

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 548**

21 Número de solicitud: 201731218

51 Int. Cl.:

C08L 5/08 (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01)
C08K 3/011 (2008.01)
C08K 3/28 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.04.2019

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA FERNÁNDEZ, Luis;
VÁZQUEZ LASA, Blanca;
SAN ROMÁN DEL BARRIO, Julio;
TORRENT GIBERT, Ana María y
MONTELL BONAVENTURA, Eulalia**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **HIDROGEL BIOCOMPATIBLE, PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y USO DEL MISMO**

57 Resumen:

Hidrogel biocompatible, procedimiento de preparación y uso del mismo.

La presente invención se refiere a un hidrogel biocompatible para la regeneración del tejido cartilaginoso y óseo. El hidrogel está formado por el entrecruzamiento de ácido hialurónico y quitosano mediante un diisocianato. La presente invención también se refiere al procedimiento de preparación y uso del mismo.

ES 2 709 548 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrogel biocompatible, procedimiento de preparación y uso del mismo

5 La presente invención se refiere a un hidrogel biocompatible para la regeneración del tejido cartilaginoso y óseo. También se refiere al procedimiento de preparación y uso del mismo. Por tanto, la presente invención se encuadra en el sector biomédico y farmacéutico, más concretamente, en el campo de la regeneración de tejidos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad, las lesiones óseas y cartilaginosas siguen siendo un reto en el campo biomédico. Las patologías del cartílago articular suponen la pérdida de la estructura y de la función del tejido y son una de las principales causas de discapacidad en personas mayores. El tratamiento estándar para la regeneración de lesiones óseas
15 consiste en un injerto de hueso autólogo del propio paciente. Aunque la posibilidad de rechazo es mínima, este método presenta ciertas limitaciones como la cantidad de tejido donante o la morbilidad de la zona del mismo. Para solventar estos inconvenientes existen otras alternativas como son los biomateriales. Un biomaterial se define como una sustancia farmacológicamente inerte, de origen natural o sintético,
20 diseñada para ser implantada o incorporada dentro del sistema vivo para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. El tipo de biomateriales empleados con fines de regenerativos en el campo de la biomedicina ha experimentado una evolución notable a medida que ha aumentado el conocimiento sobre las interacciones de los mismos con el cuerpo humano.

25 Entre los biomateriales desarrollados se encuentran los soportes multicapa de colágeno y glicosaminoglicanos, que son soportes preparados mediante la superposición de capas de colágeno y glicosaminoglicanos inspirados en la estructura del tejido osteocondral. El problema de estos sistemas es la pobre integración entre
30 capas y la falta de permeabilidad a nutrientes debido a su baja porosidad. Recientemente se están desarrollando nuevos soportes basados en hidrogeles, que son estructuras tridimensionales formadas por polímeros reticulados, capaces de absorber gran cantidad de agua y de proporcionar un microambiente acuoso muy similar al de la matriz extracelular. Son porosos, por lo que permiten el paso de
35 nutrientes y de productos de desecho, necesarios para la supervivencia celular. Además tienen que ser biodegradables para poder ser sustituidos por la matriz

extracelular una vez se haya regenerado el tejido. El ácido hialurónico es uno de los compuestos utilizados en la fabricación de hidrogeles por ser éste un compuesto (glicosaminoglicano) muy abundante en la matriz extracelular del cartílago que presenta unas funciones biológicas interesantes, ya que es un material esencial para la hidratación de tejidos, organización de estructuras de proteoglicanos y diferenciación de células.

Algunos ejemplos de materiales biocompatibles se encuentran divulgados en el documento CN100384923C, que describe un método para la preparación de un material de ácido hialurónico-quitosano entrecruzado con una carbodiimida para aplicaciones bioquímicas. El documento US6703444B2 se refiere a un proceso para la producción de derivados de ácido hialurónico reticulado y biopolímeros y sus usos en aplicaciones cosméticas, médicas y farmacéuticas. La publicación de Clara R. Correia *et al.: Tissue Engineering: Part C*, Vol. 17, No. 7, 2011, hace referencia a biomateriales compuestos de quitosano y el ácido hialurónico como materiales muy prometedores en aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

A pesar de conocerse composiciones de biomateriales y, en particular, hidrogeles en base a ácido hialurónico, éstas presentan inconvenientes ya que los métodos utilizados hasta el momento para la formación del gel incluyen componentes de alta toxicidad (carbodiimidias, dextranos oxidados,...) o la formación de hidrogeles poco estables donde el ácido hialurónico se encuentra formando parte de una red semi-interpenetrada por lo que se va perdiendo con el tiempo.

La presente invención se refiere a una nueva composición en forma de hidrogel biocompatible mediante su entrecruzamiento con diisocianatos que presenta ventajas o mejoras frente a los ya conocidos como es la ausencia de toxicidad o un grado de hinchamiento adecuado, que sin llegar a deformar el gel, absorbe una cantidad mucho mayor de líquido en comparación con otros sistemas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a hidrogel biocompatible caracterizado por comprender ácido hialurónico y quitosano entrecruzados con al menos un agente de entrecruzamiento, donde dicho agente de entrecruzamiento es un

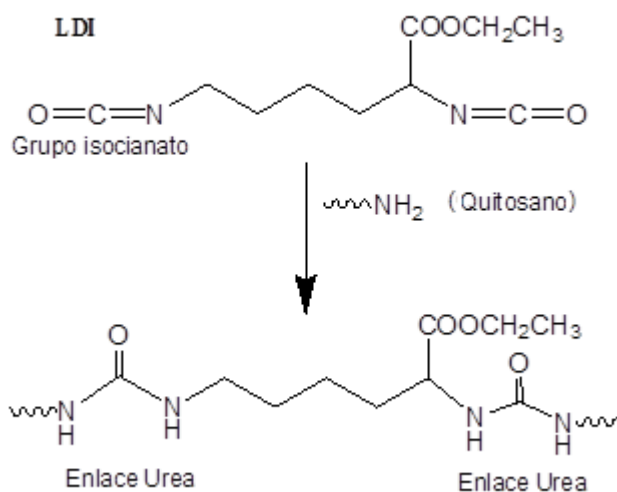
diisocianato.

En una realización preferida, el diisocianato es seleccionado de la lista que comprende hexametilén diisocianato, tetraetilen diisocianato y diisocianato de lisina; más
5 preferiblemente el diisocianato es diisocianato de lisina.

Este tipo de agente de entrecruzamiento no ha sido utilizado hasta el momento y proporciona estabilidad al sistema frente a otro tipo de enlaces hidrolizables.

10 Así, los diisocianatos (en este caso di-isocianato de Lisina), puede reaccionar de dos formas distintas:

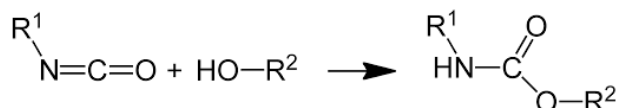
- Di-isocianato de lisina (LDI), que al reaccionar con los grupos amina del quitosano formará grupos urea, más estables que los grupos imina frente a la
15 hidrólisis.



- Sin embargo, también se da la posibilidad de que el ácido hialurónico reaccione con LDI a través de sus grupos OH libres del residuo de N-acetil glucosamina, formando grupos uretano. En este caso, se formaría una red interpenetrada, más estable que la red semi-interpenetrada. En la red semi-interpenetrada las cadenas de ácido hialurónico quedan entrecruzadas entre las del quitosano de
20 forma física, es decir, sin formas enlaces químicos, por lo que su estabilidad es
25

baja, sin embargo en las redes interpenetradas se dan uniones químicas entre todas las cadenas, lo cual aporta estabilidad al sistema.

5



10 Por lo tanto, la mayor parte del LDI queda integrado en el gel.

En una realización preferida, la relación molar entre el agente de entrecruzamiento y los grupos $-\text{NH}_2$ en el hidrogel está entre 3:1 y 7:1, más preferiblemente es 5:1.

15 En una realización preferida, la relación en peso entre el quitosano y el ácido hialurónico en el hidrogel está entre 1:0,5 y 1:1; más preferiblemente es 1:1.

En otra realización preferida, el gel comprende además sulfato de condroitina. Preferiblemente, la relación en peso entre el ácido hialurónico y sulfato de condroitina en el hidrogel es de entre 1:0,05 y 1:0,5; más preferiblemente de 1:0,2.

20

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de preparación de la composición descrita en el primer aspecto de la invención.

25 El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) disolución de ácido hialurónico en una solución acuosa de un copolímero de polietilen-propilenglicol al 0,5-1,5% en peso y ácido acético, donde la proporción en volumen entre la solución acuosa del copolímero de polietilen-propilenglicol y el ácido acético está entre 1000:10 y 1000:1, y donde
- 30 la concentración de ácido hialurónico en la disolución es de entre 10 y 30 mg/mL, más preferiblemente de 20 mg/mL de disolución,
- b) adición de quitosano a la disolución anterior,
- c) adición de un diisocianato a la solución obtenida en la etapa b) seguida de agitación para obtener una dispersión,
- 35 d) mantenimiento de la dispersión obtenida en la etapa c) a temperatura de entre 20 y 65°C durante al menos 3 horas para permitir el entrecruzamiento, formándose así el hidrogel.

En una realización preferida, la disolución de la etapa a) se prepara a una temperatura

entre 20 y 65°C, más preferiblemente de 37°C.

En una realización preferida, el copolímero de polietilen-propilenglicol mencionado en la etapa a), que es un agente estabilizante de las burbujas que se forman, es
5 Pluronic® F127.

En una realización preferida, el copolímero de polietilen-propilenglicol, está al 1% en la solución acuosa.

10 En una realización preferida, en la etapa a), la proporción en volumen entre la solución acuosa del copolímero de polietilen-propilenglicol y el ácido acético está entre 1000:10 y 1000:1

En una realización preferida, la cantidad de quitosano añadida en la etapa b) es tal
15 que la proporción en peso entre el quitosano y el ácido hialurónico está entre 1:0,5 y 1:1; más preferiblemente es 1:1.

Preferiblemente, la disolución formada en la etapa b) se mantiene bajo agitación durante al menos 2 horas previamente a la adición del diisocianato.

20 En una realización preferida, en la etapa b) se añaden unas gotas de HCl hasta la completa disolución de quitosano, preferiblemente HCl 1N. Preferiblemente, se añade un 12,5% (v/v) de HCl 1N a la disolución, de manera que se consigue una disolución completa del quitosano.

25 Preferiblemente, en la etapa b) se llevó a cabo a una temperatura entre 20 y 65°C, más preferiblemente de 37°C.

En una realización preferida de la invención, en la etapa b) se añade, además del
30 quitosano, sulfato de condroitina. Preferiblemente, la cantidad de sulfato de condroitina añadida en la etapa b) es tal que la proporción en peso entre el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina está entre 1: 0,05 y 1:0,5, más preferiblemente, es 1:0,2.

En otra realización preferida, en la etapa c) la cantidad de diisocianato añadida es tal
35 que la relación molar entre el diisocianato y los grupos -NH₂ del quitosano está entre 3:1 y 7:1, más preferiblemente es 5:1.

Preferiblemente, la agitación que se lleva a cabo en la etapa c) se realiza mediante un dispositivo homogeneizador de alta potencia (como UltraTurrax®) a 10000-20000 rpm, más preferiblemente a 15000 rpm. La agitación mediante un dispositivo de alta potencia se realiza preferiblemente entre 0,5 y 2 min, más preferiblemente durante 1 min.

En una realización preferida, el diisocianato es seleccionado de la lista que comprende hexameten diisocianato, tetraeten diisocianato y diisocianato de lisina; más preferiblemente el diisocianato es diisocianato de lisina.

Preferiblemente, la etapa d) se lleva a cabo a 37°C.

En una realización preferida de la invención, el hidrogel obtenido en la etapa d) se lava con agua destilada y se seca por liofilización, de manera que se obtiene una membrana porosa seca.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del hidrogel para la fabricación de un dispositivo de uso médico. En una realización preferida el dispositivo de uso médico es para la regeneración del tejido óseo o cartilaginoso, tal como una membrana porosa o un apósito.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Muestra imágenes de microscopía óptica de membranas preparadas según la presente invención con diferente tipo de agitación: A) agitación magnética; B) agitación mediante UltraTurrax® y C) agitación mediante UltraTurrax® a mayor aumento.

35

FIG. 2: Muestra imágenes de microscopía óptica de membranas preparadas según la

presente invención con diferentes proporciones LDI/ NH_2 (mol/mol): A) 3:1; B) 5:1 y C) 7:1.

FIG. 3: Gráfica que muestra el hinchamiento en función del tiempo de membranas entrecruzadas con LDI (LDI/ NH_2 5:1) con relaciones quitosano (Q):ácido hialurónico(HA) 1:1 y 1:0,75 respectivamente y membranas entrecruzadas con dextranos con relaciones Q:HA 1:1 y 1:0,75 respectivamente.

FIG 4: Gráfica que muestra la citotoxicidad de las membranas con el tiempo A) membranas entrecruzadas con dextranos; B) membranas entrecruzadas con LDI según la presente invención.

FIG 5: Gráfica que muestra la pérdida en peso de las membranas de la presente invención con y sin sulfato de condroitina (SC) en función del tiempo.

FIG 6: A) muestra gráfico de HPLC del ácido hialurónico (HA) y del sulfato de condroitina (SC); B) muestra gráfico de HPLC de los productos de degradación de los geles con el tiempo.

FIG 7: Gráficas que muestran la carga máxima necesaria para la separación del hidrogel y del hueso en cuatro situaciones diferentes: hueso en contacto con el hidrogel hidratado, hueso en contacto con el hidrogel hidratado y añadiendo pegamento de fibrina, hueso perforado en contacto con el hidrogel hidratado y pegamento de fibrina y hueso perforado en contacto con el hidrogel hidratado y sangre humana: A) para el hidrogel preparado con SC (Q:HA: SC 1:1:0,2 en peso); B) para el hidrogel preparado sin SC (Q:HA 1:1 en peso).

FIG 8: Gráfica que muestra la fluorescencia obtenida en el ensayo *alamar blue* de adhesión celular a diferentes tiempos para las membranas preparadas según el procedimiento de la invención: Q:HA:SC 1:1:0,2 en peso y Q:HA 1:1 en peso.

FIG. 9: Gráfica que muestra las propiedades reológicas de las muestras para las membranas preparadas según el procedimiento de la invención: Q:HA:SC 1:1:0,2 en peso y Q:HA 1:1 en peso.

FIG. 10: Fotografía que muestra el hinchamiento de las membranas porosas de Q/HA con LDI para distintas relaciones en peso HA:Q :A) 1:1; B) 1:0.75 y C) 1:0.5.

5 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

10 Ejemplo 1: Preparación de membranas porosas

Para la preparación de membranas porosas se ha utilizado la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano (Q) y ácido hialurónico (HA) utilizando diisocianato de lisina (LDI) como agente de entrecruzamiento.

15

Para ello, se disolvió la correspondiente cantidad de ácido hialurónico a 37°C en 4 mL una disolución acuosa de Pluronic® F127 al 1% en peso y ácido acético (4µL). Después de la disolución completa del ácido hialurónico, se añadió quitosano y, opcionalmente, sulfato de condroitina. Con el fin de ayudar a la completa solubilidad del componente, se agregaron unas gotas (0,5 mL aprox) de ácido clorhídrico (1N). Esta solución se dejó bajo agitación lenta para evitar la formación de burbujas y a 37° C durante al menos de 2 horas. La solución obtenida se trasladó a un pequeño vaso de precipitados y se añadió LDI, inmediatamente la solución fue dispersada con un UltraTurrax® a 15000 rpm por 1 minuto o bien con agitación magnética durante 1 min.

20

La dispersión final fue trasladada a molde de Teflon con la geometría deseada y agitada suavemente para eliminar las burbujas grandes. Se dejó que el gel reticulara a 37°C en una cámara cerrada al menos durante 3 horas. Después de este tiempo, el gel se lavó con agua destilada y se secó por liofilización, obteniendo así una membrana porosa seca.

25

30

En la Tabla 1 se muestran los experimentos realizados variando la concentración de quitosano (Q) y el modo de agitación una vez añadido el LDI con relación en peso HA:Q es 1:1.

35

Tabla 1. Condiciones utilizadas en la preparación de membranas porosas de Q/HA con LDI variando agitación y concentración de quitosano; relación en peso HA:Q es

1:1:

Medio de reacción	mg/mL Q. en la mezcla de reacción	Agitación	V (mL)	Relación LDI/NH ₂ (mol/mol)	Observaciones de la membrana en seco
Agua + 1% Pluronic F127 (4mL)	10	Magnetica	3	5:1	Membrana frágil y grandes poros
	20	Magnetica	3	5:1	Membrana frágil, pequeños poros dispersos
	30	Magnetica	3	5:1	Membrana gruesa con poros pequeños y dispersos
	20	UltraTurrax (UT)	3	5:1	Membrana con poro fino y homogéneo

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 20 mg/mL de quitosano, tanto con agitación magnética como con el UltraTurrax®.

5

En la figura 1A se observa la membrana preparada mediante agitación magnética, los poros tienen una gran dispersión de tamaños (entre 10 y 300 micras de diámetro) y parecen no estar conectados entre ellos. La segunda imagen (B) muestra la membrana preparada median agitación con el UltraTurrax®, el tamaño de poro es mucho más homogéneo (entre 50 y 130 micras). Además, en este caso, como se observa en la tercera imagen (C), hay evidencia de interconexión entre poros.

Tabla 2. Condiciones utilizadas en la preparación de membranas porosas de Q/HA con LDI variando relación molar LDI/-NH₂ para una misma concentración de quitosano (Q) en la mezcla de reacción y agitación mediante UltraTurrax® (UT); relación en peso HA:Q es 1:1.

Medio de reacción	mg/mL Q. en la mezcla de reacción	Agitación	V (mL)	Relación LDI/NH ₂ (mol/mol)	Observaciones de la membrana en seco
Agua + 1% Pluronic F127 (4 mL)	20	UT	4	3:1	Membrana ligeramente flexible, pocos poros y dispersos (A)
	20	UT	4	5:1	Membrana ligeramente frágil, poro pequeño y homogéneo (B)
	20	UT	4	7:1	Membrana muy frágil con el poro más fino (C)

20

Las membranas A y B se pudieron cortar sin problema con una troqueladora de 1,2 cm de diámetro. Estos discos se sumergieron en tampón fosfato durante una hora comprobándose como la composición con un menor grado de entrecruzamiento (A)

ofrecía un mayor hinchamiento de la membrana. Aunque la composición con menor grado de entrecruzamiento (A) ofrece un mejor comportamiento de hinchamiento, la composición con un grado de entrecruzamiento mayor (B) ofrece una mejor distribución de tamaño de poro (150 ± 50 micras de diámetro), tal y como puede verse en la figura 2).

Tabla 3. Condiciones utilizadas en la preparación de membranas porosas de Q/HA con LDI para distintas relaciones en peso HA:Q (Agitación UT).

Medio de reacción	mg/mL Quit. en la mezcla de reacción	mg/mL HA en la mezcla de reacción	Relación Q/HA (p/p)	Relación LDI/NH ₂ (mol/mol)	Observaciones de la membrana en seco
Agua + 1% Pluronic F127 (4 mL)	20	20	1:1	5:1	Membrana algo rígida (A)
		15	1:0.75	5:1	Membrana flexible (B)
		10	1:0.5	5:1	La membrana más flexible (C)

Para comprobar el hinchamiento de estas membranas, se troquelaron discos de 1,2 cm de diámetro y se introdujeron en tampón fosfato (PBS) a 37°C durante tres días, observándose como la membrana C es la que sufre un mayor grado de hinchamiento siendo estables las tres membranas y no observándose degradación alguna (véase figura 10).

En principio, la rigidez no afecta mucho a las propiedades finales, por lo que lo más deseable es que la membrana no se hinche mucho, ya que, una vez implantada, un exceso de hinchamiento puede hacer que se salga de su lugar.

En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran las condiciones utilizadas en la preparación de membranas porosas de Q y HA con LDI cargadas con sulfato de condroitina (SC), compuesto que favorece la regeneración del cartílago.

Tabla 4. Condiciones utilizadas en la preparación de membranas porosas de Q/HA con LDI cargadas con sulfato de condroitina (SC) (agitación UT)

Medio de reacción	mg/mL Q. en la mezcla de reacción	Relación Q/HA (p/p)	Relación HA/SC (p/p)	Relación LDI/NH ₂ (mol/mol)
Agua + 1% Pluronic F127 (4 mL)	20	1:1	1:0,2	5:1 5
		1:0,75		

10 **Ejemplo 2: Estudio del grado de hinchamiento de las membranas a 37°C en PBS**

Las membranas A y B de la Tabla 3 se sumergieron en tampón PBS pH: 7,4 y 37 °C con el objetivo de estudiar el nivel de hinchamiento (véase figura 3).

Se comparó el hinchamiento con el de las membranas no porosas entrecruzadas con dextranos (son membranas ya descritas y conocidas en el estado de la técnica).

15 Estas membranas entrecruzadas con dextranos se prepararon de la siguiente manera: Se disolvió la correspondiente cantidad de ácido hialurónico y dextrano oxidado a 37°C en 2 mL de una disolución acuosa de Tampón fosfato 0.025M pH=7.4. Por otra parte, se disolvió la correspondiente cantidad de quitosano a 37°C en 2 mL de una disolución acuosa con ácido acético (4µL) y, opcionalmente, sulfato de condroitina.

20 Después de la disolución completa de ambos compuestos se mezclaron las dos disoluciones y se dejaron bajo agitación lenta para evitar la formación de burbujas y a 37°C durante al menos de 15 min. Pasado este tiempo la solución fue dispersada con un UltraTurrax® a 15000 rpm por 1 minuto y fue trasladada a un molde de Teflón con

25 la geometría deseada.

Se observa cómo las membranas porosas sintetizadas con LDI tienen un hinchamiento superior a las membranas no porosas entrecruzadas con dextranos. (Dentro de cada tipo de membranas la composición con mayor cantidad de ácido hialurónico presenta

30 un mayor grado de hinchamiento. Todas las membranas alcanzan el equilibrio pasadas unas horas.

Ejemplo 3: Ensayos de citotoxicidad de las membranas (Ensayo MTT)

35 El ensayo de citotoxicidad fue realizado en fibroblastos de piel humanos (HFB,

Innoprot). Para la obtención de los extractos, se introducen trozos de membrana (HA:Q:CS 1.1:0,2 y 1:0,75:0,2) en 5 ml de medio de cultivo a $37\pm1^{\circ}\text{C}$, en un baño termostatzado con agitación. El medio de cultivo que contiene los extractos solubles de los materiales, fue obtenido después de 1 día de incubación y reemplazado por medio fresco. Este procedimiento fue repetido a los 2, 7, 14 y 21 días después del comienzo del experimento y en condiciones idénticas. Todos los extractos fueron obtenidos bajo condiciones estériles y congelados a -18°C .

Las células fueron sembradas en placa de 96 pocillos con una densidad de 11×10^4 células/ml e incubadas durante 24 horas a $37\pm1^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue eliminado y reemplazado con 100ml/pocillo de los extractos solubles de cada material, el THX (control), y a cada día de extracción. En todos los casos, el número de réplicas fue de 16. Las placas fueron incubadas a $37\pm1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Posteriormente, se eliminaron los extractos y se añadió 100 μl /pocillo de Bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol – 2 -yl) - 2,5 - diphenyltetrazol (MTT) (0,5 mg/mL) y se incubaron las placas a 37°C durante 3 horas y 30 minutos. Como blanco, se utilizó una réplica sin células sembradas ni adición de extractos. Se eliminó el MTT y se añadieron 100ml/pocillo de DMSO que disuelve los cristales violetas de formazán, formados por células viables. La densidad óptica (D.O.) fue medida con un lector de placas Biotek ELX808IU, usando una longitud de onda de 570 nm. Los valores de densidad óptica (D.O.) fueron corregidos teniendo en cuenta la media de absorbancia del blanco.

En la figura 4 se observa que en las membranas entrecruzadas con dextranos (Figura 4A) en el primer día existe una disminución considerable de la viabilidad celular, esto se puede deber a la presencia de dextranos no entrecruzados que se liberan al medio en las primeras horas, afectando a la viabilidad celular. Posteriormente, la viabilidad celular se recupera indicando que la liberación de productos tóxicos solo tiene lugar durante las primeras horas.

En el caso de las membranas entrecruzadas con LDI (figura 4B) se observa un ligero descenso en la viabilidad celular, no siendo inferior al 80%, por lo que estas membranas no resultan tóxicas para las células.

Ejemplo 4: Estudio de degradación de las membranas

El estudio de degradación de las membranas (con y sin SC con proporción en peso Q/HA 1:1) se ha realizado sumergiendo las membranas en PBS a 37°C durante determinados periodos de tiempo. Una vez transcurridos estos periodos las muestras
 5 se han lavado con agua destilada para eliminar los restos de sales y se han liofilizado para obtener el peso final de la muestra. De esta forma se puede determinar la pérdida de peso de la muestra con el tiempo.

Como se observa en la figura 5, hay una pérdida de peso inicial de aproximadamente
 10 el 30% en las membranas de HA:Q (1:1) (sin SC) y de un 25% en las membranas de HA:Q:SC (1:1:0.2) (con SC). Esta pérdida de peso inicial se debe principalmente a la liberación de cadenas de HA que no han sido integradas dentro de la estructura química del hidrogel, por lo que tendremos una liberación de HA inicial.

En el caso de las membranas de HA:Q:SC, la pérdida de peso es menor y
 15 posteriormente se observa que hay una evolución con el tiempo. Esto puede ser debido a la incorporación del SC que hace que el porcentaje inicial de HA libre sea menor.

Se analizaron los extractos de las liberaciones a diferentes tiempos mediante HPLC
 20 con el objetivo de identificar los compuestos que se estaban liberando. Como se observa en la figura 6 se puede distinguir entre HA y SC por su tiempo de elución.

En la segunda gráfica (6B) se observa cómo en los extractos obtenidos durante los primeros días hay presencia de HA y SC además de una serie de picos a tiempos de elución mayores correspondientes a productos de bajo peso molecular como podrían
 25 ser cadenas de ácido hialurónico o quitosano que se hayan degradado. A partir del día 5 ya no se observa la presencia de sulfato de condroitina, por lo que se supone que la práctica totalidad de esta se libera durante los primeros días, además las señales correspondientes a compuestos de bajo peso molecular van desapareciendo con el tiempo.

30

Ejemplo 5: Medidas de adhesión de los hidrogeles HA:Q:SC (1:1:0.33 en peso)

Se han realizado medidas de adhesión de los geles sobre hueso en distintas condiciones. El hueso utilizado para realizar los ensayos ha sido la parte plana de la
 35 quilla de gallina.

Para la realización de las medidas los huesos se han recortado con el objetivo de obtener la parte más plana del hueso y obtener la mayor superficie de contacto con el hidrogel.

5

Las medidas se han realizado en un equipo Instron equipado con una célula de medida de 50 N en la que se ha acoplado el sistema hueso-membrana hidrogel mediante la fijación de unos soportes metálicos con cianoacrilato y una tracción de 5 mm/min.

10

Las medidas se han realizado de dos formas distintas:

1 - Resistencia al desplazamiento en forma de deslizamiento o cizalla.

2 - La resistencia a la fuerza de bioadhesión. Ambos en tres situaciones diferentes:

- Hueso en contacto con el hidrogel hidratado
- 15 • Hueso en contacto con el hidrogel hidratado y añadiendo pegamento de fibrina
- Hueso perforado en contacto con el hidrogel hidratado y pegamento de fibrina
- Hueso perforado en contacto con el hidrogel hidratado y sangre humana

La figura 7 muestra los resultados promedio obtenidos de seis medidas en cada uno de los casos anteriores.

20

La fuerza necesaria para la separación del hidrogel hidratado en el caso en el que este puesto directamente en el hueso es muy baja (0,3 N). Esta fuerza se puede mejorar mediante la adición de pegamento de fibrina a la interfaz (≈ 1 N) o haciendo agujeros en el hueso (>1 N en cizalla y 3,7-8 N en adhesión).

25

El mejor de los resultados se obtiene cuando se utiliza sangre en la interfaz y se deja coagular. Se ha elegido este sistema por su similitud con los tratamientos actuales consistentes en realizar perforaciones en el hueso para que sangre y forme un coagulo rico en factores de crecimiento. Utilizando este sistema se consiguen fuerzas superiores a los 25 N en adhesión.

30

Un aspecto muy destacable es que a pesar de que las membranas se aplican hidratadas para poder manipularlas y adaptarlas a la superficie del hueso, presentan una elevada capacidad de adsorción de líquidos o de sangre, de tal forma que prácticamente toda la sangre que se ha depositado inicialmente en el hueso es materialmente adsorbida por la membrana de hidrogel.

35

La fuerza necesaria para la separación del hidrogel y del hueso en el caso de adhesión con sangre en ocasiones fue superior a la estabilidad del hidrogel, por lo que el hidrogel fallo antes de separarse del hueso

- 5 Dado que el hueso de gallina es bastante poroso, los resultados se pueden extrapolar a las condiciones humanas.

Ejemplo 6: Ensayos de adhesión celular (Ensayo Alamar Blue)

- 10 Las membranas preparadas (HA:Q: 1:1 en peso y HA:Q:SC 1:1:0,33 en peso) se colocaron en placas de 24 pocillos y se esterilizaron mediante ciclos de congelación. Sobre las membranas se sembraron Fibroblastos de piel humana con una densidad de 14×10^4 células/mL. Tras la incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, y 5% CO_2 durante 1, 7 y 14 días, se eliminó el medio de los pocillos y se añadió una solución de Alamar Blue. Las placas
15 fueron incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 hora, tiempo suficiente para que el reactivo sea metabolizado por las células presentes en la superficie y nos dé una medida indirecta de la adhesión celular a los hidrogeles. De cada pocillo fueron tomadas alícuotas de 100 μL y medidas en un lector de placas.
- 20 En ambas muestras tenemos una buena adhesión celular y el número de células va creciendo con el tiempo (véase figura 8). Destaca que esta evolución es mucho más pronunciada en el caso de los hidrogeles sin SC.

Ejemplo 7: Propiedades mecánicas de los hidrogeles

- 25 La determinación de las propiedades mecánicas se llevó a cabo en un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado de TA Instruments modelo ARG2, utilizando una geometría de platos paralelos. Las muestras se midieron utilizando un plato superior de acero de 20 mm de diámetro. Se realizaron ensayos dinamomecánicos, fijando el
30 porcentaje de deformación en un 2% y manteniendo la fuerza normal inicial constante para todas las muestras. De esta forma se obtuvieron las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles, definidas a partir de su módulo de almacenamiento (G') y su módulo de pérdidas (G'').
- 35 Los barridos de deformación se llevaron a cabo para determinar el rango de

viscoelasticidad lineal del sistema. Este rango se define como el rango en el que el hidrogel cumple la ley de elasticidad de Hooke ($\sigma = G \cdot \gamma$, siendo σ el esfuerzo aplicado, G el módulo de relajación y γ la deformación que sufre el material), y es el rango en el que el sistema presenta un comportamiento visco elástico. El barrido de deformación se realizó entre 1×10^{-3} y 1000 por ciento de deformación, fijando la frecuencia y la temperatura a 0.5 Hz y 25°C respectivamente.

El barrido de frecuencia se realizó con un 2% deformación entre 0,01 y 20 Hz a 25°C como se observa en la siguiente figura. La diferencia entre los valores de G' y G'' es mayor del 25% lo que nos indica que los geles se encuentran entrecruzados químicamente. Valores menores del 25% indicarían que el entrecruzamiento es de tipo físico. Comparando ambos geles, observamos que los valores de los módulos de carga y pérdida son inferiores en el caso de los geles con sulfato de condroitina (HA:Q:SC) lo que indica que estos geles van a ser menos estables mecánicamente, esto también se observa en la gráfica de dureza, en donde se aprecia que los geles HA:Q:SC alcanzan antes el punto de rotura (véase figura 9).

Si tomamos los valores del módulo elástico en el rango en donde los geles son estables obtenemos los siguientes valores:

$$\begin{aligned} \text{Q:HA} &= 5,48 \pm 1,05 \text{ KPa} \\ \text{Q:HA:SC} &= 2,13 \pm 1,38 \text{ KPa} \end{aligned}$$

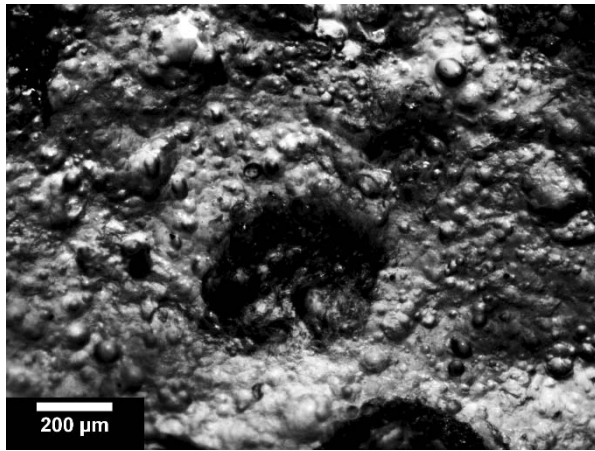
REIVINDICACIONES

1. Hidrogel biocompatible caracterizado por comprender ácido hialurónico y quitosano entrecruzados con al menos un agente de entrecruzamiento, donde el agente de entrecruzamiento es un diisocianato.
2. Hidrogel según reivindicación 1 donde el diisocianato es seleccionado de la lista que comprende hexametilén diisocianato, el tetraetilén diisocianato y el diisocianato de lisina.
3. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la relación molar entre el agente de entrecruzamiento y los grupos $-NH_2$ del quitosano está entre 3:1 y 7:1.
4. Hidrogel según reivindicación 3 caracterizado porque la relación molar entre el agente de entrecruzamiento y los grupos $-NH_2$ del quitosano es 5:1.
5. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque la relación en peso entre el quitosano y el ácido hialurónico está entre 1:0,5 y 1:1.
6. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque la relación en peso entre el quitosano y el ácido hialurónico es 1:1.
7. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque comprende además sulfato de condroitina.
8. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque la relación en peso entre el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina es 1:0,33.
9. Procedimiento para preparar el material biocompatible descrito en las reivindicaciones anteriores caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a) disolución de ácido hialurónico en una solución acuosa de un copolímero de polietilén-propilenglicol al 0,5-1,5% en peso y ácido acético, donde la proporción en volumen entre la solución acuosa del copolímero de polietilén-propilenglicol y el ácido acético está entre 1000:10 y 1000:1, y donde la concentración de ácido hialurónico en la disolución es de entre 10 y 30 mg/mL,

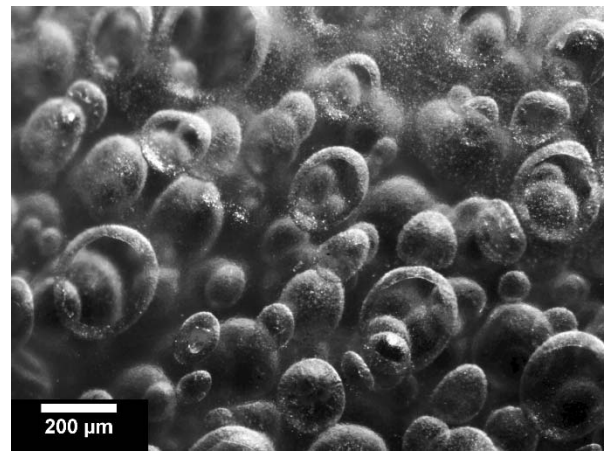
- b) adición de quitosano a la disolución anterior,
 - c) adición de un diisocianato a la solución obtenida en la etapa b) seguida de agitación para obtener una dispersión,
 - d) mantenimiento de la dispersión obtenida en la etapa c) a temperatura de entre 20 y 65°C durante al menos 3 horas para permitir el entrecruzamiento, formándose así el hidrogel.
- 5
10. Procedimiento según reivindicación 9 donde el copolímero de polietilen-propilenglicol es Pluronic® F127.
- 10
11. Procedimiento según reivindicación 9 o 10 donde la disolución de la etapa a) se prepara a una temperatura entre 20 y 65°C.
12. Procedimiento según reivindicación 11 donde la disolución de la etapa a) se prepara a una temperatura de 37°C.
- 15
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-12 donde el copolímero de polietilen-propilenglicol está al 1% en la solución acuosa.
- 20
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-13 donde la concentración de ácido hialurónico en la disolución preparada en la etapa a) es de 20 mg/mL.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-14 donde la proporción en peso utilizada entre el quitosano y el ácido hialurónico está entre 1:0,5 y 1:1.
- 25
16. Procedimiento según reivindicación 15 donde la proporción en peso entre el quitosano y el ácido hialurónico es 1:1.
- 30
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-16 donde la disolución formada en la etapa b) se mantiene bajo agitación durante al menos 2 horas previamente a la adición del diisocianato.
- 35
18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-17 donde en la etapa b) se añade además HCl hasta la completa disolución de quitosano.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-18 donde la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura entre 20 y 65°C.
20. Procedimiento según reivindicación 19 donde la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 37 °C.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-20 donde en la etapa b) se añade, además del quitosano, sulfato de condroitina.
22. Procedimiento según reivindicación 21 donde la proporción en peso utilizada entre el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina es 1:0,33.
23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-22 donde la relación molar utilizada entre el diisocianato y los grupos -NH₂ del quitosano está entre 3:1 y 7:1.
24. Procedimiento según reivindicación 23 donde la relación molar utilizada entre el diisocianato y los grupos -NH₂ del quitosano es 5:1.
25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-24 donde la agitación en la etapa c) se realiza entre 10000-20000 rpm.
26. Procedimiento según reivindicación 25 donde la agitación en la etapa c) se realiza a 15000 rpm.
27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25-26 donde la agitación en la etapa c) se realiza entre 0,5-2 min.
28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-27 donde el diisocianato es seleccionado de la lista que comprende hexametilen diisocianato, tetraetilen diisocianato y diisocianato de lisina.
29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-28 donde la etapa d) se lleva a cabo a 37°C.

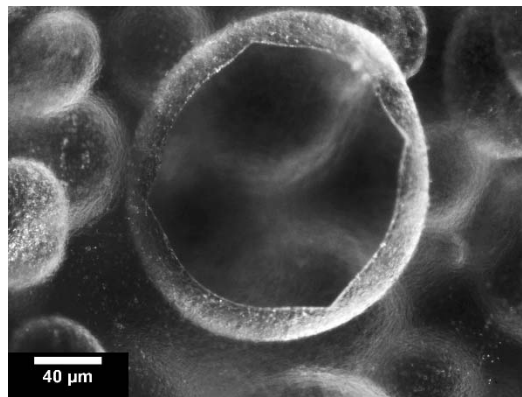
30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-29 caracterizado porque el hidrogel obtenido en la etapa d) se lava con agua destilada y se seca por liofilización.
- 5 31. Uso del hidrogel definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la fabricación de un dispositivo de uso médico.
32. Uso según la reivindicación 31 donde el dispositivo de uso médico es para la regeneración del tejido óseo o cartilaginoso.
- 10 33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31-32 donde el dispositivo de uso médico es una membrana porosa, injerto o un apósito.



A)



B)



C)

FIG. 1

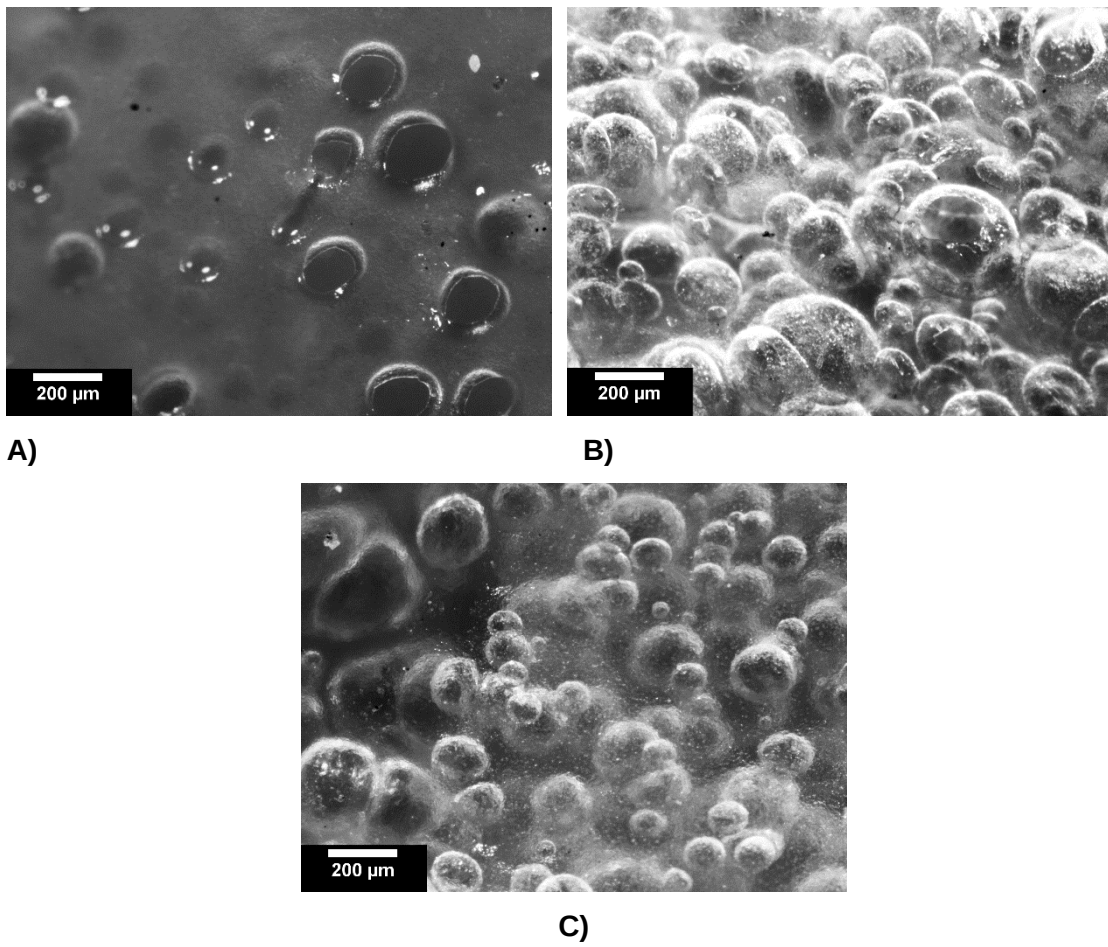


FIG. 2

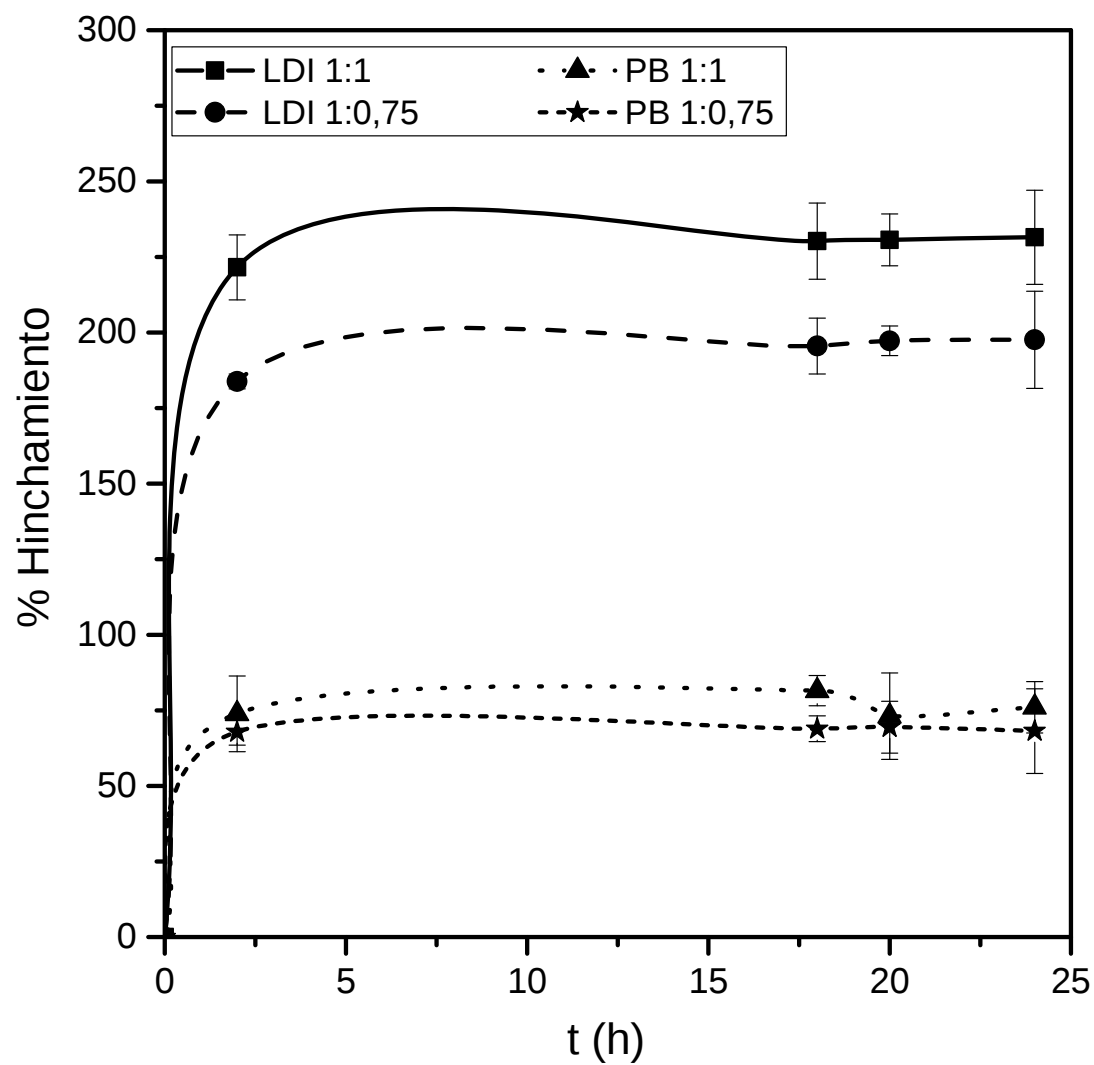
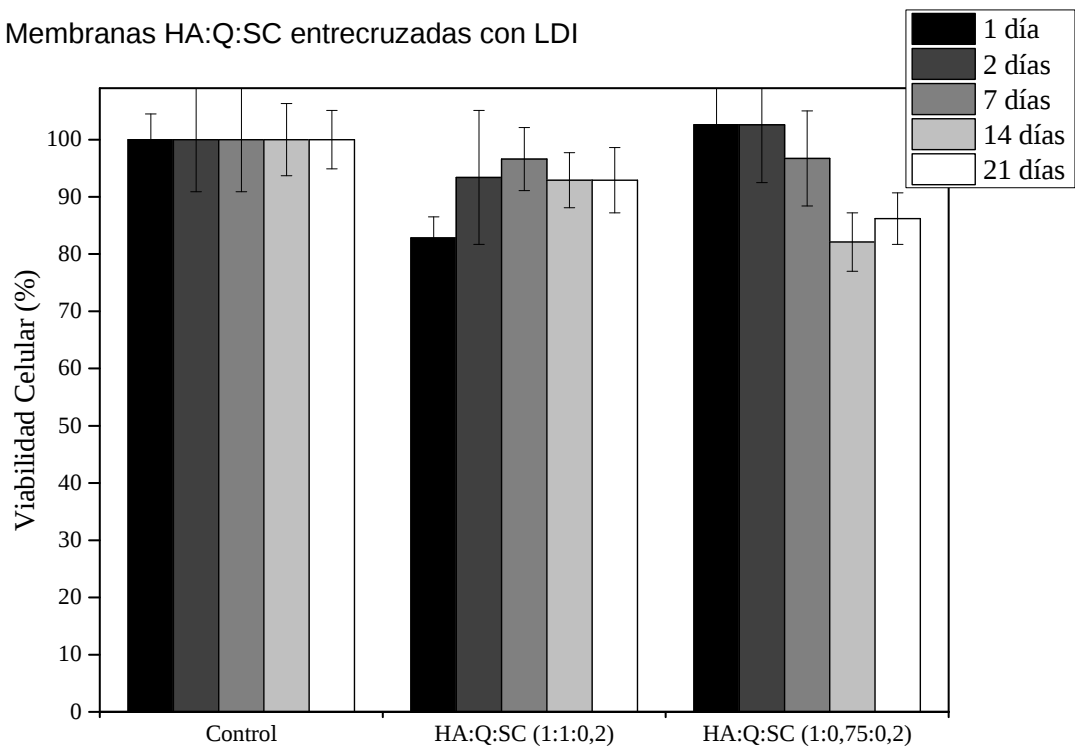


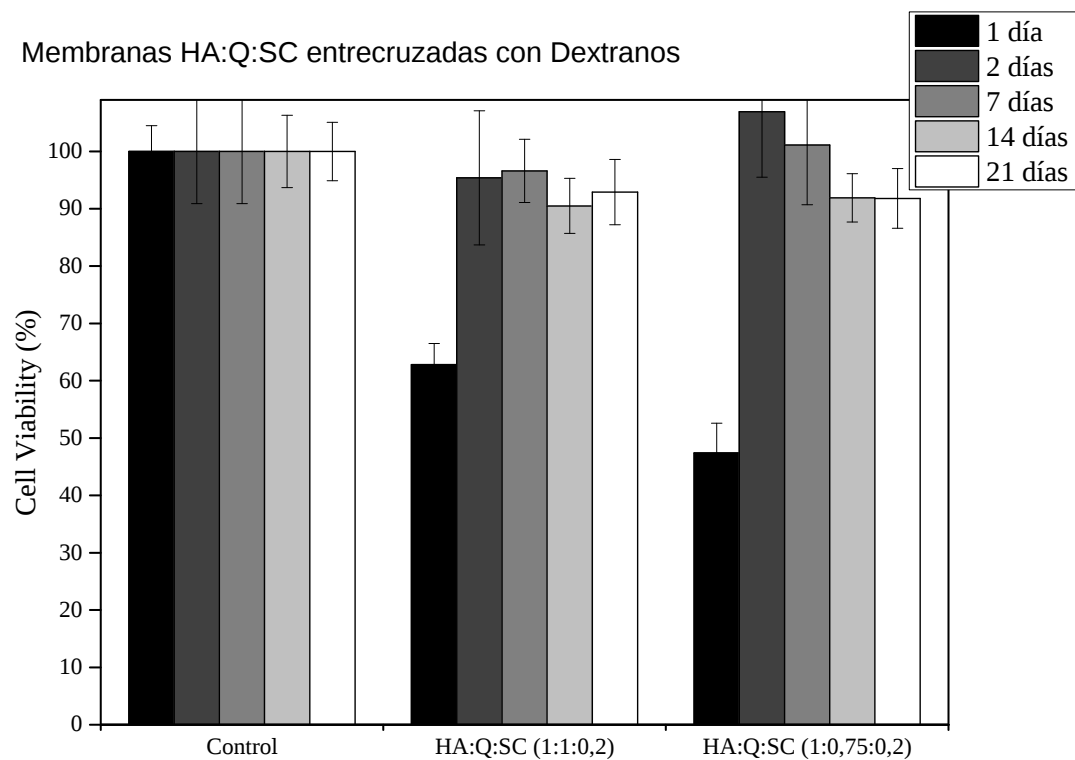
FIG. 3

Membranas HA:Q:SC entrecruzadas con LDI



A)

Membranas HA:Q:SC entrecruzadas con Dextranos



B)

FIG. 4

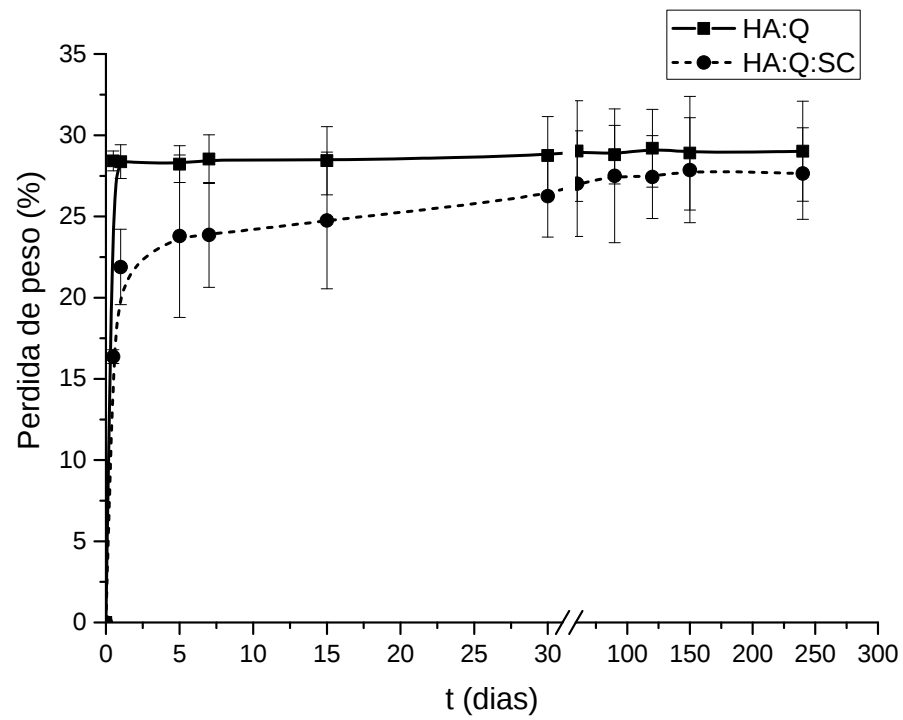


FIG. 5

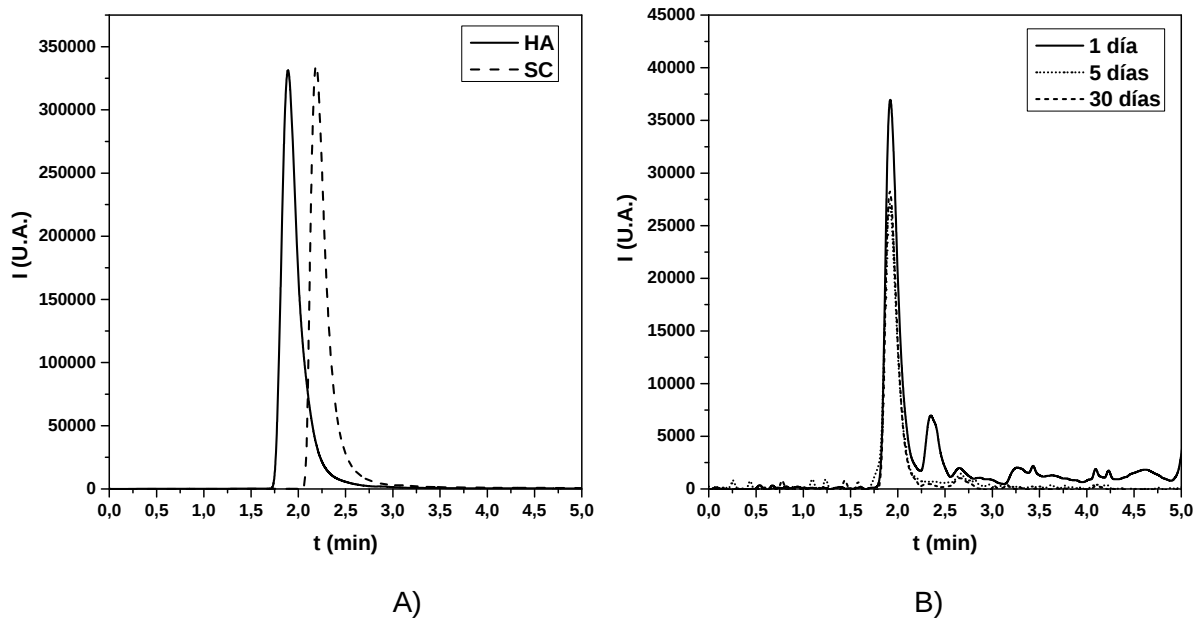


FIG. 6

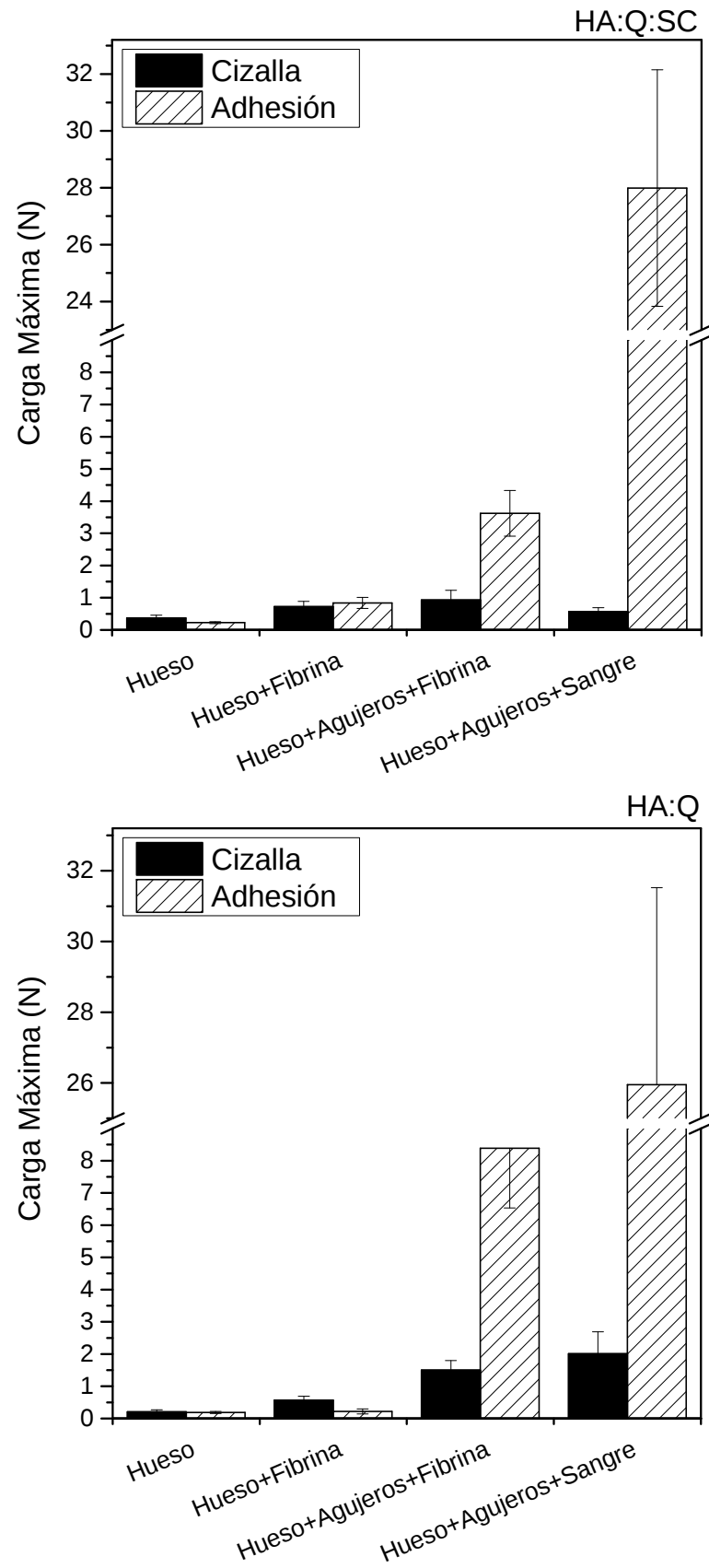


FIG. 7

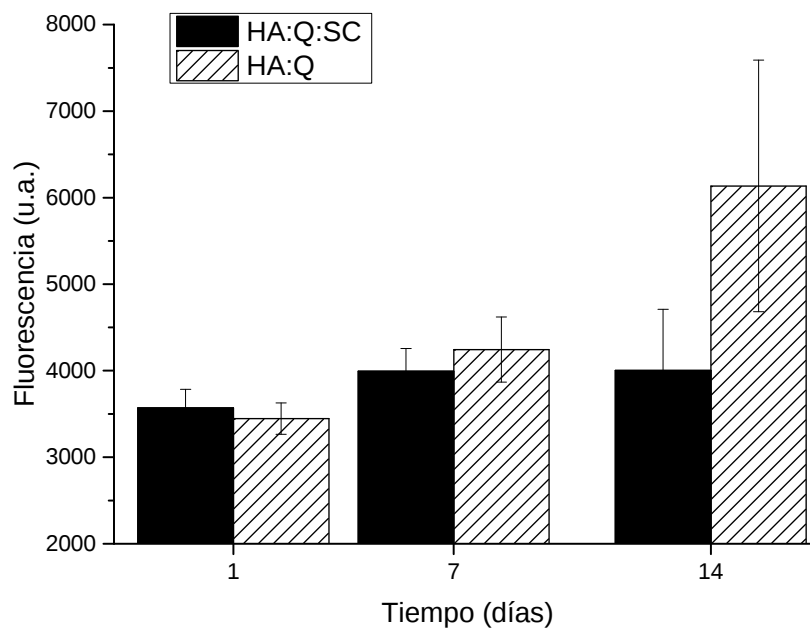


FIG. 8

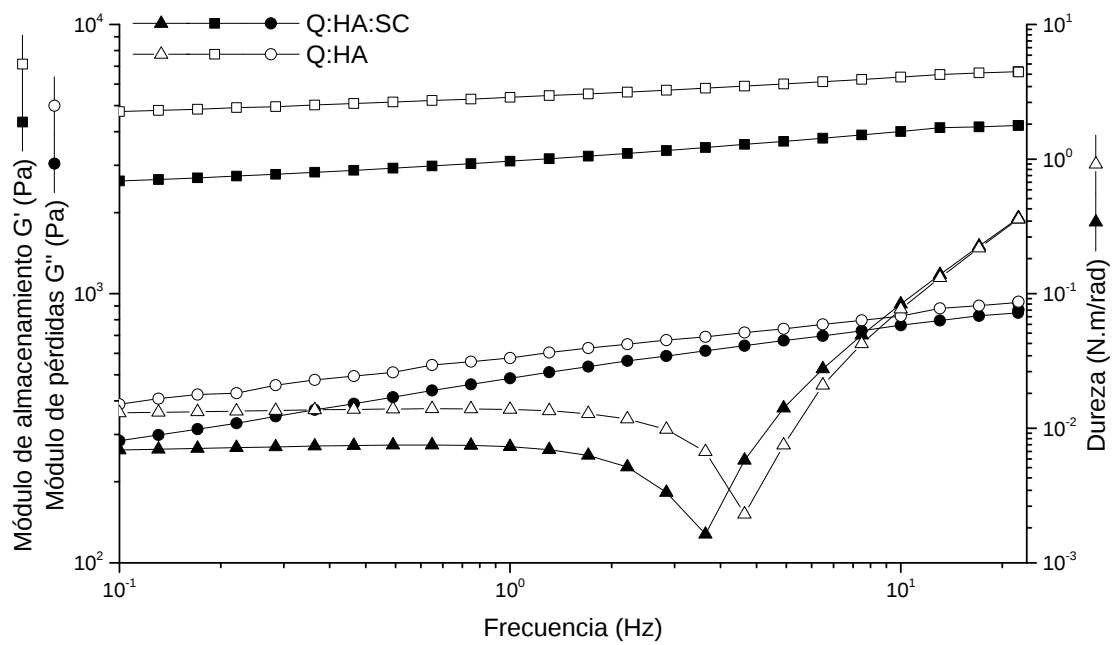


FIG. 9

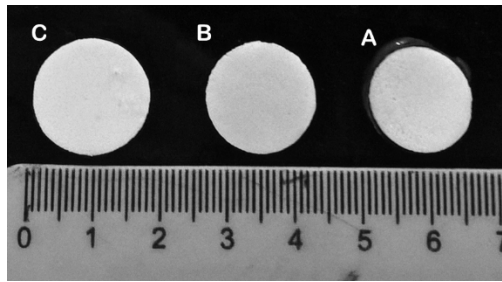


FIG. 10



- ②① N.º solicitud: 201731218
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.10.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2002049281 A1 (ZHAO XIAOBIN <i>et al.</i>) 25/04/2002, Párrafos [0015], [0030], [0052], [0064]-[0066], [0081]-[0088]; ejemplos 3-9.	1, 2, 5, 6, 31-33
X	WO 2014079198 A1 (SHENZHEN LANDO BIOMATERIALS CO LTD) 30/05/2014, Párrafos [0021], [0023/0015], [0078]-[0082/0046]; ejemplo 8; reivindicación 9.	1, 2, 5-7, 31-33
A	US 2012264852 A1 (JAMES SUSAN P <i>et al.</i>) 18/10/2012, Ejemplo 6, Tabla 4, párrafo [0168].	
A	JP H03165775 A (KATAKURA CHIKKARIN CO LTD) 17/07/1991, (resumen). [en línea] [Recuperado el 24.05.2018]. Recuperado de: EPOQUE WPI Database, DW199135, nº acceso 1991-256053.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.05.2018

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08L5/08 (2006.01)
C08J3/24 (2006.01)
C08K3/011 (2018.01)
C08K3/28 (2006.01)
A61L15/28 (2006.01)
A61L27/52 (2006.01)
A61L27/20 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08L, C08J, C08K, A61L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP