



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 368 307**

② Número de solicitud: 201030624

⑤ Int. Cl.:

C08L 1/00 (2006.01) **C08L 3/00** (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01) **C08L 101/14** (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) **A61K 9/51** (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) **A61K 47/18** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.04.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.11.2011

⑦ Solicitante/s: **Universidade de Santiago de Compostela** (Titular al 50%)
Centro de Innovación e Transferencia de Tecnoloxía Edificio EMPRENDIA, Campus Sur 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Università degli Studi di Roma, La Sapienza (Titular al 50%)

⑦ Inventor/es: **López Cebal, Rila;**
Seijo Rey, Begoña;
Sánchez Barreiro, Alejandro;
Casadei, Maria Antonietta y
Paolicelli, Patrizia

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Hidrogeles elaborados a base de polímeros aniónicos de origen natural.**

⑤ Resumen:

Hidrogeles elaborados a base de polímeros aniónicos de origen natural.

La presente invención se refiere a hidrogeles que comprenden: (a) al menos un polímero de origen natural dotado de carga eléctrica negativa; (b) al menos una molécula constituyente natural del organismo humano capaz de actuar como reticulante catiónico del polímero o los polímeros anteriores. Al uso de los mismos como medicamentos o en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa, o con aplicaciones cosméticas, de higiene, nutricionales y de recubrimiento de superficies así como a procedimientos para su preparación.

ES 2 368 307 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles elaborados a base de polímeros aniónicos de origen natural.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo de hidrogeles que comprenden al menos un polímero de origen natural dotado de carga eléctrica negativa y al menos una molécula constituyente natural del organismo humano capaz de actuar como reticulante catiónico del polímero anterior sin establecer enlaces químicos con el mismo.

10 El carácter natural y las especiales propiedades de los componentes habilita nuevos usos a los geles constituidos de los mismos, bien sea por sí mismos o bien asociando ingredientes activos.

Además la presente invención se refiere al desarrollo de un procedimiento para la preparación de este tipo de hidrogeles y a los usos de los mismos.

15 Antecedentes de la invención

Los sistemas poliméricos de tipo hidrogel presentan un enorme potencial claramente reconocido en numerosos campos habiendo despertado un gran interés sobre todo en el ámbito biomédico y cosmético. Sin embargo, pese a los grandes avances experimentados en el diseño de hidrogeles y la enorme versatilidad de algunos de ellos, en la actualidad el potencial de los hidrogeles disponibles se encuentra limitado en algunos campos. Entre estos campos hay que señalar por su enorme interés y repercusiones tan importantes en la salud y economía, el de la ingeniería de tejidos. Concretamente, y a pesar de los significativos avances que ha experimentado este campo, existen desafíos que deben de resolverse si se pretende conseguir una aplicación clínica amplia. Dichos desafíos incluyen la necesidad de disponer de hidrogeles con propiedades mecánicas, químicas y biológicas adecuadas (Khademhosseini *et al.*, PNAS 103, 2006, 2480-2487). Dos son las estrategias a seguir para abordar este desafío, que pueden ser desarrolladas por separado o de modo combinado. Por un lado, la síntesis de nuevos materiales que permitan el desarrollo de geles con características más ventajosas (Langer, *Molecular Therapy*, 1, 2000, 12-15). En este sentido, en los últimos años se ha llevado a cabo el desarrollo de numerosos polímeros con tal finalidad. Por otro lado, el desarrollo de estrategias de elaboración de hidrogeles que permitan aprovechar el potencial de biomateriales de reconocido interés, pero que con las técnicas actuales de elaboración de hidrogeles no pueden ser incorporados en un hidrogel de modo eficaz. Esta segunda estrategia se caracteriza por haber sido escasamente explorada.

Un ejemplo ilustrativo de la situación y limitaciones anteriormente descritas es el correspondiente a los hidrogeles basados en ácido hialurónico. Este es un biomaterial constituyente natural de nuestro propio organismo, conocido por su biodegradabilidad y bioresistencia y su papel en funciones celulares como la adhesión, proliferación y migración, con el consiguiente potencial en ingeniería de tejidos. No obstante, las técnicas de elaboración de hidrogeles actualmente disponibles hacen necesaria su modificación química para poder ser integrado eficazmente en un hidrogel. Es evidente que esta necesidad hace que el producto finalmente empleado no sea ya el constituyente de nuestro propio organismo, sino un producto semisintético sobre el cual habrá que aplicar los criterios de las correspondientes agencias regulatorias antes de pensar en su utilización. Esto ocurre por ejemplo con el hialurónico-metacrilato propuesto recientemente por Gerecht *et al.* (Gerecht *et al.*, PNAS 104, 2007, 11298-11303), quienes también han desarrollado dextrano-metacrilato y polietilenglicol-diacrilato con similar objetivo (Yeh *et al.*, *Biomaterials* 27, 2006, 5391-5398).

45 Tal y como señalan los autores citados anteriormente, una de las técnicas de elaboración de hidrogeles consiste en la reticulación iónica. Esta técnica posee interesantes ventajas, destacando por su suavidad y por ser una técnica rápida, económica, fácilmente reproducible y escalable y que requiere de una tecnología muy simple, aspectos todos ellos de indudable interés para la industria. Con dicha técnica es posible elaborar hidrogeles a base de alginato, material que se retícula iónicamente con iones calcio dando lugar a estructuras insolubles en medio acuoso. No obstante, no ha sido desarrollada para la elaboración de hidrogeles basados en otros materiales de origen natural, con los que únicamente es posible obtener complejos con calcio suspendidos en medios acuosos, pero no sistemas hidrogel. De este modo, para la obtención de auténticos hidrogeles es necesario recurrir a reticulación covalente mediada por agentes químicos como glutaraldehído o carbodiimida cuando lo que se pretende es obtener hidrogeles constituidos por otros biopolímeros hidrosolubles (Ikada, *J.R. Soc. Interface* 3, 2006, 589-601) (Tabata, *J.R. Soc. Interface* 6, 2009, S311-S324). Esta característica ha conducido a una situación de cierto olvido de la reticulación iónica incluso en revisiones que describen las técnicas de elaboración de hidrogeles para ingeniería de tejidos (Khademhosseini and Langer, *Biomaterials* 28, 2007, 5087-5092) (Tabata, *J.R. Soc. Interface* 6, 2009, S311-S324).

No obstante, es necesario recordar que la reticulación química covalente presenta serios inconvenientes. Concretamente, es una técnica que se basa en la formación de enlaces covalentes estabilizantes debido al empleo de agentes del grupo de los aldehídos, que se caracterizan por su toxicidad y por no ser aceptados para su empleo en humanos. Además, este tipo de agentes pueden dar lugar también a la reticulación e inactivación de la propia molécula bioactiva que se pretende asociar al sistema, sobre todo si se trata de moléculas con grupos amino, como en el caso de péptidos y proteínas, tales como factores de crecimiento celular. Todos estos problemas de los aldehídos y agentes reticulantes químicos se encuentran descritos en la literatura.

65 En base a lo anteriormente expuesto, los inventores han desarrollado un nuevo tipo de geles que únicamente pueden ser desarrollados utilizando constituyentes de nuestro propio organismo a modo de reticulantes catiónicos.

A diferencia de geles como los de alginato, que sí pueden ser reticulados empleando iones inorgánicos, la utilización de tales compuestos permite desarrollar hidrogeles con una gran variedad de componentes que presentan las siguientes características y aportan a los geles formados las ventajas que se mencionan a continuación:

5 - El hialurónico o condroitina no sólo son altamente biocompatibles, sino que también presentan actividad por sí mismos sin necesidad de asociar ningún ingrediente activo. De hecho, además de su reconocido potencial en cosmética y estética, se ha descrito la utilización de hialurónico para el tratamiento de osteoartritis y en la preparación de lágrimas artificiales, encontrándose comercializadas varias de estas formulaciones. Por otro lado, el ácido hialurónico y la condroitina presentan la capacidad de estimular la proliferación celular a través de interacciones con receptores
10 celulares como el CD44 y de proteger al ADN frente a reacciones de oxidación (Zhao *et al.*, International Journal of Oncology, 32, 2008, 1159-1167), interacción que puede ser utilizada para dirigir sistemas elaborados a base de dichos componentes hacia células que sobre-expresan dicho receptor, como es el caso de muchas células tumorales (Tool, Nature reviews, 4, 2004, 528-539).

15 - Además de actuar como potenciales reticulantes catiónicos, Las aminos de origen natural empleadas como reticulantes son componentes naturales de las células y fluidos corporales y desempeñan un papel fundamental en los procesos de proliferación y diferenciación celular y de síntesis de macromoléculas biológicas. Además, recientemente ha sido descrito su capacidad de inhibir el stress oxidativo en seres vivos y promover su longevidad (Eisenberg *et al.*, Nature Cell Biology, 4 October 2009, doi:10.1038/ncb1975). Aunque las células son capaces de sintetizar las aminos
20 que necesitan para los procesos de crecimiento celular, han sido descritos mecanismos de internalización celular que les permiten obtener estas aminos del torrente sanguíneo. Estos mecanismos están influenciados por proteoglicanos como el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico (Belting M. *et al.* Biochem J 1999, 338, 317-323). Por lo tanto, parece lógico suponer un efecto biológico sinérgico entre los propios constituyentes de los geles objeto de la presente invención y los agentes reticulantes empleados en su elaboración, sin necesidad de que se encuentre presente de otro
25 tipo de ingrediente activo.

Lo anteriormente expuesto supone una clara ventaja en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa e incluso cosmética. Por otro lado, la presencia de espermina o espermidina permite la incorporación en la composición de los geles de material genético, debido a la conocida capacidad que presentan de interacción con dicho material (Rider
30 *et al.*, Amino Acids, 33, 2007, 231-240). La posibilidad de incorporación de material genético resulta especialmente atractiva, teniendo en cuenta que se trata de moléculas bioactivas de enorme versatilidad. Ello ha conducido a que, en los últimos años se haya sugerido el interés de desarrollar plataformas capaces de liberar plásmidos ADN conteniendo genes que codifican factores de crecimiento (Griffith and Naughton, Science 295, 2002, 1009-1014), habida cuenta de la frágil naturaleza de las proteínas en general y de dichos factores en particular.

35 - Los hidrogeles de la presente invención permiten la incorporar entre los componentes de los hidrogeles, moléculas proteicas. Este hecho resulta de particular interés. Por un lado, la incorporación de proteínas como la albúmina facilita la asociación de moléculas bioactivas, especialmente las moléculas lipofílicas, debido a la conocida capacidad de unión de muchos fármacos a esta proteína plasmática (Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,
40 McGraw Hill; Maham A *et al.* Protein-based nanomedicine platforms for drug delivery. Small. 5, 2009, 1706-21) Esto representa una clara ventaja a las ya aportadas por hidrogeles convencionales, habida cuenta que éstos se caracterizan por el elevado contenido en agua y por la consiguiente dificultad de asociar a los mismos moléculas lipofílicas (Peppas *et al.*, Eur J Pharm Biopharm. 50, 2000, 27-46). Por otro lado, las proteínas incorporadas pueden tener especial interés en medicina regenerativa o ingeniería de tejidos.

45 Así, por ejemplo, existen proteínas con actividad enzimática, como la catalasa y la superóxido dismutasa, que son las encargadas de eliminar de las células las denominadas "especies de oxígeno reactivas" o "ROS", generadas en las células como resultado de la utilización del oxígeno con fines metabólicos, y que pueden causar daños a proteínas y a lípidos intracelulares, los cuales pueden conducir incluso a la muerte celular. Estas enzimas son muy eficientes eliminando de las células elevadas cantidades de las mencionadas ROS, lo cual es especialmente importante en situaciones
50 en las que los niveles de producción de estas sustancias se ven aumentados, como ocurre cuando las células de un tejido se ven sometidas a algún tipo de estrés o contaminación por microorganismos (Li, Z *et al.* Published-Ahead-of-Print on October 15, 2009 by Journal of Andrology; Shukla MR. Journal of Basic Microbiology 2009, 49, 1-5; Siwale, RC *et al.* Journal of Drug Targeting, 2009; 17(9): 710-718).

55 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevos hidrogeles de origen natural caracterizados por su simplicidad, versatilidad y por la posibilidad que presentan de incorporar en exclusiva biomateriales que son constituyentes naturales del propio organismo humano. De este modo, la presente invención se dirige a la elaboración de sistemas de tipo hidrogel
60 con aplicaciones tanto biomédicas como cosméticas, de higiene, nutricionales y de recubrimiento de superficies.

El término hidrogel hace referencia a una estructura macromolecular tridimensional hinchada con un medio acuoso que resulta insoluble en dicho medio, debido a que su disposición como entramado reticulado *Encyclopedia of
65 Controlled Drug Delivery (Edith Mathiowitz, Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999)*. Esta definición engloba a estructuras que presentan numerosas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, entre otras. No obstante, es necesario precisar que esta definición no incluye a nanoagregados o microagregados poliméricos que podrían ser encuadrados dentro de conceptos más recientes como los de micro o nanohidrogeles.

ES 2 368 307 A1

A diferencia de lo que ocurre con polímeros como el alginato, que es posible gelificar recurriendo a iones inorgánicos, con los polímeros naturales empleados en la presente invención únicamente es posible llevar a cabo su reticulación bajo la forma de un hidrogel y no un simple complejo en suspensión en un medio líquido, mediante la utilización de compuestos aminados, como la espermina y espermidina. La utilización de tales compuestos, además de resultar indispensable para la formación de los mencionados hidrogeles, aporta a los mismos las ventajas que se mencionan a continuación:

- Permiten la obtención de geles constituidos por biomateriales constitutivos de nuestro propio organismo, como el hialurónico o condroitina, que hasta la fecha sólo podían incorporarse en geles previa modificación de los mismos para dar lugar a productos semisintéticos o mediante el empleo de ingredientes conocidos por su toxicidad. Los inventores han comprobado que los reticulantes iónicos clásicos como el calcio no permiten tal desarrollo, como se recoge en los correspondientes ejemplos. La ventaja del citado desarrollo se encuentra relacionada no sólo con la biocompatibilidad de los materiales mencionados, sino también con las propias características que presentan los mismos de por sí y sin necesidad de asociar ningún ingrediente activo, que los hace útiles en el tratamiento de osteoartritis y en la preparación de lágrimas artificiales, encontrándose comercializadas varias de estas formulaciones.

- Supone la presencia en los hidrogeles de las citadas aminos de origen natural, para las cuales se han descrito la capacidad de inhibir el stress oxidativo en seres vivos y promover su longevidad. Esto supone una clara ventaja en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa e incluso cosmética.

- Permite la incorporación en la composición de los geles de proteínas como la albúmina, que a su vez facilita la asociación de moléculas bioactivas lipofílicas. Esto representa una clara ventaja a las ya aportadas por hidrogeles convencionales, habida cuenta que éstos se caracterizan por la dificultad de asociar a los mismos moléculas lipofílicas.

- Permite la incorporación en la composición de los geles de proteínas como la catalasa y la superóxido dismutasa, lo cual puede tener especial interés en medicina regenerativa o ingeniería de tejidos, debido a sus especiales propiedades.

- Permite la incorporación en la composición de los geles de material genético, habida cuenta de la conocida capacidad que presentan de interacción con dicho material.

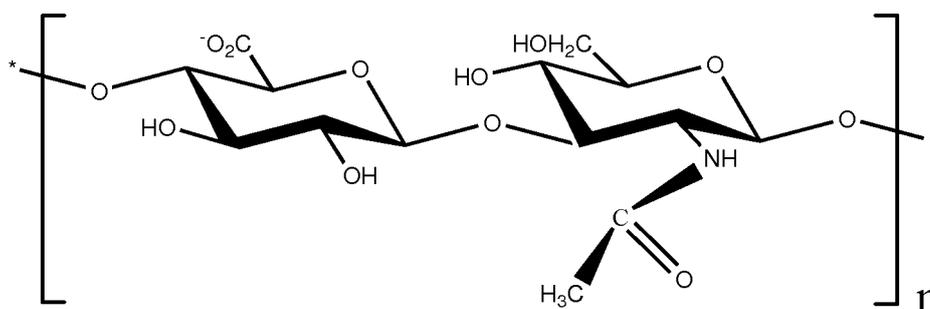
Por lo tanto un primer aspecto esencial de la invención se refiere a hidrogeles naturales que comprenden los siguientes elementos:

- (a) al menos un polímero aniónico de origen natural; y
- (b) al menos un agente reticulante catiónico de origen natural;

donde los componentes se encuentran entrecruzados mediante interacciones de tipo electrostático.

Por el término “*polímero aniónico*” se entiende cualquier polímero, preferiblemente de origen natural, con una carga neta negativa, incluyendo en dicha definición aquellos polímeros aniónicos sobre los que se han efectuado modificaciones tales como fragmentación enzimática o química o derivatización. El polímero aniónico se selecciona del grupo formado por ácido hialurónico o sales del mismo, ácido colomínico o derivados, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dextrano, heparina, carragenina, glucomanano, goma gelano, así como fragmentos de los mismos o derivados de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

El hialuronano es un polímero lineal que comprende la repetición de una estructura de disacárido formada por la adición alterna de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos alternando enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glucosídicos tal como se muestra en la siguiente fórmula:



en la que el número entero n representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacárido en la cadena de hialuronano.

En el contexto de la presente invención, se puede emplear ácido hialurónico con un amplio intervalo de pesos moleculares. El ácido hialurónico de elevado peso molecular está comercialmente disponible, mientras que el de peso molecular inferior puede obtenerse mediante la fragmentación del ácido hialurónico de elevado peso molecular, utilizando, por ejemplo, una enzima hialuronidasa.

5

El término "hialurónico, ácido hialurónico, hialuronano" tal como se utiliza en la presente descripción incluye o bien el ácido hialurónico o bien una base conjugada del mismo (hialuronato). Esta base conjugada puede ser una sal alcalina del ácido hialurónico que incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, sales orgánicas tales como sales de aminoácidos básicos a pH neutro, preferiblemente dichas sales son farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la invención, la sal alcalina es la sal de sodio del ácido hialurónico.

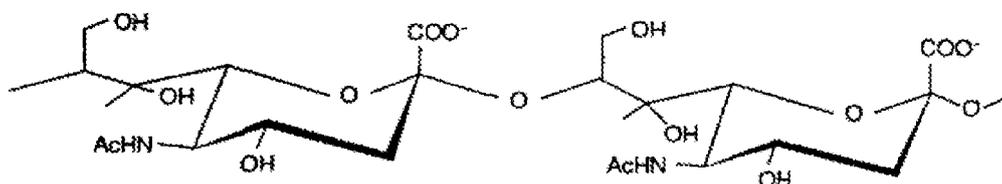
10

El ácido colomínico es un polímero perteneciente a la familia de los ácidos polisialícos, polímeros naturales de origen bacteriano. Es un polímero lineal constituido por residuos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac; también conocido como ácido siálico), un constituyente natural de células y tejidos, unidos por enlaces glicosídicos α -(2 \rightarrow 8).

15

Cada residuo de ácido N-acetilneuramínico posee un grupo carboxilo, responsable de la carga negativa del ácido colomínico, tal y como se muestra en la siguiente fórmula:

20



25

30

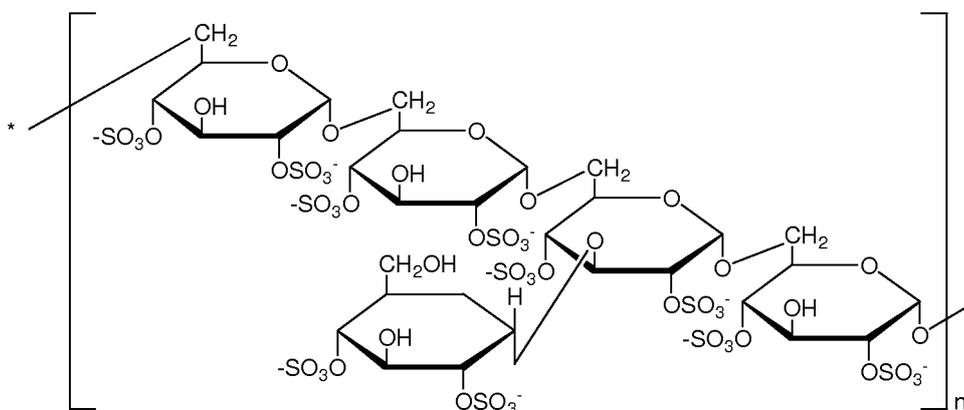
Se trata de un material de indudable interés en el campo farmacéutico y cosmético, por ser biocompatible y biodegradable, no inmunogénico, cuyos productos de degradación no son tóxicos (Gregoriadis G *et al.* Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57, 1964-1969). Por otro lado, los ácidos polisialícos están caracterizados por tener, entre otras propiedades, una semivida plasmática muy larga, por lo que han sido propuestos como alternativa a los derivados de polietilenglicol para prolongar el tiempo de permanencia en el plasma de fármacos y sistemas de liberación de moléculas bioactivas, como los liposomas. De hecho, en la patente "WO/2008/033253 - Liposome complexes containing pharmaceutical agents and methods" se recurre a su empleo para modificar en superficie liposomas preformados. Por último, teniendo en cuenta sus características estructurales, este material ofrece la posibilidad de su modificación, por ejemplo de la introducción de grupos amino y consiguiente cationización.

35

40

El sulfato de dextrano es un glucano (polisacárido) complejo constituido por unidades de moléculas de glucosa, cada una de las cuales contiene aproximadamente dos grupos sulfato tal como se muestra en la siguiente fórmula:

45



50

55

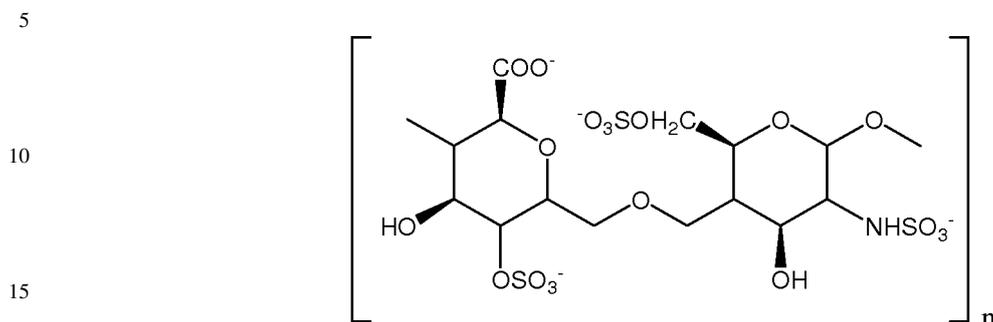
60

65

El sulfato de dextrano se prepara mediante sulfatación de dextrano y posterior purificación mediante procedimientos de sobra conocidos por un experto en la materia.

ES 2 368 307 A1

La heparina es una sustancia de origen natural de la familia de los glicosaminoglicanos cuya estructura química comprende la repetición de unidades monoméricas disacáridas de ácido 2-O-sulfo- α -L-idurónico y 2-deoxi-2-sulfamido- α -D-glucopiranosil-6-O-sulfato, representada a continuación:



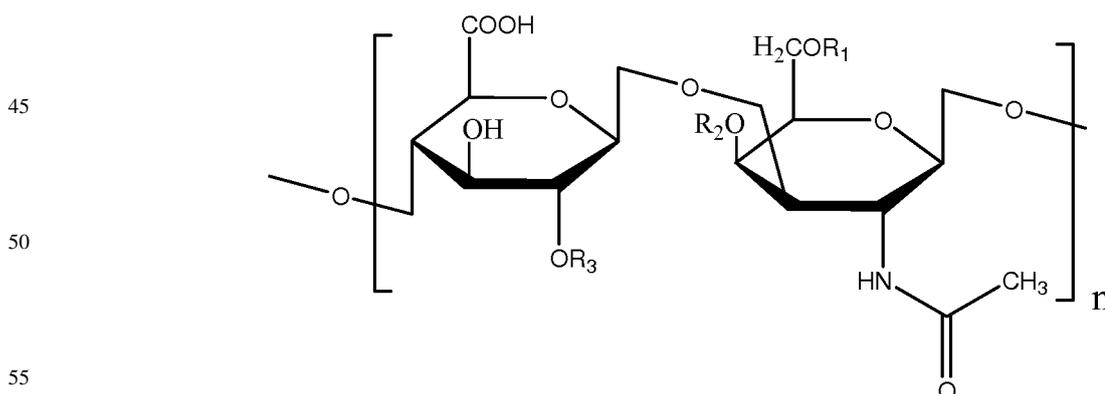
20 donde n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de heparina.

25 En el contexto de la presente invención, es posible emplear tanto la heparina fraccionada como la no fraccionada. La heparina tradicional o no fraccionada se distingue claramente de la heparina fraccionada o de bajo peso molecular. La primera de ellas es una sustancia natural presente en todos los vertebrados. Ambos tipos de heparina se pueden utilizar en forma de base libre o en forma de sal, como por ejemplo su sal sódica o cálcica.

30 La heparina fraccionada o de bajo peso molecular se produce por despolimerización química o enzimática de heparinas convencionales. Ejemplos de este tipo de heparinas son enoxaparina, parnaparina, dalteparina y nadroparina, así como sus sales tales como las sales de sodio y calcio.

35 Los derivados de heparina también pueden ser empleados en la composición de las nanopartículas de la presente invención. Estos derivados son conocidos en el estado de la técnica y se originan como consecuencia de la reactividad de los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. Así, heparinas *N*-acetiladas, *O*-descarboxiladas, oxidadas o reducidas son ampliamente conocidas.

40 El sulfato de condroitina es un glicosaminoglucano (GAG) sulfatado compuesto por una cadena de azúcares alternados. Se encuentra normalmente unido a proteínas como parte de un proteoglucano. Se representa mediante la siguiente estructura:



60 en la que n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades de disacáridos en la cadena de sulfato de condroitina y en la que R_1 , R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno o un grupo SO_3H . Cada monosacárido puede dejarse sin sulfatar, sulfatarse una vez, o sulfatarse dos veces. La sulfatación está mediada por sulfotransferasas específicas.

65 En el contexto de la presente invención, el término "sulfato de condroitina" incluye todos sus diferentes isómeros y derivados, así como combinaciones de los mismos.

ES 2 368 307 A1

En una realización particular, el sulfato de condroitina se selecciona entre las siguientes sustancias y combinaciones de las mismas:

- sulfato de condroitina A que está sulfatado predominantemente en el carbono 4 del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) y que también se conoce como sulfato de 4-condroitina ($R_1=H$, $R_2=SO_3H$ y $R_3=H$).
- sulfato de condroitina B que se denomina también sulfato de dermatano. Esta sustancia está compuesta por unidades de repetición lineales que contienen N-acetilgalactosamina y o bien ácido L-idurónico o bien ácido glucurónico, y cada disacárido puede estar sulfatado una vez o sulfatado dos veces. Está presente mayoritariamente en la piel, pero también se encuentra en vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendones y pulmones.
- sulfato de condroitina C que está sulfatado predominantemente en el carbono 6 del azúcar GalNAc y que se conoce también como sulfato de 6-condroitina ($R_1=SO_3H$, $R_2=H$ y $R_3=H$);
- sulfato de condroitina D que está sulfatado predominantemente en el carbono 2 del ácido glucurónico y en el carbono 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 2,6-condroitina ($R_1=SO_3H$, $R_2=H$ y $R_3=SO_3H$);
- sulfato de condroitina E que está sulfatado predominantemente en los carbonos 4 y 6 del azúcar GalNAc y se conoce también como sulfato de 4,6-condroitina ($R_1=SO_3H$, $R_2=SO_3H$ y $R_3=H$).

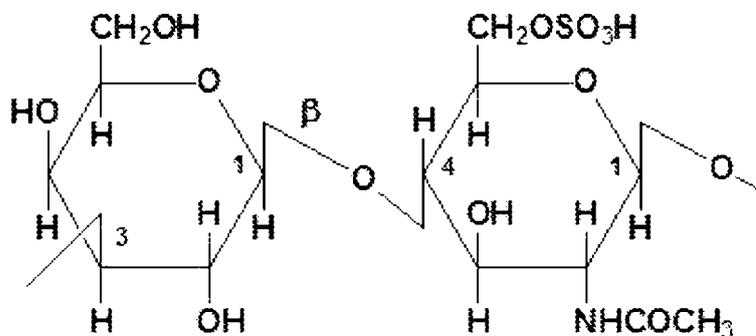
El término "sulfato de condroitina" también incluye sales orgánicas e inorgánicas del mismo. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, mediante reacción de la forma básica de este compuesto con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales inorgánicas incluyen, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y las sales orgánicas incluyen, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquileo-etanolamina, trietanolamina, glucamina y aminoácidos básicos. Preferiblemente las sales son farmacéuticamente aceptables.

Las funciones de la condroitina dependen en buena parte de las propiedades del proteoglicano global del que es una parte. Estas funciones pueden dividirse de forma amplia en papeles reguladores y estructurales. Sin embargo, esta división no es absoluta y algunos proteoglicanos pueden desempeñar papeles tanto estructurales como reguladores.

Con respecto a su papel estructural, el sulfato de condroitina es un componente principal de la matriz extracelular, y es importante para mantener la integridad estructural del tejido. Como una parte de un agregado, el sulfato de condroitina es un componente principal del cartílago. Los grupos sulfato sumamente cargados y de empaquetamiento compacto del sulfato de condroitina generan repulsiones electrostáticas que proporcionan mucha de la resistencia del cartílago a la compresión.

El sulfato de queratano es un glucosaminoglicano sulfatado similar al sulfato de condroitina en el que el grupo sulfato se encuentra en el glucurónico. Concretamente, se encuentra constituido por galactosa y GlcNAc-6-sulfato, unidos mediante un enlace β -1,4.

Se encuentra principalmente en córnea, cartílago y hueso. A nivel de las articulaciones ayuda a absorber impactos mecánicos, disminuyendo los efectos de éstos sobre estructuras circundantes. Participa en el desarrollo del sistema nervioso central y en los mecanismos de protección que se activan cuando en éste se produce un daño.



La carragenina o carragenano está formada por unidades de galactosa y/o de anhidrogalaactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos α -1,3 y β -1,4. Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de grupos de anhidrogalaactosa se distinguen varios tipos de carragenano, con propiedades como hidrocoloides claramente distintas. A mayor proporción de grupos sulfato, la solubilidad es mayor, y a mayor proporción de grupos de anhidrogalaactosa la solubilidad es menor. En el contexto de la presente invención, están

ES 2 368 307 A1

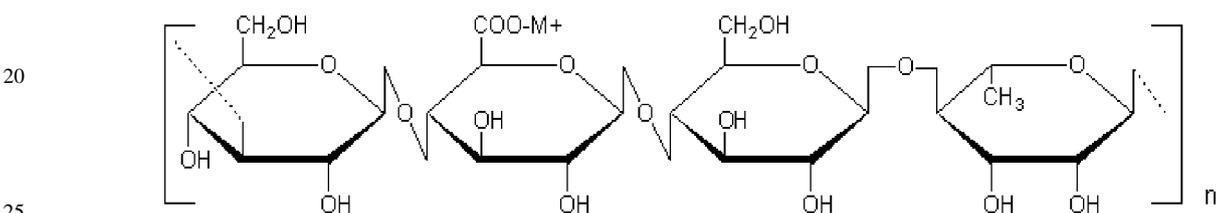
incluidos todos los tipos de carrageno. Algunos de estos incluyen por ejemplo los carragenanos kappa, iota y lambda (k, i y l).

5 El glucomanano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica lineal con una pequeña proporción de ramificaciones. En concreto, está formado por unidades de D-manosa y D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 en una proporción de 1.6:1, respectivamente.

10 En una realización particular de la invención, el glucomanano empleado es un derivado de glucomanano con carga negativa seleccionado entre los derivados fosforilados, carboximetil y dicarboxi-glucomananos.

La goma gelano es un polisacárido soluble en agua de origen natural. La estructura química de este compuesto consiste en una cadena polimérica formada por unidades de α -L-ramnoso, β -D-ácido glucurónico y dos unidades de β -D-glucosa.

15 Se representa mediante la siguiente estructura:



20 donde n es un número entero y representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de goma gelano. El polímero puede encontrarse en forma parcialmente acetilada. Dependiendo de su grado de acetilación, la goma gelano proporciona geles con propiedades mecánicas distintas.

25 En el contexto de la presente invención, el término “goma gelano” incluye todos sus diferentes derivados, así como combinaciones de los mismos.

30 *El agente reticulante catiónico* es una amina seleccionada del grupo formado por espermina, espermidina, sales de las mismas o mezclas de las mismas.

35 Los hidrogeles de la presente invención se caracterizan por haberse formado a través de un mecanismo de interacción iónica que provoca la reticulación de los componentes de dichos geles como consecuencia de la adición de un agente reticulante de carga positiva. Además de ser un procedimiento sencillo, no se requiere el uso de disolventes orgánicos o de sustancias auxiliares tóxicas. La presencia del agente reticulante catiónico permite el entrecruzamiento del polímero aniónico mediante un proceso de gelificación iónica.

40 No obstante, y a diferencia de lo que ocurre con polímeros como el alginato, que es posible gelificar recurriendo a iones inorgánicos, con los polímeros naturales empleados en la presente invención únicamente es posible llevar a cabo su reticulación bajo la forma de un hidrogel y no un simple complejo suspendido en un medio líquido, mediante la utilización de compuestos aminados constituyentes de nuestro propio organismo, como la espermina y espermidina. La utilización de tales compuestos, además de resultar indispensable para la formación de los mencionados hidrogeles, permite obtener hidrogeles con unas características estructurales y de viscoelasticidad que los hacen ser adecuados como sistemas para aplicaciones tanto biomédicas como no biomédicas.

45 En una realización particular, el agente reticulante es una amina de fórmula general (I):



55 donde x, y y z toman, independientemente, un valor comprendido entre 1 y 66. Preferentemente, x, y y z, independientemente, presentan un valor comprendido entre 1 y 10.

60 De forma más preferente, la amina se selecciona entre espermina, espermidina, sales de las mismas o cualquier combinación de las mismas. Estas aminas son componentes naturales de las células y fluidos corporales y desempeñan un papel fundamental en los procesos de proliferación y diferenciación celular y de síntesis de macromoléculas biológicas.

ES 2 368 307 A1

Por otro lado, la conocida capacidad de estas poliaminas de interaccionar con el material genético y protegerlo (Rider *et al.*, Amino Acids, 33, 2007, 231-240) permite una fácil incorporación del mismo a formulaciones en cuya composición figuren dichas aminas.

5 En una realización particular, la relación en peso agente reticulante/polímero aniónico está comprendida entre 0.1/1 y 0.5/1, preferentemente entre 0.2/1 y 0.4/1, lo que proporciona formulaciones con una baja polidispersidad.

Según una realización preferida el hidrogel comprende adicionalmente al menos una *proteína* que se selecciona del grupo formado por albúmina, gelatina, proteínas enzimáticas, colágeno, atelocolágeno, derivados de las mismas o
10 cualquier combinación de los mismos.

El colágeno es una proteína fibrosa con estructura de triple hélice. Está presente en el tejido conectivo, donde sus fibras forman estructuras que resisten las fuerzas de tracción, gracias a su capacidad de compactación y de estiramiento. Juega además un papel fundamental en el mantenimiento de la morfología de tejidos y órganos, ya que las células interactúan con el colágeno de la matriz extracelular tanto mecánica como químicamente, lo que produce notables efectos sobre la arquitectura tisular.
15

El colágeno en lugar de ser una proteína única, se considera una familia de moléculas estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas. Se describen así varios tipos de colágeno:

20 Colágeno tipo I: Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón, la dentina y la córnea. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas alfa de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. A uno de los cuales se designa como cadena alfa1 y al otro, cadena alfa2. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Su función principal es la de resistencia al estiramiento.
25

Colágeno tipo II: Se encuentra sobre todo en el cartílago, pero también se presenta en la córnea embrionaria y en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. En el cartílago forma fibrillas finas de 10 a 20 nanómetros, pero en otros microambientes puede formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I. Están constituidas por tres cadenas alfa2 de un único tipo. Es sintetizado por el condroblasto. Su función principal es la resistencia a la presión intermitente.
30

Colágeno tipo III: Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, la dermis de la piel y el estroma de varias glándulas. Es un constituyente importante de las fibras de 50 nanómetros que se han llamado tradicionalmente fibras reticulares. Está constituido por una clase única de cadena alfa3. Es sintetizado por las células del músculo liso, fibroblastos, glía. Su función es la de sostén de los órganos expandibles.
35

Colágeno tipo IV: Es el colágeno que forma la lámina basal que subyace a los epitelios. Es un colágeno que no se polimeriza en fibrillas, sino que forma un fieltro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y con las proteínas estructurales laminina y fibronectina. Es sintetizado por las células epiteliales y endoteliales. Su función principal es la de sostén y filtración.
40

Colágeno tipo V: Presente en la mayoría del tejido intersticial. Se asocia con el tipo I.

45 Colágeno tipo VI: Presente en la mayoría del tejido intersticial. Sirve de anclaje de las células en su entorno. Se asocia con el tipo I.

Colágeno tipo VII: Se encuentra en la lámina basal.

50 Colágeno tipo VIII: Presente en algunas células endoteliales.

Colágeno tipo IX: Se encuentra en el cartílago articular maduro. Interactúa con el tipo II.

Colágeno tipo X: Presente en cartílago hipertrófico y mineralizado.

55 Colágeno tipo XI: Se encuentra en el cartílago. Interactúa con los tipos II y IX.

Colágeno tipo XII: Presente en tejidos sometidos a altas tensiones, como los tendones y ligamentos. Interactúa con los tipos I y III.

60 Colágeno tipo XIII: Se encuentra como una proteína asociada a la membrana celular. Interactúa con los tipos I y III.

El atelocolágeno es colágeno de tipo I altamente purificado y tratado con la enzima pepsinasa. La molécula de colágeno posee una secuencia aminoacídica llamada telopéptido, tanto en su extremo N-terminal, como en su extremo C-terminal. Estos telopéptidos son los principales responsables de la antigenicidad del colágeno. El atelocolágeno tratado con pepsinasa tiene por tanto una menor inmunogenicidad, y es usado clínicamente con una gran variedad de aplicaciones, incluyendo curación-regeneración de heridas, prótesis vascular, substitutivo de cartílago óseo y agente hemostático.
65

La gelatina es un polímero de origen natural que se obtiene a partir del colágeno, por hidrólisis parcial irreversible del mismo. Se conocen dos tipos diferentes de gelatina: gelatina tipo A, obtenida por hidrólisis ácida y gelatina tipo B, obtenida por hidrólisis alcalina. En lo que refiere a su estructura molecular, posee algunos grupos funcionales (carboxilo, imidazol, amino, guanidino) que se ionizan en solución acuosa según su valor de pKa y el valor de pH del medio. De esta forma, la gelatina tipo A tiene una mayor cantidad de grupos básicos ionizables que grupos ácidos y su punto isoeléctrico se encuentra entre 9 y 9.4. Durante el proceso de hidrólisis alcalina la mayoría de grupos amida se convierten en grupos carboxilo, presentando puntos isoeléctricos comprendidos entre 4.8 y 5.1. El punto isoeléctrico es una propiedad importante de las gelatinas ya que da una idea de cuál va a ser su comportamiento en determinadas condiciones de pH. Es un material biocompatible y biodegradable, relativamente barato, que se puede obtener libre de pirógenos y es considerado un excipiente GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA. Además, se encuentra comercialmente disponible gelatina obtenida mediante tecnología de ADN recombinante, con la cual se evitan eventuales riesgos relacionados con reacciones de tipo alérgico, además de que en esta gelatina el peso molecular es uniforme y no hay variabilidad interlote. Esto es importante, pues normalmente esta variabilidad limita el empleo de biopolímeros naturales para la elaboración de geles, ya que complica mucho la estandarización y escalado de las técnicas de elaboración de los mismos. La gelatina posee, tal como se señaló anteriormente, interesantes propiedades desde el punto de vista físico-químico ya que presenta un amplio rango de puntos isoeléctricos según el proceso por el cual ha sido obtenida, y una gran cantidad de grupos funcionales que permiten su modificación. Por ejemplo, es posible incrementar su carga positiva mediante aminación o disminuirla mediante tiolación, lo que ofrece la posibilidad de mejorar la interacción con las moléculas terapéuticas que serán asociadas en sistemas que contengan este material y, además, permite modular la capacidad de interacción con las superficies biológicas del organismo.

La albúmina es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 66.5 kDa y punto isoeléctrico de aproximadamente 4.9. Es la principal proteína presente en el plasma sanguíneo. Al igual que las demás proteínas del plasma, la albúmina es sintetizada en el hígado, siendo la responsable de la presión osmótica de la sangre. Al degradarse, sus aminoácidos proveen nutrientes a los tejidos periféricos. Transporta un gran número de componentes endógenos y exógenos y participa en procesos metabólicos como la solubilización de ácidos grasos, por lo que es esencial en el metabolismo de lípidos. Numerosas moléculas bioactivas, incluyendo moléculas lipofólicas se unen a esta proteína plasmática (Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hill; Maham A *et al.* Protein-based nanomedicine platforms for drug delivery. *Small*. 5, 2009, 1706-21).

La albúmina es una proteína tipo ácida muy soluble, estable en un amplio rango de pH (4-9) y a temperaturas en que otras proteínas sufrirían desnaturalización. Posee grupos amino y carboxilo que ofrecen la posibilidad de ser modificados químicamente o de acoplar ligandos como otras proteínas, anticuerpos, carbohidratos y fármacos. Por ser un material fácilmente disponible, biodegradable, carente de toxicidad y de respuestas de tipo inmune, la hacen un candidato ideal como biomaterial para vehicular compuestos bioactivos.

Con la introducción de la ingeniería genética en la producción de proteínas, se ha desarrollado albúmina sérica recombinante, la cual ha demostrado ser segura y comparable en términos de farmacocinética y farmacodinamia con la proteína nativa.

El Fibrinógeno es una proteína soluble del plasma sanguíneo, su longitud es de 46 nm y su peso molecular de 340 kDa. Es una molécula fibrilar, y en sus extremos tiene cargas fuertemente negativas. Estos extremos repelen a otras moléculas del compuesto, previniendo la agregación. Está compuesta por tres pares de cadenas de polipéptidos, concretamente 2 cadenas A α , 2 B β y 2 γ (A α , B β , γ)² unidas por enlaces disulfuro. Estas cadenas están genéticamente ligadas y reguladas en forma coordinada en el ser humano.

Es responsable de la formación de los coágulos de sangre. Cuando se produce una herida se desencadena la transformación del fibrinógeno en fibrina, gracias a la actividad de plaquetas. Asimismo, da lugar a un matriz provisional de extrema importancia en los lugares donde se han producido heridas, jugando además un papel crucial en los procesos de reparación de éstas.

La Fibrina es una proteína fibrilar. Tiene la capacidad de formar redes tridimensionales y desempeña un importante papel en el proceso de coagulación (forma agregados con otras moléculas de fibrina, formando un coágulo blando). Normalmente se encuentra en la sangre en una forma inactiva, el fibrinógeno, el cual por la acción de una enzima llamada trombina se transforma en fibrina.

La Trombina es una enzima glucoproteínica, del grupo de las peptidasas. Está formada por dos cadenas de polipéptidos de 36 y 259 aminoácidos respectivamente, unidas por un puente disulfuro. Se obtiene a partir de un precursor, la protrombina, en una reacción catalizada por la enzima tromboplastina, en presencia de iones calcio (Ca⁺⁺). Tiene un peso molecular de 33.70 kDa. Esta enzima no es parte de la sangre, sino que se forma como parte del proceso de coagulación sanguínea, y ayuda a la degradación del fibrinógeno a monómeros de fibrina.

Según otra realización preferida, el hidrogel comprende adicionalmente al menos una *molécula bioactiva* que se encuentra en una proporción de hasta un 25% en peso con respecto al peso total de los componentes del hidrogel. Dicha molécula bioactiva se selecciona del grupo formado por hormonas, péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos hidrofílicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos o cualquier combinación de las mismas.

ES 2 368 307 A1

El término “molécula biológicamente activa” se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o que se utiliza para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales, así como aquel compuesto que se destina a destruir, impedir la acción, contrarrestar o neutralizar, cualquier organismo nocivo, o bien cualquier sustancia que se utiliza como cosmético o de higiene, así como aquel compuesto que se destina a regenerar tejidos o en ingeniería de tejidos.

Los hidrogeles objeto de la presente invención son adecuados para asociar moléculas bioactivas independientemente de las características de solubilidad de las mismas. La capacidad de asociación dependerá de la molécula correspondiente, pero en términos generales será elevada tanto para moléculas hidrófilas, como para las de marcado carácter hidrófobo.

En una realización particular, la molécula bioactiva se selecciona entre péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos como oligonucleótidos, polinucleótidos o bien combinaciones de las moléculas citadas.

En una realización preferida de la invención, la molécula bioactiva posee actividad antifúngica, antiséptica o antiinflamatoria, o bien una molécula de interés en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, cosmética o de higiene, como un péptido o proteína, o bien un derivado de ácido nucleico, tal como un plásmido de ADN, oligonucleótido, ARN de interferencia o un polinucleótido. El plásmido de ADN es aquel que incorpora material genético para ser introducido en células y expresar proteínas o bien que actúe como precursor de RNA.

Superóxido dismutasa: Esta enzima cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Existe en las células de los organismos en diferentes isoformas. En humanos existen tres isoformas:

- SOD1, ubicada en el citoplasma celular, es un homodímero de peso molecular 32.5 KDa y contiene cobre y zinc en su centro activo.
- SOD2, localiza en la mitocondria, es un tetrámero, y contiene manganeso en su centro activo.
- SOD3, se encuentra en el líquido extracelular, es un tetrámero, y contiene cobre y zinc en su centro activo.

En una realización particular la SOD utilizada en la presente invención es la SOD1.

Catalasa: Enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y O₂. Se localiza en los peroxisomas de casi todos los tipos celulares. Es un tetrámero formado por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene una longitud de 500 aminoácidos, y a cada una de las cuales se une un grupo porfirina. Coordinado a cada uno de los grupos porfirina existe un átomo de hierro, que será el responsable de la interacción con el peróxido de hidrógeno.

El pH óptimo de actuación de esta enzima se encuentra alrededor de 7, esto hace que tome especial relevancia el hecho de que las composiciones tipo hidrogel descritas en este documento hayan sido obtenidas a un pH 7.4, el cual, como se ha comprobado, no varía con el tiempo.

Prednisolona: Es un corticosteroide (los corticosteroides son hormonas del grupo de los esteroides, y son producidas por la corteza de las glándulas suprarrenales) utilizado terapéuticamente como anti-inflamatorio e inmunosupresor. Es un compuesto liposoluble de peso molecular 360.44 g/mol.

Plásmido: Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal, que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico. Poseen conformación en doble hélice y su tamaño varía desde 1 a 250 kb. Están presentes normalmente en bacterias, aunque en algunas ocasiones también se encuentran organismos eucariotas (como las levaduras), y su número puede variar desde una sola copia hasta algunos cientos por célula.

El hecho de que sean capaces de reproducirse de manera independiente del ADN cromosomal, así como su relativamente fácil manipulación y la posibilidad de inserción de nuevas secuencias genéticas, han potenciado su creciente uso en ingeniería genética.

Relacionado con el ARN existe en todas las células un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, denominado ribotransferencia, interferencia por ARN o RNAi (acrónimo del nombre inglés *RNA interference*). Ésta es ejercida concretamente por moléculas de ARN que, siendo complementarias a un ARN mensajero, conducen a la degradación de éste. Debe entonces distinguirse entre interferencia por ARN (RNAi), mecanismo biológico o técnica experimental que lo aprovecha, y ARN interferente, molécula de ARN que ejerce interferencia por ARN, y puede ser de varios tipos: siRNA, miRNA o piRNA. Concretamente, el siRNA (acrónimo en inglés de small interfering RNA, en español ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento), es un tipo de ARN interferente con una longitud de 20 a 25 nucleótidos, y es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana. De este modo, el siRNA interfiere con la expresión de un gen específico, reduciéndola. Además, los siRNAs también actúan en otras rutas relacionadas con el RNAi, como en la defensa antiviral o en la organización de la estructura de la cromatina en un genoma.

ES 2 368 307 A1

La proporción de molécula bioactiva incorporada en los geles puede llegar a ser de hasta el 25% en peso con respecto al peso total de los componentes de los geles. Sin embargo, la proporción adecuada dependerá en cada caso del principio activo que va a incorporarse, la indicación para la que se utiliza y la eficiencia de administración. En una realización particular, la proporción de principio activo se encuentra entre 1 y 20% en peso.

En otra realización preferida, los hidrogeles de la presente invención comprenden, adicionalmente, al menos un compuesto capaz de facilitar la evolución de los mismos tras su aplicación a un ser vivo. De forma preferente, dicho compuesto es un *marcador*, tal como un antígeno de membrana, o un agente de tinción como por ejemplo fluoresceína o TexasRed.

Según otra realización preferida, el hidrogel comprende adicionalmente al menos un compuesto capaz de facilitar o reforzar el efecto de la molécula bioactiva, tal como por ejemplo un *adyuvante*, un *inmunomodulador* (inmunosupresor o inmunoestimulador) o cualquier combinación de los mismos.

Asimismo, el hidrogel puede llevar asociado un *compuesto capaz de interactuar con componentes biológicos*, como un anticuerpo, un aptámero o un compuesto con afinidad por un receptor existente en los seres vivos o capaz de actuar como receptor de componentes biológicos.

Según otra realización preferida, el hidrogel comprende adicionalmente al menos un *compuesto estabilizante* de tipo lipídico, graso u oleoso, sacarídico, un derivado de aminoácido o proteico, un derivado de óxido de etileno, un compuesto de tipo morfolino o cualquier combinación de los mismos.

Según otra realización preferida, el hidrogel comprende adicionalmente agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes blanqueadores, agentes antiseborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, enzimas o cualquier combinación de los mismos.

Según otra realización preferida el hidrogel se encuentra en forma liofilizada.

Según otra realización preferida el hidrogel se usa para la preparación de un *medicamento*.

Según otra realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un hidrogel como se describe en la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

Otra realización preferida se refiere a una *composición de recubrimiento de superficies* que comprende al menos un hidrogel de origen natural.

Otra realización preferida se refiere a una *composición nutricional* que comprende al menos un hidrogel de origen natural.

Dicha composición nutricional puede ser un alimento, un suplemento dietético o un suplemento nutricional. Las composiciones nutricionales pueden incluir leche, yogures, zumos de fruta y de vegetales, postres, productos infantiles o productos deshidratados. La adición de los hidrogeles a la composición nutricional se realiza mediante mezcla y homogenización según el procedimiento técnico para elaborar cada producto. Adicionalmente, otros componentes tales como las vitaminas pueden añadirse a la composición nutricional. Ejemplos de estos compuestos son vitaminas del grupo A, B, C, D, E o mezclas de las mismas.

Un segundo aspecto esencial de la presente invención se refiere al uso del hidrogel en la fabricación de un medicamento.

Según otra realización preferida se refiere al uso del hidrogel para su empleo en ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa.

Según otra realización preferida se refiere al uso del hidrogel para su administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, pulmonar, ótica, vaginal, intrauterina, rectal, entérica, o parenteral.

Cuando la composición se administra por vía oral, los hidrogeles presentan la ventaja adicional de ser estables en medio ácido (HCl 0.1 N) y fluido intestinal simulado, por lo que pueden alcanzar el tejido epitelial intestinal sin sufrir degradación alguna y liberar allí la molécula bioactiva asociada.

Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para la administración sobre piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes o mucosas.

ES 2 368 307 A1

Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para la asociación al mismo de diferentes formas de liberación de moléculas, tales como sistemas micro y nanoparticulares.

5 Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para terapia génica, silenciamiento o interferencia genética, o vacunación genética.

10 Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para producir la asociación, expansión o activación de poblaciones celulares o para manipular o alterar las características biológicas de células vivas tanto autólogas, como alogénicas, xenogénicas o de cultivos celulares y posteriormente emplear dichas células o grupos celulares para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico, preventivo o con fines regenerativos, o para modificar la producción de compuestos por dichas células, o para adaptarlas y asociarlas de modo efectivo a micropartículas o microcápsulas, matrices y andamiajes.

15 Un aspecto adicional de la invención está representado por el caso en que la composición de gel se utiliza como tal porque permite la fabricación de una composición viscoelástica. Tal composición viscoelástica es útil, por ejemplo en la cirugía ocular, como un sustituto de fluido sinovial y como gotas oculares y, como se ha indicado anteriormente, la presente invención hace posible ajustar a medida las propiedades viscoelásticas para tales usos.

20 Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para facilitar, estimular o modificar la producción de compuestos por células, con fin de producción biotecnológica.

25 Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel con la finalidad de higiene o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado.

Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para modificar, corregir o introducir propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad en un medicamento o en un producto cosmético o de higiene personal.

30 Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para la fabricación de una composición viscoelástica útil en la cirugía o terapia ocular, como gotas oculares o como un sustituto de fluido sinovial, o de algún componente de las articulaciones.

35 Según una realización preferida se refiere al uso del hidrogel para acondicionar, modificar o restablecer las características de agua, alimentos o suplementos nutricionales, así como para modificar, corregir o introducir nuevas propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad de los mismos y para facilitar o hacer posible la administración de alimentos o nutrientes a seres vivos.

40 *Un tercer aspecto esencial de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un hidrogel de origen natural que comprende las siguientes etapas:*

- a) preparar una disolución acuosa de al menos un polímero aniónico de origen natural;
- b) preparar una disolución acuosa de un agente reticulante catiónico; y opcionalmente; y
- 45 c) mezclar bajo agitación las disoluciones obtenidas en a) y b) con formación espontánea del gel.

50 La incorporación del polímero o los polímeros aniónicos se lleva a cabo mediante disolución acuosa del mismo o los mismos a una concentración de entre 100 y 0.1 mg/mL, más preferiblemente entre 50 y 1 mg/mL y aún más preferiblemente entre 10 y 5 mg/mL.

El agente reticulante catiónico se disuelve en agua a una concentración de entre 100 y 0.01 mg/mL, preferiblemente entre 50 y 0.05 mg/mL; más preferiblemente entre 10 y 0.1 mg/mL, aún más preferiblemente entre 4 y 1 mg/mL.

55 Según una realización preferida, adicionalmente se prepara una disolución acuosa de al menos una proteína y se incorpora a una de las soluciones obtenidas en a) y b) cuyos componentes sean de la misma carga eléctrica que la proteína o se adiciona sobre el gel ya formado.

60 La incorporación de la proteína o proteínas se lleva a cabo mediante disolución acuosa de la misma o las mismas a una concentración de entre 100 y 0.1 mg/mL, más preferiblemente entre 50 y 1 mg/mL y aún más preferiblemente entre 10 y 2 mg/mL.

65 Según otra realización preferida, al menos una de las disoluciones de los constituyentes del gel se calienta antes de ser mezcladas.

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende además la adición de una molécula bioactiva, y/o un compuesto capaz de facilitar o reforzar el efecto de la molécula bioactiva, y/o un compuesto capaz de interactuar con componentes biológicos y/o un compuesto capaz de actuar como receptor de algún componente biológico y/o

un compuesto estabilizante, en la disolución a) si es de naturaleza aniónica o en la disolución b) si es de naturaleza catiónica, o bien se adiciona sobre los geles ya formados.

Según otra realización preferida, todos los compuestos que pueden ser incorporados al sistema de geles de la invención mencionados anteriormente, se pueden adicionar a las soluciones de los polímeros constituyentes de los geles previamente a la formación de los mismos o bien pueden ser adicionados a los hidrogeles una vez formados.

La molécula biológicamente activa, y/o el compuesto capaz de facilitar el seguimiento de la evolución del hidrogel o de facilitar o reforzar el efecto de la molécula bioactiva, y/o el compuesto capaz de interactuar con componentes biológicos o de actuar como un receptor de componentes biológicos, y/o el compuesto estabilizante, y/o el compuesto aromatizante o la molécula activa que actúa como agente cosmético o de higiene, es disuelto en una de las disoluciones a) o b), dependiendo de la carga que posea, es decir, si presenta carga negativa se disuelve en la disolución a) y, si por el contrario, presenta carga positiva, se disuelve en la disolución b). En una variante del procedimiento, dicha molécula se adiciona sobre los hidrogeles una vez formados. En otra variante del procedimiento, dicha molécula se adiciona a los hidrogeles incluida en un sistema micro o nanoparticular. En otra variante del procedimiento, dicha molécula se adiciona previamente a la proteína o proteínas que opcionalmente puede incluirse entre sus componentes o a otro de los componentes de los sistemas.

En el caso de moléculas lipofílicas, éstas pueden ser disueltas en primer lugar en un pequeño volumen de un disolvente orgánico, de un aceite o compuesto lipídico o lipofílico, o de una mezcla de agua y los compuestos anteriormente mencionados, el cual seguidamente se adicionará a una de las disoluciones acuosas mencionadas con anterioridad, de forma que la concentración en peso del disolvente orgánico en la disolución final sea siempre menor al 25%. En un caso de este tipo, el disolvente orgánico tiene que extraerse del sistema, a menos que sea farmacéuticamente aceptable. Por otro lado, las moléculas lipofílicas también pueden asociarse a proteínas incorporadas al hidrogel, como es el caso de la albúmina. Dicha asociación a proteínas puede llevarse a cabo previamente a la formación del hidrogel o bien una vez formado.

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende una etapa adicional después de la etapa c) en el que el gel se somete a un proceso de liofilización, con el fin de preservarlas durante su almacenamiento para que conserven sus características iniciales y se reduzcan los volúmenes de producto que van a manipularse. Por otra parte, el grado de reticulación de los hidrogeles puede aumentar con este proceso, ya que puede tener lugar una aproximación entre las cadenas poliméricas, lo que podría facilitar que aumente el grado de entrecruzamiento polimérico, así como que se potencie el efecto del agente reticulante.

Según otra realización preferida, el procedimiento comprende una etapa adicional en la que se regenera el gel liofilizado.

La formación de los hidrogeles objeto de la presente invención es consecuencia de un proceso controlado de entrecruzamiento ionotrópico de los componentes que presentan carga opuesta. Fruto de dicho proceso controlado, denominado reticulación iónica o ionotrópica, se obtienen hidrogeles de propiedades físico-químicas predeterminadas, homogéneas, ajustables y reproducibles, con independencia de que se asocie o no molécula bioactiva alguna.

En una variante de la invención la reticulación se realiza en un medio a pH y/o fuerza iónica controlados, que se lleva a cabo mediante disolución de los constituyentes de los geles en medios acuosos tamponados. De forma preferente el pH de dichas disoluciones esta comprendido entre 5 y 8.

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.

A continuación, para una mayor comprensión de las características y ventajas de la presente invención, se hará referencia a una serie de ejemplos que de forma explicativa completan la descripción anterior, sin suponer en modo alguno que ésta se vea limitada a los mismos.

55 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representa el uso de espermidina en la preparación de hidrogeles a base de polímeros aniónicos de origen natural, preparación que no resulta posible empleando iones inorgánicos como el calcio: Imagen fotográfica en la que se observa cómo empleando espermidina se forma un hidrogel que conserva su consistencia y no cae al voltear el tubo de ensayo en el que se ha formado, quedando en la parte superior (imagen de la izquierda). Por el contrario, en la imagen de la derecha se observa una disolución no gelificada con iones calcio y que, consiguientemente, al voltear el tubo de ensayo cae como tal solución a la parte baja del tubo.

Figura 2. Representa la variación de la viscosidad (η) de los geles (F14, F15 y F16) frente al esfuerzo de corte (γ).

Figura 3. Representa la modulación de las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles mediante una adecuada selección de sus componentes: Variación de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los geles (F14, F15 y F16) frente a la frecuencia (f).

Figura 4: Representa hidrogeles desarrollados capaces de liberar una molécula activa previamente asociada a los mismos, incluso teniendo ésta carácter lipofílico: Liberación de prednisolona a partir de hidrogeles elaborados empleando goma gelano y sulfato de condroitina. (n=3).

5 Figura 5: Representa hidrogeles desarrollados capaces de asociar eficazmente y de manera homogénea material genético: Imágenes fotográficas en las que se evidencia la incorporación de siRNA marcado con el marcador de fluorescencia cy3 con el característico color rosáceo que muestra a luz natural (A) o bien con la fluorescencia emitida por dicho siRNA marcado cuando se recurre a la técnica de microscopía de fluorescencia (microscopio ECLIPSE-NIKON 80j, Japan) (B).

10

Ejemplos

15 Como procedimiento común a los ejemplos detallados a continuación, se han caracterizado los hidrogeles en función de sus propiedades viscoelásticas, utilizando para tal fin un reómetro Haake RheoStress 300 Rotational (Alemania) equipado con un termostato Haake DC10 a una temperatura de $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

20 Los diferentes polímeros, tal y como se utilizan en los siguientes ejemplos, fueron adquiridos a diferentes casas comerciales: carragenina (Gelymar, Providencia, Santiago, Chile), sulfato de condroitina (Sigma Aldrich, Madrid Spain), sulfato de dermatano (Calbiochem, Merck, CA, USA), glucomanano (Shimizu Chemical, Japan), goma gelano (Sigma Aldrich, Madrid Spain), albúmina bovina (Sigma Aldrich, Madrid Spain), gelatina (Sigma Aldrich, Madrid Spain), poliglicerol (Hyperpolymers GmbH, sod (Sigma Aldrich, Madrid, España), catalasa (Sigma Aldrich, Madrid, España), espermidina (Sigma Aldrich, Madrid, España), espermina (Sigma Aldrich, Madrid, España). La prednisolona fue adquirida en Sigma Aldrich (Italia) y el siRNA en MWG Biotech AG (Ebersbeg, Alemania).

25

En los siguientes ejemplos, así como durante toda la presente memoria descriptiva, las cantidades de cada uno de los ingredientes se expresan en porcentaje en peso referido a la masa total de ingredientes empleados.

30 Ejemplo 1

Uso de espermidina para preparar hidrogeles a base de polímeros aniónicos de origen natural, preparación que no es posible empleando iones inorgánicos como el calcio

35 Se prepararon hidrogeles empleando como ingredientes goma gelano, sulfato de condroitina y albúmina, según el procedimiento previamente descrito. Como agentes reticulantes se emplearon la molécula catiónica espermidina o bien cloruro de calcio. Para ello se prepararon disoluciones de goma gelano (5 mg/mL), sulfato de condroitina (6 mg/mL), espermidina (0,67 mg/mL) y albúmina (5 mg/mL) en tampon HEPES 100 mM pH 7,4. Todos los componentes de carga negativa se mezclaron dando lugar a una relación en masa sulfato de dextrano:albúmina:sulfato de condroitina de 1:1:0,72. La disolución resultante se mezcló con 1,2 mL (0,8 mg) de la disolución de espermidina o bien con 1,2 mL (2,4 mg) de la disolución de calcio en tampon HEPES 100 mM pH 7,4, bajo agitación magnética. Empleando espermidina como agente reticulante se obtuvieron de modo espontáneo geles, como muestra la Figura 1. No obstante, cuando se empleó CaCl_2 no se produjo gelificación, observándose en la misma Figura 1 un medio totalmente líquido.

45

Ejemplo 2

50 *Preparación de hidrogeles a base de diferentes polímeros aniónicos de origen natural mediante reticulación con espermidina*

Se prepararon diversas formulaciones de hidrogeles empleando diferentes polímeros aniónicos de origen natural mediante reticulación con espermidina. Opcionalmente se incorporó a la composición una o varias proteínas, concretamente albúmina o gelatina. Las Tablas 1-5 recogen los componentes de los geles formados.

55

60

65

ES 2 368 307 A1

TABLA 1

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina (Formulaciones F1 a F4)

FORMULACION	F1	F2	F3	F4
INGREDIENTES	% peso	% peso	% peso	% peso
Carragenina	0.2	0.2	0.2	0.2
Sulfato de condroitina	0	0.036	0.072	0.1
Gelatina	0.1	0.1	0.1	0.1
Albumina	0.1	0.1	0.1	0.1
Espermidina	0.024	0.024	0.024	0.024
Agua desionizada	99.6	99.54	99.50	99.48

TABLA 2

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina (Formulaciones F5 a F8)

FORMULACION	F5	F6	F7	F8
INGREDIENTES	% peso	% peso	% peso	% peso
Carragenina	0.2	0.2	0.2	0.2
Sulfato de condroitina	0.4	0	0.06	0.2
Albumina	0	0.2	0.2	0.2
Gelatina	0.25	0	0	0
Espermidina	0.04	0.02	0.024	0.04
Agua desionizada	99.1	99.58	99.52	99.36

ES 2 368 307 A1

TABLA 3

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina (Formulaciones F9 a F13)

FORMULACION	F9	F10	F11	F12	F13
INGREDIENTES	% peso	% peso	% peso	% peso	% peso
Carragenina	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sulfato de dermatano	0.4	0.1	0.06	0.036	0.072
Albumina	0	0.2	0.2	0.1	0.1
Gelatina	0.25	0	0	0	0
Espermidina	0.04	0.02	0.024	0.024	0.024
Agua desionizada	99.1	99.48	99.52	99.64	99.6

TABLA 4

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina (Formulaciones F14 a F17)

FORMULACION	F14	F15	F16	F17
INGREDIENTES	% peso	% peso	% peso	% peso
Goma gelano	0.1	0.1	0.14	0.14
Sulfato de condroitina	0.1	0.1	0.1	0.1
Albumina	0.14	0	0.14	0
Gelatina	0	0.14	0	0.14
Espermidina	0.034	0.034	0.034	0.034
Agua desionizada	99.63	99.63	99.59	99.59

ES 2 368 307 A1

TABLA 5

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina (Formulaciones F18 a F21)

FORMULACION	F18	F19	F20	F21
INGREDIENTES	%	%	%	%
	peso	peso	peso	peso
Goma gelano	0.1	0.1	0.14	0.14
Sulfato de dermatano	0.1	0.1	0.1	0.1
Albumina	0.14	0	0.14	0
Gelatina	0	0.14	0	0.14
Espermidina	0.034	0.034	0.034	0.034
Agua desionizada	99.63	99.63	99.59	99.59

Ejemplo 3

Modulación de las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles mediante una adecuada selección de sus componentes

Los hidrogeles elaborados a base de sulfato de condroitina y goma gelano descritos en el ejemplo anterior como formulaciones F14, F15 y F16 fueron sometidos a evaluación de sus propiedades viscoelásticas. Como muestra la Figura 2, independientemente de la composición todas las formulaciones presentan una viscosidad similar, la cual resulta adecuada para una aplicación tópica de dichos hidrogeles. Sin embargo, tal y como muestra la Figura 3, las propiedades viscoelásticas de dichos hidrogeles pueden ser moduladas mediante una adecuada selección de su composición.

Ejemplo 4

Los hidrogeles capaces de asociar una molécula bioactiva, incluso cuando ésta tiene carácter lipofílico y, asimismo, son capaces de dar lugar a la liberación posterior de la molécula asociada

Se prepararon geles de gelano y sulfato de condroitina asociando una molécula bioactiva, seleccionando para tal fin la prednisolona. Teniendo en cuenta que se trata de una molécula lipofílica se procedió previamente a asociarla a albúmina. Para ello se disolvieron 20 mg de prednisolona en una disolución de albúmina en metanol (10 mg/ml). Tras la evaporación del metanol, el sistema albumina-prednisolona fue resuspendido en tampón HEPES 100 mM pH 7,4 (5 mg/ml) y la dispersión coloidal obtenida se mezcló con una disolución en tampón HEPES 100 mM pH7,4 de gelano (5 mg/ml) y sulfato de condroitina (6 mg/ml). A la mezcla resultante se adicionaron 1,2 mL de una disolución de espermidina en tampón HEPES 100 mM pH7,4 (2 mg/ml), bajo agitación magnética, dando lugar a la formación espontánea de hidrogeles asociando la molécula bioactiva prednisolona (proporción de 7% en peso con respecto a los componentes).

Los geles obtenidos fueron sometidos a un estudio de liberación in vitro en tampón fosfato pH 7,4. Para ello, se tomaron 3,2 g de dichos geles y se incubaron en condiciones sink a $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en 500 ml de dicho medio de liberación en un aparato de disolución (Sotax AT7 Smart, Switzerland) sometidos a agitación de 100 rpm. A diferentes tiempos se determinó la prednisolona liberada al medio, mediante una técnica HPLC (Perkin-Elmer Series 200 LC pump, 235 Diode Array Detector, USA) Merck Hibar LiChrocart (250-4, 5 μm) columna RP⁻¹⁸, mezcla MeOH/H₂O (7:3), flujo 0.6 mL/min y se cuantificó a una $\lambda=245$ nm frente a la correspondiente recta de calibrado ($y = 91,168 x - 0,1008$). La Figura 4 muestra el correspondiente perfil de liberación. Como puede comprobarse, los geles desarrollados son capaces de liberar la molécula bioactiva lipofílica previamente asociada a los mismos.

ES 2 368 307 A1

Ejemplo 5

Incorporación en la composición de los hidrogeles de enzimas de interés en cosmética, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

Se prepararon hidrogeles en cuya composición se incluyeron las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa. Para ello se procedió a su disolución en tampón HEPES 20 mM (pH 7.4) y 1 ml de esta solución de concentración 5 mg/ml se mezcló con 1 ml de solución de carragenina en tampón HEPES 20 mM pH 7.4 (5 mg/ml). Sobre la mezcla resultante se adicionaron 0.3 ml de una disolución de espermidina en tampón HEPES 20 mM (2 mg/ml), bajo agitación magnética, dando lugar a la formación espontánea de hidrogeles. Los componentes de dichos hidrogeles se recogen en las Tablas 6-7.

TABLA 6

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina, incluyendo en su composición enzimas de interés en cosmética, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos (Formulaciones F22 a F24)

FORMULACION	F22	F23	F24
INGREDIENTES	%	%	%
	peso	peso	peso
Carragenina	0.17	0.17	0.17
Sulfato de condroitina	0	0.03	0
Albúmina	0.1	0.17	0
superóxido dismutasa	0.05	0.05	0.17
Espermidina	0.02	0.02	0.02
Agua desionizada	99.66	99.56	99.64

TABLA 7

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina, incluyendo en su composición enzimas de interés en cosmética, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos (Formulaciones F25 a F27)

FORMULACION	F25	F26	F27
INGREDIENTES	%	%	%
	peso	peso	peso
Carragenina	0.17	0.17	0.17
Sulfato de condroitina	0	0.03	0
Albúmina	0.1	0.17	0
Catalasa	0.05	0.05	0.17
Espermidina	0.02	0.02	0.02
Agua desionizada	99.66	99.56	99.64

ES 2 368 307 A1

TABLA 8

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina, incluyendo en su composición enzimas de interés en cosmética, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos (Formulaciones F28 a F29)

5

10

15

20

25

FORMULACION	F28	F29
INGREDIENTES	% peso	% peso
Carragenina	0.17	0.17
Sulfato de condroitina	0	0.03
Gelatina	0.1	0.17
Catalasa	0.05	0.05
Espermidina	0.02	0.02
Agua desionizada	99.66	99.56

30 Ejemplo 6

Preparación con espermidina de hidrogeles capaces de asociar material genético

35 Se prepararon hidrogeles en cuya composición se incluyó ARN de interferencia, marcado con el marcador de fluorescencia cy3 (longitud de onda de excitación: 550 nm y longitud de onda de emisión: 570 nm). Para ello se procedió a la preparación del gel del ejemplo F16 (Tabla 4) y se incorporó a éste una cantidad de siRNA que se correspondía con un 2.5% de la masa total del mismo. El siRNA se añadió a la solución de componentes negativos, previamente a la formación del gel.

40 Del gel resultante se obtuvieron imágenes fotográficas en las que se evidencia la incorporación de siRNA marcado con el marcador de fluorescencia cy3 con el característico color rosáceo que muestra a luz natural (Figura 5A) o bien con la fluorescencia emitida por dicho siRNA marcado cuando se recurre a la técnica de microscopía de fluorescencia (microscopio ECLIPSE-NIKON 80j, Japan) (Figura 5B).

45

Ejemplo 7

Empleo de espermidina para preparar hidrogeles constituidos exclusivamente por componentes naturales del organismo humano

50

55 Se prepararon hidrogeles empleando como ingredientes atelocolágeno (Koken, Japan) y albúmina, según el procedimiento previamente descrito. Como agente reticulante se empleó la molécula catiónica espermidina. Para ello se prepararon disoluciones de atelocolágeno (5 mg/mL en HCL 0.001 M pH = 3), albúmina (5 y 10 mg/mL), y espermidina (4 mg/mL) en tampon HEPES 20 mM pH 7.4. En la preparación de los hidrogeles se añadió 1 mL de la solución de espermidina sobre 2 mL de la solución de atelocolágeno bajo agitación magnética y, a continuación, se añadieron 1.2 mL de la solución de albúmina, resultando la relación de componentes la indicada en la Tabla 9 y un pH final de 7.4. Dichos hidrogeles presentan aspecto y características reológicas similares a las ya descritas en los ejemplos previos.

60

65

ES 2 368 307 A1

TABLA 9

Componentes de los hidrogeles obtenidos mediante reticulación con espermidina y constituidos exclusivamente por componentes naturales del organismo humano (Formulaciones F30 a F31)

5

FORMULACION	F30	F31
INGREDIENTES	% peso	% peso
Atelocolágeno	0.23	0.23
Espermidina	0.095	0.095
Albúmina	0.14	0.28
Agua desionizada	99.535	99.395

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Hidrogel de origen natural que comprende:

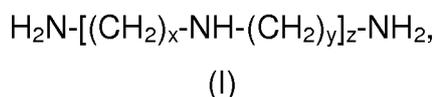
- (a) al menos un polímero aniónico de origen natural; y
- (b) al menos un agente reticulante catiónico de origen natural;

donde los componentes se encuentran entrecruzados mediante interacciones de tipo electrostático.

2. Hidrogel según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos una proteína.

3. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero aniónico se selecciona del grupo formado por ácido hialurónico o sales del mismo, ácido colomínico o derivados, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dextrano, heparina, carragenina, glucomanano, goma gelano, así como fragmentos de los mismos o derivados de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

4. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agente reticulante catiónico es un compuesto de fórmula general (I):



donde x , y y z toman, independientemente, un valor comprendido entre 1 y 66, preferentemente, x , y y z , independientemente, presentan un valor comprendido entre 1 y 10.

5. Hidrogel según cualquiera de la reivindicación 4, donde el compuesto de fórmula general (I) se selecciona entre espermina, espermidina, sales de las mismas o cualquier combinación de las mismas.

6. Hidrogel según la reivindicación 2, donde la proteína se selecciona del grupo formado por albúmina, gelatina, proteínas enzimáticas, colágeno, atelocolágeno, derivados de las mismas o cualquier combinación de los mismos.

7. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente al menos una molécula bioactiva.

8. Hidrogel según la reivindicación 7, donde la molécula bioactiva se encuentra en una proporción de hasta un 25% en peso con respecto al peso total de los componentes del hidrogel.

9. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, donde la molécula bioactiva se selecciona del grupo formado por hormonas, péptidos, proteínas, compuestos lipídicos o lipofílicos, compuestos sacarídicos, compuestos hidrofílicos, compuestos de ácidos nucleicos o nucleótidos o cualquier combinación de las mismas.

10. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente al menos un adyuvante, un inmunomodulador o cualquier combinación de los mismos.

11. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende adicionalmente al menos un compuesto que interacciona con componentes biológicos y/o con afinidad por un receptor existente en los seres vivos y/o que de actúa como receptor de algún componente biológico, tales como un anticuerpo, un aptámero, un receptor de superficie o cualquier combinación de los mismos.

12. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende adicionalmente al menos un compuesto estabilizante de tipo lipídico, graso u oleoso, sacarídico, un derivado de aminoácido o proteico, un derivado de óxido de etileno, un compuesto de tipo morfolino o cualquier combinación de los mismos.

13. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes blanqueadores, agentes antiseborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, enzimas o cualquier combinación de los mismos.

14. Hidrogel según cualquiera e las reivindicaciones 1 a 13, donde el gel se encuentra en forma liofilizada.

15. Hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 14 para la preparación de un medicamento.

ES 2 368 307 A1

16. Composición farmacéutica que comprende al menos un hidrogel según las reivindicaciones 1 a 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 17. Composición de recubrimiento de superficies que comprende al menos un hidrogel de origen natural como se define en las reivindicaciones 1 a 14.

18. Composición nutricional que comprende al menos un hidrogel de origen natural como se define en las reivindicaciones 1 a 14.

10 19. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento.

20. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para ingeniería de tejidos o medicina regenerativa.

15 21. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su administración por vía oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, pulmonar, ótica, vaginal, intrauterina, rectal, entérica o parenteral.

22. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la preparación de un producto cosmético o de higiene personal para la administración sobre piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, 20 dientes o mucosas.

23. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la asociación al mismo de diferentes formas de liberación de moléculas, tales como sistemas micro y nanoparticulares.

25 24. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para terapia génica, silenciamiento o interferencia genética, o vacunación genética.

25. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para producir la asociación, expansión o activación de poblaciones celulares o para manipular o alterar las características biológicas de células vivas tanto 30 autólogas, como alogénicas, xenogénicas o de cultivos celulares y posteriormente emplear dichas células o grupos celulares para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico, preventivo o con fines regenerativos, o para modificar la producción de compuestos por dichas células, o para adaptarlas y asociarlas de modo efectivo a micropartículas o microcápsulas, matrices y andamiajes.

35 26. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para facilitar, estimular o modificar la producción de compuestos por células, con fin de producción biotecnológica.

27. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, con la finalidad de higiene o estética, para neutralizar o eliminar ectoparásitos, para perfumar, modificar el aspecto de la superficie corporal y/o corregir olores corporales y/o protegerla o mantenerla en buen estado. 40

28. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para modificar, corregir o introducir propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad en un medicamento o en un producto cosmético o de higiene personal.

45 29. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la fabricación de una composición viscoelástica útil en la cirugía o terapia ocular, como gotas oculares o como un sustituto de fluido sinovial, o de algún componente de las articulaciones.

30. Uso del hidrogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para acondicionar, modificar o restablecer las características de agua, alimentos o suplementos nutricionales, así como para modificar, corregir o introducir nuevas propiedades organolépticas o mejorar la estabilidad de los mismos y para facilitar o hacer posible la administración de alimentos o nutrientes a seres vivos. 50

31. Un procedimiento para la preparación de un hidrogel de origen natural según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende las siguientes etapas: 55

a) preparar una disolución acuosa de al menos un polímero aniónico de origen natural;

b) preparar una disolución acuosa de un agente reticulante catiónico; 60

c) mezclar bajo agitación las disoluciones obtenidas en a) y b) con formación espontánea del gel.

32. Procedimiento según la reivindicación 32, donde adicionalmente se prepara una disolución acuosa de al menos una proteína y se incorpora a una de las soluciones obtenidas en a) y b) cuyos componentes sean de la misma carga eléctrica que la proteína o se adiciona sobre el gel ya formado. 65

ES 2 368 307 A1

33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 32 y 33, donde al menos una de las disoluciones de los constituyentes del gel se calientan antes de ser mezcladas.

5 34. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, que comprende además la adición de una molécula bioactiva, y/o un compuesto capaz de facilitar o reforzar el efecto de la molécula bioactiva, y/o un compuesto que interacciona con componentes biológicos y/o con afinidad por un receptor existente en los seres vivos y/o que actúa como receptor de algún componente biológico y/o un compuesto estabilizante, en la disolución a) si es de naturaleza aniónica o en la disolución b) si es de naturaleza catiónica, o bien se adiciona sobre los geles ya formados.

10 35. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, que comprende una etapa adicional después de la etapa c) en el que el gel se somete a un proceso de liofilización.

15 36. Procedimiento según la reivindicación 36, que comprende una etapa adicional en la que se regenera el gel liofilizado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

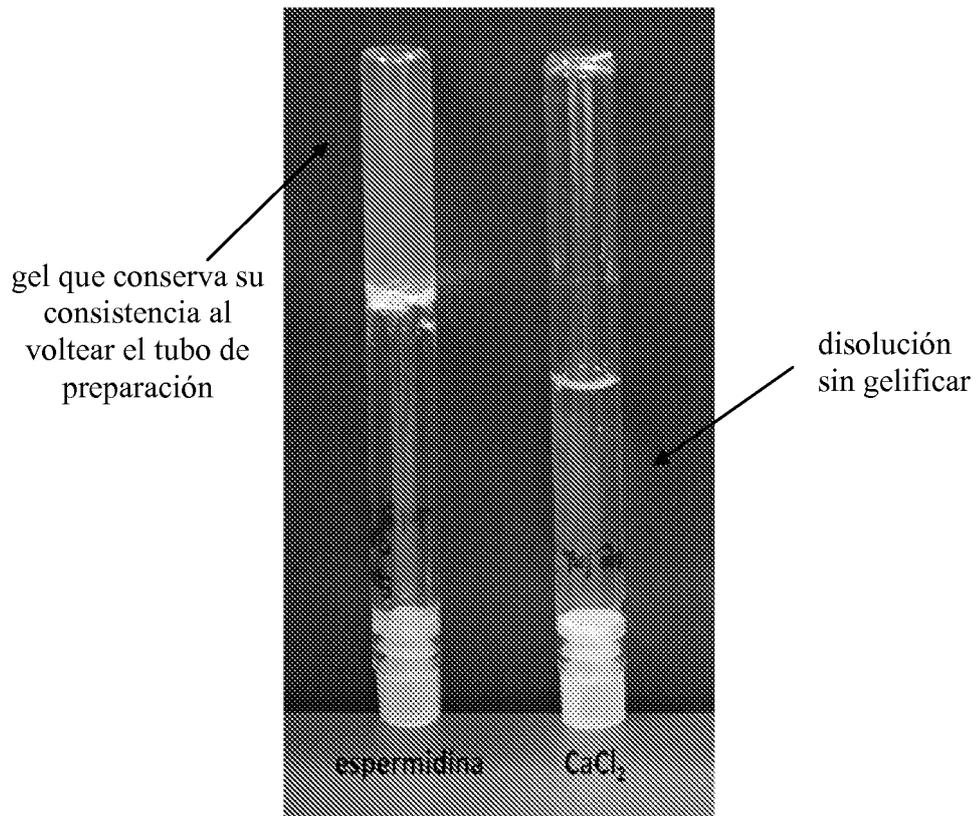


FIG. 1

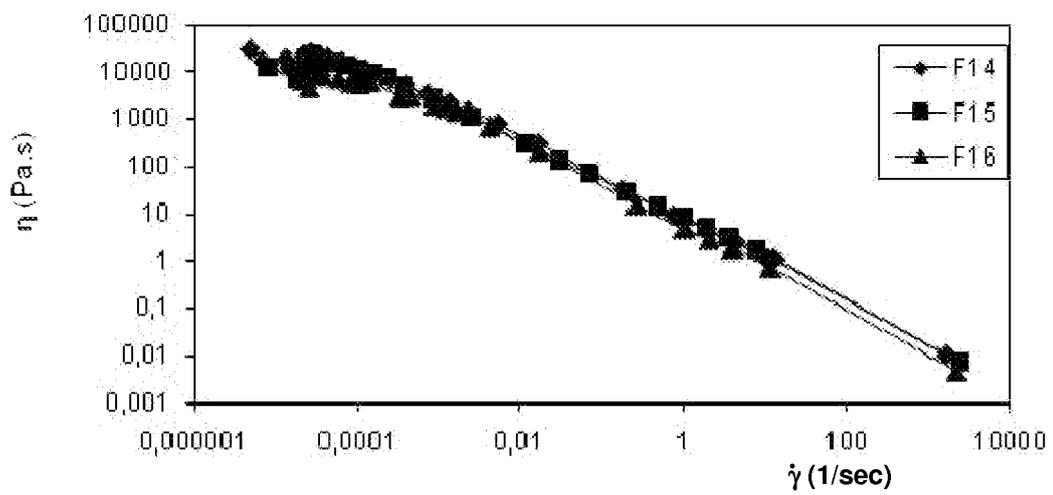


FIG. 2

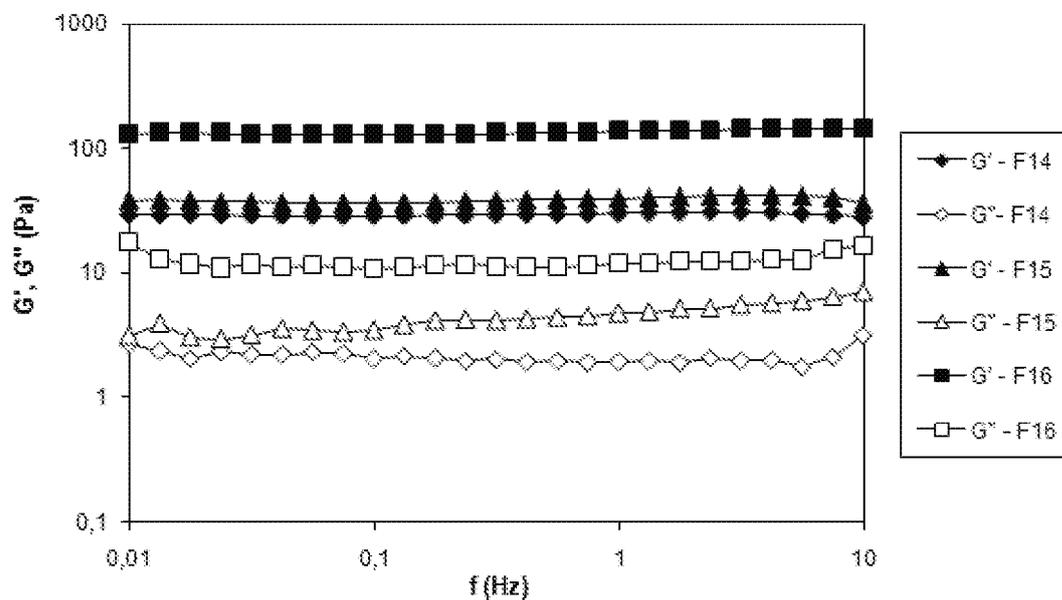


FIG. 3

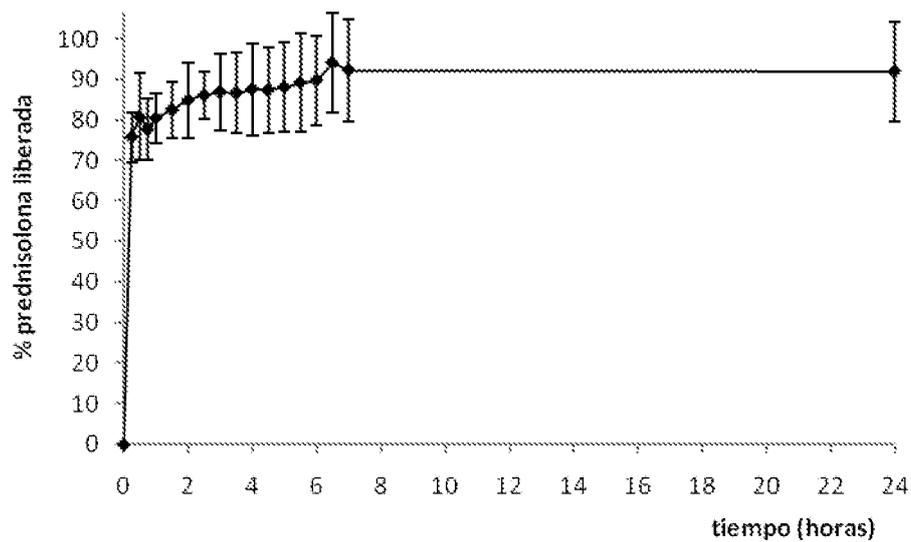
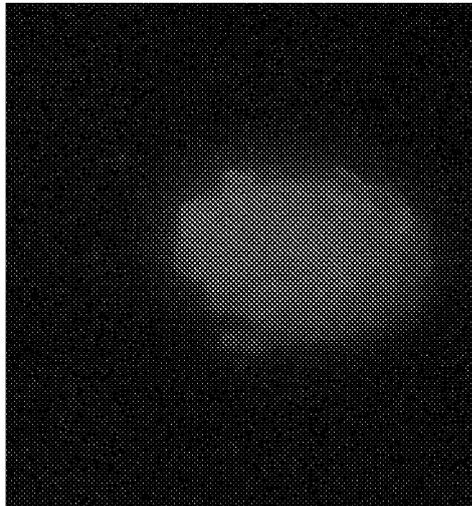


FIG. 4



(A)



(B)

FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030624

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KR 20090112150 A (KOREA RES. INST. CHEM. TECHN.) 28.10.2009, (resumen), World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado el 06.09.2011]. Recuperado de: EPODOC, EPO, DW 201004, N° de acceso: 2009-Q93137	1-5,19,20
X	A.PROKOP et al., "Hydrogel-based colloidal polymeric system for protein and drug delivery: Physical and chemical characterization, permeability control and applications", Adv. Polym. Sci., 2002, vol. 160, páginas 119-173, ver páginas 124,125,136,162.	1-9,14-16,19, 23-26,31-36
X	S. YUAN et al., "Alginate-chondroitin sulfate hydrogels", Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 1996, 23rd, páginas 238-239.	1,3-5,15,16,19,20, 31-36
A	US 20050008572 A1 (A. PROKOP et al.) 13.01.2005, párrafos [0019]-[0044],[0063]-[0083]; ejemplo 8.	1-5
A	T. KUSHIBIKI et al., "Controlled released of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds", J. Controlled Release, 2006, vol. 112, páginas 249-256.	1-36
A	T. COVIELLO et al., "Polysaccharide hydrogels for modified release formulations", J. Controlled Release, 2007, vol. 119, páginas 5-24.	1-36
A	M. HAMIDI et al., "Hydrogel nanoparticles in drug delivery", Adv. Drug Delivery Rev., 2008, vol. 60, páginas 1638-1649.	1-36

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
26.09.2011

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08L1/00 (2006.01)
C08L3/00 (2006.01)
C08L5/00 (2006.01)
C08L101/14 (2006.01)
A61K9/10 (2006.01)
A61K9/51 (2006.01)
A61K47/36 (2006.01)
A61K47/18 (2006.01)

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

C08L, A61K

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, XPESP, CALPUS, MEDLINE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 10-13,17,18,21,22,24-30	SI
	Reivindicaciones 1-9,14-16,19,20,23,31-36	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 17,18,21,22,27,28,30	SI
	Reivindicaciones 1-16,19,20,23-26,29,31-36	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KR 20090112150 A (KOREA RES. INST. CHEM. TECHN.)	28.10.2009
D02	A. PROKOP et al., Adv. Polym. Sci., 2002, vol. 160, pgs. 119-173.	
D03	S. YUAN et al., Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 1996, 23rd, pgs. 238-239.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un hidrogel que comprende a) al menos un polímero aniónico y b) al menos un agente reticulante catiónico, ambos de origen natural, entrecruzados por interacciones de tipo electrostático. El polímero aniónico puede ser un polisacárido (ácido hialurónico, ácido colomínico, ácido polisiálico, condroitina, queratano, dextranos, heparina, carragenano, furceleranós, alginatos, agar agar, glucomanano, gomas, pectinas, celulosa, almidones y ésteres de sorbitano), y el agente reticulante catiónico es una poliamina (espermina, espermidina). El hidrogel puede contener además otros componentes (proteínas, nanopartículas y/o micropartículas, ingredientes activos, marcadores, adyuvantes, inmunomoduladores, anticuerpos, aptámeros, receptores de superficie, estabilizantes de tipo lipídico, compuestos sensibles a la polimerización, emolientes, conservantes, fragancias, antioxidantes, etc.).

La invención también se refiere al procedimiento de preparación del hidrogel, a la composición farmacéutica, de recubrimiento, nutricional o cosmética que lo comprende, así como al uso del mismo para diferentes aplicaciones biomédicas, farmacológicas, sanitarias o cosméticas.

El documento D01 divulga un hidrogel sensible a la temperatura que comprende un polímero aniónico (carboximetil celulosa) y un polímero catiónico (polietilenimina, esparteina, espermina, espermidina, fenilpropanolamina, trietanolamina, epinefrina y serotonina) enlazados por interacción electrostática. El hidrogel tiene aplicación en ingeniería de tejidos y en sistemas de administración de fármacos.

El documento D02 divulga un sistema polimérico coloidal en forma de hidrogel con aplicación como sistema de administración y liberación de proteínas y fármacos. Está formado a partir de componentes poliméricos biocompatibles aniónicos y catiónicos entre los que se mencionan alginato sódico, sulfato de celulosa, goma gelano, goma arábiga, condrotin sulfato, carragenano, quitosano y espermina (ver páginas 124-125). Entre los polímeros que se utilizan para formar el hidrogel se divulga una mezcla a base de alginato sódico, sulfato de celulosa y espermina (ver página 124, sistema 2). El sistema incluye además distintos ingredientes activos como proteínas (ovoalbúmina, heparina, citocromo C), factores de crecimiento, antígenos, etc.

También en D02 se divulga una composición de nanopartículas que comprenden los componentes poliméricos aniónicos y catiónicos mencionados y que incluyen ingredientes activos (ver página 125, Tablas 2 y 3).

El documento D03 divulga un hidrogel obtenido por reacción de un polímero alginato-condroitin sulfato con diferentes poliaminas como etilendiamina, espermidina, espermina, tetrametilen-pentamina y polilisina. Se menciona en D03 que se consiguen así hidrogeles a base de polímeros naturales con aplicación como sistemas de transporte y liberación de fármacos.

A la vista de los documentos citados, se considera que las reivindicaciones 1-9,14-16,19,20,23,31-36 no son nuevas (Art. 6.1 LP 11/1986).

Respecto a las reivindicaciones 10-13, referente a la incorporación adicional de ingredientes activos específicos, queda divulgado en D02 la incorporación de distintas proteínas y fármacos (ovoalbúmina, heparina, citocromo C, factores de crecimiento, antígenos). La adición de otros compuestos como adyuvantes, estabilizantes o que refuerzan el efecto del principio activo es habitual en la práctica farmacéutica y no implica actividad inventiva. Además, en la descripción no se encuentran recogidos ejemplos que incorporen estos compuestos.

Por lo tanto, las reivindicaciones 10-13 de la solicitud se considera que carecen de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que describan composiciones de recubrimiento, nutricionales o cosméticas que comprendan un hidrogel como el de la invención. Tampoco existen indicios que lleven al experto en la materia a concebir el uso del mismo como marcador, producto sanitario, cosmético o de higiene, o como suplemento nutricional.

En consecuencia, la invención recogida en las reivindicaciones 17,18,21,22,24-30 de la solicitud se considera que es nueva, implica actividad inventiva y tiene aplicación industrial (Arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).