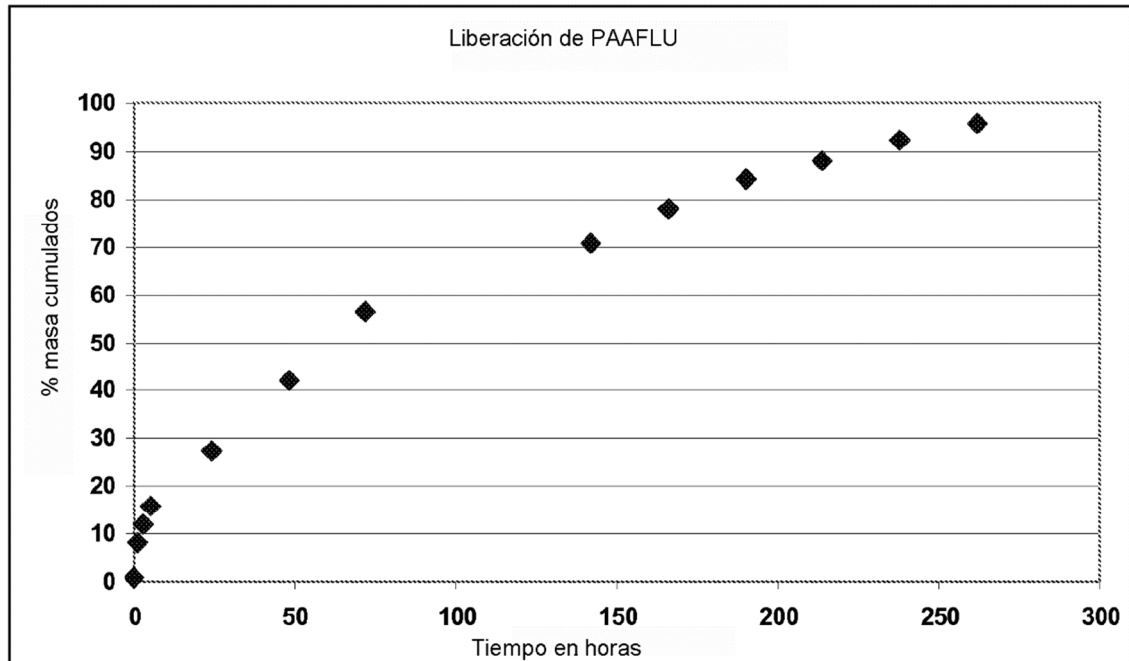


Figura 5

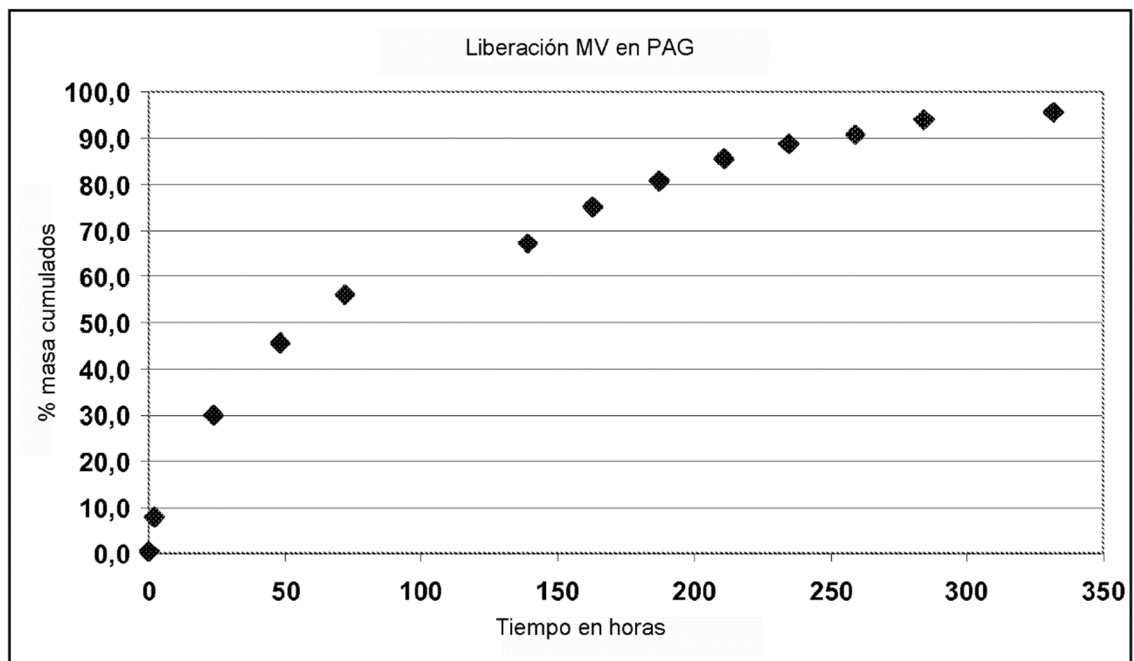


Figura 6