

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 856**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2015 PCT/IB2015/050389**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2015 E 15707784 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3096804**

54 Título: **Método de preparación de un hidrogel, hidrogel y formulación para vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos obtenidos usando dicho método**

30 Prioridad:

20.01.2014 IT VI20140011

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

07.07.2020

73 Titular/es:

**BIOTECK S.P.A. (100.0%)
Via Enrico Fermi 49
36057 Arcugnano (VI), IT**

72 Inventor/es:

FIORINI, MAURO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 771 856 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

Método de preparación de un hidrogel, hidrogel y formulación para vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos obtenidos usando dicho método

Campo de la invención

5 La presente invención generalmente encuentra aplicación en el campo de los biomateriales para la implantación en el cuerpo humano y concretamente se refiere a un método de preparación de un hidrogel.

La invención también se refiere a un hidrogel y una formulación que comprende dicho hidrogel, que están diseñados para su uso como vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos de origen sintético, autólogo, homólogo y heterólogo.

Técnica anterior

10 Se conoce el trasplante de biomateriales en el cuerpo humano para la regeneración/sustitución de determinados tipos de tejidos después de traumatismos o determinadas afecciones patológicas.

Por norma, dichos biomateriales pueden ser de origen sintético o proceder de materiales biológicos y se pueden trasplantar en el cuerpo por medio de cirugía o inyección en la región afectada por la enfermedad o el traumatismo.

15 Concretamente, la finalidad principal de estos biomateriales es sustituir la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos, y favorecer la regeneración del tejido dañado por medio del apoyo e inducción de la proliferación celular, posiblemente en respuesta a determinados estímulos mecánicos dentro o fuera del cuerpo.

20 Estos biomateriales incluyen, entre otros, hidrogeles basados en polímeros que se pueden solubilizar y/o hidratar en soluciones acuosas, y se polimerizan y esterilizan por medio de radiación γ o β . Los polímeros solubles en agua pueden tener diferentes pesos moleculares de acuerdo con su grado de polimerización, es decir, el número de unidades básicas que componen su estructura química.

En particular, la viscosidad final de la disolución acuosa, y además la del gel deseado, viene dada por el peso molecular de los polímeros solubles en agua en proporción directa, de acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink, que es como se muestra a continuación:

$$[\eta] = KM^a$$

25 en la que $[\eta]$ es la viscosidad de la disolución, K es la constante de proporcionalidad directa, M es el peso molecular del polímero, a es un parámetro asociado a la interacción polímero-disolvente.

No obstante, el principal inconveniente de estos materiales es que el grado de polimerización obtenido tras la irradiación no resulta fácilmente controlable.

30 La dificultad de controlar la polimerización provoca dificultad en la regulación de la viscosidad del biomaterial, y además reduce la capacidad de predecir su comportamiento físico/químico frente al tejido en el que se implanta.

Generalmente, estos hidrogeles tienen propiedades mecánicas menores que la matriz extracelular, lo cual limita la proliferación de células implantadas y, con ello, provoca una regeneración tisular únicamente parcial.

35 En un intento de obviar estos inconvenientes, se han desarrollado hidrogeles que comprenden, además de los polímeros solubles en agua anteriormente mencionados, componentes adicionales diseñados para limitar el proceso de polimerización tras la irradiación.

El documento US5540033 divulga un hidrogel basado en PEO (poli(óxido de etileno)) que comprende un agente inhibidor de polimerización seleccionado entre el grupo que comprende ácido ascórbico y sus derivados.

En particular, el ácido ascórbico permite la captura de radicales libres formados tras irradiación, retrasando de este modo las reacciones de polimerización de las moléculas de poli(óxido de etileno) (PEO).

40 No obstante, un primer inconveniente de estos materiales es que el uso de ácido ascórbico y/o sus derivados en combinación con PEO únicamente retarda la polimerización, y además la viscosidad no se regula de forma constante.

Como resultado de ello, este hidrogel tiende a modificar sus propiedades mecánicas con el tiempo tras la acción de los tejidos biológicos o la adhesión y la proliferación de células y otro material biológico sobre su superficie.

45 Un inconveniente adicional es que el uso de estos tipos particulares de componentes proporciona un hidrogel que tiene cierta consistencia, pero inapropiado para inyección usando jeringas o instrumentos similares.

Finalmente, un inconveniente serio es que la viscosidad del material antes y después de la irradiación puede variar de manera considerable, y esto requiere acciones repetidas sobre la composición de hidrogel antes de la implantación.

5 El documento WO2015/086694 divulga un método de uso de un dispositivo biomédico oclusivo con un hidrogel que comprende celulosa y ácido ascórbico. Se usa PEG para contraer el hidrogel, pero sin usar radiación.

El documento US2008/0139694 divulga un hidrogel que comprende, entre otros, celulosa y PEG/PEO en combinación. La polimerización se logra sin el uso de radiación.

Divulgación de la invención

10 El objetivo de la presente invención es solucionar los inconvenientes anteriores, proporcionando un método de preparación de un hidrogel, así como también un hidrogel y una formulación para vehículos y/o un sustituto de tejidos conjuntivos que sean altamente eficaces y relativamente rentables.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un hidrogel y una formulación para vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos que permitan que la viscosidad se mantenga sustancialmente constante con el tiempo.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un hidrogel y una formulación para vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos cuyas propiedades mecánicas y químicas sean apropiadas para mejorar la proliferación celular.

También, un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un hidrogel y una formulación para vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos cuyas propiedades mecánicas y químicas sean sustancialmente similares a las de la matriz extracelular de los tejidos objeto de reintegración.

20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de preparación de un hidrogel, un hidrogel y una formulación para vehículos y/o un sustituto de tejidos conjuntivos que puedan proporcionar productos implantables que tengan consistencias diferenciadas.

Estos y otros objetivos, como se explica más claramente a continuación, se cumplen por medio de un método de preparación de un hidrogel como se define en la reivindicación 1.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un hidrogel y una formulación para vehículos y/o un sustituto de tejidos conjuntivos como se define en las reivindicaciones 10 y 12, respectivamente.

Con estas características, se puede obtener un hidrogel de viscosidad controlable, que puede actuar como soporte para la proliferación de un sustituto de células para tejidos biológicos dañados, al tiempo que imita las propiedades mecánicas de la matriz extracelular.

30 Las realizaciones ventajosas de la invención son como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

35 Características adicionales y ventajas de la invención resultarán más evidentes tras la lectura de la descripción detallada de una realización no limitante de un método de preparación de hidrogeles, un hidrogel y una formulación para vehículos y/o sustituto de tejidos conjuntivos, que se muestran como ejemplo no limitante con ayuda de las figuras anexas, en las que:

las Figuras 1 a 4 muestran diagramas de las curvas de consistencia y/o viscoelasticidad de una primera muestra de hidrogel con un polímero soluble en agua que tiene un primer peso molecular;

40 las Figuras 5 y 6 muestran diagramas de las curvas de consistencia y/o viscoelasticidad de una segunda muestra de hidrogel con el mismo polímero soluble en agua de las Figuras 1 a 4, con un segundo peso molecular, diferente del primero;

las Figuras 7 a 10 muestran diagramas de las curvas de consistencia y/o viscoelasticidad de una tercera muestra de hidrogel con un segundo polímero soluble en agua que tiene un peso molecular diferente de los dos primeros.

Descripción detallada de unas pocas realizaciones preferidas

45 La presente invención aborda un método de preparación de un hidrogel diseñado para su uso como vehículo y/o sustituto de tejido conjuntivo.

De manera ventajosa, un hidrogel obtenido por medio del uso del método de la invención se puede implantar directamente in situ en el cuerpo humano, debido a su elevada biocompatibilidad y su virtual ausencia de toxicidad para los tejidos biológicos objeto de regeneración.

En particular, el método puede proporcionar un hidrogel que pueda imitar la estructura de la matriz extracelular para la regeneración de tejido conjuntivo.

- 5 En su forma básica, el método comprende una etapa de suministro de una cantidad predeterminada de una disolución acuosa, una etapa de adición de una cantidad predeterminada de un agente regulador de polimerización en la disolución acuosa, para regular la polimerización del primer polímero soluble en agua polimerizable por radiación electromagnética y una etapa de adición, hidratación y/o solubilización de una cantidad predeterminada del primer polímero soluble en agua en la disolución acuosa.

Preferentemente, la disolución acuosa puede estar seleccionada entre el grupo que comprende PBS u otras disoluciones salinas tamponadas.

- 10 El uso de PBS permite que el pH de operación se mantenga en un valor sustancialmente próximo al valor fisiológico de 7,4, de manera que el hidrogel también tenga un pH compatible con el del cuerpo.

De manera apropiada, la cantidad de polímero soluble en agua está seleccionada de acuerdo con el volumen de la disolución acuosa y la cantidad final de hidrogel que se pretende obtener, para evitar la saturación de la disolución, y la formación de precipitados que podrían alterar las propiedades físico/químicas del hidrogel.

- 15 Además, la etapa de adición, hidratación y/o solubilización del primer polímero soluble en agua en la disolución acuosa se puede acelerar usando procedimientos bien conocidos, tales como agitación magnética, agitación mecánica o calentamiento de la disolución acuosa.

Las etapas de adición del agente regulador y el primer polímero soluble en agua proporcionan una mezcla de disolución acuosa homogénea.

- 20 Esta disolución puede tener una concentración predeterminada del primer polímero soluble en agua, diseñado para proporcionar una solubilización homogénea y evitar la aparición de precipitados o flóculos.

Además, la etapa de hidratación y/o solubilización se puede llevar a cabo a través de adiciones repetidas de cantidades parciales del primer polímero soluble en agua, a la vista de la aceleración del proceso y el suministro de la mezcla homogénea.

- 25 La etapa de adición del primer polímero soluble en agua va seguida de una etapa de aplicación de radiación electromagnética de una frecuencia predeterminada a la mezcla, para lograr la polimerización del primer polímero con una viscosidad predeterminada y para obtener un hidrogel estéril.

- 30 Ventajosamente, la radiación electromagnética permite la activación de una reacción de reordenación de radicales sobre las moléculas del primer polímero soluble en agua, para favorecer la reacción entre las moléculas y además su polimerización.

Preferentemente, la radiación electromagnética aplicada a la mezcla puede tener una frecuencia que caiga dentro de las radiaciones ionizantes, preferentemente próxima al espectro de frecuencias de los rayos β .

La radiación electromagnética de tipo β se puede aplicar a la mezcla para que ésta última tenga una dosis promedio de radiación absorbida de 25 KGy.

- 35 Además, la radiación electromagnética de tipo β también favorece la esterilización de la mezcla, para eliminar cualquier riesgo de infección bacteriana o vírica tras la implantación del hidrogel.

Ventajosamente, la etapa de aplicación de la radiación electromagnética puede ir precedida por una etapa de combinación de la mezcla con material biológico del sustituto de tipo de tejido conjuntivo, de manera que éste último se pueda esterilizar tras la irradiación.

- 40 De acuerdo con un aspecto peculiar de la invención, se añade un segundo polímero soluble en agua polimerizable por radiación, que es diferente del primero y no reactivo con el regulador, a la disolución acuosa antes de la aplicación de la radiación electromagnética para obtener un hidrogel estéril.

- 45 Particularmente, la cantidad de agente regulador con respecto al primer polímero soluble en agua y la cantidad del segundo polímero están seleccionadas para permitir el control de la consistencia final y la viscosidad del hidrogel estéril.

De manera apropiada, el control de larga duración de la viscosidad del hidrogel resulta esencial para obtener un biomaterial cuyas propiedades químicas, físicas y mecánicas sean sustancialmente idénticas a las de la matriz extracelular que se pretende sustituir.

- 50 En el caso de polímeros solubles en agua, los valores de consistencia y viscoelasticidad del hidrogel obtenido al final del proceso están relacionados con el grado de polimerización del polímero, es decir, el número de monómeros que componen la cadena polimérica, y con el peso molecular del polímero.

En particular, a medida que aumenta el número de monómeros que forman las cadenas, también aumenta el grado de polimerización, y proporciona valores elevados de consistencia y viscoelasticidad del producto final.

Ventajosamente, el agente regulador se adapta para regular el grado de polimerización del primer polímero soluble en agua y, además, indirectamente, la consistencia final y la viscoelasticidad del hidrogel.

- 5 Además, el segundo polímero soluble en agua está seleccionado a la vista de estar completamente polimerizado tras la aplicación de radiación electromagnética.

El presente método, en particular debido al efecto combinado del agente regulador y el segundo polímero soluble en agua, proporciona un hidrogel que tiene consistencia controlada y viscoelasticidad con el tiempo.

- 10 Un hidrogel obtenido mediante el uso del método de la presente invención puede ser un medio ideal para la proliferación de un sustituto de células de tejido conjuntivo que pueda imitar las propiedades mecánicas de la matriz extracelular.

De manera apropiada, el agente regulador está seleccionado entre el grupo que comprende ácido ascórbico y se puede adaptar para reducir el grado de polimerización del primer polímero soluble en agua a medida que aumenta su concentración en la mezcla, como se muestra en los diagramas de las figuras.

- 15 Como se sabe en la técnica, el ácido ascórbico, o vitamina C, generalmente actúa como antioxidante, por medio de la captación de los radicales libres formados como resultado de determinadas reacciones electroquímicas.

Ventajosamente, en el método de la presente invención, el ácido ascórbico captura las especies radicales del primer polímero soluble en agua formado tras la aplicación de la radiación electromagnética, fomentando de este modo la limitación del proceso de polimerización y el grado final de polimerización del hidrogel.

- 20 De este modo, si dichas especies radicales del polímero soluble en agua no son capturadas por el ácido ascórbico, podrían mantenerse en la reacción con otras y continuar su proceso de polimerización.

El agente regulador también puede estar seleccionado entre el grupo que comprende carotenoides, ácido lipoico, vitaminas E, D, B y glutatión, que también tiene efectos antioxidantes similares para las especies radicales.

La concentración del agente regulador en la mezcla se mantiene con un valor de 100 mM o menos.

- 25 En particular, dicha concentración de ácido ascórbico favorece la protección de pos-irradiación para el material biológico combinado con la mezcla.

No obstante, también se encontró experimentalmente que una concentración de regulador de 2 mM era suficiente para modular y controlar el grado de polimerización del primer polímero soluble en agua, y además la viscosidad final del hidrogel.

- 30 El primer polímero soluble en agua está seleccionado entre un primer grupo que comprende polietilenglicol (PEG) para obtener un hidrogel inyectable.

El polietilenglicol (PEG) apropiado para la preparación del hidrogel puede tener un peso molecular que varía de 10 Kg/mol a 100 Kg/mol, preferentemente de 10 Kg/mol a 40 Kg/mol.

- 35 Tipos de polietilenglicol (PEG) particularmente apropiados pueden tener pesos moleculares de 10 Kg/mol, 20 Kg/mol y 35 Kg/mol, respectivamente.

El uso de estos tipos de polietilenglicol (PEG), en combinación con el agente regulador y el segundo polímero soluble en agua, proporciona un hidrogel que puede tener valores apropiados de consistencia y viscoelasticidad para una preparación inyectable.

- 40 Alternativamente, el primer polímero soluble en agua está seleccionado entre un segundo grupo que comprende poli(óxido de etileno) (PEO) para obtener un hidrogel sustancialmente semisólido.

El poli(óxido de etileno) (PEO) apropiado para la preparación del hidrogel puede tener un peso molecular que varía de 100 Kg/mol a 1000 Kg/mol, preferentemente de 100 Kg/mol a 600 Kg/mol.

Ventajosamente, los tipos de poli(óxido de etileno) apropiado (PEO) pueden tener pesos moleculares de 100 Kg/mol, 200 Kg/mol, 400 Kg/mol y 600 Kg/mol, respectivamente.

- 45 El uso de estos tipos de poli(óxido de etileno) (PEO), en combinación con el agente regulador y el segundo polímero soluble en agua, proporciona un hidrogel con mayores valores de consistencia y viscoelasticidad que el primer hidrogel.

El porcentaje en peso del primer polímero soluble en agua varía de un 1% a un 20%, basado en el peso total del hidrogel.

En particular, el porcentaje en peso del polímero de polietilenglicol (PEG) en una preparación inyectable puede variar de un 5% a un 15%, basado en el peso total del hidrogel.

Alternativamente, el porcentaje en peso del polímero de poli(óxido de etileno) (PEO) puede variar de un 2% a un 10%, basado en el peso total del hidrogel.

- 5 El segundo polímero soluble en agua está seleccionado entre el grupo que comprende derivados de celulosa tales como hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilcelulosa (EC), metilcelulosa (MC) o similares.

El uso de derivados de celulosa favorece el control constante de la viscosidad del hidrogel, y evita que su solubilización interfiera con la solubilización del primer polímero soluble en agua.

- 10 Además, la polimerización de los monómeros de celulosa, en particular para soluciones de baja concentración, principalmente tiene lugar por medio de una reacción de esterificación que no se ve afectada por ácido ascórbico o sus derivados y otros agentes antioxidantes como agentes reguladores.

Por este motivo, los polímeros de celulosa son inertes para el agente regulador, y su polimerización continua independiente de la polimerización del primer polímero soluble en agua.

- 15 No obstante, la polimerización de polímeros de celulosa se puede ver afectada y/o limitada por el impedimento estérico intermolecular por medio de las cadenas del primer polímero soluble en agua, cuyo grado de polimerización se modula por medio de ácido ascórbico y/o sus derivados.

El porcentaje en peso del segundo polímero soluble en agua varía de un 0,1% a un 10%, preferentemente de un 0,5% a un 5%, basado en el peso total del hidrogel.

- 20 Por supuesto, el uso de celulosa como segundo polímero soluble en agua está destinado a modo de ejemplo y sin limitación, ya que la celulosa se puede sustituir por otros polímeros solubles en agua que tienen propiedades viscoelásticas equivalentes.

- 25 En un aspecto particular, la invención se refiere a un hidrogel diseñado para su uso como vehículo y/o sustituto de tejido conjuntivo, que comprende una disolución acuosa, un primer polímero polimerizado en una disolución acuosa y una cantidad predeterminada del agente regulador para regular el grado de polimerización del primer polímero en la disolución acuosa.

Un aspecto peculiar del presente hidrogel es que comprende una cantidad predeterminada de un segundo polímero soluble en agua que es diferente del primero y es inerte con respecto al agente regulador.

Además, las cantidades de agente regulador y segundo polímero soluble en agua están seleccionadas para permitir el control de la consistencia y viscosidad finales del hidrogel estéril.

- 30 Ventajosamente, el primer polímero soluble en agua está seleccionado entre el grupo que comprende polietilenglicol (PEG) o poli(óxido de etileno) (PEO), mientras que el agente regulador puede estar seleccionado entre el grupo que comprende ácido ascórbico.

Además, el segundo polímero soluble en agua está seleccionado entre el grupo que comprende derivados de celulosa tales como hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o similares.

- 35 El presente hidrogel puede tener valores diferentes de consistencia y viscoelasticidad de acuerdo con el tipo de primer polímero soluble en agua en uso y de acuerdo con la cantidad de agente regulador que se haya añadido durante su preparación.

- 40 Particularmente, un hidrogel que comprende polietilenglicol (PEG) puede tener baja consistencia y viscoelasticidad, y se puede usar como vehículo y/o sustituto inyectable de tejido conjuntivo, mientras que un hidrogel que comprende polietilenglicol (PEO) puede tener una consistencia y viscoelasticidad relativamente elevadas y se puede adaptar para su uso como vehículo y/o sustituto pre-conformado semisólido de tejido conjuntivo.

También, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación diseñada para su uso como vehículo para células y/o tejidos conjuntivos de moléculas bioactivas y/o de origen sintético autólogas o heterólogas.

Particularmente, las células pueden ser células de tejido óseo y/o cartilaginoso de origen equino.

- 45 Las moléculas bioactivas pueden estar seleccionadas entre el grupo que comprende factores de crecimiento, fármacos o bacteriocinas.

Debe comprenderse que la formulación puede comprender células diferentes de las mencionadas anteriormente, procedentes de tejidos no óseos de origen autólogo, homólogo o sintético.

A continuación, se proporcionan dos ejemplos de composiciones de hidrogel diferentes de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de un hidrogel basado en polietilenglicol (PEG) y análisis de la consistencia y viscoelasticidad del hidrogel

5 Se preparó el hidrogel en primer lugar proporcionando un volumen predeterminado de una disolución acuosa, que depende de la cantidad deseada final y peso del hidrogel.

Preferentemente, la disolución acuosa consistió en Disolución Salina Tamponada de Fosfato (PBS) a concentración 1X.

10 A continuación, se solubilizaron cantidades predeterminadas de ácido ascórbico y/o sus derivados en PBS por medio de agitación magnética usando un agitador ARGOLAB M2-A en un vaso de precipitados a 300 rpm durante 10 minutos o hasta la solubilización completa de ácido ascórbico y/o sus derivados.

A continuación, se pesaron los componentes sólidos, en particular los polímeros solubles en agua objeto de disolución en la disolución acuosa.

15 En particular, se prepararon dos muestras diferentes, referidas como LMW 35K y LMW 20K, que comprendían dos tipos de polietilenglicol (PEG) cuyos pesos moleculares son 35K g/mol y 20K g/mol, respectivamente. Después, se añadió una cantidad constante de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) a ambas muestras.

La proporción en peso de polietilenglicol (PEG) con respecto a hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) se mantuvo sustancialmente en un valor de 15:1 o menos.

Posteriormente, se añadieron lentamente dos polímeros (PEG y HPMC) usando una espátula.

20 Mientras se añadieron los polímeros, se mantuvo la disolución bajo agitación en un vaso de precipitados usando un agitador de columna de álabes fijos (ARGOLAB AM20-D) a 300 rpm. Se agitó la mezcla durante 24 h o hasta completar la hidratación de los polímeros.

Se usaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico para cada una de las dos muestras, de manera que se pudo evaluar su efecto sobre la consistencia y viscoelasticidad finales del hidrogel.

25 Tras la solubilización de los polímeros, se distribuyó la mezcla obtenida de este modo en recipientes de plástico o vidrio apropiados, o se combinó con un sustituto de tejidos conjuntivos.

A continuación, se irradió la mezcla con radiación electromagnética de tipo β para favorecer la polimerización mediada por ácido del polietilenglicol (PEG) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Las muestras obtenidas de este modo experimentaron un ensayo para medir la consistencia y la viscoelasticidad usando un analizador de textura Stable Micro Systems TA.XT Plus.

30 En particular, se colocaron las muestras en vidrios de plástico cilíndricos y se llevó a cabo un ensayo de relajación y compresión usando una sonda cilíndrica apropiada P25.

El ensayo consiste en provocar que la sonda se deslice en el hidrogel hasta una distancia fija de 10 mm a una velocidad constante de 0,5 mm/s, y, después de 120 segundos de tiempo de espera, controlar la relajación de la muestra.

35 La medida de la fuerza de resistencia de compresión cuando se han cubierto 10 mm proporciona una cuantificación de la viscoelasticidad de cada muestra.

Los valores de viscosidad de ambas muestras LMW 35K y LMW 20K y sus diferentes composiciones se explican en la Tabla I y Tabla II siguientes. Los valores de la Tabla I se representan en los diagramas de las Figuras 1-4, mientras que los valores de las muestras 10NS y 10S de la Tabla II se representan en los diagramas de las Figuras 5 y 6.

40 Tabla I

Código Numérico	Formulación	Sonda	Fuerza promedio (g)
21 NS	LMW 35K, sin Vit. C – NO ESTÉRIL	P25	35,35
21 S	LMW 35K sin Vit. C – ESTÉRIL	P25	372,46
22 S	LMW 35K Vit.C 1 mM - ESTÉRIL	P25	34,34
23 S	LMW 35K Vit.C 2mM - ESTÉRIL	P25	17,66
Hidrogel LMW 35K (Bajo Peso Molecular): PEG 35 Kg/mol, HPMC K15M, Ascorbil Fosfato de Sodio (SAP), PBS1X			

Tabla II

8 NS	LMW 20K, sin Vit. C - NO ESTÉRIL	P25	35,38
10 NS	LMW 20K, Vit.C 2 mM - NO ESTÉRIL	P25	35,28
9 S	LMW 20K Vit.C 1 mM - ESTÉRIL	P25	32,41
10 S	LMW 20K Vit.C 2 mM - ESTÉRIL	P25	14,95
Hidrogel LMW 20K (Bajo Peso Molecular): PEG 20 Kg/mol, HPMC K15M, Ascorbil Fosfato de Sodio (SAP), PBS1X			

Las expresiones “NO ESTÉRIL” y “ESTÉRIL” designan las muestras antes y después de la aplicación de la radiación electromagnética, respectivamente.

- 5 Las tablas y diagramas muestran que la adición de concentraciones crecientes de ácido ascórbico limita la consistencia y la viscoelasticidad del hidrogel tras la aplicación de la radiación electromagnética.

Sin ácido ascórbico, la viscosidad tiende a alcanzar valores muy elevados, debido al elevado grado de polimerización de polietilenglicol (PEG), y a que la aptitud de inyección del hidrogel no queda garantizada.

- 10 Además, se aprecia que, para ambas preparaciones que comprenden polietilenglicol (PEG), la viscosidad permanece sustancialmente sin modificación antes y después de la aplicación de la radiación electromagnética, debido al efecto del ácido ascórbico a una concentración 1 mM.

Ejemplo 2

Preparación de hidrogel basado en poli(óxido de etileno) (PEO) y análisis de la consistencia y viscoelasticidad del hidrogel

- 15 Se preparó el hidrogel en primer lugar proporcionando un volumen predeterminado de una disolución acuosa, que depende de la cantidad final deseada y peso del hidrogel.

Preferentemente, la disolución acuosa consistió en una Disolución Salina Tamponada de Fosfato (PBS) a una concentración 1X.

- 20 Las cantidades predeterminadas de ácido ascórbico y/o sus derivados se solubilizaron posteriormente en PBS por medio de agitación magnética usando un agitador ARGOLAB M2-A en un vaso de precipitados a 300 rpm durante 10 minutos o hasta solubilización completa del ácido ascórbico y/o sus derivados.

Posteriormente, se pesaron los componentes sólidos, en particular los polímeros solubles en agua objeto de disolución posterior en la disolución acuosa.

- 25 En particular, se preparó una muestra que comprendía poli(óxido de etileno) (PEO), cuyo peso molecular fue de 400 kg/mol. A continuación, se añadió una cantidad constante de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) a la muestra.

Se mantuvo sustancialmente la proporción en peso de poli(óxido de etileno) PEO) con respecto a hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en un valor de 15:1 o menos.

Posteriormente, se añadieron lentamente los dos polímeros usando una espátula.

- 30 Mientras se añadían los polímeros, se mantuvo la disolución en agitación en un vaso de precipitados usando un agitador de columna de álabes fijos (ARGOLAB AM20-D) a 100 rpm.

Se agitó la mezcla durante 24 horas o hasta hidratación completa de los polímeros.

Se usaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico de manera que se pudo evaluar su efecto sobre la consistencia final y la viscoelasticidad del hidrogel.

- 35 Tras la solubilización de los polímeros, se distribuyó la mezcla obtenida de este modo en recipientes apropiados de plástico o vidrio, o se combinó con un sustituto de tejidos conjuntivos.

Posteriormente, se irradió la mezcla con radiación electromagnética de tipo β para favorecer la polimerización mediada por ácido ascórbico del poli(óxido de etileno) (PEO) y la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC).

Las muestras obtenidas de este modo experimentaron un ensayo para medir consistencia y viscoelasticidad usando el analizador de textura Stable Micro Systems TA.XT Plus.

En particular, se colocaron las muestras en vidrios de plástico cilíndricos y se llevó a cabo un ensayo de relajación y compresión usando una sonda cilíndrica apropiada P25.

5 El ensayo consiste en provocar que la sonda se deslice en el hidrogel hasta una distancia fija de 10 mm a una velocidad constante de 0,5 mm/s, y, después de 120 segundos de tiempo de espera, controlar la relajación de la muestra.

La medida de la fuerza de resistencia de compresión cuando se han cubierto 10 mm proporciona una cuantificación de la viscoelasticidad de cada muestra.

Los valores de viscosidad de las muestras y sus diferentes composiciones se explican a continuación en la Tabla III.

Los valores de la Tabla III se representan en los diagramas de las Figuras 7-10.

10

Tabla III

Código Numérico	Formulación	Sonda	Fuerza promedio (g)
14 NS	HMW, sin Vit. C – NO ESTÉRIL	P25	101,77
14S	HMW, sin Vit. C - ESTÉRIL	P40	178,19
15S	HMW Vit.C 0,5 mM - ESTÉRIL	P40	150,84
16S	HMW Vit.C 2 mM - ESTÉRIL	P40	132,18
Hidrogel HMW (Peso Molecular Elevado): PEO 400 Kg/mol, HPMC K15M, Ascorbil Fosfato de Sodio (SAP), PBS1X			

Las tablas y diagramas muestran que la adición de concentraciones crecientes de ácido ascórbico limita y reduce progresivamente la consistencia y viscoelasticidad del hidrogel tras la aplicación de radiación electromagnética.

Sin ácido ascórbico, la viscosidad tiende a alcanzar valores muy elevados, debido al elevado grado de polimerización del poli(óxido de etileno) (PEO).

15 El método, el hidrogel y la formulación de la invención son susceptibles de muchos cambios y variantes dentro del principio de la invención divulgado en las reivindicaciones anexas.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención encuentra aplicación industrial en el campo de los dispositivos médicos y biomateriales para su uso terapéutico y/o médico/cosmético, y en particular en el campo de los biomateriales para la implantación en el cuerpo humano como sustitutos de tejidos conjuntivos.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de preparación de un hidrogel para su uso como vehículo y/o sustituto de tejido conjuntivo, que comprende las etapas de:
- proporcionar una cantidad predeterminada de una disolución acuosa;
- 5 - añadir una cantidad predeterminada de agente regulador de polimerización a dicha disolución acuosa, para regular la polimerización de un primer polímero soluble en agua polimerizable por radiación electromagnética;
- añadir, hidratar y/o solubilizar una cantidad predeterminada de dicho primer polímero soluble en agua en dicha disolución acuosa, para obtener una mezcla;
- 10 - añadir, hidratar y/o solubilizar un segundo polímero soluble en agua polimerizable por radiación electromagnética, diferente del primero, en dicha mezcla;
- aplicar una radiación electromagnética de frecuencia predeterminada a dicha mezcla, para lograr la polimerización de dicho primer polímero y dicho segundo polímero con una viscosidad predeterminada, y para obtener un hidrogel estéril;
- 15 caracterizado por que dicho segundo polímero soluble en agua no es reactivo con dicho agente regulador y tiene un grado de polimerización que varía de acuerdo con el impedimento estérico intermolecular de las cadenas de dicho primer polímero, estando seleccionado dicho primer polímero soluble en agua entre un primer grupo que comprende polietilenglicol (PEG) o entre un segundo grupo que comprende poli(óxido de etileno) (PEO), variando el porcentaje en peso de dicho primer polímero soluble en agua de un 1% a un 20%, basado en el peso total del hidrogel, estando
- 20 seleccionado dicho segundo polímero soluble en agua entre el grupo que comprende hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilcelulosa (EC), metilcelulosa (MC), variando el porcentaje en peso de dicho segundo polímero soluble en agua de un 0,1% a un 10%, preferentemente de un 0,5% a un 5%, basado en el peso total del hidrogel, estando seleccionado dicho agente regulador entre el grupo que comprende ácido ascórbico, carotenoides, ácido lipoico, vitaminas E, D, B y glutatión, siendo la concentración de dicho agente regulador en la mezcla de 100 mM o menos.
- 25 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho primer polímero soluble en agua está seleccionado entre un primer grupo que comprende polietilenglicol y tiene un peso molecular que varía de 10 Kg/mol a 100 Kg/mol, preferentemente de 10 Kg/mol a 40 Kg/mol, para que dicho hidrogel sea de tipo inyectable.
- 30 3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho primer soluble en agua está seleccionado entre un segundo grupo que comprende poli(óxido de etileno) y tiene un peso molecular que varía de 100 Kg/mol a 1000 Kg/mol, preferentemente de 100 Kg/mol a 600 Kg/mol, para que dicho hidrogel sea sustancialmente semisólido y pre-conformable.
- 4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho agente regulador está seleccionado entre el grupo que comprende ácido ascórbico, estando adaptado dicho agente regulador para reducir el grado de polimerización de dicho primer polímero soluble en agua a medida que aumenta su concentración en la mezcla.
- 35 5.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicha radiación electromagnética tiene una frecuencia que se encuentra dentro del intervalo de radiaciones ionizantes, y está preferentemente próxima al espectro de frecuencia de rayos β .
- 40 6.- Un hidrogel para su uso como vehículo y/o sustituto de tejido conjuntivo, que comprende una disolución acuosa, un primer polímero soluble en agua polimerizado en dicha disolución acuosa, un segundo polímero soluble en agua, diferente del primero, y una cantidad predeterminada de un agente regulador para regular el grado de polimerización de dicho primer polímero en dicha disolución acuosa, caracterizado por que dicho primer polímero soluble en agua está seleccionado para ser reactivo con dicho agente regulador y dicho segundo polímero soluble en agua está
- 45 seleccionado para ser no reactivo con el agente regulador y para tener un grado de polimerización influenciado por el impedimento estérico intermolecular de las cadenas de dicho primer polímero soluble en agua, estando seleccionado dicho primer polímero soluble en agua entre un primer grupo que comprende polietilenglicol (PEG) o entre un segundo grupo que comprende poli(óxido de etileno) (PEO), variando el porcentaje en peso de dicho primer
- 50 polímero soluble en agua de un 1% a un 20% basado en el peso total del hidrogel, estando seleccionado dicho segundo polímero soluble en agua entre el grupo que comprende hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilcelulosa (EC), metilcelulosa (MC), variando el porcentaje en peso de dicho primer polímero soluble en agua de un 1% a un 20%, basado en el peso total del hidrogel, estando seleccionado dicho agente regulador entre el grupo que comprende ácido ascórbico, carotenoides, ácido lipoico, vitaminas E, D, B y glutatión, siendo la concentración de dicho agente regulador de 100 mM o menos, variando el porcentaje en peso de dicho segundo polímero soluble en agua de un 0,1% a un 10%, preferentemente de un 0,5% a un 5%, basado en el peso total del hidrogel.

7.- Un hidrogel de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que dicho polímero soluble en agua es no reactivo para dicho agente regulador y por que dicho segundo polímero tiene un grado de polimerización que varía de acuerdo con el impedimento estérico intermolecular de las cadenas de dicho primer polímero.

5 8.- Una formulación diseñada para su uso como vehículo para células y/o tejidos conjuntivos de origen autólogo, heterólogo o sintético y/o moléculas bioactivas, que comprende un hidrogel de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 y 7.

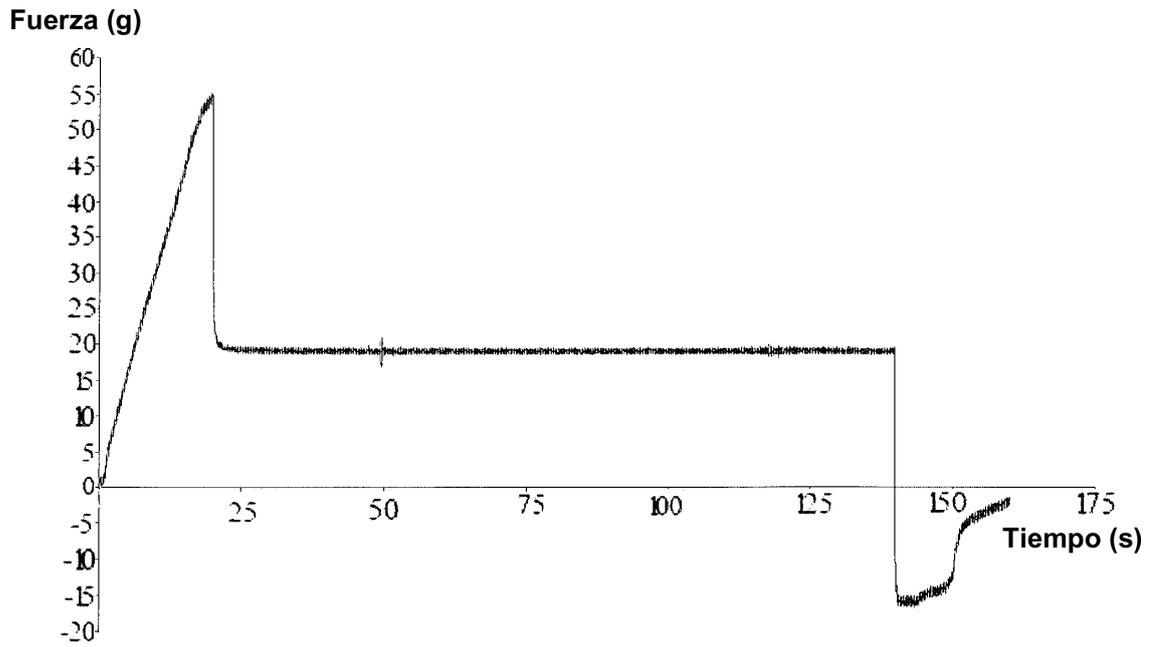


FIG. 1

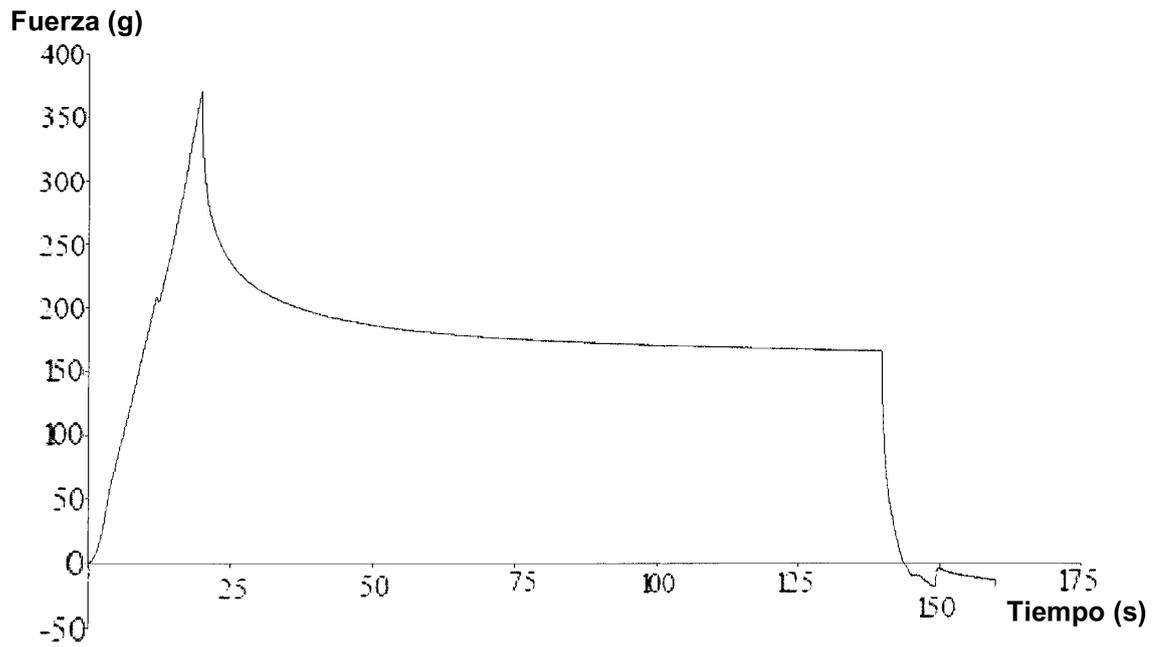


FIG. 2

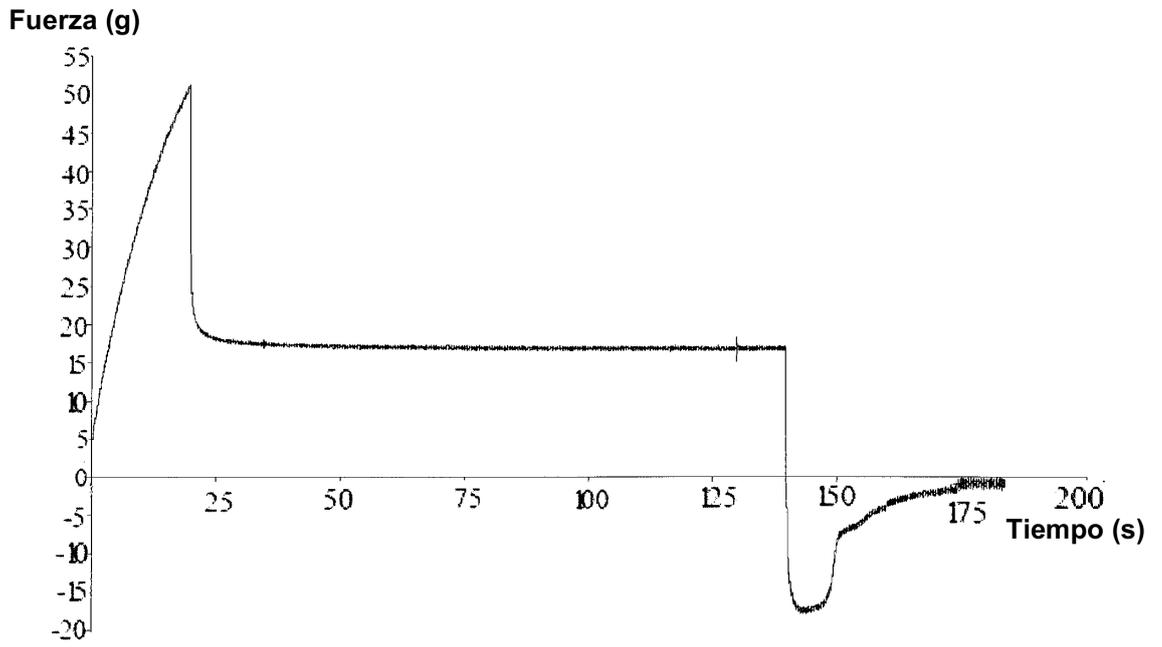


FIG. 3

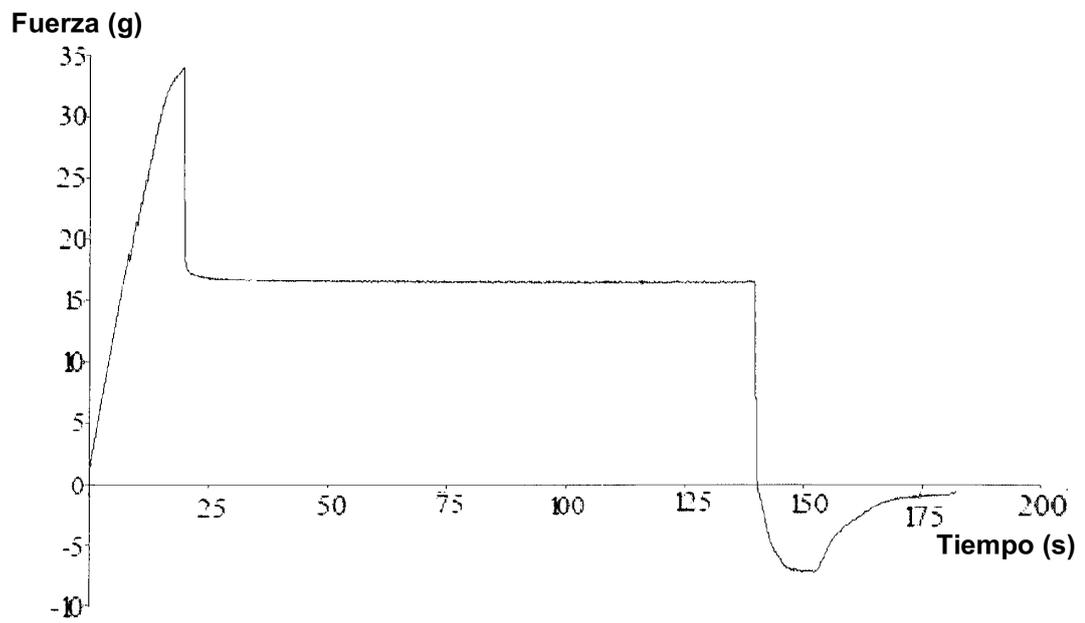


FIG. 4

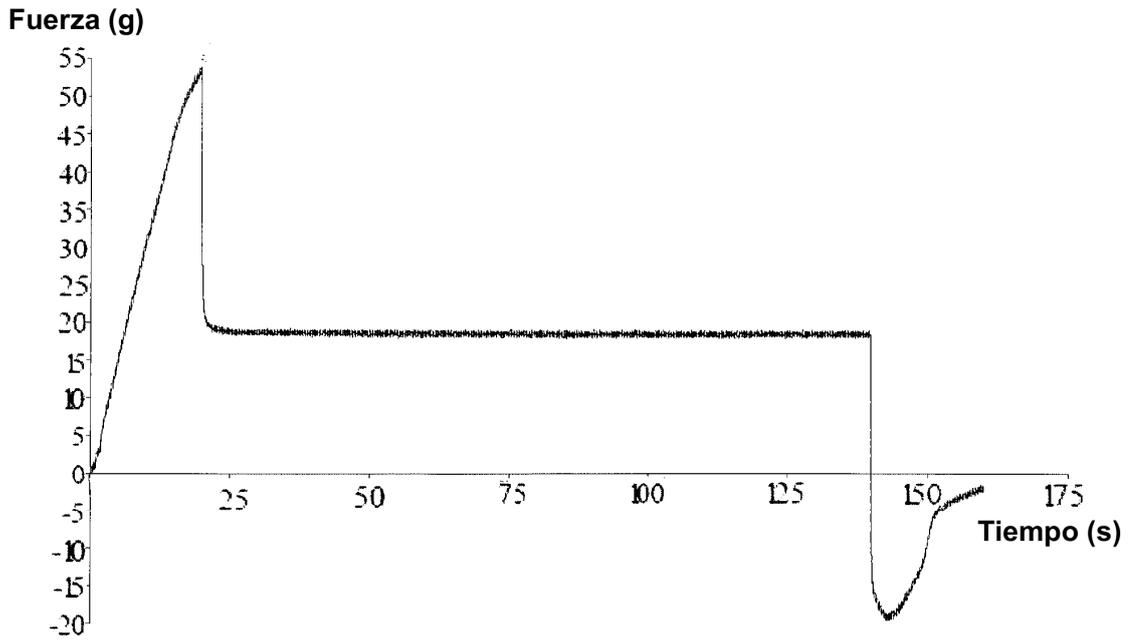


FIG. 5

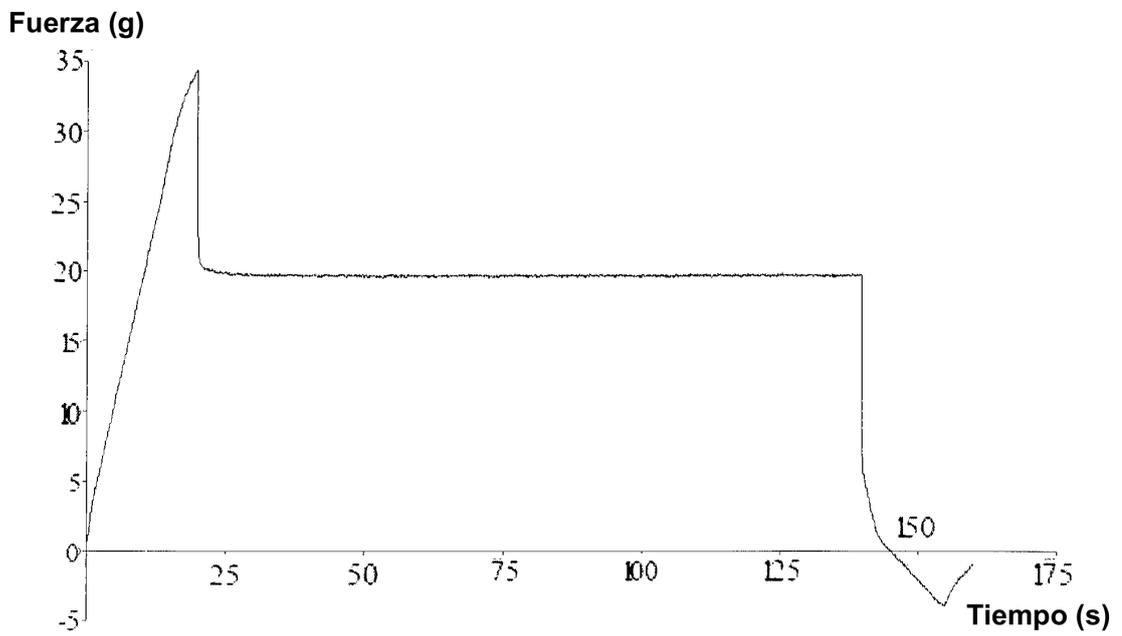


FIG. 6

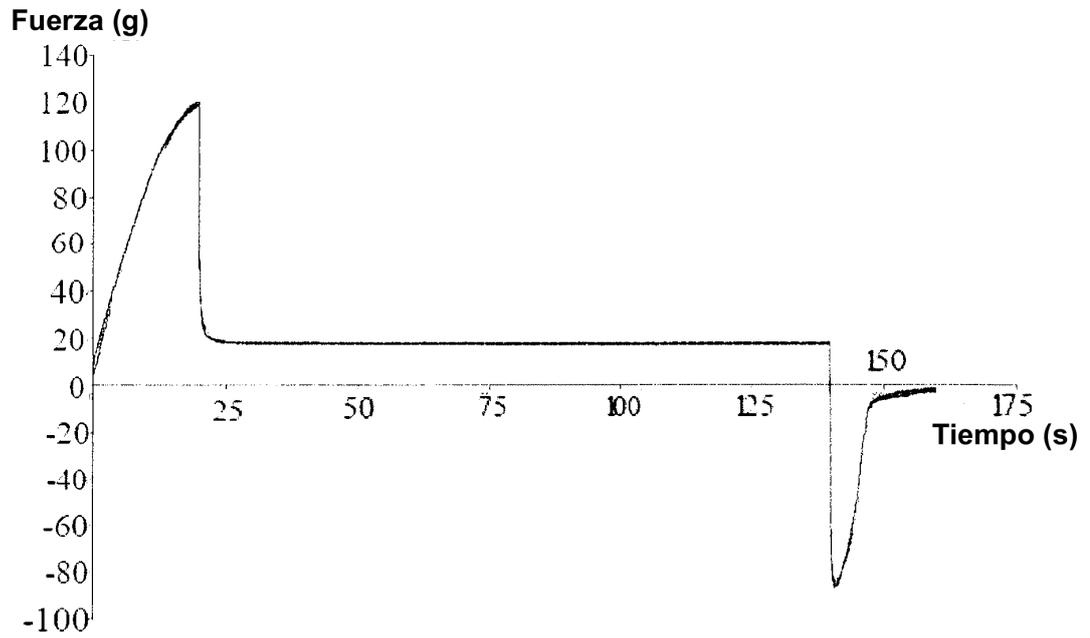


FIG. 7

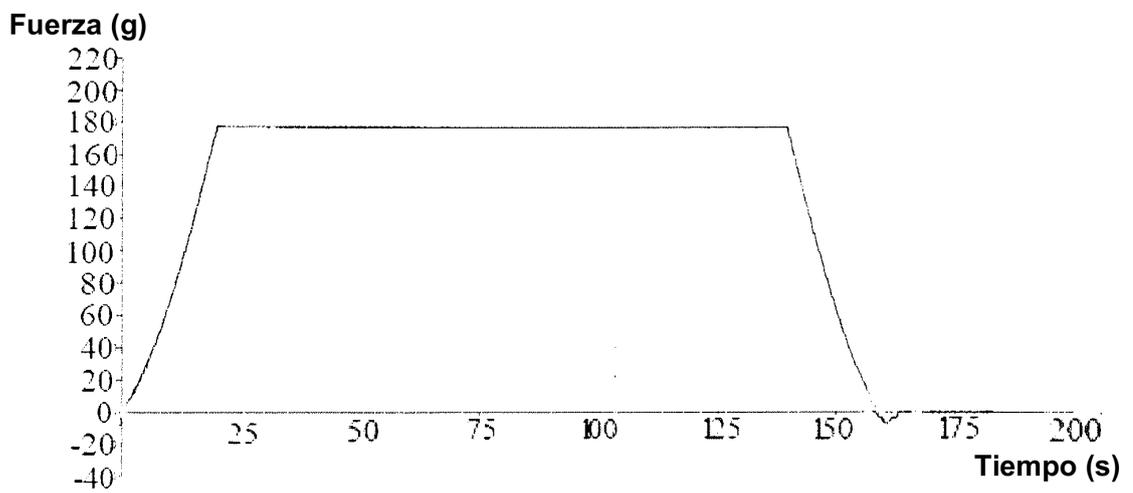


FIG. 8

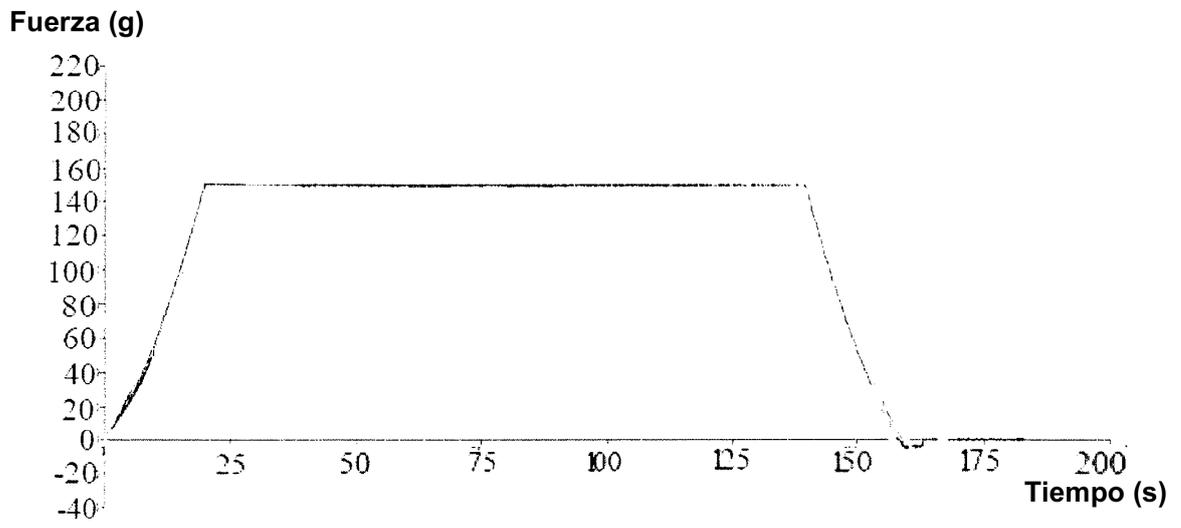


FIG. 9

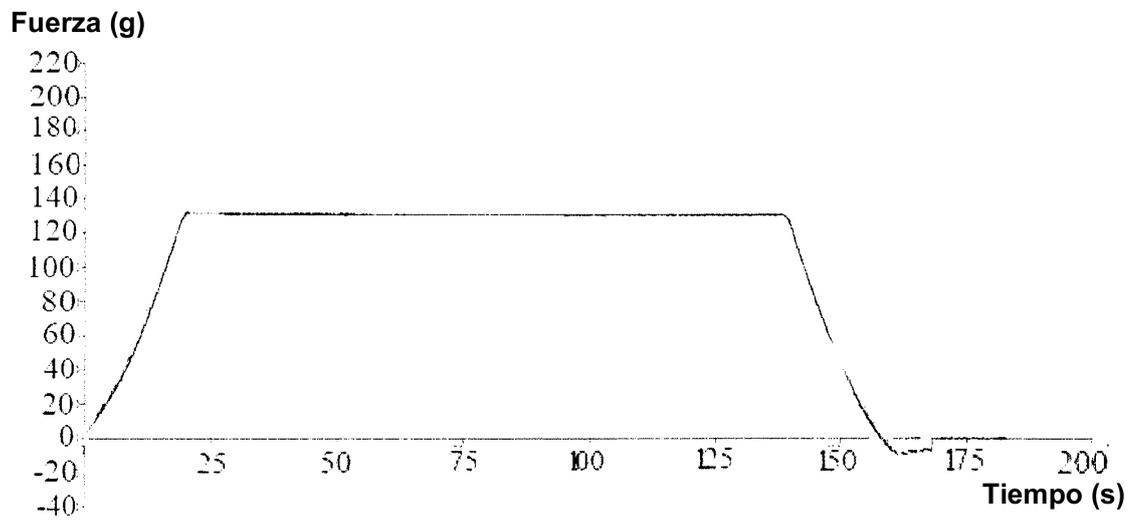


FIG. 10