

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 269**

51 Int. Cl.:

<b>C08J 3/24</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/52</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)
<b>A61L 31/14</b>	(2006.01)
<b>A61L 31/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>C08J 3/075</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2009 PCT/CN2009/001013**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10043106**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09820182 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2353612**

54 Título: **Hidrogel reticulado inyectable in situ y el procedimiento de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

**16.10.2008 CN 200810043845**

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

**18.04.2018**

73 Titular/es:

**BIOREGEN BIOMEDICAL (CHANGZHOU) CO., LTD. (100.0%)  
No. 165 East East Road  
Changzhou, Jiangsu 213025, CN**

72 Inventor/es:

**SHU, XIAOZHENG**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 664 269 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Hidrogel reticulado inyectable in situ y el procedimiento de preparación y uso del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un hidrogel, y particularmente a un hidrogel reticulado, con enlace de disulfuro, inyectable in situ. Además, la presente invención se refiere a sus procedimientos de preparación y al uso en medicina o en operaciones quirúrgicas.

Antecedentes de la invención

10 El hidrogel es la sustancia más común e importante con alto contenido de agua pero insoluble en agua. Pueden absorber agua con una cantidad de hasta varios cientos de veces su propio peso mientras todavía mantienen sus formas. Los geles naturales que existen dentro de la mayoría de organismos y de plantas, y muchos geles químicamente sintetizados pertenecen a los hidrogeles. Los geles macromoleculares son un tipo de hidrogeles comunes. Tienen una estructura de red reticulada tridimensional que se compone de las cadenas principales de las macromoléculas, y sus cadenas laterales también contienen grupos hidrofílicos (polares), grupos hidrófugos y/o grupos disociables con el disolvente atrapado en la red molecular. Los sitios reticulados de la red de gel macromolecular 15 pueden formarse mediante reticulación química por medio de enlaces covalentes, o pueden formarse mediante reticulación física por medio de la interacción electrostática, la interacción de enlace de hidrógeno, la interacción hidrófuga, etc.

20 Los hidrogeles, especialmente los hidrogeles macromoleculares que se preparan con los materiales de matriz extracelular son usados ampliamente en campos de la biomedicina. Comparados con los hidrogeles preparados con materiales sintéticos, los hidrogeles que se preparan con la matriz extracelular tienen muchas ventajas, tales como la estimulación del ambiente natural dentro de los organismos, un contenido muy alto de agua, buena permeabilidad, mejor biocompatibilidad y de gran habilidad enzimática ajustable (Silva et al, Curr Top Dev Biol, 64, 181, 2004; Drury et al, Biomaterials, 24, 4337, 2003). De modo más importante, la matriz extracelular puede poseer funciones de bioinducción, puede dirigir e inducir la regeneración específica de los tejidos. Por ejemplo, el hialuronato de sodio es una macromolécula de matriz extracelular natural que posee funciones biológicas tales como el manejo de la adhesión y migración celular y la regulación de la división y diferenciación celular. El hialuronato de sodio de alto peso molecular puede inducir una célula madre de médula de extremidad embrionaria de un pollo que puede diferenciarse a una célula de cartílago (Kujawa et al, Develop Biol, 114, 519, 1986). Por lo tanto, en el campo de la biomedicina (particularmente la ingeniería de tejidos), se presta más y más atención al hidrogel preparado con matriz extracelular.

30 Aunque los hidrogeles tienen una cantidad de ventajas, su procedimiento de administración limita significativamente su amplia aplicación en el campo de la biomedicina. En la actualidad, muchos productos médicos de hidrogeles se formulan en películas y esponjas porosas, etc., por ejemplo, esponja de gelatina y esponjas de colágeno. Habitualmente estos productos pueden usarse solamente por vía tópica o en laparotomía. Sin embargo, con el desarrollo de la tecnología médica, más y más doctores y pacientes se inclinan a la cirugía mínimamente invasiva, lo cual requiere que los productos médicos también pueden usarse bajo endoscopios, lo cual presenta un nuevo reto para desarrollar productos médicos.

40 Los productos médicos de hidrogel inyectable pueden usarse bien sea bajo un endoscopio o en combinación con una cirugía mínimamente invasiva. También son adecuados para heridas tridimensionales de cualquier forma complicada y pueden adherirse las heridas muy bien, lo cual tiene perspectivas de amplia aplicación en el campo de la biomedicina. Por ejemplo, en la actualidad diversos hidrogeles reticulados inyectables hechos a partir de hialuronato de sodio que superan el riesgo de inmunogenidad del material de relleno antiarrugas de colágeno han sido ampliamente usados en cosmetología como materiales de relleno antiarrugas de nueva generación. Como productos representativos de tales materiales de relleno antiarrugas de nueva generación, Restylane (Q-Med, Suecia), Hylaform (Inamed Corporation, Estados Unidos), Juvederm (Leaderm, Francia), Belotero (Anteis, Suiza), y Puragen (Mentor Corporation, Estados Unidos) se encuentran comercialmente disponible en Europa (entre ellos Restylane y Hylaforms han sido aprobados además por la FDA de los Estados Unidos).

50 Actualmente, la mayoría de productos médicos de hidrogeles se preparan mediante reticulación química, seguida por una purificación para retirar agentes residuales reticulante y subproductos. Sin embargo, los agentes químicos reticulante habitualmente tienen grandes efectos tóxicos y colaterales, e incluso un procedimiento complicado puede difícilmente garantizar la retirada de ellos completamente. De modo más grave, los agentes reticulantes residuales que tienen parte de los grupos funcionales reticulados han sido inmovilizados en el hidrogel por medio de enlaces covalentes y no pueden retirarse. Estos agentes reticulantes residuales pueden causar síntomas tóxicos y colaterales tales como inflamación en un contexto clínico. Por ejemplo, la cantidad de trazas de agentes reticulantes residuales en la esponja de gelatina puede causar grave respuesta de inflamación en los organismos. Los hidrogeles reticulados inyectables descritos previamente, hechos de hialuronato de sodio, también se preparan mediante el procedimiento reticulante en primer lugar y luego purificación. Por ejemplo, Restylane y Hylaforms se preparan mediante reacciones químicas entre el grupo hidroxilo de hialuronato de sodio y éter de diglicidilo de 1,4-tetrametilenglicol o sulfóxido de 55

divinilo (Malson et al, EP0185070, 1985; Balazs et al, US 4582865, 1986; Balazs et al, US 4713448, 1987). Sin embargo, el éter de diglicidilo de 1,4-tetrametilenglicol o el sulfóxido de divinilo residuales son muy difíciles de retirar completamente del hidrogel, y no pueden retirarse aquellos con un grupo funcional que se hace reaccionar y se fija en el hidrogel por medio del enlace covalente. Esta limitación no solamente requiere un procedimiento de purificación complicado, sino también plantea riesgos clínicos.

Recientemente han sido investigados hidrogeles reticulados enlazados con disulfuro. Este enlace de disulfuro es un enlace químico reversible; los grupos tiol libres pueden oxidarse en enlaces de disulfuro que pueden reducirse nuevamente a los grupos libres de tiol. Por ejemplo, actualmente el hidrogel reticulado por enlace de disulfuro ha sido usado como una matriz de cultivo celular y las células pueden recuperarse muy convenientemente adicionando un reductor de enlaces de disulfuro que sea compatible con las células.

Los oxidantes (es decir, peróxido de hidrógeno, yodo, peróxido de alquilo, peróxido ácido, sulfóxido de dimetilo,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{4+}$ , etc.) pueden oxidar grupos tiol en enlaces de disulfuro (Capozzi G.; Modena G., en *The Chemistry of the Thiol Group Part II*; Patai S. Ed.; Wiley: New York, 1974; pp 785-839). Sin embargo, estos oxidantes habitualmente tienen ciertos efectos tóxicos y colaterales y son muy dañinos si se dejan en los productos médicos; además, su capacidad de oxidaciones demasiado fuerte y la reacción es tan vigorosa que el enlace de disulfuro se oxida adicionalmente en subproductos tales como sulfonato (Shu et al, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002; Capozzi et al, *The Chemistry of the Thiol Group Part II*, 785, 1974).

El oxígeno también puede oxidar grupos tiol libres en enlaces de disulfuro y producir también dos moléculas de agua, sin ningún otro subproducto. Preparar hidrogeles reticulados con enlace de disulfuro con oxígeno gaseoso como oxidante tiene muchas ventajas, tales como unas condiciones de reacción simples y suaves y no se necesita un agente reticulante. Usando oxígeno gaseoso como el agente reticulante para preparar hidrogeles reticulados con enlace de disulfuro, se espera romper la limitación del agente reticulante residual en el procedimiento de preparación de hidrogel, tal como se ha descrito antes.

Los hidrogeles reticulados con enlace de disulfuro tienen muchas aplicaciones potenciales en el campo de la biomedicina y se les ha prestado mucha atención en los años recientes. Sin embargo, hasta ahora no ha habido un informe acerca de sus aplicaciones clínicas prácticas y hay dos razones principales responsables de esto. La primera es que el procedimiento actual de preparación del hidrogel reticulado con enlace de disulfuro no es adecuado para la producción industrializada. Usar oxígeno gaseoso para oxidar el grupo tiol en el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro en condiciones fisiológicas es un procedimiento lento que necesita consumir continuamente mucho oxígeno gaseoso. Ampliamente se acepta por parte de los expertos en la materia que comúnmente hacer la solución abierta al aire es una precondición para formar el gel reticulado con enlace de disulfuro. En los informes divulgados actualmente, todas las soluciones biocompatibles de macromolécula que contienen grupos tiol necesitan estar abiertas al aire para formar el gel reticulado con enlace de disulfuro. Por ejemplo, la solución de derivado de hialuronato de sodio tiolado puede formar el gel reticulado con enlace de disulfuro al abrirse al aire y producir una película reticulada con enlace de disulfuro después de haberse secado (Shu et al, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002); la solución mezclada de un derivado de hialuronato de sodio tiolado y un derivado de colágeno tiolado pueden formar el gel reticulado con enlace de disulfuro cuando está abierta al aire y producir la película reticulada con enlace de disulfuro o la esponja porosa después de haberse secado a las temperaturas normales o de congelamiento (Shu et al, *Biomaterials*, 24, 3825, 2003; Liu et al, *Journal of Biomedical Materials Research*, 68, 142, 2004). Lo segundo para impedir que el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro se use en la práctica clínica es la forma del producto. La mayoría de los geles reticulados con enlace de disulfuro actualmente reportados se preparan en la forma de una película o una esponja y pueden usarse solamente por vía tópica o en laparotomía, sin cumplir los requisitos de muchas terapias clínicas (especialmente la cirugía mínimamente invasiva).

Hasta ahora no ha habido un prejuicio técnico generalizado entre aquellos expertos en la técnica. La solución biocompatible de macromolécula que contiene el grupo tiol necesita abrirse al aire para formar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro (Shu et al, *Biomaterials*, 24, 3825, 2003; Liu et al, *Journal of Biomedical Materials Research*, 68, 142, 2004; George et al, *PCT Int. Appl. WO 2008/098019*; Wallace et al, *US6624245*). En una gran medida, este prejuicio limita el procedimiento de producción industrializado a gran escala del hidrogel reticulado con enlace de disulfuro. Hasta ahora no ha habido un informe acerca de la preparación del hidrogel reticulado con enlace de disulfuro en un contenedor inyectable sellado, aunque este hidrogel reticulado con enlace de disulfuro, inyectable, tiene amplias aplicaciones en el campo de la biomedicina.

#### Resumen de la invención

Un primer propósito de la presente invención es proporcionar un hidrogel reticulado con enlace de disulfuro que sea inyectable in situ, cuyo procedimiento de gelificación finalice en una jeringa. Este hidrogel reticulado con enlace de disulfuro que es inyectable in situ es conveniente para usar, libre de impurezas y tiene buena biocompatibilidad, no tiene efectos tóxicos y colaterales, y tiene perspectivas de una muy amplia aplicación en el campo de la biomedicina.

Un segundo propósito de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro que es inyectable in situ. Este método elimina el prejuicio técnico de que se requiere una

apertura al aire para preparar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro; resuelve el problema técnico con la producción industrializada a gran escala y simplifica el procedimiento de preparación.

Por una parte, la presente invención suministra un método para preparar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro que es inyectable in situ, el cual incluye las siguientes etapas:

- 5 (1) envasar una solución activa reticulable en un contenedor para inyección del hidrogel, en cuyo caso la solución activa reticulable contiene al menos un tipo de macromolécula biocompatibles con más de dos grupos tiol en la cadena lateral;
- (2) sellar el contenedor inyectable que contiene la solución activa reticulable; y
- 10 (3) oxidar los grupos tiol a enlaces de disulfuro para formar el hidrogel reticulado por el oxígeno disuelto en la solución activa reticulable en el contenedor inyectable sellado;

15 donde la macromolécula biocompatible con más de dos grupos tiol en la cadena lateral es un derivado de polisacáridos o proteínas producidas por una o más modificaciones químicas que incluyen al menos una modificación de tiol. Este procedimiento se caracteriza porque el grupo tiol se oxida en un contenedor inyectable sellado para obtener el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro in situ por parte del oxígeno disuelto en la solución activa de reticulación. Además, este método puede regular flexiblemente la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa de reticulación controlando de manera conveniente tales parámetros como temperatura, presión parcial del oxígeno gaseoso o el tiempo de contacto y, por lo tanto, regulando el procedimiento de reticulación del enlace de disulfuro y las propiedades del hidrogel reticulado con enlace de disulfuro.

Algunos de los términos usados en la presente invención se definen tal como sigue.

20 "Hidrogel" se refiere a una sustancia con una estructura de red reticulada tridimensional que contiene una gran cantidad de agua, el estado se encuentra entre un líquido y un sólido sin fluidez. "Gelificación" se refiere a un procedimiento por el cual un líquido con fluidez se cambia a un gel sin fluidez; y "tiempo de gelificación" se refiere a un período de tiempo durante el cual un líquido con fluidez se cambia a un gel sin fluidez.

25 En la presente invención, "solución activa reticulante" se refiere una solución que contiene al menos un tipo de las macromoléculas biocompatibles con más de dos grupos tiol en la cadena lateral. La solución activa reticulante usa agua como disolvente principal y también puede contener algunos componentes de sal (por ejemplo, cloruro de sodio sal reguladora de pH) para regular la presión osmótica y estabilizar el valor de pH de la solución, etc.; además, la solución activa reticulante también puede contener algunos otros componentes polares, hidrosolubles, tales como etanol.

30 En la presente invención, "macromolécula biocompatible con más de dos grupos tiol en la cadena lateral" se refiere principalmente al derivado producido mediante una o más modificaciones químicas de polisacáridos, proteínas o macromoléculas sintéticas, en cuyo caso al menos una de las modificaciones químicas es la modificación de tiol.

35 Polisacáridos incluyen sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido algínico, ácido hialurónico, dermatán, sulfato de dermatán, pectina, carboximetilcelulosa, quitosano, etcétera, así como también sus formas salinas (tales como la sal de sodio y la sal de potasio). Las proteínas incluyen colágeno, gelatina alcalina, gelatina ácida, gelatina de recombinación del gen, etcétera. Las macromoléculas sintéticas incluyen poli(ácido acrílico), poli(ácido aspártico), poli(ácido tartárico), poli(ácido glutámico), poli(ácido fumárico), etcétera, así como también sus formas salinas (tales como la sal de sodio y la sal de potasio). El sulfato de condroitina tal como se describe antes incluye diversos tipos tales como Tipo A, Tipo B, y Tipo C. Los pesos moleculares de los polisacáridos, las proteínas y las macromoléculas sintéticas se encuentran habitualmente en el intervalo de 1.000-10.000.000. Las macromoléculas sintéticas, tal como se describen antes, no incluyen polietilenglicol.

40 El procedimiento de modificación química incluye la modificación hidrofobizante (por ejemplo, modificación por alquilación), modificación por carboxilación (por ejemplo, modificación por carboximetilación), modificación por tiol, etcétera.

45 La modificación por tiol se refiere a un procedimiento de modificación química de introducción de grupos tiol libres. Habitualmente, los grupos tiol libres pueden introducirse por medio de los grupos funcionales en las cadenas laterales (tales como el grupo carboxilo, grupo amino y grupo hidroxilo) de polisacáridos, proteínas y macromoléculas sintéticas a través de reacciones químicas apropiadas. Una modificación común por tiol incluye principalmente los siguientes procedimientos de reacción química; hacer reaccionar los grupos carboxilo de la cadena lateral de polisacáridos, proteínas y macromoléculas sintéticas con diaminas o dihidrazidas que contienen los enlaces de disulfuro mientras se activan las carbodiimidias para producir los productos intermedios y luego reducir los enlaces de disulfuro a los grupos tiol libres (Shu et al, Biomacromolecules, 3, 1304, 2002; Aeschlimann et al, US 7196180; Prestwich et al, PCT Int. Appl. WO 2004/037164). Las aminas primarias con grupos tiol protegidos también pueden usarse en lugar de las diaminas o de hidrazidas que contienen los enlaces de disulfuro (Gianolio et al, Bioconjugate Chemical, 16, 1512,

2005). Muchos polisacáridos, proteínas y macromoléculas sintéticas que contienen grupos carboxilo en la cadena lateral pueden tratarse de esta manera para producir los derivados con más de dos grupos tiol en la cadena lateral, por ejemplo, derivados de hialuronato de sodio tiolado, derivados de sulfato de condroitina tiolado, derivados de gelatina tiolada (Shu et al, Biomacro-molecules, 3, 1304, 2002; Aeschlimann et al, US 7196180). Los derivados que

5 contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral también pueden producirse por medio de reacción directa de los grupos carboxilo con las carbodiimidias que contienen los enlaces de disulfuro (por ejemplo 2,2'-ditiobis-(N-etil (N'-etilcarbodiimida))) seguido por la reducción de los enlaces de disulfuro bonds (Bulpitt et al, US 6884788).

Otra modificación común con tiol son modificaciones químicas directas o indirectas de los grupos amino de la cadena lateral de polisacáridos, proteínas y macromoléculas sintéticas. Por ejemplo, la modificación con tiol puede realizarse

10 mediante la reacción del grupo amino de cadena lateral de tales proteínas como colágeno con una sustancia de activación que contiene el enlace de disulfuro (por ejemplo, el éster activado de diimidazol de carbonilo bisacilcistamina disuccínico), y la reducción del enlace de disulfuro al grupo tiol libre (Benesch et al, Proc Natl Acad Sci USA, 44, 848, 1958; Yamauchi et al, Biosubstances, 22, 855, 2001; Nicolas et al, Biosubstances, 8, 807, 1997; Kafedjiiski et al, Biosubstances, 26, 819, 2005). La modificación con tiol del grupo amino de la cadena lateral de polisacáridos, proteínas

15 y macromoléculas sintéticas también puede realizarse indirectamente, por ejemplo, carboxilizando primero el grupo amino y luego realizando la modificación con tiol por medio de la modificación con el grupo carboxilo (Song et al, CN101200504).

La modificación con tiol del grupo hidroxilo de cadena lateral de polisacáridos, proteínas y macromoléculas sintéticas también se usa comúnmente. Por ejemplo, el grupo hidroxilo de cadena lateral de tales polisacáridos como celulosa,

20 ácido hialurónico, quitina y quitosano puede carboxilarse en condiciones muy alcalinas y luego el grupo carboxilo es tiolado mediante el procedimiento anterior. Carbilan-S es precisamente ese derivado tiolado de hialuronato de sodio que se prepara de esta manera (Prestwich et al, PCT Int. Appl., WO 2005/056608). El grupo hidroxilo de cadena lateral también puede ser tiolado mediante una reacción química directa, tal como el derivado tiolado de alcohol polivinílico (OSSIPOV et al, Maxromolecules, 41, 3971, 2008).

En la presente invención, la macromolécula biocompatible que contiene más de dos grupos tiol en la cadena lateral también puede prepararse mediante tales procedimientos como la fermentación de ingeniería genética. En la

25 ingeniería genética, la macromolécula biocompatible que contiene más de dos grupos tiol en la cadena lateral puede producirse mediante la ingeniería de fermentación controlando la expresión del fragmento del gen según la estructura molecular definida teóricamente (Lutolf et al, Nature Biotechnology, 23, 47, 2005).

En la presente invención, los derivados que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral pueden prepararse de manera conveniente para obtener el gel inyectable según la presente invención, tal como derivados tiolados de

30 hialuronato de sodio, derivados tiolados de sulfato de condroitina, derivados tiolados de heparina, derivados tiolados de quitosano, derivados tiolados de gelatina y derivados tiolados de colágeno.

En la presente invención, la solución activa reticulante puede contener un tipo o dos o más tipos de las macromoléculas biocompatibles que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral. Por ejemplo, tal como se requiere por

35 aplicaciones diferentes, la solución activa reticulante puede contener un tipo o múltiples tipos de las siguientes sustancias: derivados tiolados de hialuronato de sodio, derivados tiolados del sulfato de condroitina, derivados tiolados de heparina, derivados tiolados de gelatina, derivados tiolados de colágeno y derivados tiolados de quitosano.

En la presente invención, además de al menos un tipo de las macromoléculas biocompatibles que tienen más de dos

40 grupos tiol en la cadena lateral, la solución activa reticulante puede contener además un tipo o múltiples tipos de otras sustancias. Estas sustancias pueden ser polisacáridos, proteínas o compuestos de macromolécula tales como hialuronato de sodio, sulfato de condroitina, heparina sódica, gelatina ácida, gelatina alcalina, gelatina de recombinación de gen, poli(ácido acrílico), poli(ácido aspártico), poli(ácido tartárico), poli(ácido glutámico), poli(ácido fumárico), etcétera; estas sustancias también pueden ser componentes médicos activos que incluyen esteroides,

45 antibióticos y fármacos antitumorales tales como diversos fármacos de proteína, por ejemplo, diversos factores de crecimiento (un factor básico de crecimiento, un factor ácido de crecimiento, un factor de crecimiento de vaso sanguíneo, un factor de crecimiento de dosificación, etc.) y ácidos nucleicos (por ejemplo ARN); además, estas sustancias pueden ser fármacos diversos de pequeñas moléculas (por ejemplo, antibióticos y corticosteroides), etc. este componente médico activo puede dispersarse en la solución activa reticulante en forma de partículas sólidas, o

50 puede disolverse en la solución activa reticulante.

El grupo tiol, como un grupo funcional que existe naturalmente en un organismo y posee buena biocompatibilidad, tiene muy buena reactividad. El enlace de disulfuro es un enlace químico reversible. El grupo tiol libre puede oxidarse a enlace de disulfuro que puede reducirse nuevamente a grupo tiol libre. Esto es importante para la biología. El hidrogel

55 reticulado, con enlace de disulfuro, tiene perspectiva de aplicación importante en el campo de la biomedicina; por ejemplo, puede usarse para promover la curación de heridas, como un soporte de cultivos celulares y para reparación y regeneración de tejidos.

El oxígeno gaseoso, como un oxidante biocompatible moderado natural, existe ampliamente en diversos procedimientos fisiológicos dentro del cuerpo humano. El oxígeno gaseoso también puede oxidar el grupo tiol libre al

enlace de disulfuro. Una molécula de oxígeno gaseoso puede oxidar cuatro grupos tiol a dos enlaces de disulfuro y producir dos moléculas de agua también, sin ningún otro subproducto. La presente invención, con oxígeno gaseoso como oxidante, es ventajosa en muchos aspectos tales como condiciones de reacción simples y suaves y la falta de necesidad de agentes reticulantes.

5 Para el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro, con oxígeno gaseoso como oxidante, existe un prejuicio técnico generalizado entre aquellos expertos en la materia: la solución de macromolécula biocompatible que contiene el grupo tiol necesita abrirse al aire para formar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro (Shu et al, Biosubstances, 24, 3825, 2003; Liu et al, Journal of Biomedical Substances Research, 68, 142, 2004; George et al, PCT Int. Appl., WO 2008/098019; Wallace et al, US6, 624, 245). Hemos hecho una investigación profunda sobre el procedimiento de gelificación reticulante con enlace de disulfuro. El resultado indica que es principalmente el oxígeno disuelto en la solución, en lugar del oxígeno gaseoso en el aire, el que oxida el grupo tiol hasta el enlace de disulfuro reticulado. Este descubrimiento proporciona una nueva estrategia para preparar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro e indica la posibilidad de un procedimiento de producción industrializado a gran escala.

10 Hasta ahora no ha habido reportes de investigación sobre la preparación del hidrogel reticulado con enlace de disulfuro por medio del oxígeno disuelto en la solución en condiciones selladas. Los resultados de investigación, tal como se han descrito antes, indican una nueva estrategia para nosotros: la solución activa reticulante también puede formar hidrogel reticulado con enlace de disulfuro en condiciones de aislamiento del aire, y el punto clave es el contenido del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante. Por ejemplo, nuestra investigación indica que la solución neutra de 1,0 % (p/v) del derivado de hialuronato de sodio tiolado (con 45% de grupos carboxilo modificados en los grupos tiol) (Shu et al, Biomacromolecules, 3, 1304, 2002) se aísla del aire después de haberse envasado en una jeringa y habitualmente pierde fluidez gradualmente en 2-7 días para formar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro.

15 Análisis adicional revela que el contenido de grupos de tiol en la solución neutra de 1,0 % (p/v) del derivado de hialuronato de sodio tiolado en el ejemplo anterior es de aproximadamente 10 mmol/L (es decir 330 mg/L), el cual necesita de manera correspondiente 2,5 mmol/L (más precisamente 80 mg/L) de oxígeno gaseoso disuelto para oxidar todos los grupos tiol hasta los enlaces de disulfuro. La solubilidad saturada del oxígeno gaseoso en agua es solamente de 8,4 mg/L (25°C) a temperatura normal de 25 °C, la cual puede oxidar teóricamente sólo el 10% de los grupos tiol libres en la solución de derivados de hialuronato de sodio tiolado descrita antes hasta los enlaces de disulfuro. Aunque la concentración del oxígeno disuelto es habitualmente más baja que la solubilidad saturada en el procedimiento real, el oxígeno disuelto también es suficiente para formar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro en condiciones selladas, pero el hidrogel es inferior en fuerza y el tiempo de gelificación es más largo.

20 Para regular adicionalmente el proceso de gelificación y la propiedad del gel (por ejemplo, la fuerza), la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante se regula como uno de los medios importantes de la presente invención. En términos generales, la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso en agua puede calcularse según la ley de Henry ( $C_{O_2} = K_{O_2} P_{O_2}$ ), donde  $C_{O_2}$  es la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso en agua,  $K_{O_2}$  es la constante de Henry, y  $P_{O_2}$  es la presión parcial de oxígeno gaseoso.

25 A 1 atm, por ejemplo, la solubilidad de oxígeno gaseoso en agua saturada con aire puede calcularse según la ley de Henry. Con la presión parcial del vapor de agua a 25° que es de 0,0313 atm y la presencia allí de 20,95 % de oxígeno gaseoso en el aire seco, la presión parcial de oxígeno gaseoso según la ley de presión parcial de Dalton es  $P_{O_2} = (1,0000 \text{ atm} - 0,0313 \text{ atm}) \times 0,2095 = 0,2029 \text{ atm}$ ; la constante de Henry de oxígeno gaseoso en agua a 25 °C es  $K_{O_2} = 1,28 \times 10^{-8} \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{Pa})$ . Por lo tanto, la solubilidad de oxígeno gaseoso en agua según la ley de Henry es  $C_{O_2} = K_{O_2} \cdot P_{O_2} = 1,28 \times 10^{-8} \times 0,2029 \times 1,013 \times 10^5 = 2,63 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ; con el peso molecular de oxígeno gaseoso que esté 32, la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso es de 8,4 mg/L.

30 La temperatura es un factor importante que afecta la solubilidad de oxígeno gaseoso en agua, la cual puede expresarse mediante la ecuación de Clausius-Clapeyron

$$45 \quad \log \frac{c_1}{c_2} = \frac{\Delta H}{2.303R} \left[ \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right]$$

50 en la cual  $C_1$  y  $C_2$  son la solubilidad saturada del gas en agua (mg/L) a las temperaturas absolutas  $T_1$  y  $T_2$ , respectivamente;  $\Delta H$  es el calor de disolución (J/mol); y  $R$  es la constante de gases (8,314 J/K.mol). De la fórmula anterior puede verse que la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso en agua disminuye gradualmente con la temperatura creciente. Por ejemplo, cuando la temperatura sube desde 4 °C a 25 °C, la concentración del oxígeno disuelto de modo saturado en agua pura se disminuye de 13,1 mg/L a 8,4 mg/L.

La presión es un factor clave que afecta la solubilidad de oxígeno gaseoso en agua. Según la ley de Henry  $C_{O_2} = K_{O_2} \cdot P_{O_2}$ , la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso en agua se encuentra en proporción directa a presión parcial de oxígeno gaseoso determinadas temperaturas. A 25 °C, por ejemplo, la solubilidad de oxígeno gaseoso en agua

saturada con aire (1 atm) es de 8,4 mg/L, mientras que la solubilidad en agua saturada con oxígeno gaseoso (1 atm) se incrementa en alrededor de 5 veces (alrededor de 40 mg/L).

5 El contenido de sal en el agua también afectará la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso en agua, aunque de manera no tan significativa. La solubilidad de oxígeno en agua disminuirá con el contenido creciente de sal. Por ejemplo, la concentración del oxígeno disuelto de modo saturado en agua marina es generalmente de alrededor de 80%, tanto como en agua fresca.

10 En la presente invención, la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante se regula habitualmente controlando la presión parcial de oxígeno gaseoso y la temperatura. La concentración del oxígeno disuelto de modo saturado puede incrementarse disminuyendo la temperatura, cuando la temperatura normalmente está en el intervalo de 0-50°C, de la manera más común 4-40 °C. La presión parcial de oxígeno gaseoso es el factor más importante para regular la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante. De acuerdo con la ley de Henry, la solubilidad saturada de oxígeno gaseoso en agua se encuentra en proporción directa a presión parcial de oxígeno gaseoso en las mismas condiciones. Regulando la presión parcial de oxígeno gaseoso, puede entonces regularse de manera conveniente la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante, y por lo tanto se regula el procedimiento de gelificación del grupo tiol libre oxidado hasta el enlace de disulfuro. A 25 °C, por ejemplo, la concentración saturada de oxígeno disuelto en agua es de 8,4 mg/L a 1 atm de aire, y se incrementará en alrededor de 5 veces (40 mg/L) a 1 atm de oxígeno gaseoso, equivalente a la concentración del oxígeno disuelto de modo saturado bajo 5 atm de aire; y bombeando a vacío durante 15 minutos puede entonces retirarse casi todo el oxígeno disuelto en agua. En la presente invención, aumentar la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante puede acelerar de manera significativa el procedimiento de gelificación e incrementar la fuerza del gel y, de otra manera, retardará el procedimiento de gelificación y se disminuirá la resistencia del gel.

El procedimiento de preparación de la presente invención habitualmente incluye las siguientes etapas:

(1) envasar la solución activa reticulante en un contenedor inyectable;

(2) sellar el contenedor inyectable que contiene la solución activa reticulante; y

25 (3) oxidar el grupo tiol hasta el enlace de disulfuro mediante el oxígeno disuelto en la solución activa reticulante para formar el hidrogel reticulado.

La presente invención puede realizarse por medio del procedimiento estéril o el procedimiento de esterilización terminal para cumplir diferentes requisitos médicos. Habitualmente, la solución activa reticulante puede envasarse en un contenedor inyectable de manera manual o por medio de un equipo de envasado en la industria médica y luego los enlaces de disulfuro son reticulados in situ en el contenedor inyectable para formar el gel.

30 La presente invención elimina el prejuicio técnico de que se requiere una apertura al aire para preparar el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro y resuelve los problemas técnicos con la producción industrializada a gran escala del gel reticulado con enlace de disulfuro que es inyectable. Con el procedimiento de preparación de la presente invención, la producción industrializada a gran escala puede realizarse luego con la línea de producción de envasado que se usa comúnmente en la industria médica, con un rendimiento horario fácilmente de hasta más de 3000 piezas. La línea de producción de envasado puede seleccionarse a partir de una línea de producción de pre-ensado de jeringa totalmente automática en línea recta o un pre-ensado completamente automático de jeringa en colmena y equipo de sellado fabricado por la compañía Groninger, y un pre-ensado de líquido en jeringa de pre-esterilización y máquina de sellado fabricada por la compañía Bosch de Alemania, etc. El contenedor inyectable puede hacerse de vidrio o de plástico, tal como la jeringa de pre-esterilización de Hypac SCF fabricada por la compañía BD. La jeringa también puede reemplazarse por tales contenedores que pueden extrudirse como las bolsas plásticas blandas.

45 Las etapas (1) y (2), tal como se han descrito antes, pueden realizarse de manera conveniente con los equipos de envasado de la industria médica. En el procedimiento de envasado de la solución activa reticulante en la jeringa, el lado de conexión de la aguja de la jeringa habitualmente se sella; la solución activa reticulante se envasa desde el extremo abierto (el lado de la barra de empuje de la jeringa) que luego se sella con un tapón de caucho; y finalmente, la barra de empuje se instala. En la etapa (3) tal como se ha descrito antes, la solución activa reticulante envasada en la jeringa forma el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro. El tiempo empleado para que la solución activa reticulante forme gradualmente el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro en el contenedor inyectable es generalmente de más de 30 minutos. Incrementar la temperatura puede promover la gelificación y el tiempo de gelificación habitualmente es de unas pocas horas a varios días. El procedimiento de gelificación también puede acelerarse iluminando o irradiando con un rayo de electrones. El procedimiento de gelificación también puede afectarse de manera significativa por tales factores como el valor de pH de la solución activa reticulante y el contenido de grupos tiol de la macromolécula biocompatible. Cuanto más alto es el valor de pH de la solución activa reticulante, más rápido será el procedimiento de gelificación. Un valor de pH de ácido débil, de neutralidad o de una base débil habitualmente se adopta en la presente invención. El incremento en el contenido de grupos tiol de la macromolécula biocompatible también promoverá de manera significativa el procedimiento de gelificación.

En la presente invención, la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante también puede regularse tal como se requiere antes y después del paso (1) para regular el procedimiento de gelificación y la propiedad del gel. La concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante puede incrementarse o reducirse controlando tales parámetros como la presión parcial de oxígeno gaseoso, la temperatura y el tiempo. La concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante puede disminuirse bombeando a vacío o mediante interacción entre la solución activa reticulante y un gas cuya presión parcial de oxígeno sea más pequeña que la presión parcial de oxígeno en el aire atmosférico. El bombeo al vacío es el procedimiento más comúnmente usado para retirar el oxígeno disuelto. Mantener la solución activa reticulante al vacío durante un cierto período de tiempo puede luego retirar la mayor parte del oxígeno disuelto; y luego envasar la solución activa reticulante en el contenedor inyectable y sellarlo bajo la protección del gas inerte. Aquí, el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro tiene un tiempo de gelificación más largo y una fuerza más baja. La concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante puede incrementarse mediante interacción entre la solución activa reticulante y un gas cuya presión parcial de oxígeno es más alta que la presión parcial de oxígeno en el aire atmosférico. Poner en contacto con un gas que contiene oxígeno gaseoso es un procedimiento comúnmente usado para incrementar la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante. El gas que contiene oxígeno gaseoso puede seleccionarse de aire presurizado, oxígeno gaseoso puro u otros gases que contienen oxígeno gaseoso, donde la presión parcial de oxígeno gaseoso es más alta que la del oxígeno gaseoso en el aire atmosférico; incrementar la presión parcial de oxígeno gaseoso puede luego incrementar significativamente la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante. Durante el procedimiento de operación, el gas que contiene oxígeno gaseoso puede dirigirse a la solución activa reticulante o encima de la solución, y la velocidad de disolución de oxígeno gaseoso se incrementa revolviendo. Mientras se pone en contacto con el gas que contiene oxígeno gaseoso, la solución activa reticulante puede envasarse de manera conveniente en la jeringa, la cual se sellará rápidamente con un tapón de caucho para impedir que el oxígeno disuelto se escape debido a la variación de la presión de aire.

Después que la solución activa reticulante se envasa en la jeringa, el tapón de caucho habitualmente alcanza de manera directa la superficie de la solución cuando se usa equipo de envasado y de sellado para taponar, sin que quede espacio. Sin embargo, la profundidad del tapón de caucho en la jeringa también puede ajustarse flexiblemente según se requiera, dejando un cierto volumen de espacio. Por ejemplo, cuando se envasa en 5 ml de solución activa reticulante en una jeringa de 10 ml, el tapón puede posicionarse a 6 ml u otras escalas para lograr sellar la jeringa, según se requiera. Con el equipo actual disponible de producción de pre-ensado y sellado de jeringa, el espacio en la jeringa puede llenarse de manera conveniente con gas (tal como aire, oxígeno gaseoso puro, etc.), que regula además la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante. Además, la solución activa reticulante también puede estar en contacto con el gas que contiene oxígeno gaseoso antes de sellarse con el tapón de caucho, lo cual regula adicionalmente la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulante. Por ejemplo, el gas con una cierta presión parcial de oxígeno gaseoso se dirige al contenedor inyectable que será sellado con un tapón de caucho después de un cierto período de tiempo. Sin embargo, esta operación hace complicado el procedimiento y generalmente no se adopta.

Por otra parte, la presente invención proporciona el hidrogel reticulado in situ, inyectable, preparado mediante el procedimiento tal como se ha descrito antes

En la presente invención, la macromolécula biocompatible en la solución activa reticulante que contiene más de dos grupos tiol en la cadena lateral puede purificarse en el estado de solución y los procedimientos de purificación disponibles actualmente (por ejemplo, ultrafiltración) pueden retirar impurezas completamente; además, si la gente reticulante adicionado en el procedimiento de gelificación, el oxígeno gaseoso disuelto en la solución puede oxidar el grupo tiol hasta el enlace de disulfuro reticulado, con agua como subproducto. Por lo tanto, en comparación con otro gel reticulado inyectable, el gel reticulado in situ inyectable, preparado mediante la presente invención, es significativamente ventajoso.

Las aplicaciones médicas del hidrogel reticulado in situ que se prepara mediante la presente invención incluyen: vendaje para heridas para la piel u otras heridas para acelerar el curado de la herida; para prevenir adhesión que incluya adhesión fibrosa entre tejidos u órganos después de una operación quirúrgica (por ejemplo, cirugía sinusales); para reparación y regeneración de tejidos tales como la regeneración de la piel y la regeneración de los cartílagos; y como lubricantes de articulaciones para el tratamiento de artritis, etcétera.

Las aplicaciones farmacéuticas del hidrogel reticulado in situ que se prepara mediante la presente invención incluyen usarse como un soporte para diversas sustancias terapéuticas activas para realizar liberación sostenida. La sustancia terapéutica activa puede ser un factor de actividad en un fármaco químico o biología, tal como un promotor antiflogístico, antibiótico, analgésico, anestésico de curación de heridas, promotor o inhibidor de crecimiento celular, inmuno-estimulante y medicina antiviral.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Los siguientes ejemplos pueden hacer que los expertos en la materia entiendan la presente invención de manera más completa, antes que limitar la presente invención de ninguna manera.

**Ejemplo 1. Preparación de hialuronato de sodio tiolado**

El hialuronato de sodio tiolado fue preparado mediante el procedimiento divulgado por Shu et al en Biomacromolecules, 3, 1304, 2002. 20 g de ácido hialurónico fueron disueltos en 2 L de agua destilada. Fueron adicionados 23,8 g de ditiodipropil dihidrazida y se revolvió para disolver. Luego fue ajustado el valor de pH de la solución a 4,75 con solución de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L. Se adicionaron 19,2 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (Aldrich, Estados Unidos) y se revolvió de modo electromagnético. Una cantidad apropiada de solución de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L fue adicionada continuamente a la solución anterior para mantener el valor de pH de la solución en 4,75. Fue adicionado hidróxido de sodio de 1,0 mol/L para ajustar el valor de pH a 7,0 para finalizar la reacción. Fueron adicionados 100 g ditioeritritol (Diagnostic Chemical Limited, Estados Unidos) y una cantidad apropiada de hidróxido de sodio de 1,0 mol/L mientras se revolvió. El valor de pH de la solución fue ajustado a 8,5 y se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente revolviendo de manera electromagnética durante 24 horas. Luego, fue adicionado ácido clorhídrico de 1 mol/L a la solución anterior hasta que el pH estuvo alrededor de 3,5. La solución anterior fue envasada en un tubo de diálisis (peso molecular límite 3500, Sigma, Estados Unidos), y sometida a diálisis frente a una cantidad grande de ácido clorhídrico de 0,0003 mol/L y solución de cloruro de sodio de 0,1 mol/L durante 5 días, con el cambio de solución de diálisis cada 8 horas; y luego se sometió adicionalmente a diálisis frente a una gran cantidad de solución de ácido clorhídrico de 0,0003 mol/l durante 3 días, con el cambio de solución de diálisis cada 8 horas. Finalmente, la solución en el tubo de diálisis fue recolectada y liofilizada para dar un sólido blanco en forma de flóculos.

El anterior sólido blanco en forma de flóculos fue disuelto en agua destilada para proporcionar la solución de 1,0-2,5% p/v y el valor de pH de la solución fue ajustado a 4,0-8,0. Después de esterilizada mediante filtración, la solución fue usado inmediatamente o almacenada en forma congelada para usos futuros. O durante el procedimiento de preparación tal como se ha descrito antes, la solución purificada mediante diálisis fue concentrada por medio de una columna de diálisis a la concentración apropiada (habitualmente 1,0-2,5% p/v), y fue ajustado el valor de pH de la solución (habitualmente 4,0-8,5). Después de esterilizada mediante filtración, la solución fue usado inmediatamente o almacenada congelada para usos futuros.

El grado de sustitución del grupo tiol de cadena lateral en el hialuronato de sodio tiolado fue de 42/100 unidades repetidas de disacárido que fueron detectadas mediante la resonancia magnética nuclear del espectro de hidrógeno ( $^1\text{H-NMR}$ ) (con  $\text{D}_2\text{O}$  en calidad de disolvente); y el peso molecular y su polidispersidad (determinados mediante GPC) son tal como siguen más adelante: el peso molecular promedio de peso 136.000 y el peso molecular promedio de número 61.000.

**Ejemplo 2. Síntesis y caracterización de sulfato de condroitina tiolada**

1 g de sulfato de condroitina (tipo c, del cartílago de tiburón, Sigma, Estados Unidos) fue disuelto en 100 mL de agua destilada para proporcionar una solución clara transparente. Se adicionaron 0,704 g de dihidrazida de bisacilcistamina disuccinato a la solución anterior (Shu et al, patente de invención china No. CN101190891), y se agitó para disolver. El valor de pH de la solución fue ajustado a 4,75 con una solución de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L. Luego se adicionaron 0,192 g de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminepropil)carbodiimida (Aldrich, Estados Unidos) mientras se agitaba de modo electromagnético. Una cantidad apropiada de solución de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L fue adicionada de manera continua a la solución anterior para mantener el valor de pH a 4,75. La solución fue agitada de modo electromagnético a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se adicionaron 10 g de ditioeritritol (Diagnostic Chemical Limited, Estados Unidos) y una pequeña cantidad de solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/L mientras se agitaba de modo electromagnético. El gel fue disuelto gradualmente; se adicionó continuamente solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/L al mismo tiempo para mantener el valor de pH de la solución a 8,5. Después de que todo el gel fue disuelto, la solución fue agitada de modo electromagnético a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego se adicionó solución de ácido clorhídrico de 6 mol/L a la solución anterior hasta que el pH fue de aproximadamente 3,0. La solución anterior fue envasada en un tubo de diálisis (peso molecular de corte 2000, Sigma, Estados Unidos), y sometida a diálisis frente a 10 l de ácido clorhídrico de 0,001 mol/L y solución de cloruro de sodio de 0,3 mol/L durante 5 días, con el cambio de solución de diálisis cada 8 horas; y luego fue sometida a diálisis frente a 10 l de solución de ácido clorhídrico de 0,001 mol/L durante 3 días con el cambio de solución de diálisis cada 8 horas. Finalmente, la solución en el tubo de diálisis fue liofilizada o deshidratada a través de una columna de diálisis a la concentración apropiada (3,0-6,0% p/v), y fue ajustado el valor de pH (usualmente 4,0-8,5). La solución fue esterilizada mediante filtración y almacenada para uso futuro

El pico de absorción característico de metilo del grupo acetilo del sulfato de condroitina fue usado como estándar interno. El grado de sustitución de la cadena lateral del sulfato de condroitina tiolada fue calculado según el área de absorción y el resultado es de 47%.

El peso molecular y su polidispersidad fueron detectados mediante GPC: el peso molecular promedio de peso 38.000; el peso molecular promedio de número 17.000, y la polidispersidad de peso molecular 2,23.

Mediante el procedimiento modificado, reportado por Shu et al en *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002. Fue detectado contenido del grupo activo tiol del sulfato de condroitina tiolada: 44,2 grupos tiol /100 unidades repetidas de disacárido de sulfato de condroitina.

### Ejemplo 3. Preparación de gelatina tiolada

5 1 g de gelatina (Tipo B, de piel de cerdo, Sigma, Estados Unidos) fue disuelto en 100 ml de agua destilada para proporcionar una solución clara transparente. Se adicionaron 0,75 g de dihidrazida de bisacilcistamina disuccinato a la solución anterior (Shu et al, patente de invención china No. CN101190891) y se revolvió para disolver. El valor de pH de la solución fue ajustado a 4,75 con solución de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L. Se adicionó 1 g de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (Aldrich, Estados Unidos) mientras se agitaba de modo electromagnético.

10 Una cantidad apropiada de solución de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L fue adicionada de manera continua a la solución anterior para mantener el valor de pH en 4,75. La viscosidad de la solución se incrementó continuamente y se formó un gel en aproximadamente 10 minutos. Después de que el gel fue formado, la solución se mantuvo todavía a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se adicionaron 10 g de ditioeritrol (Diagnostic Chemical Limited, Estados Unidos) y una pequeña cantidad de solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/L mientras se agitaban. El gel

15 fue disuelto gradualmente; al mismo tiempo se adicionó solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/l para mantener el valor de pH de la solución en 8,5. Después de que se disolvió todo el gel, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación electromagnética durante 24 horas. Luego se adicionó solución de ácido clorhídrico de 6 mol/L a la solución anterior hasta que el pH fue de aproximadamente 3,0. La solución anterior se basó en un tubo de diálisis (peso molecular de corte 2000, Sigma, Estados Unidos), y fue sometida a diálisis frente a 10 l de ácido clorhídrico de 0,001 mol/l y solución de cloruro de sodio de 0,3 mol/l durante 5 días, con el cambio de solución de diálisis cada 8 horas; y luego fue sometido adicionalmente a diálisis frente a 10 l de solución de ácido clorhídrico de 0,001 mol/l durante 3 días con el cambio de solución de diálisis cada 8 horas. Finalmente, la solución en el tubo de diálisis fue recogida y liofilizada para proporcionar aproximadamente 0,6 g de un sólido blanco en forma de flóculos.

25 El sólido blanco en forma de flóculos, tal como se ha descrito antes, fue disuelto en agua destilada para proporcionar la solución de 3,0-6,0% p/v y el valor de pH de la solución fue de 4,0-8,0. Después de esterilizada mediante filtración, la solución fue usado inmediatamente o almacenada en forma congelada para usos futuros.

No fueron detectados pequeños picos de impureza molecular mediante GPC (con agua pura como fase móvil y detectado a UV 210 nm), lo que indica que la gelatina tiolada sintética es altamente purificada y las impurezas estuvieron por debajo de la limitación mínima del equipo.

30 El contenido del grupo activo tiol de gelatina tiolada fue de 0,57 mmol/g, detectado mediante el método modificado de Ellman, reportado por Shu et al en *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002.

### Ejemplo 4. Preparación de hidrogel reticulado inyectable in-situ

35 Gel de hialuronato de sodio: la solución de hialuronato de sodio tiolado, que se prepara en el ejemplo 1 (pH 7,0, 1,0% p/v), fue envasada en una jeringa de 1 ml inmediatamente después de esterilización mediante filtración, fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Después de una semana se observó que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel. El gel era insoluble en agua, pero soluble en solución de ditioeritrol, lo cual confirma la formación del enlace reticulado disulfuro.

40 Gel de sulfato de condroitina: la solución de sulfato de condroitina tiolada que fue preparada en el ejemplo 2 (pH 7,0, 5,0% p/v) fue envasada en una jeringa de 1 ml inmediatamente después de esterilización mediante filtración. La jeringa fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Se observó después de una semana que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel. El gel fue insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol, lo cual confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

45 Gel de gelatina: la solución de gelatina tiolada que fue preparada en el ejemplo 3 (pH 7,0, 5,0% p/v) fue envasada en una jeringa de 1 ml inmediatamente después de filtración aséptica, y fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Después de una semana, se encontró que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó el gel. El gel era insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol, lo cual confirma la formación de enlace reticulado de disulfuro.

### Ejemplo 5. Preparación de hidrogel reticulado, inyectable in-situ

50 Hialuronato de sodio/gel de gelatina: la solución de hialuronato de sodio tiolado que fue preparada en el ejemplo 1 (pH 7,0, 1,0% p/v) y la solución de gelatina tiolada que fue preparada en el ejemplo 3 (pH 7,0, 5,0% p/v) fueron mezcladas de manera uniforme según una proporción apropiada de volumen (por ejemplo 10: 1, 1: 1 y 1: 10), y la solución mezclada fue envasada a una jeringa de 1 ml que luego fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Se observó después de una semana que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel. El gel fue insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol, lo cual confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

55

5 Sulfato de condroitina /gel de gelatina: la solución de sulfato de condroitina tiolada que fue preparada en el ejemplo 2 (pH 7,0, 5,0% p/v) y la solución de gelatina tiolada que fue preparada en el ejemplo 3 (pH 7,0, 5,0% p/v) fueron mezcladas de manera uniforme según una proporción apropiada de volumen (por ejemplo 10: 1, 1: 1 y 1: 10), y la solución mezclada fue envasada inmediatamente en una jeringa de 1 ml que después fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Después de una semana se observó que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel. El gel fue insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol, lo cual confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

10 Hialuronato de sodio/sulfato de condroitina/gel de gelatina: la solución de hialuronato de sodio tiolado, que fue preparado en el ejemplo 1 (pH 7,0, 1,0% p/v), la solución de sulfato de condroitina tiolada que fue preparada en el ejemplo 2 (pH 7,0, 5,0% p/v), y la solución de gelatina tiolada que fue preparada en el ejemplo 3 (pH 7,0, 5,0% p/v) fueron mezcladas de manera uniforme según una proporción apropiada de volumen (por ejemplo 1: 1: 1), y la solución mezclada fue envasada inmediatamente en una jeringa de 1 ml que luego fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Después de una semana, se observó que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel. El gel fue insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol, lo que confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

**Ejemplo 6. Preparación de hidrogel reticulado inyectable in-situ**

20 Gel de hialuronato de sodio que contiene sulfato de condroitina: sulfato de condroitina (Tipo c, de cartilago de tiburón, Sigma, Estados Unidos) fue disuelto en agua para proporcionar la solución al 1,0% p/v. se mezcló con la solución de hialuronato de sodio tiolado, que se había preparado en el ejemplo 1 (pH 7,0, 1,5% p/v) según la proporción de volumen de 2: 1, luego la solución mezclada fue envasada inmediatamente en una jeringa de 1 ml la cual fue luego sellada y mantenida a temperatura ambiente. Se observó después de una semana que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel. El gel fue insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol lo cual confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

25 Gel de sulfato de condroitina que contiene hialuronato de sodio: hialuronato de sodio (con el peso molecular alrededor de 1.000.000, fabricado por Shandong Freda Biochem Co., Ltd.) fue disuelto en agua para proporcionar la solución al 1,0% p/v. Fue mezclado de manera uniforme con la solución de sulfato de condroitina tiolada que fue preparada en el ejemplo 2 (pH 7,0, 6,0% p/v), luego la solución mezclada fue envasada inmediatamente en una jeringa de 1 ml que luego fue sellada y mantenida a temperatura ambiente. Después de una semana se observó que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez se formó un gel. El gel fue insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol, lo cual confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

35 Gel de gelatina que contiene hialuronato de sodio: hialuronato de sodio (con el peso molecular alrededor de 1.000.000, fabricado por Shandong Freda Biochem Co., Ltd.) fue disuelto en suero fisiológico al 0,9% para proporcionar la solución de 1,0% p/v. se mezcló de manera uniforme con la solución de gelatina tiolada que se había preparado en el ejemplo 3 (pH 7,0, 8,0% p/v). La solución mezclada fue envasada inmediatamente en una jeringa de 1 ml, la cual fue sitiada luego es mantenida temperatura ambiente. Después de una semana se observó que la solución sellada en el inyector había perdido fluidez y se formó un gel. El gel es insoluble en agua, pero soluble en la solución de ditioeritrol que contiene cloruro de sodio, lo cual confirma la formación del enlace reticulado de disulfuro.

**Ejemplo 7. Regulación de concentración de oxígeno disuelto en solución reticulante activa**

40 La solución de hialuronato de sodio tiolado que se había preparado en el ejemplo 1 (pH 8,0, 1,0% p/v) fue evacuada durante 10 minutos y luego expuesta al aire a temperatura ambiente mientras se agitaba de modo electromagnético. La concentración del oxígeno disuelto en la solución fue registrada por un analizador de oxígeno disuelto (HI 9143, fabricado por la compañía HANNA) a un cierto intervalo de tiempo, con los resultados de medición tal como sigue:

Tiempo (minutos)	0	5	10	15	20	25	30	35
Concentración de oxígeno disuelto (mg/l)	0.28	2.77	4.73	5.82	6.50	7.00	7.22	7.33

**Ejemplo 8. Preparación y caracterización de hidrógeno reticulado, inyectable in-situ**

45 En el ejemplo 6, la solución agitada a temperatura ambiente durante 5 minutos (solución A) y la otra solución agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos (solución B) fueron envasadas en una jeringa de 1 ml, respectivamente, y las jeringas fueron selladas y mantenidas a temperatura ambiente. Después de 48 horas se observó que la solución A, aunque se había vuelto muy viscosa, todavía tenía cierta fluidez; mientras que la solución B había perdido fluidez completamente y había formado un gel. Midiendo el contenido del enlace de disulfuro en las soluciones A y B con el procedimiento reportado por Shu et al en Biomacromolecules, 3, 1304, 2002, se encontró que el contenido del enlace de disulfuro en la solución B fue de aproximadamente 15% más alto que el contenido en la solución A.

**Ejemplo 9. Regulación de la concentración de oxígeno disuelto en la solución reticulante activa**

La solución de hialuronato de sodio tiolado que se había preparado en el ejemplo 1 (pH 8,0, 1,0% p/v) fue expuesta a oxígeno gaseoso de 1 atm en un contenedor sellado mientras se agitaba de modo electromagnético. La concentración del oxígeno disuelto en la solución fue registrada por un analizador de oxígeno disuelto (HI 9143, fabricado por la compañía HANNA) a un cierto intervalo de tiempo, con los resultados de medición tal como sigue:

Tiempo (minutos)	0	5	10	15	20
Concentración de oxígeno disuelto (mg/L)	7,38	13,92	18,73	24,82	28,50

5

**Ejemplo 10. Preparación y caracterización de hidrogel reticulado, inyectable in-situ**

En el ejemplo 8, al exponerse a oxígeno gaseoso de 1 atm, la solución agitada durante 0 minutos (solución A) y la solución agitada durante 10 minutos (solución B) fueron envasadas a una jeringa de 1 ml, respectivamente. La jeringa fue sellada y mantenida temperatura ambiente. En la solución B, el gel se formó dentro de 24 horas, mientras que la gelificación de la solución A duró aproximadamente 48 horas. Después de 48 horas, se encontró que el contenido del enlace de disulfuro en la solución B era aproximadamente 30% más alto que el contenido en la solución A midiendo el contenido del enlace de disulfuro en las soluciones A y B con el procedimiento reportado por Shu et al en Biomacromolecules, 3, 1304, 2002.

10

**Ejemplo 11. Preparación de fármaco que contiene hidrogel reticulado, inyectable in-situ**

A 10 ml de solución de hialuronato de sodio tiolado que había sido preparada en el ejemplo 1 (pH 7,0, 1,0% p/v), fueron adicionados 50 mg de antibiótico (gentamicina), 100 mg de fármaco antitumoral (Taxol) o 50 µg de factor de crecimiento básico, de manera alternativa. La solución fue mezclada de manera uniforme y luego, inmediatamente, envasada en una jeringa de 1 ml. La jeringa fue sellada y mantenida temperatura ambiente. Después de una semana se observó que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel.

15

**Ejemplo 12. Preparación y caracterización de corticosteroide que contiene hidrogel reticulado, inyectable in-situ**

A 10 ml de solución de hialuronato de sodio tiolado que se había preparado en el ejemplo 1 (pH 7,0, 1,0% p/v), fueron adicionados 0,1-10 mg de un tipo de corticosteroide (por ejemplo, beclometasona, dipropionato de beclometasona, budesonida; dexametasona, prednisolona o prednisona). La solución fue mezclada uniformemente y fue envasada inmediatamente en una jeringa de 1 ml que luego fue sellada y mantenida temperatura ambiente después de una semana se observó que la solución sellada en la jeringa había perdido fluidez y se formó un gel.

25

0,2 mL de un fármaco que contiene un gel, tal como se ha descrito antes, fueron envasados en un tubo plástico de centrífuga de 15 ml; se adicionaron 10 ml de solución reguladora de pH de fosfato al tubo de centrífuga que luego se puso en una incubadora (37°C, 100 rpm); a cierto intervalo de tiempo se registró la absorción ultravioleta del fármaco en el sobrenadante. Los resultados de la longitud de onda medida se muestran a continuación: beclometasona 246 nm; dipropionato de beclometasona 240 nm; budesonida 248 nm; dexametasona 242 nm; prednisolona 248 nm; y prednisona 244 nm.

30

Los porcentajes acumulativos de liberación del fármaco en diferentes momentos son tal como sigue:

Tiempo (día)	Beclometasona	Dipropionato de beclometasona	Budesonida	Dexametasona	Prednisolona	Prednisona
7	61%	<1%	21%	39%	95%	82%
14	82%	<1%	40%	61%	100%	95%
21	91%	<1%	57%	74%	100%	100%

De los resultados anteriores puede verse que el hidrogel reticulado, inyectable in situ, como un portador de liberación sostenida para muchos fármacos tiene un buen efecto de liberación sostenida para seis tipos de corticosteroide. Debido a diferencias en la condición hidrófuga, los medicamentos son muy diferentes en sus conductas de liberarse del gel. Cuanto más fuerte sea la condición hidrófuga del medicamento, más sostenida es la liberación. Tomando la prednisolona más hidrofílica, por ejemplo, esta se había liberado sustancialmente de manera completa en 7 días; mientras que para el dipropionato de beclometasona muy hidrófugo casi nunca se detectó la liberación.

40

**Ejemplo 13. Aplicación de hidrogel reticulado, inyectable in situ para prevenir restenosis del orificio del seno nasal después de cirugía de nasosinusitis**

Fueron usados conejos machos blancos de Nueva Zelanda, después de esterilización según el método de Pasteur, y cada uno pesaba 3,5-4,0 kg; fueron anestesiados mediante inyección de ketamina (35 mg/kg) y toluolzosina (5 mg/kg) en sus músculos. Después que las partes traseras externas fueran despojadas de sus narices, los conejos fueron desinfectados con yodo y anestesiados con un líquido mezclado de 3 ml de lidocaína al 1% y adrenalina 1: 100000.

45

En condiciones asépticas se hizo una incisión perpendicular de 2,5 mm a lo largo de la línea media. Los tejidos blandos y el periostio que cubre la cavidad fueron levantados y separados. La pared anterior de la cavidad fue abierta con un taladro eléctrico de cirugía, rompiendo entre la pared media de la cavidad y la cavidad nasal con una broca esférica de 4 mm, formando de esta manera un canal de poro cilíndrico de 4 mm de diámetro sin mucosa en el borde. Ambos

- 5 lados del canal del poro de los cuatro conejos se llenaron con el gel de hialuronato de sodio que había sido preparado en el ejemplo 4 (grupo terapéutico) y ambos lados del canal de poro de los otros cuatro conejos no se llenaron con nada (grupo de control). Luego, el periostio fue cocido con una atadura absorbible y la cavidad fue cocida y sellada con piel por la atadura absorbible. No se necesitó otro vendaje. A los animales se les ofreció dieta rutinaria y agua después de la operación.
- 10 Los conejos fueron sacrificados dos semanas después. Se hizo una incisión en la herida curada para exponer la cavidad del seno. Se lavó con agua, entre tanto, se extrajeron residuos suavemente de la cavidad del seno con un extractor y se inspeccionó la pared media del seno nasal con un endoscopio nasal de 30 grados y fue fotografiada. Cada ostium fue medido con una regla con escala milimétrica. El ostium fue observado y medido por medio de la
- 15 técnica de doble ciego. Los resultados de medición del ostium del grupo terapéutico y de grupo de control son tal como siguen.

	Grupo terapéutico	Grupo de control
Diámetro de osteo de seno nasal (mm)	2,9 ± 1,32	0,7 ± 0,44

La restenosis del ostium del seno nasal, como un problema importante con la operación clínica de nasosinusitis, puede afectar el efecto de la operación e incluso causar el relapso de nasosinusitis. Los resultados, tal como se han descrito antes, indican que el hidrogel reticulado, inyectable in situ puede prevenir de manera significativa la estenosis del ostium de seno nasal, y, por lo tanto, se espera que se use ampliamente en la práctica clínica.

- 20

**Ejemplo 14. Promoción de la curación de heridas con hidrogel reticulado, inyectable in situ**

El modelo animal adoptado, reportado por Kirker et al en Biosubstances, 23, 3661, 2002 fue descrito brevemente tal como sigue: después de que fueron anestesiados diez ratones, cada uno con un peso de 25 g, fue extirpada la epidermis y la dermis en la espalda de los ratones con un escalpelo, con una herida de 1 cm de diámetro. La herida del grupo terapéutico fue llenada con 0,3 ml de gel de hialuronato de sodio que se había preparado en el ejemplo 4, luego fueron vendados con los excipientes y gasa Tegaderm™; la herida del grupo de control fue vendada directamente con los excipientes y la gasa Tegaderm™. Los ratones fueron sacrificados 5 y 10 días después de la operación y la situación de curación de la herida fue caracterizada con la tasa de regeneración de epidermis (porcentaje de la neoepidermis en relación con la herida inicial). Los resultados de la tasa de regeneración de la epidermis (%) son tal como sigue:

- 25
- 30

Tiempo (día)	5	10
Grupo de control	47 ± 15	79 ± 13
Grupo terapéutico	80 ± 13	95 ± 10

El hidrogel reticulado, inyectable in situ, promueve de manera significativa la regeneración de epidermis de la herida y, por lo tanto, puede usarse como vendaje para heridas en la práctica clínica.

Funcionalidad industrial

La presente invención logra el procedimiento de gelificación de oxidación del grupo tiol en el enlace de disulfuro mediante el oxígeno disuelto en la solución reticulante activa. Este procedimiento elimina el prejuicio técnico de que se requiere abrir al aire para preparar el gel reticulado mediante enlace de disulfuro, y resuelve el problema técnico con la producción industrializada a gran escala; además, este método puede regular flexiblemente la concentración del oxígeno disuelto en la solución reticulante activa controlando de manera conveniente tales parámetros como temperatura y presión parcial de oxígeno gaseoso, etc., y por lo tanto regula el procedimiento de reticulación del enlace de disulfuro y la propiedad del hidrogel reticulado de enlace de disulfuro; entretanto, el procedimiento de gelificación es completado en un contenedor inyectable y el hidrogel producido es inyectable. El procedimiento de la presente invención tiene muchas ventajas tal como la falta de necesidad de un agente reticulante, procedimiento de preparación simple, aplicación conveniente, ningún contenido de impurezas, buena biocompatibilidad, ningún efecto tóxico ni colateral y amplia aplicación en la ciencia médica.

- 35
- 40
- 45

La presente invención, con el procedimiento de gelificación completado en un contenedor inyectable, tiene además tales ventajas como impedir la contaminación secundaria, lo cual es extremadamente conveniente para la aplicación clínica, sin infección cruzada durante el uso, lo cual impide que el aire que no esté limpio se ponga en contacto con el producto en el cuarto de un enfermo, sin necesidad de medicina para extraer y es desechable.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para preparar un hidrogel reticulado, inyectable in situ, caracterizado porque: comprende las siguientes etapas:
- 5 (1) envasar una solución reticulante activa en un contenedor para inyección del hidrogel, en cuyo caso la solución activa que puede reticularse contiene al menos un tipo de macromoléculas biocompatibles, que tiene dos grupos tiol en la cadena lateral;
- (2) sellar el contenedor que contiene la solución reticulante activa; y
- (3) oxidar los grupos tiol a enlaces de disulfuro para formar el hidrogel reticulado por oxígeno disuelto en la solución activa reticulable en el contenedor sellado;
- 10 y la macromolécula biocompatible con más de dos grupos tiol en la cadena lateral es un derivado de polisacáridos o proteínas producidos por una o más modificaciones químicas que incluyen al menos una modificación de tiol.
2. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulable se regula antes y después de la etapa (1).
- 15 3. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 2, caracterizado porque: la regulación de la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulable incluye incrementar o disminuir la concentración del oxígeno disuelto.
4. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque: la concentración del oxígeno disuelto en la solución activa reticulable se controla regulando la temperatura, la presión parcial de oxígeno de un gas en contacto con la solución activa reticulable, o el tiempo de contacto.
- 20 5. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 3, caracterizado porque: el procedimiento de incrementar la concentración del oxígeno disuelto incluye la interacción de la solución activa reticulable con un gas cuya presión parcial de oxígeno es más alta que aquella en el aire atmosférico.
6. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 3, caracterizado porque: el procedimiento de disminuir la concentración del oxígeno disuelto incluye evacuar y exponer la solución activa reticulable al gas cuya presión parcial de oxígeno es más baja que aquella en el aire atmosférico.
- 25 7. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: el contenedor es una jeringa o un contenedor que puede extrudirse.
8. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: el polisacárido se selecciona de sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido algínico, ácido hialurónico, dermatán, sulfato de dermatán, pectina, carboximetilcelulosa y quitosano, así como también sus formas salinas; la proteína se selecciona de colágeno, gelatina ácida, gelatina alcalina y gelatina de recombinación de gen.
- 30 9. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: la modificación de tiol incluye los siguientes procedimientos de reacción química: hacer reaccionar grupos carboxilo con diaminas o dihidrazidas que contienen enlaces de disulfuro con la activación de carbodiimida para producir productos intermedios, luego reducir los enlaces de disulfuro a grupos tiol y purificar los derivados tiolados.
- 35 10. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: las macromoléculas biocompatibles que contiene más de dos grupos tiol en la cadena lateral se seleccionan del siguiente grupo: derivados tiolados de hialuronato de sodio que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral, derivados tiolados de sulfato de condroitina que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral; derivados tiolados de gelatina que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral, derivados tiolados de colágeno que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral, derivados tiolados de quitosano que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral, o derivados tiolados de heparina que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral.
- 40 11. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: la solución activa reticulable contiene dos o más tipos de macromoléculas biocompatibles que contienen más de dos grupos tiol en la cadena lateral.
- 45 12. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 11, caracterizado porque: la solución activa reticulable contiene dos o más tipos de derivados tiolados seleccionados del siguiente grupo: los derivados tiolados de hialuronato de sodio, los derivados tiolados de sulfato de condroitina, los derivados tiolados
- 50

de heparina, los derivados tiolados de gelatina, los derivados tiolados de colágeno y los derivados tiolados de quitosano.

- 5 13. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, 11 o 12, caracterizado porque: la solución activa reticulable contiene además uno o más tipos de polisacáridos, proteínas y macromoléculas sintéticas.
- 10 14. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 13, caracterizado porque: el polisacárido se selecciona de sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido alginico, ácido hialurónico, dermatán, sulfato de dermatán, pectina, carboximetilcelulosa y quitosano, así como también sus formas salinas; la proteína se selecciona de colágeno, gelatina ácida, gelatina alcalina y gelatina de recombinación de gen; y la macromoléculas sintéticas se selecciona de poli(ácido acrílico), poli(ácido aspártico), poli(ácido tartárico), poli(ácido glutámico), y poli(ácido fumárico), así como también sus formas salinas.
- 15 15. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, caracterizado porque: el tiempo que dura para que la solución activa reticulable forme gradualmente el hidrogel reticulado con enlace de disulfuro en el contenedor es de más de 30 minutos.
- 15 16. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 1, 11 o 12, caracterizado porque: la solución activa reticulable contiene un componente farmacológico activo.
- 20 17. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 13, caracterizado porque: la solución activa reticulable contiene un componente farmacológico activo.
- 20 18. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 16, caracterizado porque: el componente farmacológico activo puede dispersarse en la solución activa reticulable en forma de partículas sólidas, o puede disolverse en la solución activa reticulable.
- 25 19. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 17, caracterizado porque: el componente farmacológico activo puede dispersarse en la solución activa reticulable en forma de partículas sólidas, o puede disolverse en la solución activa reticulable.
- 25 20. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque: el componente farmacológico activo incluye esteroides, antibióticos y fármacos antitumorales.
21. El procedimiento para preparar el hidrogel reticulado inyectable in situ según la reivindicación 16, caracterizado porque: el componente farmacológico activo incluye esteroides, antibióticos y fármacos antitumorales.