

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 574**

51 Int. Cl.:

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2015 PCT/EP2015/059941**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15169849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2015 E 15725516 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 3139961**

54 Título: **Hidrogeles de derivados de ácido hialurónico metacrílicos para terapia enzimática oral en enfermedad celíaca**

30 Prioridad:

07.05.2014 IT FI20140106

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

11.07.2018

73 Titular/es:

NEMYSIS LIMITED (100.0%)

7 D'Olier Street

Dublin 2, IE

72 Inventor/es:

PITARRESI, GIOVANNA;

PALUMBO, FABIO SALVATORE y

GIAMMONA, GAETANO

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 675 574 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

Hidrogeles de derivados de ácido hialurónico metacrílicos para terapia enzimática oral en enfermedad celíaca

5 **Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende hidrogeles de derivados de ácido hialurónico cargados con al menos una enzima exógena, seleccionándose dicha enzima del grupo que consiste en prolil endopeptidasa (PEP), endoproteasa (EP) y combinaciones de las mismas; teniendo por objeto dicha composición el tratamiento oral de enfermedad celíaca.

Estado de la técnica

15 [0002] La enfermedad celíaca es una patología del intestino delgado inducida por el gluten en individuos genéticamente susceptibles, incluso a pesar de que participen factores del entorno en esta enfermedad inflamatoria compleja.

20 [0003] El gluten es una mezcla de gliadinas y gluteninas, rica en prolina y glutamina, que no son sustratos preferentes para las enzimas del tracto gastrointestinal humano. En consecuencia, el gluten no se degrada totalmente en los seres humanos, produciéndose péptidos inmunogénicos metaestables de hasta 30-40 aminoácidos. En particular, la secuencia de $\alpha 2$ -gliadina, una proteína de gluten representativa, se escinde mediante pepsina en el estómago con la formación de péptidos grandes, que se digieren en el interior del intestino delgado mediante proteasas pancreáticas y peptidasas de la membrana del borde en cepillo intestinal en aminoácidos simples, di- y tri-péptidos para su absorción. Sin embargo, la secuencia de 33-meros persiste a través de la digestión para atravesar la barrera epitelial, para pasar a estar desaminada mediante transglutaminasa 2 (TG2) en restos de glutamina seleccionados. En la lámina propia subyacente, los epítomos derivados de 33-meros desaminados presentan una alta afinidad para el antígeno de leucocitos humano (HLA) DQ2. Los complejos péptidos-DQ2 del gluten desaminado en la superficie de las células que presentan antígeno (APC) provocan una potente respuesta inflamatoria desde los linfocitos T intestinales específicos de gluten, que causa la destrucción de la arquitectura intestinal, malabsorción de nutrientes, diarrea y anemia.

35 [0004] Una dieta sin gluten completa permite la resolución de signos y síntomas de la enfermedad celíaca en la mayoría de los pacientes y, hasta la fecha, constituye el único tratamiento para esta patología. Evidentemente, dada la ubicuidad del gluten en la dieta humana, esta restricción es complicada en la práctica y generalmente está asociada a una peor calidad de vida. Por otra parte, los alimentos sin gluten son muy caros de modo que, además de tener un sabor lejos de ser óptimo, las razones económicas suelen desalentar a los pacientes.

40 [0005] Lamentablemente, la escasa tolerancia por parte del paciente, ya sea de forma voluntaria o no, a una dieta sin gluten estricta provoca complicaciones, como osteoporosis, trastornos inmunes secundarios, malignidades, etc. que pueden asociarse a una mayor morbilidad y mortalidad. Por lo tanto, existe una gran necesidad de contar con alternativas terapéuticas a la dieta sin gluten, incluyendo, entre ellas, la administración oral de prolil endopeptidasas (PEP) exógenas.

45 [0006] A diferencia de las enzimas humanas del tracto gastrointestinal, las PEP exógenas pueden hidrolizar eficientemente los péptidos del gluten ricos en prolina y evitar así la respuesta inflamatoria.

50 [0007] Se han propuesto varios PEP con este objetivo, como por ejemplo PEP derivados de *Flavobacterium meningosepticum* (FM), *Myxococcus xanthus* (MX), *Sphingomonas capsulata* (SC) y *Aspergillus niger* (AN), con especificidad de longitud de cadena y secuencias diferentes, así como estabilidad en medio ácido o en presencia de proteasas gastrointestinales (Bethune MT and Khosla C. Oral enzyme therapy for celiac sprue. *Methods Enzymol.* 2012; 502:241-271).

55 [0008] Sin embargo, para la administración oral de estas enzimas es necesario seleccionar una formulación apropiada que permita tanto el proceso de fabricación sin alterar la enzima como su liberación en el tracto gastro y/o intestinal, como una forma activa y en una dosis eficaz, preferentemente, de forma gradual y constante a lo largo del tiempo.

60 [0009] La solicitud de patente WO 2007/044906 divulga una composición para administración entérica que comprende glutenasa, que comprende: una dosis eficaz de un agente secuestrante de ácido biliar en combinación con dicha glutenasa; en la que dicho agente secuestrante de ácido biliar potencia la estabilidad entérica de dicha glutenasa; en la que dicha glutenasa se selecciona del grupo que consiste en prolil endopeptidasa de *Flavobacterium meningosepticum* (FM PEP), prolil endopeptidasa de *Sphingomonas capsulate* (SC PEP) prolil endopeptidasa de *Myxococcus xanthus* (MX prolil endopeptidasa) y EP-B2 endoproteinasa de cebada. Hasta la fecha no existen en el mercado formulaciones orales con contenido en PEP, sino únicamente algunos ejemplos de ensayos clínicos, como por ejemplo la combinación catalogada como ALV003 entre PEP SC y EP-B2 (endoproteasa de cebada) (Tye-Din JA, Anderson RP, Ffrench RA, Brown GJ, Hodsman P, Siegel M, Botwick W, Shreeniwas R.

The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. Clin Immunol. 2010; 134:289-95).

5 [0010] Sin embargo, parece ser que la terapia de enzima oral que se ha investigado hasta el momento no es capaz de degradar suficientemente epítomos inmunogénicos de un consumo de gluten diario normal que asciende a > 13 g, sino más bien eliminar el efecto negativo de unos pocos cientos de miligramos a unos cuantos gramos de gluten en pacientes con una alta sensibilidad al gluten o enfermedad celíaca refractaria tipo 1, o permitir una transgresión ocasional de dieta sin gluten.

10 [0011] Finalmente, es probable que la terapia oral propuesta hasta la fecha requiera la administración de PEP con cada comida en la que se consuma intencionada o inadvertidamente gluten.

15 [0012] Por lo tanto, existe una necesidad dentro de una mejor liberación de PEP exógenos para su uso en el tratamiento oral de enfermedad celíaca, sin adolecer de los inconvenientes de la técnica anterior.

20 [0013] Por lo tanto, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar nuevas formulaciones para administración oral de enzimas exógenas seleccionadas del grupo que consiste en prolil endopeptidasa (PEP) y endoproteasa (EP), con capacidad para liberar la enzima como forma activa y dosis eficaces en el tracto gastrointestinal y de forma gradual, para permitir la administración de PEP y/o EP a una posología de una vez al día.

Definiciones y abreviaturas

[0014]

25 EDA: etilendiamina
 EP: endoproteasa
 HA: ácido hialurónico
 MA: anhídrido metacrílico
 HA-EDA-MA: ácido hialurónico en el que al menos un grupo hidroxilo ha sido funcionalizado por reacción con
 30 etilenediamina (EDA) y posterior reacción con anhídrido metacrílico (MA)
 PEP: prolil endopeptidasa
 PEP FM: prolil endopeptidasa derivada de *Flavobacterium meningosepticum*
 PEP MX: prolil endopeptidasa derivada de *Myxococcus xanthus*
 PEP SC: prolil endopeptidasa derivada de *Sphingomonas capsulata*
 35 PEP AN: prolil endopeptidasa derivada de *Aspergillus niger*

Sumario de la invención

40 [0015] La invención proporciona una composición que comprende al menos una enzima exógena, seleccionándose dicha enzima del grupo que consiste en prolil endopeptidasa (PEP), endoproteasa (EP) y combinaciones de las mismas, estando atrapada dicha enzima en hidrogel de derivados de ácido hialurónico metacrílicos fotorreticulados (HA-EDA-MA), en la que los derivados de ácido hialurónico comprende ácido hialurónico (HA) o una sal del mismo, de un peso molecular comprendido entre 50.000 y 1.500.000 Daltons en la que al menos un grupo hidroxilo, tras la activación con un agente de carbonatación seleccionado entre fenilésteres carbónicos o fenilésteres halofórmicos,
 45 ha sido funcionalizado por reacción con etilenediamina (EDA) y posterior reacción con anhídrido metacrílico (MA), preferentemente utilizando síntesis en un solo recipiente.

[0016] La composición obtenida se prepara como un gel o un polvo criodesecado.

50 [0017] Sorprendentemente, se observó que la enzima atrapada en el hidrogel quedaba protegida de la degradación durante el proceso de criodesecación, lo que permitió por tanto la producción y almacenamiento a largo plazo estable de la composición de la invención en forma de polvo criodesecado. Una composición de acuerdo con la invención permite la liberación de la enzima exógena en fluidos gastrointestinales simulados en forma sustancial y como forma activa para desintoxicar péptido gliadina. Una composición de acuerdo con la invención es por tanto
 55 adecuada para su uso en el tratamiento de enfermedad celíaca y puede utilizarse para preparar una forma farmacéutica oral convencional, como pueda ser granulados, cápsulas o comprimidos, con un revestimiento entérico o no, para la administración oral y la liberación sostenida de enzimas (PEP, EP o combinaciones de los mismos) como forma activa capaz de desintoxicar péptido de gliadina en pacientes celíacos. El objeto de la presente invención es por lo tanto también una formulación oral farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con
 60 la presente invención y al menos otro ingrediente farmacéuticamente aceptable, siendo dicha formulación para su uso en el tratamiento de enfermedad celíaca.

65 [0018] Las propiedades mucoadhesivas del polímero de partida, es decir, ácido hialurónico, podrían permitir la adhesión a la mucosa del tracto gastrointestinal y, en consecuencia, un período de permanencia más prolongado de la formulación cargada con enzimas (PEP, EP o combinaciones de ellas) en el sitio en el que ha de desintoxicarse el péptido gliadina.

[0019] Otro objeto de la presente invención es un proceso para preparar derivados de ácido hialurónico metacrílicos en los que se han funcionalizado los grupos hidroxilo del ácido hialurónico con etilendiamina y, después, con anhídrido metacrílico, siendo dicho proceso un proceso de un solo recipiente.

5 Breve descripción de las figuras

[0020]

La Figura 1 presenta el espectro de ¹H-RMN de derivado de HA-EDA-MA;

10 La Figura 2 presenta el esquema de un sistema de tubo con émbolo Pyrex utilizado para la fotoirradiación de soluciones HA-EDA-MA;

La Figura 3 presenta la estabilidad de PEP FM en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, expresada como una mezcla de la absorbancia (ABS) a 380 nm de las soluciones de sustrato (Z-Gly-Pro-pNA) procesadas con la enzima tras el almacenamiento a 4 °C hasta 5 días;

15 La Figura 4 presenta la actividad de PEP FM expresada como una medida de la absorbancia (ABS) a 380 nm de las soluciones de sustrato (Z-Gly-Pro-pNA) procesadas con la enzima tras su irradiación a 366 nm para diferentes tiempos;

La Figura 5 presenta PEP FM liberada desde geles de HA-EDA-MA analizados inmediatamente después de su preparación (a) y tras el almacenamiento a 4 °C durante 10 días (b). Los estudios de liberación fueron realizados en fluidos intestinales simulados, pH 7,2 de 0 a 24 h;

20 La Figura 6 presenta PEP FM liberada de polvos criodesecados de HA-EDA-MA analizados inmediatamente después de su preparación (a), tras el almacenamiento a 4 °C durante 10 días (b) y después del almacenamiento a -20°C durante 10 días (c). Se realizaron los estudios de liberación en fluidos intestinales simulados, pH 7,2 desde 0 a 24 h;

25 La Figura 7 presenta PEP FM liberada de polvos criodesecados de HA-EDA-MA en presencia de 1,5 p/p de trehalosa analizada inmediatamente después de su preparación (a), tras el almacenamiento a 4 °C durante 10 días (b) y tras su almacenamiento a -20°C durante 10 días (c). Se realizaron los estudios de liberación en fluidos intestinales simulados, pH 7,2 desde 0 a 24 h;

30 La Figura 8 presenta PEP FM liberada de polvos criodesecados de HA-EDA-MA en presencia de 3 % p/p de trehalosa analizada inmediatamente después de su preparación (a), tras el almacenamiento a 4 °C durante 10 días (b) y tras el almacenamiento a -20 °C durante 10 días (c). Los estudios de liberación se realizaron en fluidos intestinales simulados, pH 7,2 desde 0 a 24 h;

35 La Figura 9 presenta PEP FM liberada de polvos criodesecados de HA-EDA-MA en presencia de 3 % p/p de trehalosa analizada después del almacenamiento a 4°C durante 10 días (a), 1 mes (b) y 2 meses (c). Se realizaron los estudios de liberación en fluidos intestinales simulados, pH 7,2 desde 0 a 24 h;

La Figura 10 presenta PEP FM liberada de polvos criodesecados de HA-EDA-MA en presencia de 3 % p/p de trehalosa analizada después del almacenamiento a -20°C durante 10 días (a), 1 mes (b) y 2 meses (c). Se realizaron los estudios de liberación en fluidos intestinales simulados, pH 7,2 de 0 a 24 h.

40 Descripción detallada de la invención

[0021] Los derivados de HA-EDA-MA de acuerdo con la invención presentan un grado de funcionalización en EDA y MA comprendido entre al menos un grupo hidroxilo y el total de grupos hidroxilo de ácido hialurónico.

45 **[0022]** Los derivados de HA-EDA-MA pueden foto-reticularse por fotoirradiación a una longitud de onda en el intervalo de 180-800 nm, en solución acuosa a una concentración entre 1 % p/v y 20 % p/v y en presencia de al menos una enzima exógena, preferentemente una PEP, en una concentración entre 1 mU/mg y 100 U/mg de polímero.

50 **[0023]** Los derivados de HA-EDA-MA pueden foto-reticularse, por fotoirradiación a una longitud de onda en el intervalo de 180-800 nm, en una concentración entre 1 % p/v y 20 % p/v y cargarse después a través del contacto de los hidrogeles obtenidos con una solución de al menos una enzima exógena, preferentemente una PEP, con una concentración entre 1 mU/mg y 100 U/mg de polímero.

55 **[0024]** Los derivados HA-EDA-MA pueden foto-reticularse en un medio acuoso, preferentemente por irradiación UV a una longitud de onda de 366 nm en presencia de una enzima exógena, preferentemente prolil-endopeptidasa (PEP).

60 **[0025]** En una composición de acuerdo con la invención, la enzima puede ser PEP o EP derivada de un único microorganismo o puede ser una combinación de PEP y/o EP derivadas de diferentes microorganismos o producidas a través de un método de biotecnología; es adecuada cualquier PEP o EP conocida en la técnica, así como combinaciones de las mismas, para su atrapamiento en un hidrogel, de acuerdo con la invención.

65 **[0026]** La PEP puede prepararse también por técnicas recombinantes en *E. coli*, tal como se describe en Bethune et al. Methods Enzymol. 2012, 502, 241-271 y las notas incluidas. De acuerdo con la invención, preferentemente PEP se deriva de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Flavobacterium*

meningosepticum (FM), *Myxococcus xanthus* (MX), *Sphingomonas capsulata* (SC) o *Aspergillus niger* (AN). De acuerdo con la invención, preferentemente, EP es EP de cebada, siendo particularmente preferente EP-B2.

5 [0027] Preferentemente, de acuerdo con la invención, dicha enzima está atrapada en el hidrogel, en forma de gel, en una concentración comprendida entre 1 mU/mg y 100 U/mg de polímero. Los hidrogeles HA-EDA-MA cargados con enzimas pueden producirse como geles. Los hidrogeles HA-EDA-MA cargados con enzimas se pueden producir como polvo criodesecado.

10 [0028] El criodesecado puede realizarse tanto en ausencia como en presencia de crioprotectores, en una concentración comprendida entre 0,1 y 10 % p/p con respecto al peso del polímero; dicho crioprotector es preferentemente trehalosa.

15 [0029] Los hidrogeles HA-EDA-MA cargados con PEP (en particular PEP FM), de acuerdo con la invención, han sido probados en ensayos de liberación de PEP en fluidos gastrointestinales simulados tras su almacenamiento durante diferentes períodos (hasta seis meses desde su preparación) y a diferentes temperaturas (de -20 a 37 °C).

20 [0030] En una patente anterior (Giammona, G., Palumbo, F.S., Pitarresi, G., Method to produce hyaluronic acid functionalized derivatives and formation of hydrogels thereof. WO 2010/061005 A1), se ha notificado la síntesis de HA-EDA-MA, sin embargo ésta implicó la producción inicial de derivados de HA-EDA, que tras el aislamiento y la purificación se emplean para una reacción posterior con MA, de modo que se ha notificado una síntesis en dos recipientes.

25 [0031] En cambio, en la presente invención, se reivindica la síntesis en un solo recipiente que permite producir directamente derivados de HA-EDA-MA sin aislar derivados de HA-EDA.

[0032] Por tanto, un objeto más de la presente invención es un procedimiento, preferentemente en un solo recipiente, para la producción de derivados de ácido hialurónico metacrílico, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

30 (a) contacto de una sal de ácido hialurónico (HA) en un disolvente aprótico polar con un agente de carbonatación seleccionado entre fenilésteres carbónicos o fenilésteres halofórmicos para obtener la activación de al menos un grupo hidroxilo de HA, en el que dicho HA se encuentra en forma de una sal soluble en dicho disolvente orgánico polar aprótico;

35 (b) contacto de la sal de HA activada obtenida de la etapa (a) con etilendiamina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, indicado como EDA), para obtener, por sustitución nucleófila, HA-EDA;

(c) contacto de HA-EDA obtenida de la etapa (b) con anhídrido metacrílico (indicado como MA), para obtener por sustitución nucleófila, HA-EDA-MA; en el que, preferentemente, todas las etapas anteriores se realizan en el mismo recipiente.

40 [0033] La sal de ácido hialurónico soluble en disolventes orgánicos se selecciona preferentemente entre la sal tetrabutilamonio (indicada como TBA) o la sal de cetiltrimetilamonio (indicada como CTA).

45 [0034] El disolvente orgánico aprótico polar empleado para las reacciones de funcionalización se selecciona preferentemente entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida y mezclas de los mismos.

[0035] El agente de carbonatación empleado en la etapa (a) puede ser preferentemente el bis(carbonato de 4-nitrofenilo) (un éter carbonil fenílico) y/o un carbonato de cloro nitrofenilo.

50 [0036] La etapa (c) se lleva a cabo preferentemente en presencia de un catalizador seleccionado entre dietilamina, trietilamina, dimetilaminopiridina y mezclas de las mismas.

[0037] Todas las etapas se llevan a cabo preferentemente a temperaturas comprendidas entre 5 y 60 °C.

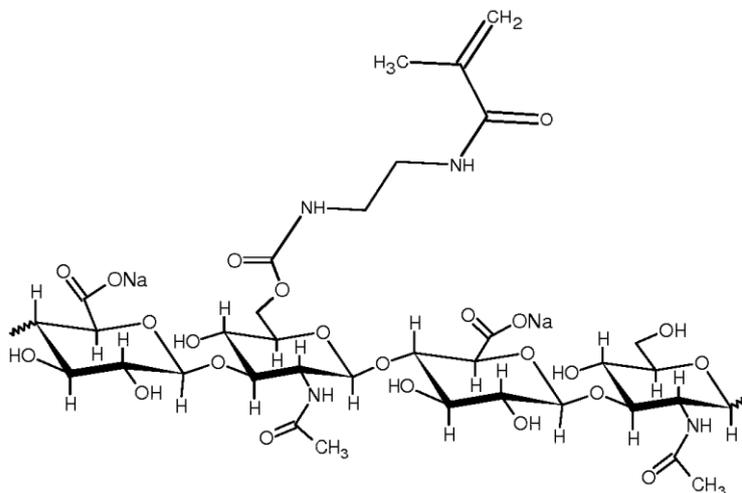
55 [0038] El grado de funcionalización en los grupos EDA y MA unidos a HA puede variar desde solo un grupo hidroxilo al total de grupos hidroxilo de HA y depende (de una manera directamente proporcional) de la cantidad de agente de carbonilación utilizado en el proceso descrito. Preferentemente, el grado de funcionalización varía entre 5 y 95 %, más preferentemente entre 20 y 80 %.

60 [0039] De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención se refiere a derivados de HA-EDA-MA que tienen un peso molecular en el intervalo de 50.000-1.500.000 Dalton que se pueden obtener a partir del proceso descrito.

65 [0040] A continuación, se presenta una fórmula estructural de HA-EDA-MA que se pretende que sea simplemente representativa del tipo de funcionalización (enlace covalente) que tiene lugar para un grupo hidroxilo HA cuando se somete al proceso descrito. No se pretende que la estructura presentada a continuación en el presente documento sea representativa del grado de funcionalización que, tal como se ha señalado, es en cambio directamente proporcional a la cantidad de agente de carbonilación reactivo, utilizado en el proceso anterior.

[0041] En particular, el tipo de funcionalización de los derivados de HA-EDA-MA podría representarse mediante la siguiente estructura que describe dos unidades de disacárido consecutivas del ácido hialurónico de partida, en el que se ha funcionalizado al menos un grupo hidroxilo.

5



HA-EDA-MA

[0042] Según otro aspecto más, la presente invención se refiere a hidrogeles reticulados obtenidos a partir de los productos descritos, es decir, derivados de HA-EDA-MA, aplicando un procedimiento de fotorreticulación, en el que la concentración de los derivados funcionalizados mencionados en solución acuosa u orgánica está comprendida entre 1 % p/v y 20 % p/v. Preferentemente, los hidrogeles se obtienen por irradiación con longitudes de onda comprendidas entre 180 y 800 nm, con o sin fotoiniciador de radicales, con un tiempo de irradiación comprendido entre 5 min y 10 h.

10

[0043] Dichos hidrogeles pueden obtenerse también por irradiación de rayos gamma, de microondas u otras radiaciones ionizantes.

15

[0044] Dicha fotorreticulación puede tener lugar también en presencia de aditivos apropiados como monómeros acrílicos y metacrílicos, metacrilatos y acrilatos de polietilenglicol, tanto mono como polifuncionales, o en presencia de otros aditivos empleados para cambiar o mejorar la plasticidad, la dureza y el carácter hidrófilo y lipófilo. De acuerdo con un aspecto más, la presente invención se refiere a la producción de hidrogeles de HA-EDA-MA obtenidos por fotoirradiación y cargados con prolil endopeptidasas exógenas (PEP) con una concentración de enzima comprendida entre 1 mU/mg y 100 U/mg de polímero, durante y/o después del proceso de irradiación. De acuerdo con un aspecto específico, la presente invención se refiere a la producción de derivados de HA-EDA-MA fotorreticulados en un medio acuoso, preferentemente a 366 nm durante 10 minutos, en presencia de prolil endopeptidasas exógenas (PEP), preferentemente PEP derivadas de *Flavobacterium meningosepticum* (FM) con una concentración de enzima comprendida entre 1 mU/mg y 100 U/mg de polímero.

20

25

[0045] Los hidrogeles HA-EDA-MA cargados con PEP se producen como geles o polvos criodesecados en ausencia o en presencia de crioprotectores, con una concentración comprendida entre 0,1 y 10 % p/p en relación con el peso del polímero.

30

[0046] Se emplearon los hidrogeles obtenidos cargados con PEP para realizar experimentos de liberación en fluidos gastrointestinales simulados tanto inmediatamente después de su producción como tras su almacenamiento durante diferentes períodos (hasta seis meses desde la preparación) y a diferentes temperaturas (desde -20 a 37 °C).

35

[0047] Los resultados del experimento demostraron que:

40

45

- PEP FM en solitario disuelta en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, con el tiempo, va perdiendo gradualmente su actividad, incluso si se almacena a baja temperatura, p.ej., 4 °C.
- PEP FM en solitario disuelta en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, pierde totalmente su actividad después de la criodesecación de la solución, también en presencia de crioprotectores;
- PEP FM en solitario disuelta en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, y fotoirradiada a 366 nm durante 10 min, mantiene su actividad durante la fotoirradiación, pero pierde totalmente su actividad después de la criodesecación de la solución, también en presencia de crioprotectores;
- PEP FM disuelta en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, en presencia de derivado de HA-EDA-MA y

fot irradiada a 366 nm durante 10 min, mantiene su actividad también después de la criodesecación, tanto en ausencia como en presencia de crioprotectores;

- Los hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con PEP FM durante la fot irradiación y recuperados como geles, si se analizan inmediatamente después de su preparación, pueden liberar de forma sostenida aproximadamente 70 % de la enzima en el fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta 24 h. La cantidad de PEP FM que permanece en los geles de HA-EDA-MA, mantiene totalmente su actividad.
- Los hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con PEP FM durante la fot irradiación y recuperados como geles, si se analizan después del almacenamiento a 4 °C durante 10 días, pueden liberar de forma sostenida aproximadamente el 60 % de la enzima en el fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta las 24 h y solo se produce una pérdida parcial de la actividad (aproximadamente 20 %).
- Los hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con PEP FM durante la fot irradiación en ausencia de crioprotectores y recuperados como polvos criodesecados, si se analizan inmediatamente después de su preparación, pueden liberar de forma sostenida aproximadamente 70 % de la enzima en el fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta las 24 h. La cantidad de PEP FM que permanece en los hidrogeles de HA-EDA-MA mantiene totalmente su actividad.
- Los hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con PEP FM durante la fot irradiación en ausencia de crioprotectores y recuperados como polvos criodesecados, si se analizan después del almacenamiento a 4 °C o -20 °C durante 10 días, pueden liberar de forma sostenida aproximadamente 50 % de la enzima en el fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta las 24 h y solo se produce una pérdida parcial de la actividad (aproximadamente 30 %). Se trata de un muy buen resultado ya que la PEP FM en solitario, es decir, en ausencia del hidrogel de HA-EDA-MA, pierde totalmente su actividad después de la criodesecación.
- Los hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con PEP FM durante la fot irradiación en presencia de trehalosa (como ejemplo de crioprotector) al 1,5 % p/p en relación con el peso del polímero y recuperados como polvos criodesecados, si se analizan inmediatamente después de su preparación, son capaces de liberar de forma sostenida aproximadamente 60 % de la enzima en el fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta las 24 h. La cantidad de PEP FM que permanece en los hidrogeles de HA-EDA-MA mantiene totalmente su actividad.

[0048] Si estas muestras se almacenan a 4 °C durante 10 días, siguen siendo capaces de liberar de forma sostenida aproximadamente 50 % de PEP FM en fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta 24 h y solo se produce una pérdida parcial de la actividad (aproximadamente 30 %).

[0049] Si se almacenan estas muestras a -20°C durante 10 días, siguen siendo capaces de liberar de forma sostenida aproximadamente el 50 % de PEP FM en fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta 24 horas y PEP FM mantiene totalmente su actividad. Los hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con PEP FM durante la fot irradiación en presencia de trehalosa (como ejemplo de crioprotector) al 3 % p/p en relación con el peso del polímero y recuperados como polvo criodesecado, si se analizan inmediatamente después de su preparación, pueden liberar de forma sostenida aproximadamente 50 % de enzima en el fluido intestinal simulado, pH 7,2, como forma activa hasta las 24 h. La cantidad de PEP FM que permanece en los hidrogeles de HA-EDA-MA mantiene totalmente su actividad.

[0050] Si se almacenan estas muestras a 4 °C o -20 °C durante 1 y 2 meses, siguen siendo capaces de liberar de forma sostenida aproximadamente el 50% de PEP FM en fluido intestinal simulado pH 7,2, como forma activa hasta 24 h y PEP FM mantiene totalmente su actividad.

[0051] Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, la composición según la invención preparada por fot irradiación de hidrogeles de HA-EDA-MA en presencia de PEP FM y un crioprotector con una concentración apropiada puede proteger totalmente la actividad enzimática frente al proceso de criodesecación.

[0052] La PEP FM cargada en hidrogeles de HA-EDA-MA recuperados como polvo criodesecado mantiene totalmente su actividad durante diferentes períodos de almacenamiento y temperaturas y se libera como forma activa en fluido intestinal simulado, pH 7,2, hasta 24 h desde hidrogeles de HA-EDA-MA.

[0053] Siguiendo el mismo enfoque empleado para cargar PEP FM, la presente invención se refiere a hidrogeles de HA-EDA-MA cargados con otra enzima exógena seleccionada del grupo que consiste en prolil-endopeptidasa (PEP), como PEP de *Myxococcus xanthus* (MX), PEP de *Sphingomonas capsulata* (SC) o PEP de *Aspergillus niger* (AN) y endoproteasa (EP), todas ellas empleadas en solitario o en combinación con PEP FM o entre ellas o con otras enzimas.

[0054] En conclusión, los hidrogeles de HA-EDA-MA pueden:

- proteger las enzimas cargadas frente al proceso de criodesecación;
- proteger las enzimas cargadas frente a la alteración durante el almacenamiento de polvos criodesecados, en general en presencia de crioprotectores;
- permitir la liberación de enzimas en fluido gástrico simulado (para las enzimas activas con ácido) y en fluido intestinal simulado (para todas las enzimas) como forma activa y de forma sostenida,

- ser utilizados para preparar formas farmacéuticas orales convencionales, como granulados, cápsulas y comprimidos, con revestimiento entérico o no, para administración oral y liberación de enzimas como forma activa capaz de desintoxicar el péptido de gliadina en pacientes celíacos.

5 **[0055]** La invención quedará mejor ilustrada con los siguientes ejemplos, cuyo objeto es ayudar a comprender la invención, y no ha de interpretarse que limitan específicamente la invención descrita y reivindicada en el presente documento.

10 **Sección experimental**

EJEMPLO 1

Preparación de derivado de HA-EDA-MA por síntesis en un solo recipiente

15 **[0056]** Se disolvió 1 g de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA), preparada por neutralización en solución de ácido hialurónico utilizando solución de hidróxido de tetrabutilamonio, en 90 ml de dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) (peso molecular medio ponderado de ácido hialurónico 260 kDa).

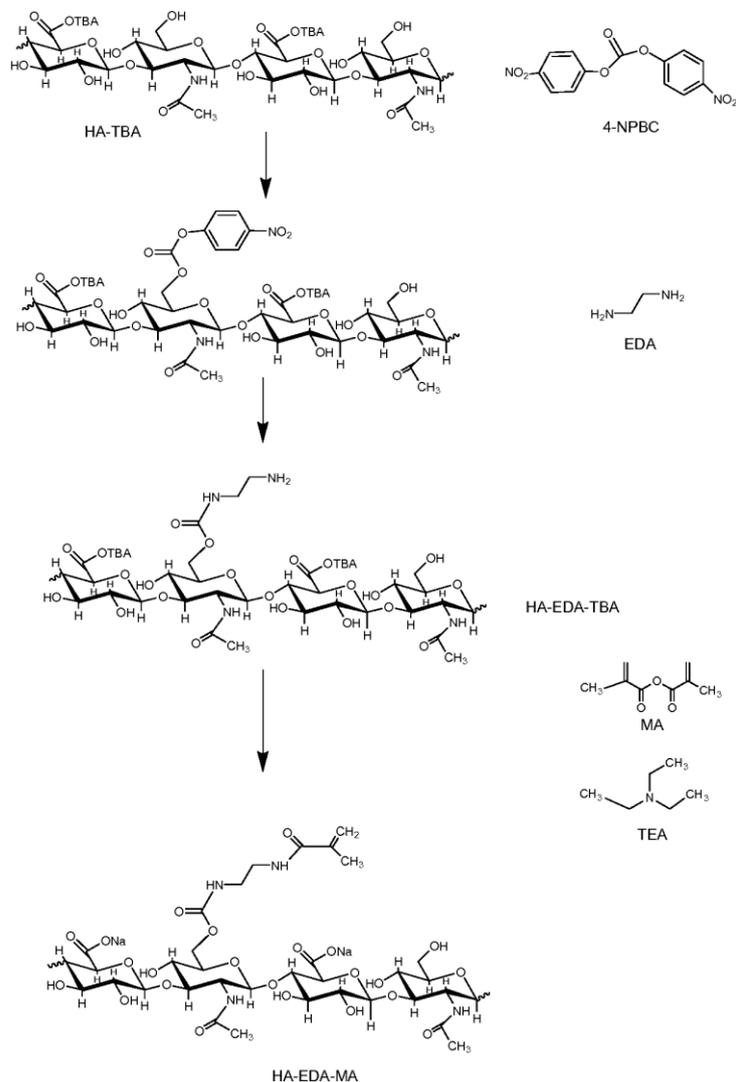
20 **[0057]** Se disolvió la cantidad adecuada de bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC) seleccionada para obtener una relación molar 4-NPBC/unidades repetitivas de HA-TBA equivalente a 0,5, en 10 ml de DMSO anhidro; se añadió esta solución gota a gota a la solución de HA-TBA a 40 °C con agitación. Transcurridas 4 h, se añadieron gota a gota 175 µl de etilendiamina (EDA) y se dejó en reposo la solución a 40 °C durante otras 3 h.

25 **[0058]** Se añadió un volumen apropiado (900 µl) de anhídrido metacrílico (MA) para obtener un exceso molar 8 veces mayor en comparación con los moles de los grupos amino en HA-TBA-EDA, a continuación, se añadieron 105 µl de catalizador de trietilamina (TEA) y se dejó en reposo la solución final durante 24 horas a 40 °C.

30 **[0059]** Se llevó a cabo el tratamiento de la reacción añadiendo primero 10 ml de una solución saturada de NaCl y se continuó mezclando durante 30 minutos con agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se hizo precipitar la solución de reacción en etanol y se lavó el producto varias veces con una solución de etanol/agua bidestilada (9: 1) hasta que se obtuvo un producto sin productos intermedios de reacción y NaCl. El sólido obtenido se denominó derivado de HA-EDA-MA. En el esquema 1 se presenta el procedimiento en un solo recipiente utilizado para preparar el derivado de HA-EDA-MA.

35

Esquema 1: Reacción de funcionalización de sal tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) con etilendiamina (EDA) y anhídrido metacrílico (MA) para obtener derivado de HA-EDA-MA a través de un procedimiento en un solo recipiente



5 **[0060]** Se caracterizó el derivado de HA-EDA-MA por 1H-RMN, (véase Figura 1) que presentó los siguientes picos (D_2O): δ 1,9 (s, $-CO-CH = CH-CH_3$); δ 2,0 (s, $-NH-CO-CH_3$); δ 5,5 y 5,7 (m, $-CO-CH = CH-CH_3$).

10 **[0061]** Se evaluó el grado de funcionalización comparando las áreas de los picos a δ 5,5 y 5,7 atribuibles a los protones de vinilo del grupo metacrílico con el área en δ 1,9 atribuible al grupo metilo de la porción N-acetilglucosamina de las unidades repetitivas HA. El grado de funcionalización en grupos metacrílicos unidos a las unidades repetitivas de HA-EDA tuvo como resultado un 50 % mol/mol, el pico que pertenece a los grupos amino libres de EDA está ausente, es decir, en δ 3,1 (m, $CO-NH-CH_2-CH_2-NH_2$), por lo que todos los grupos amino formaron derivados con anhídrido metacrílico.

15 **EJEMPLO 2**

Fotorreticulación de derivado de HA-EDA-MA

20 **[0062]** Se disolvieron 30 mg del derivado de HA-EDA-MA obtenido siguiendo el Ejemplo 1 en 500 μ l de solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, a temperatura ambiente, para obtener una concentración final equivalente a 6 % p/v y se desgasificó al vacío. A continuación, se colocó la solución en un tubo Pyrex y se irradió empleando un fotorreactor de UV Rayonet a una longitud de onda de 366 nm durante 10 min (véase Figura 2). Transcurrido este tiempo, se recuperó el hidrogel obtenido como gel o se criodesecó para obtener un polvo.

25

EJEMPLO 3*Evaluación de la actividad de PEP FM*

5 **[0063]** Se midió la actividad de PEP derivada de *Flavobacterium meningosepticum* (FM) a través de un ensayo colorimétrico en el que se hizo reaccionar la enzima con su sustrato específico, es decir, carbobenzoxi-Gly-Pro-p-nitroanilida (Z-Gly-Prp-pNA).

10 **[0064]** En particular, se mezclaron 0,25 ml de Z-Gly-Pro-pNA 2 mM en dioxano al 40 % con 1,0 ml de solución de tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2 y se preincubó la solución durante 5 minutos a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió 0,1 ml de enzima en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, y después de la incubación durante 10 minutos a 30 °C, se detuvo la reacción por adición de 2,0 ml de solución Triton-X100 (10 g de Triton-X100/95 ml de tampón de acetato 1M, pH 4,0).

15 **[0065]** Se midió la absorbancia del producto resultante a 380 nm.

[0066] Una unidad de la actividad enzimática se define como la actividad enzimática que produce 1 µmol de p-nitroanilina por minuto a 30°C, pH 7, 2, a partir de Z-Gly-Pro-pNA.

EJEMPLO 4*Estabilidad de PEP FM en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, en función del tiempo*

25 **[0067]** Se prepararon partes alícuotas (1,0 ml) de 0,2 U/ml de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, y se guardaron en un refrigerador a 4 °C hasta 5 días para evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo. Al cabo de 1, 2, 3, 4 y 5 días, se evaluó la actividad de la enzima por ensayo colorimétrico, tal como se notifica en el Ejemplo 3. Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado. Los resultados se presentan en la FIG. 3.

EJEMPLO 5

30 *Criodesecación de PEP FM en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, y evaluación de su actividad*

35 **[0068]** Se criodesecó 1 ml de 0,2 U/ml de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, en ausencia o en presencia de trehalosa (7,5 µg/ml o 15 µg/ml). A continuación, se evaluó la actividad de la enzima por ensayo colorimétrico tal como se describe en el Ejemplo 3. Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado. No se observó actividad en ninguno de los casos.

EJEMPLO 6

40 *Fotoirradiación de PEP FM en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, y evaluación de su actividad*

[0069] Se fotoirradió 1 ml de 0,2 U/ml de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, a una longitud de onda equivalente a 366 nm durante diferentes períodos (de 1 a 20 minutos).

45 **[0070]** Después de cada período de irradiación, se evaluó la actividad de la enzima por ensayo colorimétrico, tal como se describe en el Ejemplo 3.

[0071] Se llevó a cabo también el ensayo de actividad en soluciones de enzimas no irradiadas, utilizadas como control positivo. Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado. En la FIG. 4 se presentan los resultados.

EJEMPLO 7

50 *Criodesecación de PEP FM en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, tras su fotoirradiación y evaluación de su actividad*

55 **[0072]** Se fotoirradió 1 ml de 0,2 U/ml de PEP FM en solución de tampón de fosfato 0,05 M (PBS), pH 7,2, a una longitud de onda equivalente a 366 nm durante 10 minutos.

60 **[0073]** Se criodesecó la solución irradiada y se evaluó la actividad de la enzima por ensayo colorimétrico, tal como se describe en el Ejemplo 3.

[0074] Se realizó el experimento por triplicado y en ninguno de los casos se observó actividad.

EJEMPLO 8

Criodesecación de PEP FM en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, tras su fotoirradiación en presencia de trehalosa y evaluación de su actividad

5 **[0075]** Se mezclaron 200 µl de 0,2 U/ml de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, con 800 µl de trehalosa 15 µg/ml en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. Se fotoirradió esta solución a una longitud de onda equivalente a 366 nm durante 10 minutos. Se criodesecó la solución irradiada y se evaluó la actividad de la enzima por ensayo colorimétrico tal como se describe en el Ejemplo 3.

10 **[0076]** Se realizó el experimento por triplicado y no se observó actividad en ninguno de los casos.

EJEMPLO 9

15 *Preparación de gel de HA-EDA-MA cargado con PEP FM*

[0077] Se disolvieron 30 mg de derivado de HA-EDA-MA en 400 µl de solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. Se desgasificó la solución al vacío y a continuación se añadieron 100 µl de 0,4 U/mg de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. En este caso, la concentración final del polímero fue equivalente a 6 % p/v. Se fotoirradió la solución a una longitud de onda igual a 366 nm durante 10 minutos.

[0078] Se analizó el gel de HA-EDA-MA obtenido cargado con PEP FM inmediatamente después de su preparación o tras su almacenamiento a 4°C durante 10 días.

25 **[0079]** Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado.

EJEMPLO 10

30 *Preparación de hidrogel de HA-EDA-MA como polvo criodesecado cargado con PEP FM*

[0080] Se preparó hidrogel de HA-EDA-MA cargado con PEP FM a 0,4 U/mg de polímero, tal como se describe en el Ejemplo 9.

35 **[0081]** Después de la fotoirradiación, se criodesecó el hidrogel obtenido, a continuación, se analizó inmediatamente después de su preparación o tras su almacenamiento durante 10 días a 4°C o -20°C.

[0082] Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado.

EJEMPLO 11

40 *Preparación de hidrogel de HA-EDA-MA como polvo criodesecado cargado con PEP FM en presencia de 1,5 % p/p de trehalosa*

45 **[0083]** Se disolvieron 30 mg de derivado de HA-EDA-MA en una mezcla de 350 µl de solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, y 100 µl de trehalosa 4,5 mg/ml en solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. Se desgasificó la solución al vacío y luego se añadieron 50 µl de 0,4 U/mg de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. Se fotoirradió la solución a una longitud de onda equivalente a 366 nm durante 10 minutos.

50 **[0084]** Después de la fotoirradiación, se criodesecó el hidrogel obtenido, a continuación, se analizó inmediatamente después de su preparación o tras su almacenamiento durante 10 días a 4°C o -20°C.

[0085] Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado.

EJEMPLO 12

55 *Preparación de hidrogel de HA-EDA-MA como polvo criodesecado cargado con PEP FM en presencia de 3 % p/p de trehalosa*

60 **[0086]** Se disolvieron 30 mg de derivado de HA-EDA-MA en una mezcla de 350 µl de solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2, y 100 µl de trehalosa 9 mg/ml en solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. Se desgasificó la solución al vacío y a continuación se añadieron 50 µl de 0,4 U/mg de PEP FM en una solución de tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,2. Se fotoirradió la solución a una longitud de onda equivalente a 366 nm durante 10 minutos.

65 **[0087]** Después de la fotoirradiación, se criodesecó el hidrogel obtenido, a continuación, se analizó inmediatamente después de su preparación o tras su almacenamiento durante 10 días, 1 o 2 meses a 4°C o -20°C. Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado.

EJEMPLO 13

[0088] *Estudios de liberación en fluido intestinal simulado, pH 7,2, a partir de la muestra del Ejemplo 9*

5 **[0089]** Se colocaron partes alícuotas (15 mg) de gel de HA-EDA-MA cargado con PEP FM en viales que contenían 10 ml de fluido intestinal simulado, pH 7,2, durante 24 h (100 rpm, 37 °C). A intervalos de tiempo predeterminados, se extrajeron 0,15 ml de medio de liberación y se analizaron por ensayo para determinar la actividad enzimática, tal como se describe en el Ejemplo 3. Se añadió un volumen igual de medio fresco y se mantuvieron las *condiciones de sedimentación* durante todo el experimento. Se determinó la cantidad de la enzima usando una curva de calibración
10 ($y = 1,5836 x + 0,0537$, $r^2 = 0,9981$).

[0090] Se llevó a cabo cada uno de los experimentos por triplicado.

15 **[0091]** Se determinó la cantidad de enzima que permaneció en el gel de HA-EDA-MA al cabo de 24 h por ensayo para determinar la actividad enzimática pero, en este caso, se colocó el sustrato Z-Gly-Pro-pNA directamente en contacto con el gel.

20 **[0092]** En particular, se añadieron 15 mg del gel utilizado para los estudios de liberación con 0,5 ml de fluido intestinal simulado, pH 7,2, y 4,0 ml de solución de tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2, a continuación se incubó la muestra a 100 rpm, 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se mezclaron 1,25 ml de Z-Gly-Pro-pNA 2 mM en dioxano al 40% con 1,0 ml de solución de tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2, y se preincubó la solución resultante durante 5 minutos a 30 °C, a continuación, se añadió al gel y tras la incubación durante 10 minutos a 30 °C, se detuvo la reacción por adición de 20 ml de solución de Triton-X100 (10 g de Triton-X100/95 ml de tampón de acetato 1M, pH 4,0) .
25

[0093] La absorbancia del producto resultante se midió a 380 nm.

30 **[0094]** Se realizó cada uno de los experimentos por triplicado. En la FIG. 5, se presentan los resultados de los experimentos de liberación.

EJEMPLO 14

Estudios de liberación en fluido intestinal simulado, pH 7,2, a partir de la muestra del Ejemplo 10

35 **[0095]** Se realizaron estudios de liberación de PEP FM a partir de hidrogel de HA-EDA-MA como polvo criodesecado cargado con PEP FM en ausencia de crioprotector (Ejemplo 10) tal como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados de los experimentos de liberación se presentan en la FIG. 6.

EJEMPLO 15

40 *Estudios de liberación en fluido intestinal simulado, pH 7,2, a partir de la muestra del Ejemplo 11*

45 **[0096]** Se realizaron estudios de liberación de PEP FM a partir de hidrogel de HA-EDA-MA como polvo criodesecado cargado con PEP FM en presencia de trehalosa (1,5 % p/p) (Ejemplo 11) tal como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados de los experimentos de liberación se presentan en la FIG. 7.

EJEMPLO 16

50 *Estudios de liberación en solución de tampón de fosfato, pH 7,2, a partir de la muestra del Ejemplo 12*

[0097] Se realizaron estudios de liberación de PEP FM a partir de hidrogel de HA-EDA-MA como polvo criodesecado cargado con PEP FM en presencia de trehalosa (3 % p/p) (Ejemplo 12) tal como se describe en el Ejemplo 13. Los resultados de los experimentos de liberación se presentan en las Figs. 8, 9 y 10.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos una enzima exógena, seleccionándose dicha enzima del grupo que consiste en prolil endopeptidasa (PEP), endoproteasa (EP) y combinaciones de las mismas, estando atrapada dicha enzima en un hidrogel de derivados de ácido hialurónico metacrílicos (HA-EDA-MA) fotorreticulados, en el que los derivados de ácido hialurónico comprenden ácido hialurónico (HA), o una sal del mismo, de un peso molecular comprendido entre 50.000 y 1.500.000 Daltons, en el que al menos un grupo hidroxilo, tras la activación con un agente de carbonatación seleccionado entre fenilésteres carbónicos o fenilésteres halofórmicos, ha sido funcionalizado por reacción con etilendiamina (EDA) y posterior reacción con anhídrido metacrílico (MA).
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha enzima queda atrapada en el hidrogel en una concentración comprendida entre 1 mU/mg y 100 U/mg del polímero.
- 15 3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, adoptando dicha composición la forma de gel.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, adoptando dicha composición la forma de polvo criodesecado.
- 20 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además al menos un crioprotector en una concentración comprendida entre 0,1 y 10 % p/p en relación con el peso del polímero; dicho crioprotector es preferentemente trehalosa.
- 25 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la que dicha enzima, cuando es una PEP se deriva de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Flavobacterium meningosepticum* (FM), *Myxococcus xanthus* (MX), *Sphingomonas capsulata* (SC) o *Aspergillus niger* (AN) o combinaciones de los mismos, cuando es una EP es una endoproteasa de cebada.
- 30 7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en el tratamiento de enfermedad celíaca.
- 35 8. Una formulación farmacéutica para su administración oral, comprendiendo dicha formulación una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40 9. Un proceso para preparar una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo dicho proceso la fotorreticulación de derivados de HA-EDA-MA por fotoirradiación a una longitud de onda dentro del intervalo de 180-800 nm, en una solución acuosa a una concentración comprendida entre 1 % p/v y 20 % p/v, en el que dicha fotorreticulación se realiza en presencia de al menos una enzima exógena, en una concentración comprendida entre 1 mU/mg y 100 U/mg del polímero; o en el que dicha fotorreticulación se lleva a cabo en ausencia de la enzima exógena que se carga después poniendo en contacto los hidrogeles obtenidos con una solución de la enzima exógena en una concentración comprendida entre 1 mU/mg y 100 U/mg del polímero; en el que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en prolil endopeptidasa (PEP), endoproteasa (EP) y combinaciones de las mismas; en el que los derivados de HA-EDA-MA comprenden ácido hialurónico (HA) o una sal del mismo, de peso molecular comprendido entre 50.000 y 1.500.000 Daltons, en el que se ha funcionalizado al menos un grupo hidroxilo por reacción con etilenediamina (EDA) y la posterior reacción con anhídrido metacrílico (MA).
- 45 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la preparación de derivados de HA-EDA-MA de acuerdo con las siguientes etapas:
- 50 (a) contacto de una sal de ácido hialurónico (HA) en un disolvente aprótico polar con un agente de carbonatación seleccionado entre fenilésteres carbónicos o fenilésteres halofórmicos para obtener la activación de al menos un grupo hidroxilo de HA, en el que dicho HA se encuentra en forma de una sal soluble en dicho disolvente orgánico polar aprótico;
- 55 (b) contacto de la sal de HA activada obtenida de la etapa (a) con etilendiamina (NH₂-CH₂-CH₂-NH₂, indicado como EDA), para obtener, por sustitución nucleófila, HA-EDA;
- (c) contacto de HA-EDA obtenida de la etapa (b) con anhídrido metacrílico (indicado como MA), para obtener por sustitución nucleófila, HA-EDA-MA.
- 60 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que las etapas para preparar los derivados de HA-EDA-MA se llevan a cabo todas ellas posteriormente en el mismo recipiente.

FIG. 1

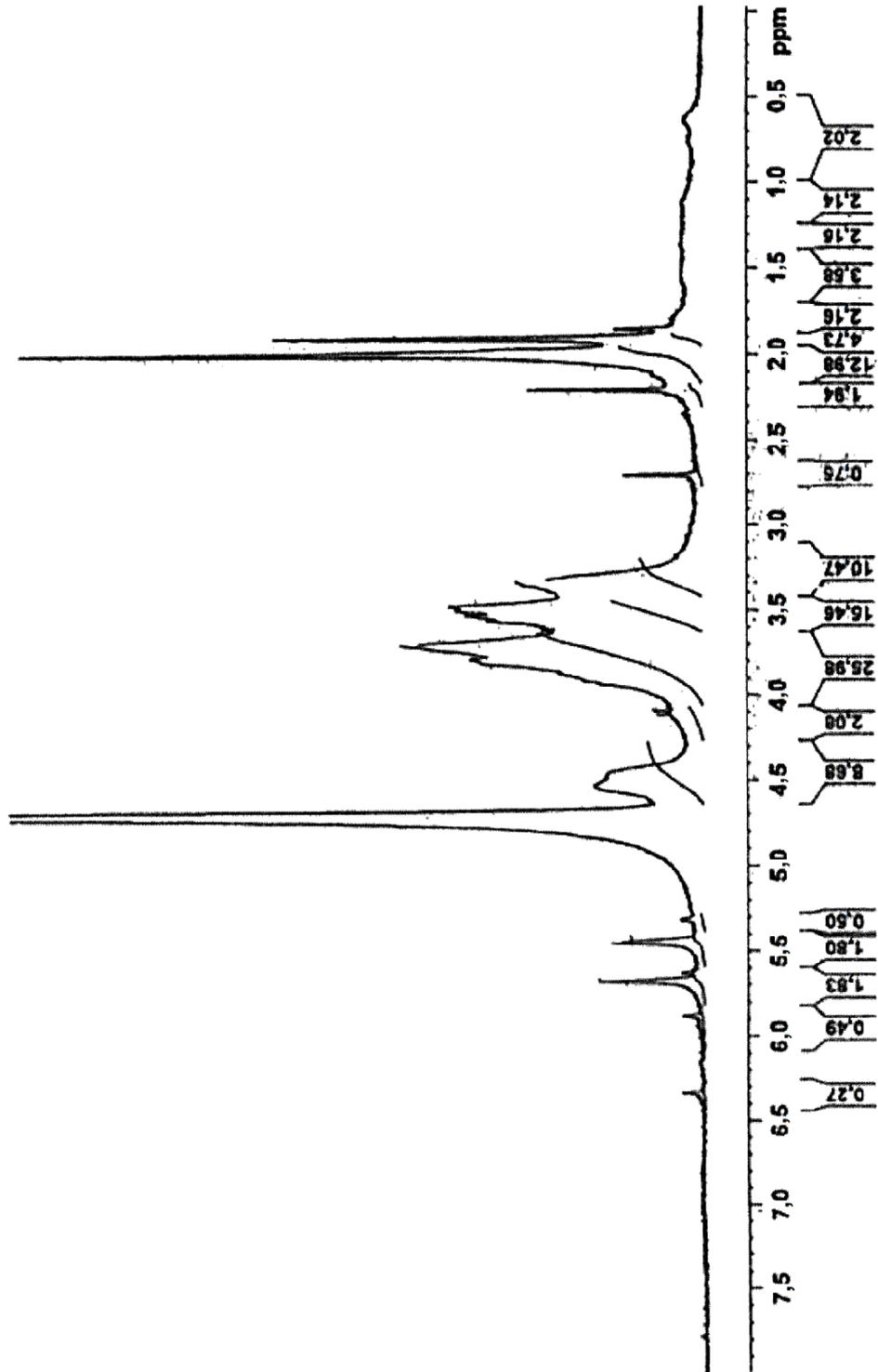


FIG. 2

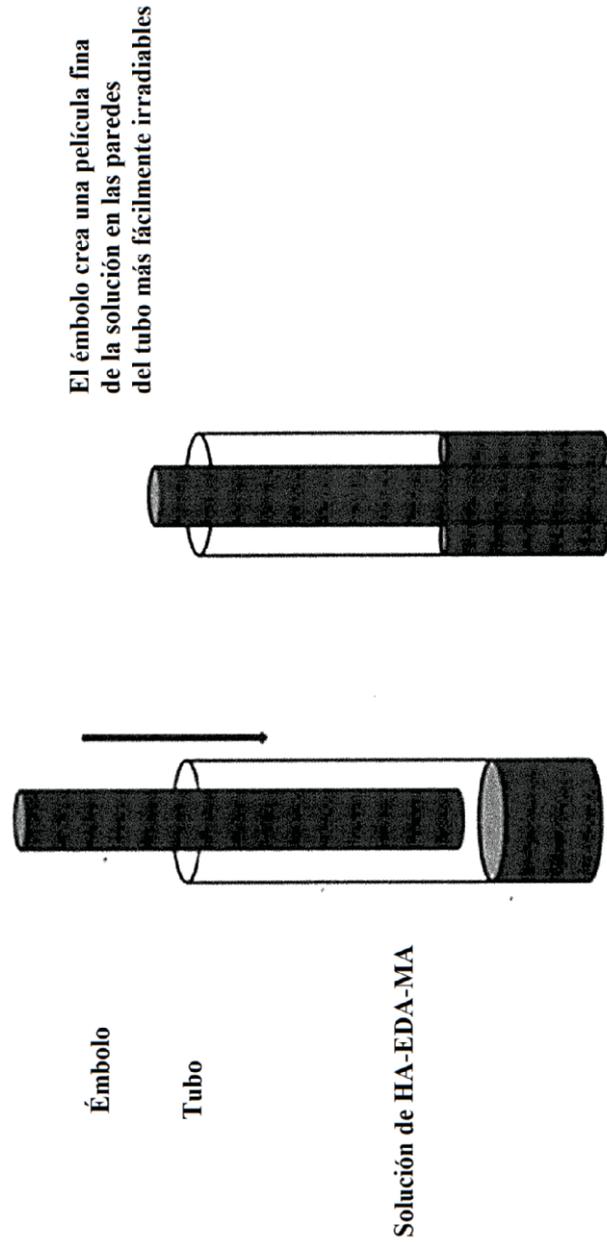


FIG. 3

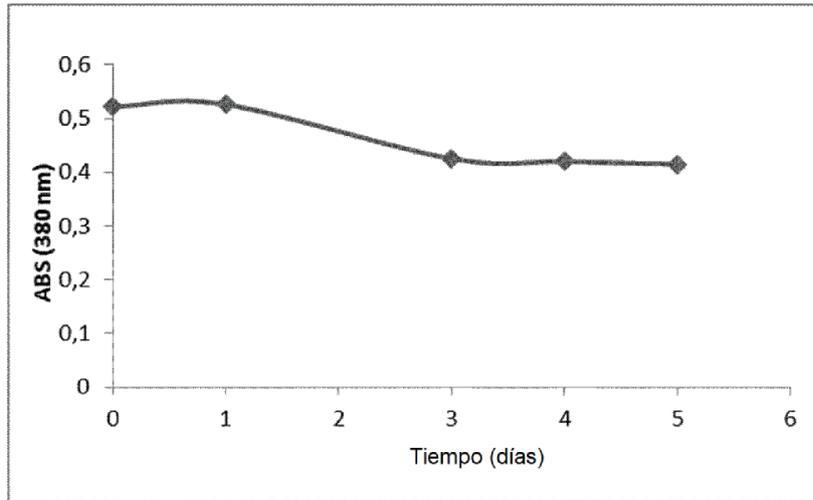


FIG. 4

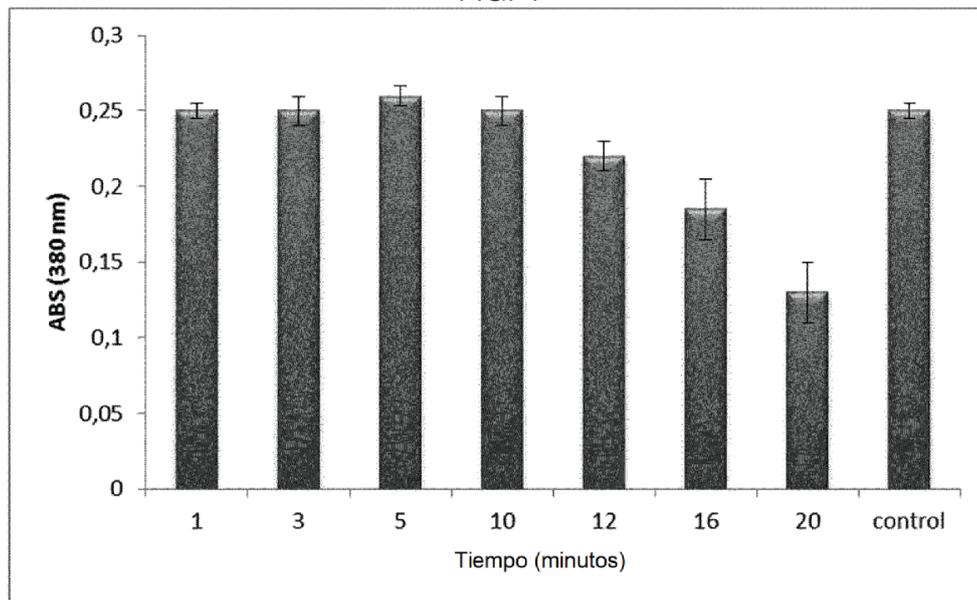


FIG. 5

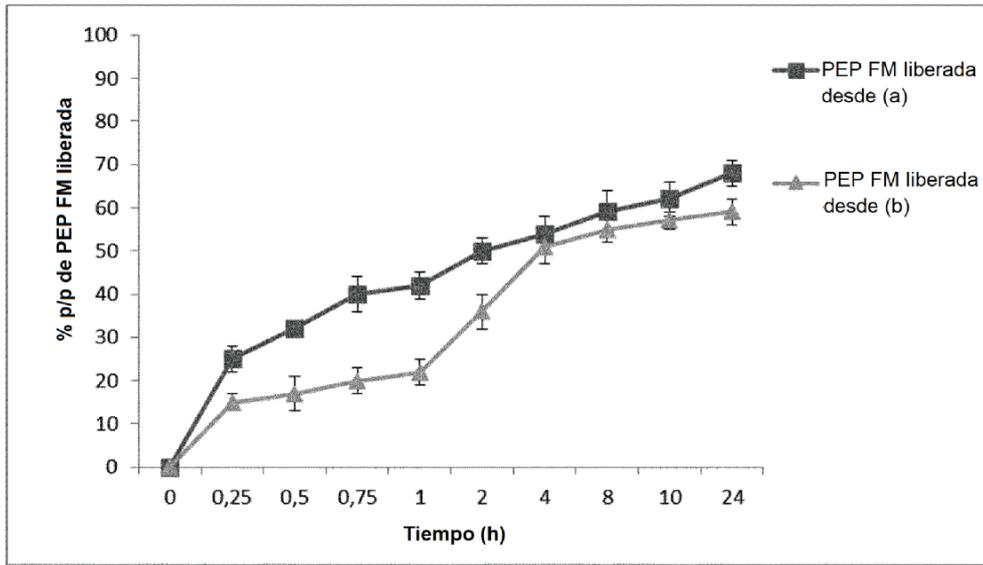


FIG. 6

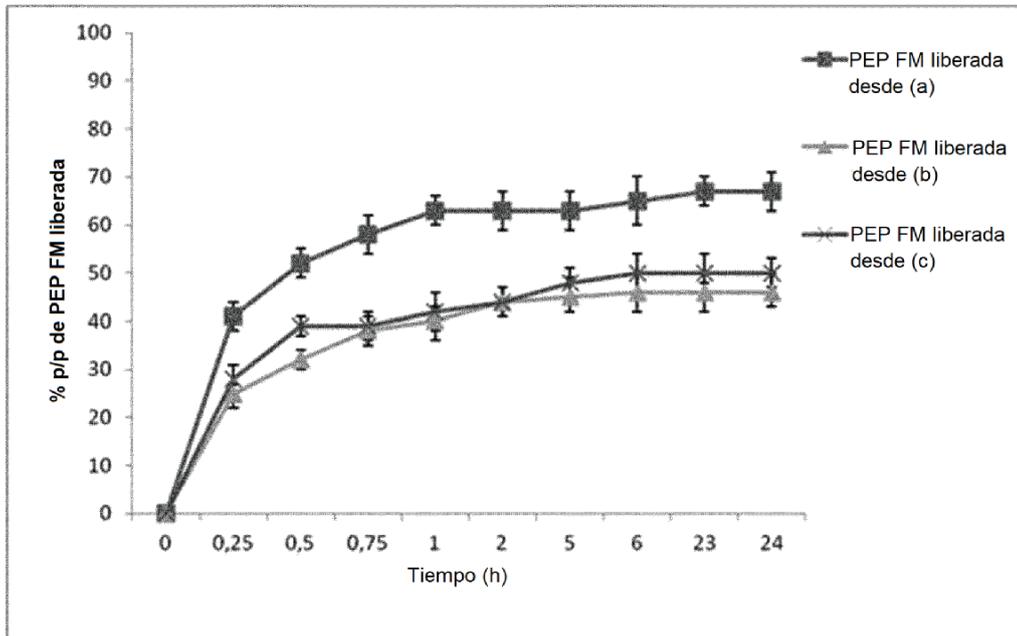


FIG. 7

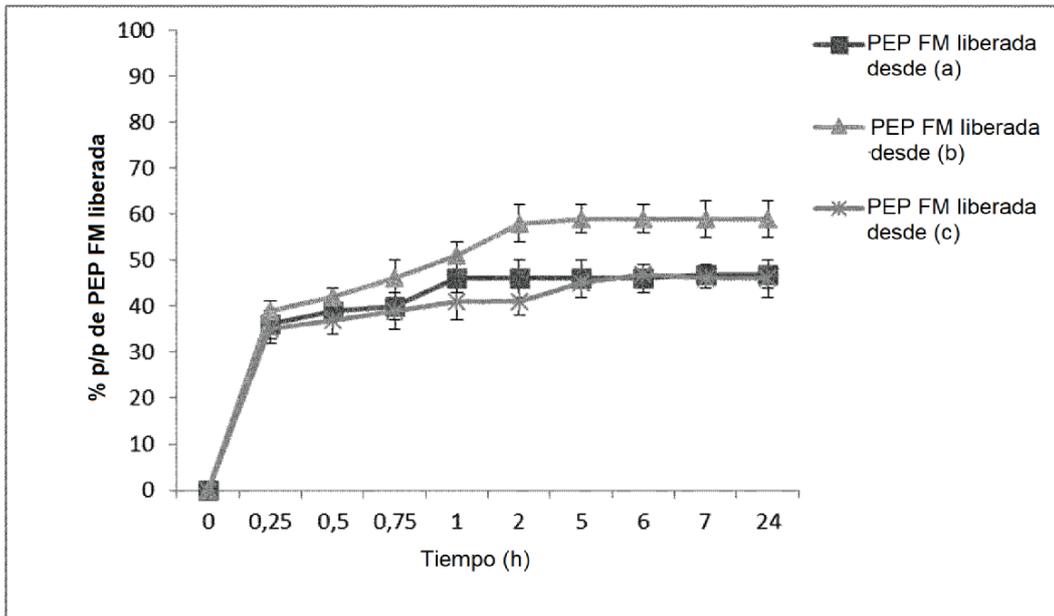


FIG. 8

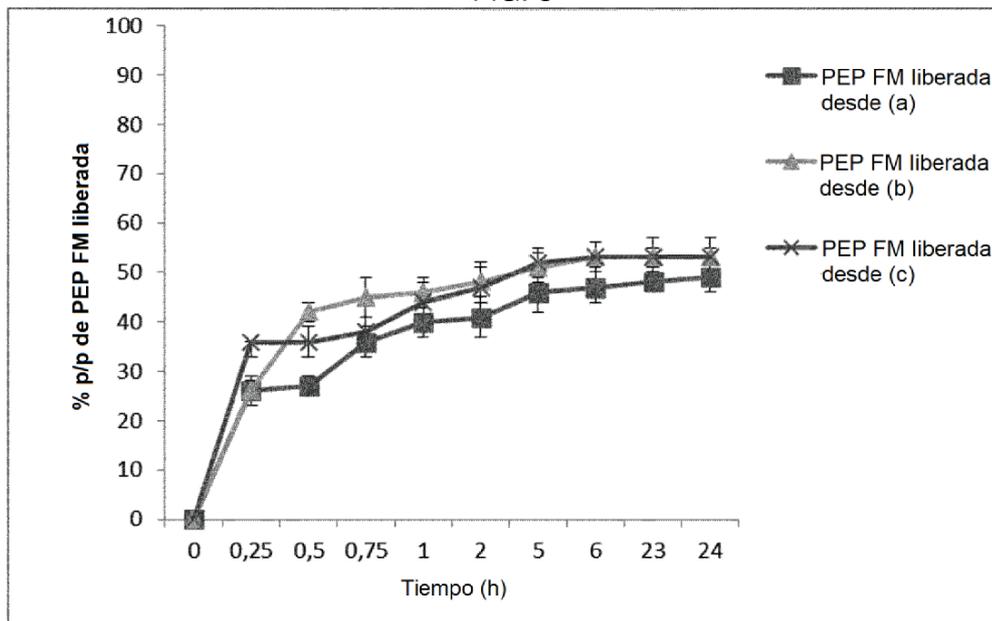


FIG. 9

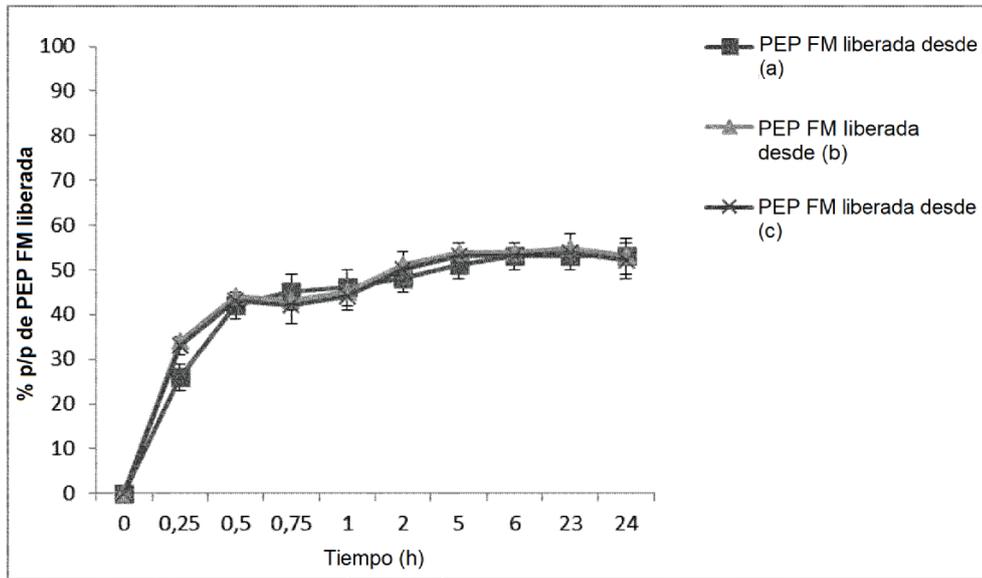


FIG. 10

