(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 541 502**

(21) Número de solicitud: 201500459

(51) Int. CI.:

A61L 27/52 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

19.06.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.07.2015

Fecha de la concesión:

26.10.2015

(45) Fecha de publicación de la concesión:

02.11.2015

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (50.0%)
Sección de Contratos y Patentes, C/ Donoso Cortés, 65
28015 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (50.0%)

(72) Inventor/es:

LÓPEZ LACOMBA, José Luis;
CIVANTOS FERNÁNDEZ, Ana;
RAMOS LINO, Viviana;
SÁNCHEZ BARREIRO, Alejandro;
SEIJO REY, Begoña y
LÓPEZ CEBRAL , Rita

(54) Título: **Hidrogeles bioactivos y su aplicación en regeneración ósea y cartilaginosa**

(57) Resumen:

Hidrogeles bioactivos y su aplicación en regeneración ósea y cartilaginosa.

La presente invención se refiere a hidrogeles bioactivos elaborados con ingredientes de origen natural, que están entrecruzados por interacciones de tipo electrostático y que incorporan proteínas morfogénicas óseas (BMP), y al método de elaboración de dichos hidrogeles. La invención también incluye la aplicación de estos hidrogeles bioactivos para elaborar productos sanitarios, composiciones farmacéuticos y/o implantes poliméricos para regeneración ósea y cartilaginosa.

ES 2 541 502 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Hidrogeles bioactivos y su aplicación en regeneración ósea y cartilaginosa

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector biomédico y farmacéutico, más concretamente, en la regeneración de tejidos y, en particular, del tejido cartilaginoso y óseo (tendones, cartílago y ligamentos).

Estado de la técnica

En la actualidad, la lesiones óseas y cartilaginosas siguen siendo un reto en el campo biomédico. El tratamiento estándar para la regeneración de lesiones óseas se caracteriza por ser osteoinductor, osteogénico y osteoconductor y consiste en el injerto de hueso autólogo, del propio paciente. Aunque la posibilidad de rechazo es mínima, este método presenta ciertas limitaciones como la cantidad de tejido donante, o la morbilidad de la zona del mismo. Para solventar estos inconvenientes existen otras alternativas: los denominados aloinjertos, injertos óseos obtenidos de otro paciente, y los biomateriales.

Un biomaterial se define como una sustancia farmacológicamente inerte, de origen natural o sintético, diseñada para ser implantada o incorporada dentro del sistema vivo para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo.

El tipo de biomateriales empleados con fines regenerativos en el campo de la biomedicina ha experimentado una evolución notable a medida que ha aumentado el conocimiento sobre las interacciones de los mismos con el cuerpo humano. Así, los primeros materiales que surgieron, de primera generación o "inertes", se emplean exclusivamente como método para restaurar las funciones perdidas, es decir, buscan reemplazar el tejido minimizando efectos nocivos en el hospedador como, por ejemplo, los implantes de titanio (Liu, X., Chu, P.K., Ding, C. (2004) *Materials Science and Engineering Reports*, 47: 49-121).

Posteriormente, se produjo un cambio en el concepto de la función de un biomaterial en el proceso de la regeneración tisular, pasando de considerarlo

sólo un mero soporte mecánico, a diseñar sistemas en los que el material presenta *per se* cierta actividad biológica.

Con mejores resultados, estos materiales bioactivos o de segunda generación, interaccionan en el organismo permitiendo su reemplazo por tejido del propio hospedador como, por ejemplo, las cerámicas de fosfato tricálcico (β-TCP del inglés *Tricalcium phospate Beta*) o los biovidrios y evitando así una segunda intervención de retirada del implante (Hench, L.L., Polak, J.M. (2000). *Science*, 295: 1014-1017). El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos y presentar buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes y tiene una cinética de degradación muy lenta.

Más recientemente, se han desarrollado los materiales de tercera generación, cuyo principal objetivo es estimular de forma específica la respuesta celular a nivel molecular mediante el empleo de sustancias activas. Son materiales que se adaptan al medio fisiológico, permitiendo la proliferación celular y el desarrollo del nuevo tejido, e incluso producen la activación de genes que estimulan la regeneración del mismo, por ejemplo, cerámicas de β-TCP activadas con rhBMP-2 (Abarrategi, A., Civantos, A., Ramos, V., Sanz Casado, J.V., López-Lacomba, J.L. (2008) *Biomacromolecules*, 9: 711-718.).

En las últimas décadas, se han desarrollado materiales poliméricos biodegradables dando lugar a un amplio abanico de polímeros naturales y sintéticos con aplicaciones biomédicas (Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2007) *Progress in Polymer Science,* 32: 762–798).

Por lo tanto, los diferentes biomateriales se pueden clasificar en función de su composición (materiales metálicos, cerámicos, poliméricos o compuestos), de su origen (naturales o sintéticos) e incluso en biodegradables o no biodegradables.

Los materiales metálicos de titanio, cobalto, aluminio y sus aleaciones correspondientes, son compatibles con los tejidos biológicos aportando

buenas propiedades mecánicas (resistencia al desgaste por ejemplo) siendo empleados desde sus inicios en la reparación de tejidos duros de sostén.

Los inconvenientes que presentan se solventan en parte con los materiales cerámicos (alúmina, porcelanas, hidroxiapatita, etc.), con una baja reactividad química que les confiere un carácter inerte y que conlleva una adecuada biocompatibilidad. Este tipo de materiales promueven la proliferación celular (muchas veces de forma específica), permitiendo la síntesis por parte de estas células de los componentes de la matriz extracelular.

Los materiales poliméricos son, con mucho, el grupo más variado y versátil dentro de los biomateriales, pudiendo clasificarse en función de su origen en: naturales (alginatos, dextranos, agarosa, celulosa, almidón, colágenos, quitosanos, etc.) o sintéticos (poliestireno, poli-α-hidroácidos, poliésteres, polilactonas, etc.) (Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2007) *Progress in Polymer Science,* 32: 762–798).

Una de las corrientes dentro del campo de la ingeniería de tejidos se centra en imitar y simular las condiciones de reparación y regeneración de los tejidos que tienen lugar de forma natural en el organismo vivo. De ahí nace la necesidad de emplear polímeros naturales presentes en los tejidos para emplearlos como biomateriales.

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales capaces de embeber grandes cantidades de agua o fluidos acuosos. Existen varias posibles clasificaciones para los hidrogeles, pero la principal se basa en el tipo de interacciones que dan lugar a la red polimérica que forma el esqueleto del hidrogel. Así, atendiendo al tipo de entrecruzamiento o reticulación, los hidrogeles se dividen en hidrogeles químicos e hidrogeles físicos. En los primeros, las uniones se realizan a través de enlaces covalentes, mientras que en los segundos, las mecanismos de formación de enlace se corresponden con interacciones de tipo físico: interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals...etc. Los hidrogeles químicos han sido ampliamente estudiados en el pasado para aplicaciones biomédicas, principalmente debido a la inestabilidad *in vivo* de los hidrogeles físicos. Sin embargo, está ampliamente descrito que muchos de los reticulantes químicos son tóxicos y que los métodos de elaboración de estos hidrogeles son

agresivos, siendo probable, como consecuencia, la alteración de posibles moléculas delicadas incorporadas en los mismos. Al mismo tiempo esto ha dificultado su aprobación para usos biomédicos por parte de las agencias regulatorias. Probablemente por este motivo hay tan pocas formulaciones hidrogel comercializadas, con respecto al importante esfuerzo investigador realizado.

De forma paralela, los biomateriales, que pueden ser biodegradables o no, naturales o sintéticos, siempre deben ser biocompatibles y no tóxicos, de tal forma que permitan y favorezcan el desarrollo de tejido *de novo*. Si son biodegradables, ha de poderse controlar la velocidad de degradación de forma que se ajuste asimismo a la velocidad de reparación, de sustitución del biomaterial por el propio tejido y sus productos de degradación han de ser inocuos. Otra característica deseable de los biomateriales es que sean adecuados para la liberación de agentes bioactivos; además, debe permitir que las células ya estimuladas con dichos agentes bioactivos los colonicen, actuando a la vez como sistemas de liberación y como soportes para la regeneración.

Puede encontrarse una revisión de los diferentes tipos de biomateriales en: Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A. (2012) *Trends in Biotechnology*, 10 (30): 548-54.

Los sistemas de regeneración ósea conocidos hasta el momento y los que ya existen en el mercado son productos sanitarios que incorporan agentes bioactivos cuyo principal inconveniente es que existe una rápida liberación inicial (*burst effect*), un efecto biológico a muy corto plazo y que la biodegradación del soporte usado (colágeno) también resulta muy rápida, al tratarse de una proteína ya existente en el cuerpo humano y para la que existen enzimas específicos. Todo ello hace que la dosis que ha de colocarse en el soporte para una acción terapéutica eficaz sea excesiva, lo cual encarece extraordinariamente el producto y puede conducir a efectos indeseados. A ese elevado coste también contribuye el hecho de que el soporte, el colágeno, resulta excesivamente caro al tener que eliminar de la molécula natural, extraída de otras especies, aquellas secuencias no homólogas con la secuencia humana que puedan dar lugar a reacciones inmunogénicas. Aparte del elevado coste, las características de estos

sistemas de regeneración no permiten obtener un efecto biológico a largo plazo conducente a la inducción a tiempos largos de la formación de osteonas (unidades micromecánicas de hueso compacto, constituidas por osteocitos y matriz ósea, necesarias en osteogénesis), a menos que se emplee una elevada dosificación de agentes bioactivos lo que, además de encarecer el producto, puede conducir a efectos secundarios como, por ejemplo, la acción en lugares no deseados del agente bioactivo incorporado.

En cambio, en la regeneración de tejidos blandos como ligamentos, tendones y/o cartílagos, no existen productos comerciales que lleven incorporados factores activos (Endobutton CL® o Ácido hialurónico).

Por ello todo lo expuesto hasta aquí, existe una incesante demanda de otros transportadores que, siendo biocompatibles con el organismo, permitan la liberación del factor bioactivo durante más tiempo y de forma controlada, para reducir los efectos secundarios asociados a su aplicación y para conseguir, no sólo una eficaz reparación de lesiones óseas, sino que la maleabilidad del mismo permita liberar factores bioactivos de forma efectiva para su aplicación en la regeneración de otros tejidos como cartílago y tendones.

Descripción detallada de la invención

Hidrogeles bioactivos y su aplicación en regeneración ósea y cartilaginosa.

La presente invención se refiere a hidrogeles bioactivos elaborados con ingredientes de origen natural que están entrecruzados por interacciones de tipo electrostático y que incorporan proteínas morfogénicas óseas (BMP); estos hidrogeles bioactivos se utilizan para elaborar productos sanitarios para regeneración ósea y cartilaginosa con muy buenos resultados debido a la prolongada vida del soporte de la BMP dentro del organismo animal, lo que favorece la formación de nuevo hueso, cartílago o tendón.

La matriz ósea extracelular constituye una importante reserva de factores de crecimiento (GF, del inglés *Growth Factors*), entre los que se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*) que intervienen en la formación de diferentes tejidos (tejido óseo, neural y cardiaco) durante la embriogénesis e, incluso, actúan en la vida

adulta en los procesos de reparación de fracturas. Dichas proteínas actúan como agentes locales, necesitan permanecer en el defecto óseo durante un tiempo determinado para producir la diferenciación celular y la consiguiente regeneración tisular. Por ello, son proteínas que requieren de una matriz portadora que permita su liberación de forma prolongada en el sitio de acción y proteja al factor de procesos degradativos.

En el 2004, la FDA (*Food and Drug Administration*, de EEUU) aprobó el uso biomédico como productos sanitarios de la rhBMP-2 y la rhBMP-7 para determinadas situaciones clínicas como, por ejemplo, el tratamiento de grandes defectos óseos, no uniones y fusión espinal anterior, lumbar y cervical. Existen diferentes productos disponibles en el mercado, como Infuse® (rhBMP-2, Medtronic, Minneapolis, USA), Inducto® (rhBMP-2, Wyeth Europa Ldt, London, UK), Osigraph® (rhBMP-7, Wyeth Europa Ldt, Londres, UK) y OP-1 Putty® (rhBMP-7, Stryker Biotech, MA, USA), que emplean como transportador esponjas de colágeno.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un hidrogel bioactivo que comprende:

a) al menos un polímero aniónico,
b) al menos un agente reticulante catiónico,
c) al menos un glicosaminoglicano, y
d) al menos dos proteínas,

donde a) y b) son de origen natural y están entrecruzados por interacciones de tipo electrostático y una de las proteínas es un agente bioactivo del grupo de las proteínas morfogénicas óseas.

Como polímero aniónico se selecciona preferentemente la goma gelano y/o la goma arábiga que pueden incorporarse al hidrogel bioactivo en concentraciones de 3 a 1 mg/ml (concentración final en el hidrogel). Los agentes reticulantes catiónicos de elección pueden ser la espermidina y/o la espermina, que se utilizan preferentemente a una concentración final entre 0,1 y 1,5 mg/ml. Preferentemente, se incorpora condroitín sulfato, ácido hialurónico y/o dermatán sulfato, como glicosaminoglicanos a una concentración final de entre 0,5 y 5 mg/ml. De las dos proteínas que incorpora

el hidrogel bioactivo, una es una BMP y la otra es, preferentemente, albúmina que puede incorporarse a una concentración final de entre 2 y 10 mg/ml.

Entre las BMP, se selecciona preferentemente la BMP2 en su forma homodimérica (BMP2-BMP2), es decir, formada por dos subunidades iguales unidas entre sí, pero se conoce que en la naturaleza puede existir la BMP-2 con otras proteínas, es decir en su forma heterodimérica como la formada por dos monómeros diferentes (BMP2-BMP4, BMP2-BMP5, BMP2-BMP6, BMP2-BMP7, BMP2-BMP9, BMP2-BMP12, etc.). La BMP- 2 escogida se empleó a una concentración final en el hidrogel de entre 0,1 y 0,5 mg/ml.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para elaborar los hidrogeles bioactivos de la invención. Este método comprende los siguientes pasos:

a) preparar una disolución acuosa de proteína,

b) añadir una disolución de BMP a la disolución acuosa del paso a),

c) mezclar con una disolución acuosa de un reticulante catiónico,

d) verter la mezcla del paso c) sobre una solución acuosa de un polímero aniónico con un glicosaminoglicano, mezclando los componentes a 55-65ºC y aplicando agitación durante 2-10 segundos, para después dejar que el hidrogel se forme a temperatura ambiente.

La proteína del paso a) es, preferentemente, albúmina que puede incorporarse a una concentración final de entre 5 y 10 mg/ml. Entre las BMP, se selecciona preferentemente la BMP2 en su forma homodimérica (BMP2-BMP2), es decir, formada por dos subunidades iguales unidas entre sí. Los agentes reticulantes catiónicos de elección pueden ser la espermidina y/o la espermina, que se añaden preferentemente a una concentración final entre 0,1 y 1,5 mg/ml. Como polímero aniónico se selecciona preferentemente la goma gelano y/o la goma arábiga que puede incorporarse al hidrogel bioactivo en concentración final de 3 a 1 mg/ml. Preferentemente, se incorpora como glicosaminoglicano condroitín sulfato, ácido hialurónioco y/o dermatán sulfato a una concentración final de entre 0,5 y 5 mg/ml. La temperatura de elección para realizar la mezcla de los componentes es de 60ºC y, preferente, se aplica agitación durante 5 segundos.

La BMP se puede disolver en ácido acético diluido filtrándola posteriormente en esterilidad mediante filtros de 0,22 µm. Para los demás componentes de los hidrogeles bioactivos las disoluciones acuosas se realizan, preferentemente, en tampón HEPES.

Por lo tanto, un método preferido para elaborar los hidrogeles bioactivos de la invención comprende los siguientes pasos:

a) preparar una disolución acuosa de albúmina,

b) añadir una disolución de BMP a la disolución acuosa de albúmina,

c) mezclar con una solución acuosa de espermidina,

d) verter la mezcla del paso c) sobre una solución acuosa de goma gelano y condroitín sulfato, mezclando los componentes a 60ºC y aplicando agitación durante 5 segundos, para después dejar que el hidrogel se forme a temperatura ambiente.

Las BMP son muy sensibles, por lo que pueden perder su actividad biológica cuando se someten a determinados procesos o condiciones ambientales. La mayoría de los biomateriales activados con proteínas durante el proceso de fabricación se inactiva y pierden su función biológica. En el caso de los hidrogeles de la invención, se consiguió incluir dichos factores y se pudo evaluar la presencia de proteína activa en los mismos. Para determinar la presencia de proteína activa incorporada en los hidrogeles se sometió a los hidrogeles a ensayos colorimétricos de actividad fosfatasa alcalina (ALP, marcador temprano de la diferenciación ósea). Dicha actividad puede detectarse únicamente en células osteoblásticas. Se utilizó la línea celular multipotente C2C12, línea celular premioblastica que en presencia de BMP2 es capaz de diferenciarse hacia diferentes fenotipos óseos. Se realizó la siembra de esta línea celular en los hidrogeles de la invención y se observó si la BMP2 cargada en los mismos se liberaba de forma activa y era capaz de promover la efectiva diferenciación de estas células hacia el linaje osteoblástico. La detección de actividad fosfatasa alcalina en muestras de células C2C12 cultivadas con medios procedentes de ensayos de liberación de BMP-2 cargada en los hidrogeles estudiados demostró la liberación de la proteína manteniendo su bioactividad.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica y/o a un producto sanitario que comprenden un hidrogel bioactivo de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica y/o a un producto sanitario para su uso en regeneración ósea o cartilaginosa.

La invención también se refiere a un método para tratar las alteraciones óseas y/cartilaginosas mediante el uso de los hidrogeles bioactivos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un hidrogel bioactivo de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica o de un producto sanitario.

Así mismo se refiere al uso de un hidrogel bioactivo de la invención en la elaboración de implantes poliméricos para regeneración ósea y cartilaginosa.

Los hidrogeles bioactivos de la presente invención son hidrogeles físicos que han demostrado ser más estables, tanto *in vitro* como *in vivo*, que a los hidrogeles físicos convencionales. La preparación de los hidrogeles bioactivos de la invención mediante la técnica de la gelificación iónica, cuyo fundamento son las interacciones electrostáticas entre compuesto de carga opuesta, tiene lugar además en un tiempo corto. De esta manera, no es preciso el uso de reactivos químicos ni de fuentes de radiación, como la radiación UV.

Las pruebas *in vivo* realizadas con los hidrogeles bioactivos de la invención han demostrado, en primer lugar, su biocompatibilidad; en segundo lugar, la larga duración de estos hidrogeles como soportes de las BMP, lo que permite la liberación del factor bioactivo durante más tiempo que otros soportes conocidos, permitiendo que el tejido generado se mantenga con mayor estabilidad en el tiempo y no sea reabsorbido, lo que facilitaría el éxito de procesos regenerativos que necesiten de un mayor tiempo para completarse, en tercer lugar, el control que han ejercido los hidrogeles bioactivos sobre la liberación de la BMP, en el lugar donde se requiere la regeneración; y, en cuarto lugar, las adecuadas propiedades mecánicas de los hidrogeles

bioactivos de la invención para actuar como soportes del crecimiento y desarrollo celular *in vivo*. Con todo ello, se consigue la eficaz reparación de lesiones óseas, así como de otros tejidos como son los tendones y ligamentos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Test de actividad BMP-2 *in vitro*. A) Determinación de la cantidad de proteínas totales (PT), expresadas en microgramos y determinadas por el método de Bradford a una absorbancia de 590nm; B) Actividad fosfatasa alcalina (ALP), mediante la determinación de la absorbancia a 405nm, del cultivo celular C2C12 sembrado con medios de liberación de los hidrogeles con proteína (H-BMP2) y sin proteína (H-C).

Figura 2. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 3 semanas de implantación de los hidrogeles sin rhBMP-2 (10x). Se aprecia la buena integración de los hidrogeles en el tejido hospedador, sin signos de encapsulación.

Figura 3. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 3 semanas de implantación de los hidrogeles sin rhBMP-2 (40x). Se observa la aparición de células colonizando el hidrogel.

Figura 4. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 3 semanas de implantación de los hidrogeles sin rhBMP-2 (40x). Se observa la aparición de vasos sanguíneos en las proximidades del hidrogel.

Figura 5. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 3 semanas de implantación de los hidrogeles cargados con rhBMP-2 (10x). Se observa la buena integración de los hidrogeles en el tejido hospedador, sin signos de encapsulación.

Figura 6. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 3 semanas de implantación de los hidrogeles. A: hidrogeles sin rhBMP-2 (40x) B: hidrogeles cargados con rhBMP-2 (10x). C y D: ampliaciones.

Figura 7. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 3 semanas de implantación de los hidrogeles cargados con BMP (10x).

Figure 8. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 9 semanas de implantación de los hidrogeles cargados con BMP (20x). A) Hueso trabecular; B) Periostium; C) Médula ósea.

Figura 9. Tinción de hematoxilina-eosina realizada en muestras obtenidas tras 9 semanas de implantación de los hidrogeles cargados con BMP (100x). En la imagen se pueden apreciar una osteona, osteocitos (flecha negra) y osteoblastos (flecha blanca).

Figura 10. En esta figura se muestran imágenes de microtomografía computarizada (μ-CT) correspondientes a los sujetos experimentales sacrificados a las 5 semanas; las imágenes se tomaron en la segunda, tercera, cuarta y quinta semana post-cirugía (se indican con números en la parte superior de la figura). En el lado derecho (LD), se implantaron los controles de colágeno (M-C) y de hidrogel (H-C) donde no se aprecia señal de tejido óseo. En cambio, en el lado izquierdo (LI), se insertaron las muestras activas con proteína BMP-2, tanto de colágeno (M+BMP-2) como de hidrogel (H+BMP-2). Se observa señal de gran intensidad en la zona del tejido blando que evoluciona durante las 5 semanas de estudio en ambas muestras. Cabe destacar la gran diferencia entre las muestras con BMP-2 en la última semana. Se distingue una señal de gran tamaño, volumen e intensidad correspondiente al nuevo tejido óseo, producido por el hidrogel con BMP-2 en la última semana en comparación con el control Mucograft con proteína BMP-2.

Figura 11. Imágenes de H/E de las muestras correspondientes al control comercial de colágeno Mucograft (A: control sin proteína, B: con BMP-2) tras 5 semanas post-cirugía. Se encuadra la zona de la muestra (5x), y se presenta un aumento (20x) de la misma a la derecha. Se detecta la presencia de osteocitos (Os) en la muestra activa rodeada de tejido adiposo (TA) característico de medula ósea (BM), rodeado de fibras musculares (FM). En la muestra sin BMP-2, se aprecia abundantes fibras de colágeno (FC) con cierta orientación y rodeadas de fibras musculares (FM) y menor cantidad de tejido adiposo (TA).

Figura 12. Imágenes de H/E de las muestras correspondientes al hidrogel de la invención (A: control sin proteína, B: con BMP-2) tras 5 semanas post-cirugía. Se encuadra la zona de la muestra (5x), y se presenta un aumento (20x) de la misma a la derecha. Se detecta la presencia de osteocitos en la muestra activa embebidos en matriz ósea (BM, de color rojo intenso, organizada y de gran densidad) rodeado de fibras musculares (FM). En la muestra sin BMP-2, se localiza fácilmente fragmentos de hidrogel (H, y flechas negras) rodeados por tejido conectivo, fibras de colágeno (FC) y fibras musculares (FM).

Figura 13. Imágenes de microtomografía computarizada (μ-CT) correspondientes a los sujetos experimentales sacrificados a las 9 semanas. Para simplificar la imagen, se muestra sólo a partir de la semana 5 hasta la semana 9. En el lado derecho (LD), se implantaron los controles, donde no se aprecia señal de tejido óseo en ninguno de los cortes. En cambio, en el lado izquierdo (LI), se insertaron las muestras activas con BMP-2 (Mucograft® en la parte superior e hidrogel en la parte inferior de la figura). Se confirma, así, la presencia de nuevo tejido óseo por más tiempo en el caso de los hidrogeles activos (H+BMP-2) donde se distingue de forma nítida la existencia de una señal correspondiente al nuevo hueso en el lado izquierdo hasta la semana 9 de estudio. Dicha señal es prácticamente inapreciable en el caso de Mucograft® con proteína (M+BMP-2), durante las 9 semanas de estudio.

Figura 14. Imágenes de TM de las muestras correspondientes al control comercial Mucograft® (A: control sin proteína, B: con BMP-2) tras 9 semanas post-cirugía. Se encuadra la zona de la muestra (5x), y se presenta un aumento de la misma a la derecha (10x). Se detecta la presencia de tejido adiposo rodeado por la muestra implantada característico de médula ósea. Ya no se aprecian indicios de tejido óseo ectópico, puesto que no se localizan osteocitos ni matriz ósea como sí se observó a las 5 semanas de estudio. En el caso del control sin BMP-2, destaca la escasez de fibras de colágeno (FC) en comparación con las imágenes obtenidas a las 5 semanas. Estos hechos son indicativos de su pronta degradación *in vivo*.

Figura 15. Imágenes de TM de las muestras correspondientes al hidrogel de la invención (A: control sin proteína, B: con BMP-2) tras 9 semanas post-cirugía. Se encuadra la zona de la muestra (5x), y se presenta un aumento de

la misma a la derecha (10x). Se detecta la presencia de menores fragmentos de hidrogel, más integrados en el tejido que a las 5 semanas. En el hidrogel control sin BMP-2, se observan, además, fibras de colágeno (FC) y musculares (FM) en contacto con la muestra. Con proteína BMP-2, se distingue tejido óseo, donde se aprecian los osteocitos. Además, se destaca con un círculo la aparición de abundantes vasos sanguíneos fundamentales para enriquecer y mantener el nuevo tejido.

Figura 16. Análisis de citotoxicidad celular de los hidrogeles. En A se muestra las células W3T3, tras 5 días de incubación con el hidrogel preparado según el ejemplo 4 y en B las imágenes que corresponden a la misma línea celular tras 45 días de incubación sobre el hidrogel preparado según el ejemplo 2.

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1. Preparación de los hidrogeles con condroitín sulfato.

En primer lugar se prepararon las siguientes soluciones:

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)
A	Goma Gelano	5	0.71
B	Condroitín Sulfato	6	0.43
C	Albúmina	20	0.93
D	Espermidina	2	0.43

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.93 ml de la solución C con 0.43 ml de la solución D, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 0.71 ml de solución A y 0.43 ml de solución B, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema. El hidrogel se mantuvo a 4° C hasta 15 minutos antes de su implantación, durante los que se dejó a temperatura ambiente.

Ejemplo 2. Preparación de los hidrogeles con ácido hialurónico.

En primer lugar se prepararon las siguientes soluciones:

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)

A	Goma Gelano	5	0.71
B	Ácido Hialurónico	6	0.43
C	Albúmina	20	0.93
D	Espermidina	2	0.43

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.93 ml de la solución C con 0.43 ml de la solución D, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 0.71 ml de solución A y 0.43 ml de solución B, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema.

Ejemplo 3. Preparación de los hidrogeles con espermina.

En primer lugar se prepararon las siguientes soluciones:

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)
A	Goma Gelano	5	0.71
B	Condroitín Sulfato	6	0.43
C	Albúmina	20	0.93
D	Espermidina	2	0.21
E	Espermina	1	0.21

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.93 ml de la solución C con 0.21 ml de la solución D y 0.21 de la solución E, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 0.71 ml de solución A y 0.43 ml de solución B, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema.

Ejemplo 4. Preparación de los hidrogeles con Condrotín sulfato y una concentración de espermidina mayor.

En primer lugar se prepararon las siguientes soluciones:

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)

A	Goma Gelano	5	0.71
B	Condroitín Sulfato	6	0.43
C	Albúmina	20	0.93
D	Espermidina	5	0.43

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.93 ml de la solución C con 0.43 ml de la solución D, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 0.71 ml de solución A y 0.43 ml de solución B, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema.

Ejemplo 5. Preparación de los hidrogeles con Ortofosfoserina y goma arábiga.

En primer lugar se prepararon las siguientes soluciones:

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)
A	Goma Gelano	5	1
B	Condroitín Sulfato	6	0.43
C	Goma Arábiga	7,5	0.90
D	Albúmina	10	0.7
E	Ortofosfoserina	1	0.30
F	Espermidina	5	0.16

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.16 ml de la solución F, con 0.30 ml de la solución E, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 1 ml de solución A, 0.43 de la solución B, 0.90 de la solución C y 0.7 de la solución D, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema.

Ejemplo 6. Preparación de los hidrogeles con dermatán sulfato.

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)
A	Goma Gelano	5	0.71

B	Dermatán Sulfato	6	0.43
C	Albúmina	20	0.93
D	Espermidina	2	0.43

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.93 ml de la solución C con 0.43 ml de la solución D, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 0.71 ml de solución A y 0.43 ml de solución B, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema.

Ejemplo 7. Preparación de los hidrogeles con condroitín sulfato y dermatán sulfato.

Solución	Componente	Concentración (mg/ml)	Volumen empleado (ml)
A	Goma Gelano	5	0.71
B	Condroitín Sulfato	6	0.43
C	Dermatán Sulfato	6	0.43
D	Albúmina	20	0.93
E	Espermidina	2	0.43

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron 0.93 ml de la solución D con 0.43 ml de la solución E, tras lo cual se añadió el conjunto sobre una mezcla de 0.71 ml de solución A, 0.43 ml de solución B y 0.43 ml de solución C, previamente situada en un baño termostatizado a 60±1°C bajo agitación magnética. Después de 5 segundos se interrumpió la agitación y se retiró la fuente de calor. La gelificación se produjo de manera espontánea, con la disminución de la temperatura del sistema.

Ejemplo 8. Preparación de hidrogeles siguiendo el ejemplo 1 con Proteína Morfogénica Ósea

La Proteína Morfogénica Ósea utilizada fue la rhBMP-2 (del inglés *Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein*-2; Proteína Morfogénica Ósea 2 recombinante humana, en español) suministrada por la empresa Noricum S.L. A lo largo de los ejemplos de la invención, todas las alusiones a la proteína BMP o BMP-2 se entenderán realizadas a la proteína rhBMP-2.

La proteína BMP-2 se incluyó en los hidrogeles durante la preparación de los mismos según se describe en el ejemplo 1. Más concretamente, se añadieron 200 µl de una solución de BMP-2 en AcOH 50 mM (2.5 mg/ml) a la solución C, dejándose interaccionar ambas sustancias durante 45 minutos. Los hidrogeles cargados con BMP-2 también se mantuvieron a 4º C hasta 15 minutos antes de su implantación.

Ejemplo 9. Análisis de citotoxicidad celular

La línea celular de fibroblastos W3T3 fue utilizada para analizar la biocompatibilidad de los hidrogeles estudiados. Para la realización de estos experimentos los hidrogeles fueron preparados en condiciones asépticas.

Los fibroblastos fueron cultivados en Dulbecco's Modified Eagle's Medium, suplementado con un 10% suero fetal bovino inactivado, un1% de L-glutamina y un 1% de penicilina-estreptomicina, a 37ºC y en una atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO_2. Posteriormente estas células fueron tripsinizadas y sembradas sobre la superficie de los hidrogeles o, en otra modalidad del experimento, incorporadas a los hidrogeles durante la preparación de los mismos, mediante su adición previa a la solución de albúmina (4×10^5 células/mL). Tras 2, 5 y 45 días, se aplicó una doble tinción. Dicha tinción está basada en la adición de 800 µl de una solución 0.012 mM de diacetato de fluoresceína en tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4), dejándose actuar ésta durante 15 minutos, y en la posterior incorporación de 800 µl de una solución de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) 0.0014 mM en PBS (pH 7.4), dejándose actuar ésta durante 5 minutos. Mediante esta tinción los núcleos de todas las células se tiñen de azul, mientras que solamente los citoplasmas de las células vivas se tiñen de verde. Finalmente, se lavaron las formulaciones con PBS (pH 7.4) generosamente, para eliminar todos los posibles residuos de los reactivos de tinción, y se observaron los geles con ayuda de un microscopio confocal (Microscopio Confocal Spectral Leica TCS-SP5; LEICA Microsystems Heidelberg GmbH, Am Friedensplatz, Mannheim, Alemania).

Tal y como se observa en la Figura 16, este análisis demostró que, a todos los tiempos estudiados, había células vivas en los hidrogeles, situadas a diferentes profundidades en el mismo. Además, imágenes de confocal de los canales verde y azul, fusionados en una única imagen con doble color, permitió confirmar la ausencia de células muertas en los mismos.

Ejemplo 10. Test de actividad de BMP-2 *in vitro.*

Se prepararon 4 muestras con forma de disco (de 0,75 cm de diámetro y 5 mm de grosor) a partir de los hidrogeles descritos en los ejemplos 1- 7. Se realizaron cultivos *in vitro* sembrando la línea celular C2C12 (premioblastica de ratón CLR 1721 ATCC) siendo el que presentó mayor citocompatibilidad y proliferación celular, el hidrogel preparado según el ejemplo 1. De estos resultados se seleccionó la composición del ejemplo 1 para realizar los mismos hidrogeles con BMP-2 siguiendo el ejemplo 8.

Se prepararon 4 muestras con forma de disco (de 0,75 cm de diámetro y 5 mm de grosor) de los hidrogeles preparados según el ejemplo 1 y el ejemplo 8. Las muestras se colocaron en placas de cultivo estériles de 24 pocillos por cuadruplicado, a los que se les añadió 0,6 ml de DMEM (Medio de Cultivo Eagle Modificado por Dulbecco). Se llevó la placa a estufa de temperatura 37ºC y, tras 5, 8, 24 y 96 horas de incubación, los medios DMEM que estuvieron en contacto con los hidrogeles se retiraron y se emplearon para los ensayos de Bradford (para determinar las proteínas totales) y fosfatasa alcalina. Como control, se siguieron los mismos pasos con muestras de hidrogel sin cargar con proteína, como los hidrogeles descritos en el ejemplo 1. El resto de hidrogeles descritos en los ejemplos 2-7, también como controles, mostraron un comportamiento semejante al hidrogel descrito en el ejemplo 1. Este hidrogel fue, por tanto, el seleccionado ya que presentó mayor citocompatibilidad, mayor proliferación celular y es el que se muestra en la figura 1.

Para los ensayos se utilizó la línea celular C2C12 procedente de la *American Type Culture Collection* (CRL-1772, Manassas, Virginia).

Los experimentos se realizaron en placas de 48 pocillos en los que se incluyó un volumen de 0,026 ml de suspensión celular con una densidad de 10000 cels/cm^2. A continuación, se añadieron 0,1 ml de las muestras previamente recogidas, tal y como se describe al principio de este ejemplo, y 0,3 ml de medio de cultivo precalentado.

Se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se lavaron con PBS (200 µl) añadiendo, a continuación, 100 µl/ pocillo de tampón de lisis (50 mM Tris pH

6,8; 0,1% Triton X-100; 2 mM $MgCl_2$). Se utilizaron 10 µl de las muestras para realizar ensayos de actividad fosfatasa alcalina (ALP) en placas de 96 pocillos, utilizando p-nitrofenil fosfato en tampón 2-amino-2-metil-1-propanol como sustrato en un volumen total de 100 µl. Después de 10 minutos a 37ºC, se paró la reacción con 100 µl de 0,5 NaOH y se midió la absorbancia a 450 nm con un Microplate Reader (Bioteck FL-600).

Se determinó la ALP (marcador temprano de la osificación, de la diferenciación celular hacia linaje óseo) en las células C2C12 premioblásticas de ratón. En primer lugar, se comprobó que las células sembradas con medio que estuvieron en contacto con hidrogeles no activos (sin proteína), no expresaban marcadores óseos como ALP (véase Figura 1, H-C.). En cambio, en las células que se sembraron con los medios que estuvieron en contacto con los hidrogeles cargados con proteína (es decir, activos; H-BMP2 en la Figura 1), sí se detectó actividad ALP, mostrando absorbancia a 405nm. Este hecho demuestra que los hidrogeles son capaces de liberar la BMP-2 de forma activa al medio y ésta ser captada por las células adyacentes. Así se consiguió demostrar que, ni el método de inclusión de la proteína ni el ambiente del hidrogel durante el proceso de liberación inactivaron a la proteína incluida en los hidrogeles, siendo estos mismos trasportadores adecuados para liberarla.

Ejemplo 11. Procedimiento quirúrgico

Cada gel preparado según el ejemplo 1 o el ejemplo 8 se dividió en 4 porciones iguales, cada una de las cuales se implantó en el tejido muscular de ratas Wistar (modelo animal seleccionado para el estudio).

La cirugía desarrollada consistió en la inserción de las muestras de hidrogeles, cargados o no con BMP-2, (o de los controles correspondientes) en tejido muscular. Para ello, y tras la anestesia vía inhalatoria (Isofluorano y O_2), se desinfectó la zona a operar que correspondió a los cuartos traseros de ratas Wistar adultas. Se realizó una incisión superficial siguiendo la columna vertebral, a 3cm de la raíz de la cola. Se separó la piel del tejido muscular y, en dicha zona, se realizó otra incisión, creando un bolsillo muscular donde se insertaron las muestras (debido al tamaño de las mismas se implantaron una cuarta parte). Tras suturar las diferentes capas de tejido, se cerró la herida y a los animales se les aplicó calor, con una fuente de luz roja, hasta observar la recuperación de la anestesia.

Los animales se sacrificaron mediante inyección de Doletal (Tiopental) en vena marginal de la cola y se obtuvieron las biopsias de la zona de implantación. Estas muestras de biopsia se fijaron con paraformaldehido (PFA) al 4% y, posteriormente, se sometieron a un tratamiento de histología en parafina. Dicho tratamiento requirió de una descalcificación durante 2 días en ácido nítrico al 5%, seguida de una deshidratación sumergiendo las muestras de biopsia en una secuencia de alcoholes de concentración creciente, un paso de miscibilidad en xilol y, por último, su embebimiento en parafina hasta conseguir la obtención de los bloques. Con un micrótomo (Leika RM 2155) se obtuvieron cortes de los bloques de aproximadamente 5 µm de espesor y sobre éstos se realizaron las correspondientes tinciones hematoxilina-eosina (H/E), de uso frecuente en clínica, y Tricrómico de Masson (TM) específica de tejido óseo.

Los tiempos empleados para los estudios que se detallan a continuación fueron 3, 5 y 9 semanas post-cirugía. Se operaron un total de 18 ratas con un n =2 para cada condición y cada punto temporal de las muestras con y sin BMP-2.

Ejemplo 12. Implantación de los hidrogeles sin BMP-2 en músculo sano. Evaluación a las 3 semanas post-cirugía.

Se evaluó el comportamiento *in vivo* de los hidrogeles bioactivos físicos preparados según se describe en el ejemplo 1 mediante gelificación iónica, y sin la incorporación del factor bioactivo BMP-2.

En la Figura 2, se presenta un corte histológico con tinción H/E correspondiente a la biopsia del tejido tras tres semanas de la implantación del hidrogel, realizada según se describe en el ejemplo 8. Se observa una integración óptima del hidrogel en el tejido muscular. No se encontraron signos de reacciones inflamatorias, o infecciosas en la zona operada. Un análisis más profundo de las muestras permitió observar la ausencia de fenómenos de encapsulación del hidrogel (reacción a cuerpo extraño), donde el tejido del hospedador reconoce y aísla dicho biomaterial implantado de los tejidos circundantes dificultando o retrasando su integración en el tejido. En este caso, los hidrogeles mostraron buena biocompatibilidad en el tejido pues no se observó ninguna cápsula fibrótica alrededor. Se pudo observar además, la colonización celular de los hidrogeles (Figura 3) y la aparición de vasos sanguíneos en sus inmediaciones (Figura 4), probablemente para mejorar el aporte de oxígeno y nutrientes a los mismos.

Mediante este ejemplo se corroboró el carácter biocompatible de los hidrogeles utilizados en la invención.

Ejemplo 13. Implantación de los hidrogeles cargados con rhBMP-2 en músculo sano.

Se estudió la producción de hueso tras la implantación de las formulaciones de hidrogel cargadas con el factor bioactivo rhBMP-2 cuya preparación se describe en el ejemplo 8.

Las ratas se sacrificaron a las 3 y 9 semanas post-implantación. Las muestras procedentes del estudio *in vivo* se trataron siguiendo el protocolo experimental descrito en el ejemplo 8 (tratamiento de histología en parafina y tinciones H/E y TM).

Los hidrogeles cargados con BMP-2, al igual que en el ejemplo 11, se integraron en el tejido hospedador. Tampoco se encontraron signos de reacciones inflamatorias, infecciosas o de encapsulación. Se observó la presencia de numerosos vasos sanguíneos cerca del hidrogel cargado con BMP-2 (Figura 5), sin embargo, algunos de estos vasos tenían el aspecto de osteonas incipientes (comparación de los dos tipos de vasos en la Figura 6). Finalmente, en la Figura 7 se observa la aparición de formaciones con aspecto de tejido adiposo. Este tipo de tejido es un componente abundante de la médula ósea, por lo que su presencia puede interpretarse como médula ósea.

Las consideraciones expuestas en el párrafo anterior se confirmaron tras 9 semanas de implantación del hidrogel cargado con BMP-2. En el análisis de los cortes histológicos correspondientes a este período se apreció claramente la presencia de tejido óseo propiamente dicho, así como de médula ósea (Figura 8), apareciendo incluso osteonas bien diferenciadas (Figura 9). Esto demuestra la capacidad de los hidrogeles para incorporar, inmovilizar y liberar la BMP-2 y protegerla del medioambiente biológico. Además, la existencia de importantes diferencias entre la tercera y la novena semana de implantación indica que los hidrogeles han ejercido un control sobre la liberación del factor de crecimiento.

Quedan evidenciadas de igual manera las adecuadas propiedades mecánicas de los hidrogeles para actuar como soportes del crecimiento y desarrollo celular *in vivo*.

Mediante el análisis de las figuras indicadas en los párrafos anteriores se hace patente también la biodegradación de los hidrogeles con el paso del tiempo, ya que los fragmentos de hidrogeles que se observaron en la muestra eran mucho menores que los trozos de hidrogel implantados. Asimismo, como en el caso de las figuras 2 y 8, se observó tejido formado entre los fragmentos de hidrogel presentes en la muestra, suplantando al propio hidrogel. Este dato es muy relevante de cara a la aplicación de los sistemas en procesos regenerativos, donde tanto la rápida biodegradación del sistema como la ausencia de biodegradación son muy negativas. Esta cualidad está directamente relacionada con el ejemplo 8.

Ejemplo 14. Comparación de la actuación de los hidrogeles con producto comercial. Estudio a las 5 y 9 semanas post cirugía.

Como hemos demostrado en el ejemplo 12, los hidrogeles permiten la liberación de la proteína BMP-2 de forma activa, consiguiendo la diferenciación del tejido muscular hacia tejido óseo. La capacidad de formación de hueso ectópico de una formulación comercial depende fuertemente de la liberación de los factores activos. En particular, los modelos que se comercializan actualmente para la liberación de rhBMP-2 (Infuse®) requieren de un transportador que controle la liberación de la misma y permita prolongar el efecto local de dicho factor durante un tiempo más prolongado. El único transportador adecuado y aprobado por la FDA es el colágeno. Los productos comerciales utilizan matrices y/o esponjas de colágeno, las cuales se impregnan de una solución del factor activo y se implantan con el fin de regenerar tejido óseo. Por este motivo, se decidió emplear Mucograft®, matriz de colágeno 3D, como control comercial frente a los hidrogeles de la invención, ambos con y sin carga proteica.

Se realizó el procedimiento quirúrgico descrito en el ejemplo 8, realizándose los estudios a las 5 y 9 semanas post-cirugía con posterior tratamiento histológico de las biopsias.

Para ello se activó el material Mucograft® con la misma cantidad de proteína que los hidrogeles. Se cargó con 2.5 mg/ml de rhBMP-2 en AcOH 50 mM. La muestra se dejó secar y se mantuvo a 4° C hasta 15 minutos antes de su implantación.

Adicionalmente al estudio histológico, se evaluó la presencia de tejido óseo *de novo,* producido por la liberación de la BMP-2 en el tejido muscular, mediante una técnica complementaria como es la microtomografía computarizada (μ-CT). Para la realización de esta técnica se empleó un Scaner PET/CT Albira ARS (GEM-IMGING; Oncovision). El protocolo de adquisición fue de alta calidad (HR) a una resolución de 0,125 mm de tamaño de pixel, 45 kV/ 0,8 mA. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Pmod 3.4, en los tres planos del animal completo, mostrándose en esta memoria descriptiva solo el plano coronal.

En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos gracias al empleo de la μ-CT. Se trata de una técnica de imagen, no invasiva, de uso frecuente en el ámbito hospitalario para el diagnóstico clínico de procesos patológicos. Dicha técnica nos permitió evaluar el seguimiento de la formación de tejido óseo durante las semanas de estudio correspondientes sin tener que sacrificar el animal. Tal y como se aprecia en la Figura 10, donde se muestra el corte coronal de las ratas, de la zona del implante a ambos lados de la columna. En el lado derecho (LD) de cada corte, hay control sin proteína tanto del hidrogel (H-C) como de Mucograft (M-C), en ninguno de los dos casos se observó en ningún corte presencia de tejido óseo (señal circular). En cambio, en el lado izquierdo (LI), en el que los injertos sí incluían BMP-2, aparece la señal correspondiente a nuevo hueso. Cabe destacar en el caso de Mucograft con BMP-2 (M+BMP-2) cómo la señal aumenta en las primeras semanas (segunda y tercera) y cómo disminuye hasta casi su completa desaparición en la quinta semana. Esta evolución se debe al tipo de liberación de BMP-2 que tiene lugar. En un primer momento se aprecia una señal de gran volumen e intensidad debido al efecto *burst*, o liberación explosiva, es decir a una liberación descontrolada y masiva, asociada a numerosos efectos secundarios. En cambio, con los hidrogeles cargados con BMP-2 (H+BMP-2), la señal que se obtiene en tiempos cortos es inferior pero incrementa en volumen e intensidad con el paso de las semanas y dicha señal se vuelve constante en el tiempo, es decir, no disminuye ni de intensidad ni de tamaño. Este hecho es indicativo de una liberación más controlada, sin el denominado efecto *burst*, y más estable.

Los resultados a través de las tinciones de histología corroboran de nuevo la adecuada biocompatibilidad de los hidrogeles, con y sin proteína BMP-2, en el tejido del hospedador. Además, se observa, gracias a la liberación de la BMP-2, la presencia de tejido óseo *de novo* comprobado tanto por las

imágenes de µ-CT analizadas gracias al programa Pmod 3.4 (Figura 10) como por la tinciones de H/E (Figura 11 y 12).

En primer lugar, se observa la tinción de H/E de las muestras del control de Mucograft® con y sin BMP-2 (Figura 11). Como se aprecia en dicha imagen, en presencia de BMP-2 se observa tejido óseo neoformado, rodeando médula ósea rica en células adiposas. En la imagen aumentada, se distingue la presencia de células redondas (osteocitos, Os) características del hueso (Figura 11-B). En cambio, el control de Mucograft sin proteína revela, simplemente, la presencia abundante de fibras de colágeno, con cierta diferenciación, muy ligera, hacia tejido óseo (Figura 11-A). Sin embargo, en las muestras de hidrogel con BMP-2 (Figura 12-B), se observa una masa ósea de gran tamaño (BM) y de color rojo intenso, característica de tejido óseo ectópico de mayor organización y más compacto en comparación con Mucograft® activado con BMP-2. Se aprecia la presencia de osteocitos rodeados de matriz ósea densa en contacto directo con fragmentos de hidrogel. El hidrogel control, (Figura 12-A) se muestra rodeado de tejido conectivo, fibras de colágeno y fibras musculares, remarcando de nuevo su total biocompatibilidad con el tejido del hospedador. No se observaron signos de encapsulación del hidrogel. Se observan numerosos fragmentos de hidrogel y, en la imagen aumentada, se aprecia la existencia de vasos sanguíneos (marcados por flechas negras).

A continuación se describen los resultados de la segunda parte experimental correspondiente a las 9 semanas post-cirugía.

Los resultados obtenidos por µ-CT hasta la semana 9 se muestran en la Figura 13, donde queda patente el comportamiento diferente de ambos soportes en la formación de tejido óseo ectópico. En primer lugar, cabe mencionar la señal tan ligera que se observa con Mucograft® y BMP-2 en el lado izquierdo (LI). Aunque se muestran solo las imágenes desde la quinta semana (ya que las anteriores han sido similares a las obtenidas en el experimento de las 5 semanas), se observa cómo la señal apenas se distingue del tejido muscular y esta es casi inapreciable al final del ensayo. En cambio, destaca la señal de gran intensidad y volumen que se ha obtenido al emplear hidrogeles con BMP-2 (H+BMP-2; LI). Dicha señal aumentó y se mantuvo estable incluso hasta final del estudio, demostrando la formación de un tejido óseo con mayor organización y complejidad, permaneciendo más tiempo en el mismo estado de madurez.

Las imágenes de histología correspondientes a las 9 semanas se muestran en las Figuras 14 y 15. Se presentan en este caso las imágenes de la tinción TM ya que ésta es más específica de tejido óseo (aunque también se ha realizado H/E).

En la Figura 14-A, se puede observar la ausencia de una masa de fibras de colágeno correspondientes al control de Mucograft® tal y como se observó a las 5 semanas poscirugía. El control comercial sin proteína prácticamente se degradó por enzimas propias del tejido, ya que apenas se distinguen ciertas fibras de color verde intenso entre las fibras musculares. En cambio, cuando el soporte de Mucograft® presentaba BMP-2, se apreció la presencia de tejido adiposo característico de la medula ósea; sin embargo, no se detectó presencia de tejido óseo ectópico, ni células propias de hueso, ni una matriz extracelular densa o compacta. Apenas una capa fina de fibras colágenas envuelvía el tejido adiposo, pero sin una diferenciación apreciable hacia linaje óseo. Por otro lado, en la Figura 15, se muestra el comportamiento de los hidrogeles de la invención. Sin proteína (Figura 15-A), se reconocieron algunos fragmentos de hidrogel de menor tamaño, en contacto directo con fibras de colágeno y fibras musculares. Sin embargo, en presencia de BMP-2 (Figura 15-B) ésta se liberó de los hidrogeles y consiguió diferenciar las células musculares hacia linaje óseo, llegándose a detectar matriz ósea, abundantes fibras de colágeno e, incluso, la presencia de osteocitos. Además, destacó la gran cantidad de vasos sanguíneos que aparecieron en la muestra, los cuales son necesarios para mantener vivo el nuevo tejido formado.

REIVINDICACIONES

1. Hidrogel bioactivo que comprende:
a) al menos un polímero aniónico,
b) al menos un agente reticulante catiónico,
c) al menos un glicosaminoglicano, y
d) al menos dos proteínas,

donde a) y b) son de origen natural y están entrecruzados por interacciones de tipo electrostático y donde una de las proteínas es un agente bioactivo del grupo de las proteínas morfogénicas óseas (BMP).

2. Hidrogel bioactivo según la reivindicación 1 en el que el polímero aniónico es goma gelano y/o goma arábiga.

3. Hidrogel bioactivo según la reivindicación 2 en el que el polímero aniónico está a una concentración final de 3 a 1 mg/ml.

4. Hidrogel bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el agente reticulante catiónico es espermidina y/o espermina.

5. Hidrogel bioactivo según la reivindicación 4 en el que el reticulante catiónico está a una concentración final de entre 0,1 y 1,5 mg/ml.

6. Hidrogel bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que el glicosaminoglicano es condroitín sulfato, ácido hialurónico, y/o dermatán sulfato.

7. Hidrogel bioactivo según la reivindicación 6 en el que el glicosaminoglicano está a una concentración final de entre 0,5 y 5 mg/ml.

8. Hidrogel bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que una de las proteínas es la albúmina.

9. Hidrogel bioactivo según la reivindicación 8 en el que la albúmina está a una concentración final de entre 5 y 10 mg/ml.

10. Hidrogel bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la BMP se selecciona del grupo formado por: BMP2 en su forma homodimérica (BMP2-BMP2) o en su forma heterodimérica (BMP2-BMP4, BMP2-BMP5, BMP2-BMP6, BMP2-BMP7, BMP2-BMP9, BMP2-BMP12).

11. Hidrogel bioactivo según la reivindicación 10 en el que la BMP está a una concentración final entre 0,1 y 0,5 mg/ml.

12. Método para elaborar hidrogeles bioactivos según se definen en las reivindicaciones 1-11 que comprende los siguientes pasos:
a) preparar una disolución acuosa de una proteína distinta a una BMP,
b) añadir una disolución de BMP a la disolución acuosa del paso a),
c) mezclar con una disolución acuosa de un reticulante catiónico,
d) verter la mezcla del paso c) sobre una solución acuosa de un polímero aniónico con un glicosaminoglicano,
e) mezclar los componentes a 55-65ºC aplicando agitación durante 2-10 segundos,
f) dejar el hidrogel a temperatura ambiente.

13. Método según la reivindicación 12 en el que la proteína del paso a) es la albúmina.

14. Método según la reivindicación 13 en el que la albúmina se añade a una concentración final de entre 5 y 10 mg/ml.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-14 en el que la BMP del paso b) se selecciona del grupo formado por: BMP2 en su forma homodimérica (BMP2-BMP2) o en su forma heterodimérica (BMP2-BMP4, BMP2-BMP5, BMP2-BMP6, BMP2-BMP7, BMP2-BMP9, BMP2-BMP12).

16. Método según la reivindicación 15 en el que la BMP se añade a una concentración final entre 0,1 y 0,5 mg/ml.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-16 en el que el reticulante catiónico del paso c) es espermidina y/o espermina.

18. Método según la reivindicación 17 en el que el reticulante catiónico se añade a una concentración final entre 0,1 y 1,5 mg/ml.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-18 en el que el polímero aniónico que se añade es goma gelano y/o goma arábiga.

20. Método según la reivindicación 19 en el que el polímero aniónico se añade a una concentración final de 3 a 1 mg/ml.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12-19 en el que el glicosaminoglicano que se añade es condroitín sulfato, ácido hialurónico y/o dermatán sulfato.

22. Método según la reivindicación 21 en el que el glicosaminoglicano se añade a una concentración final de entre 0,5 y 5 mg/ml.

23. Composición farmacéutica que comprende un hidrogel bioactivo según se definen en las reivindicaciones 1-11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

24. Producto sanitario que comprende un hidrogel bioactivo según se definen en las reivindicaciones 1-11.

25. Uso de un hidrogel bioactivo según se definen en las reivindicaciones 1-11 en la elaboración de una composición farmacéutica o de un producto sanitario.

26. Uso de un hidrogel bioactivo según se definen en las reivindicaciones 1-11 en la elaboración de implantes poliméricos para regeneración ósea y cartilaginosa.

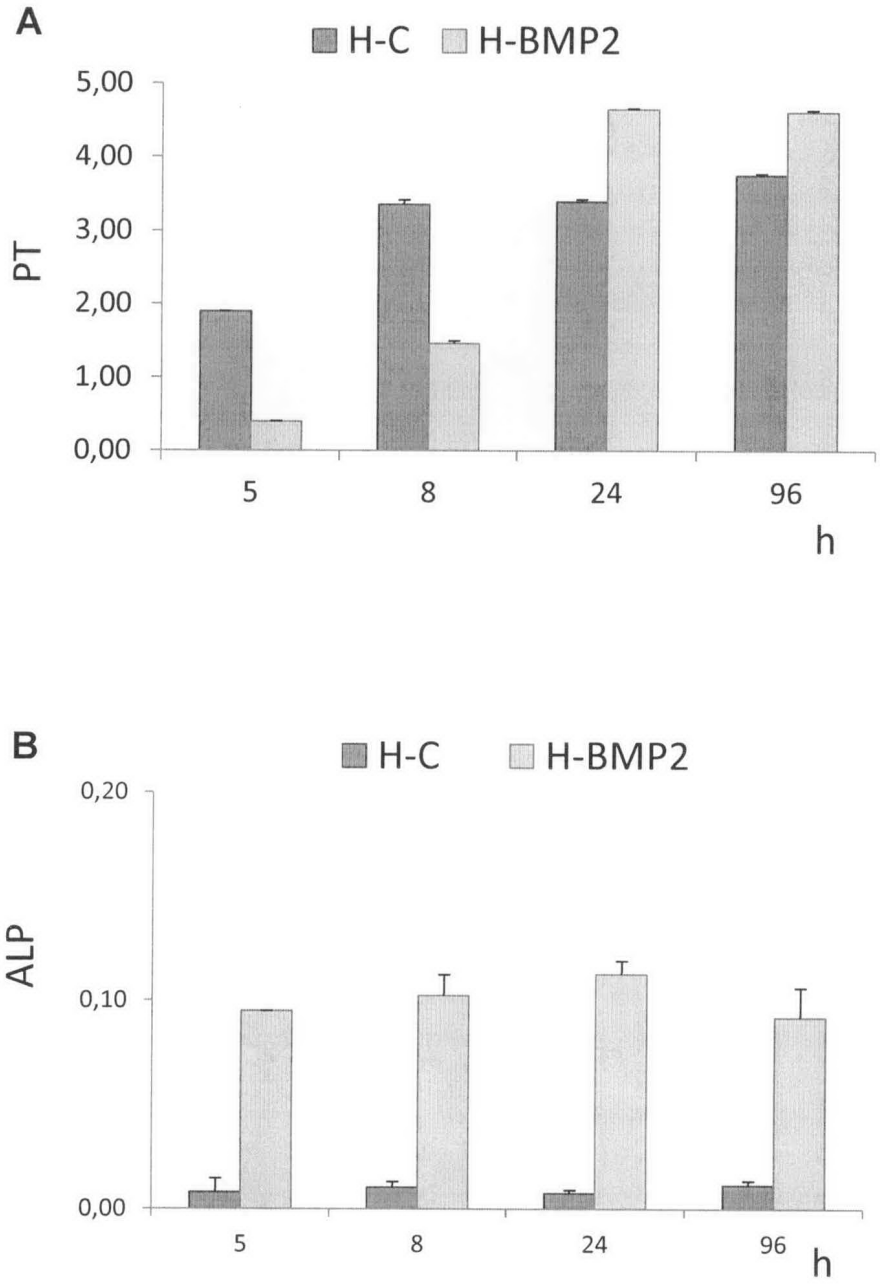

A
H-C
H-BMP2
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
PT
5
8
24
96
h
B
H-C
H-BMP2
0,20
0,10
0,00
ALP
5
8
24
96
h

Figura 1

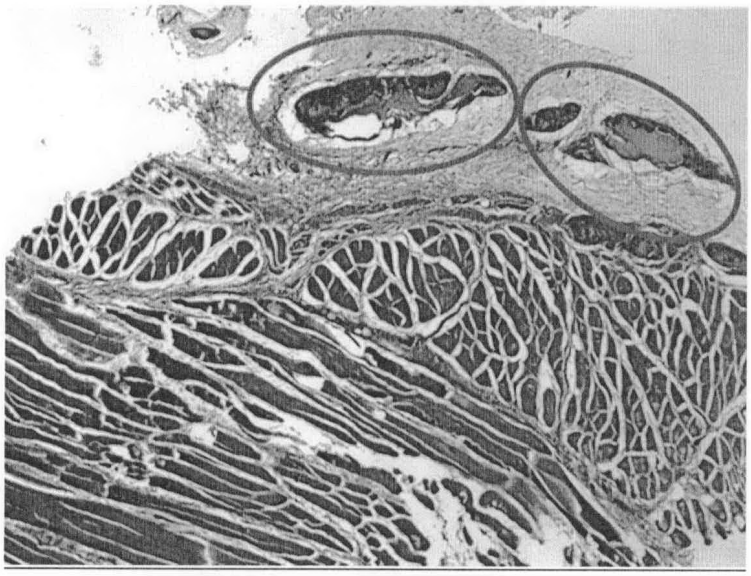


Figura 2

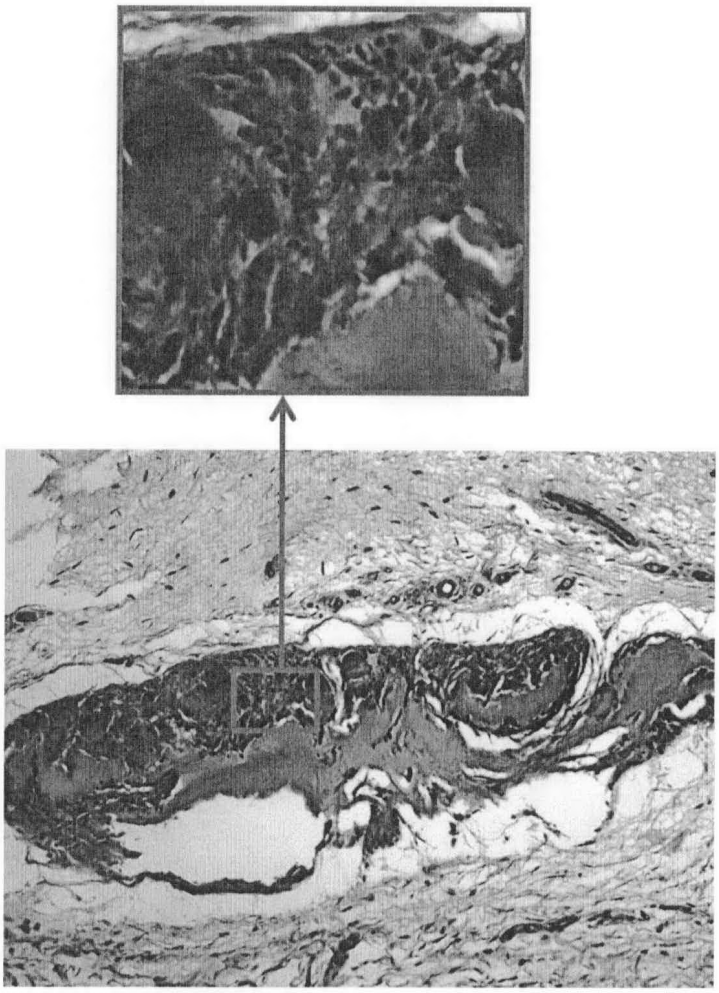


Figura 3

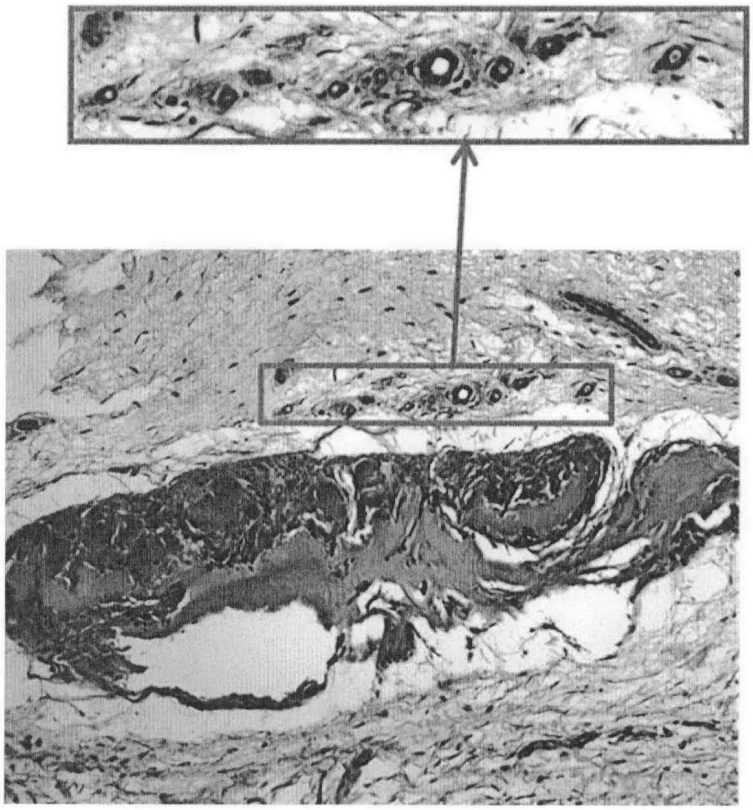


Figura 4

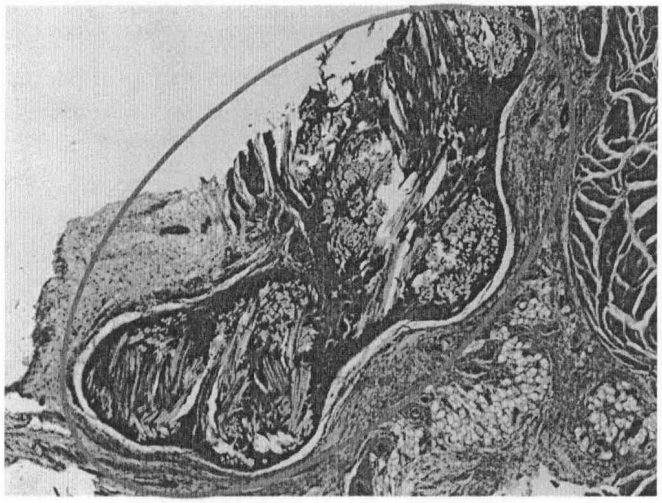


Figura 5

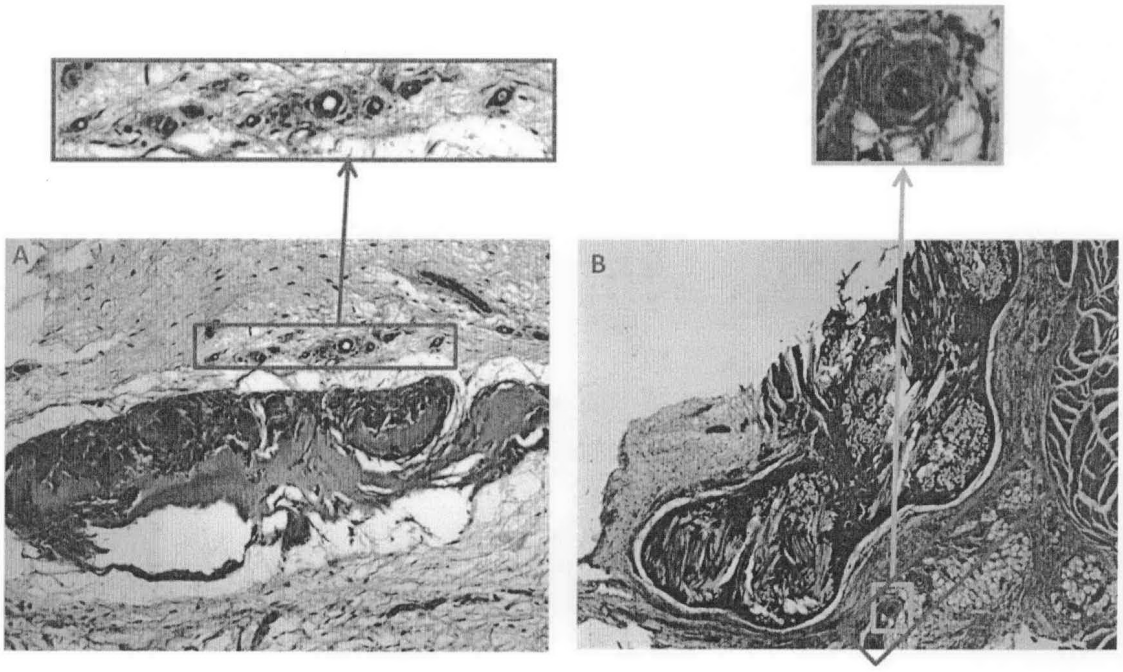


Figura 6

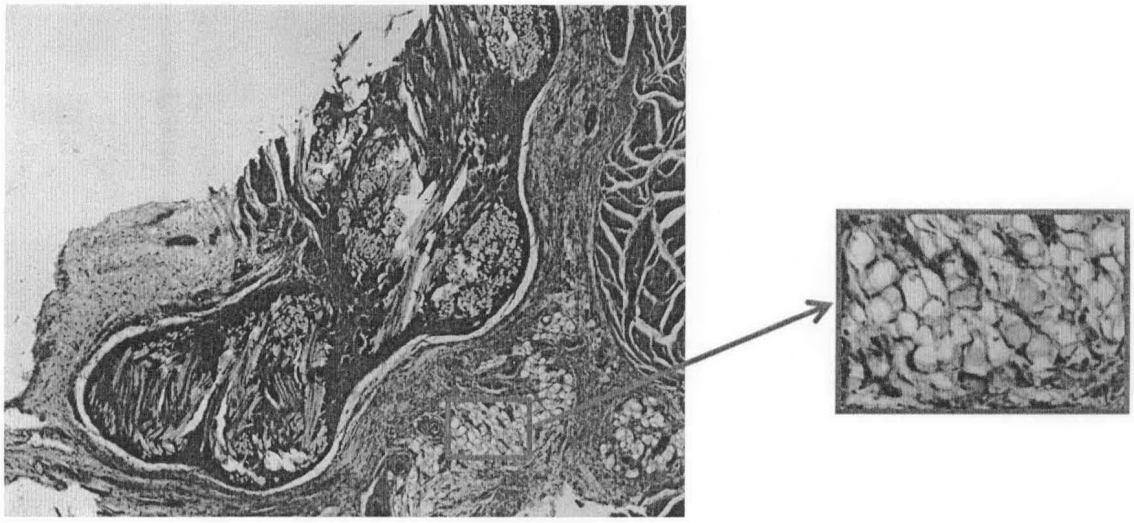


Figura 7

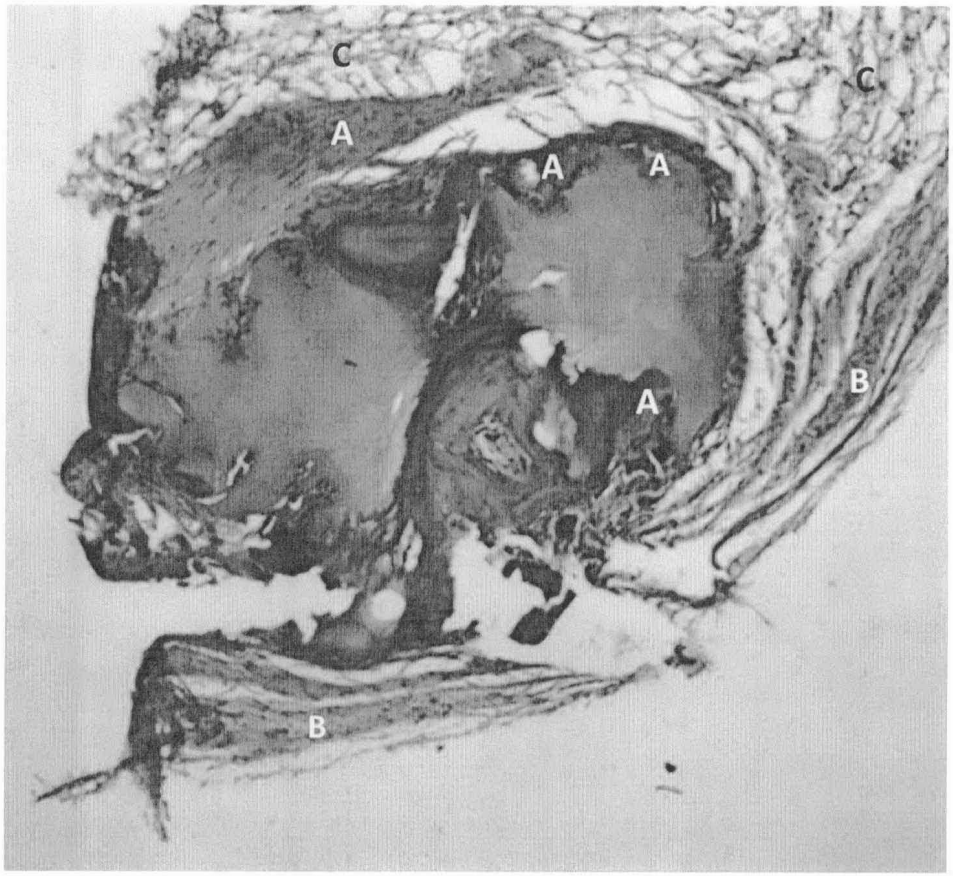


Figura 8

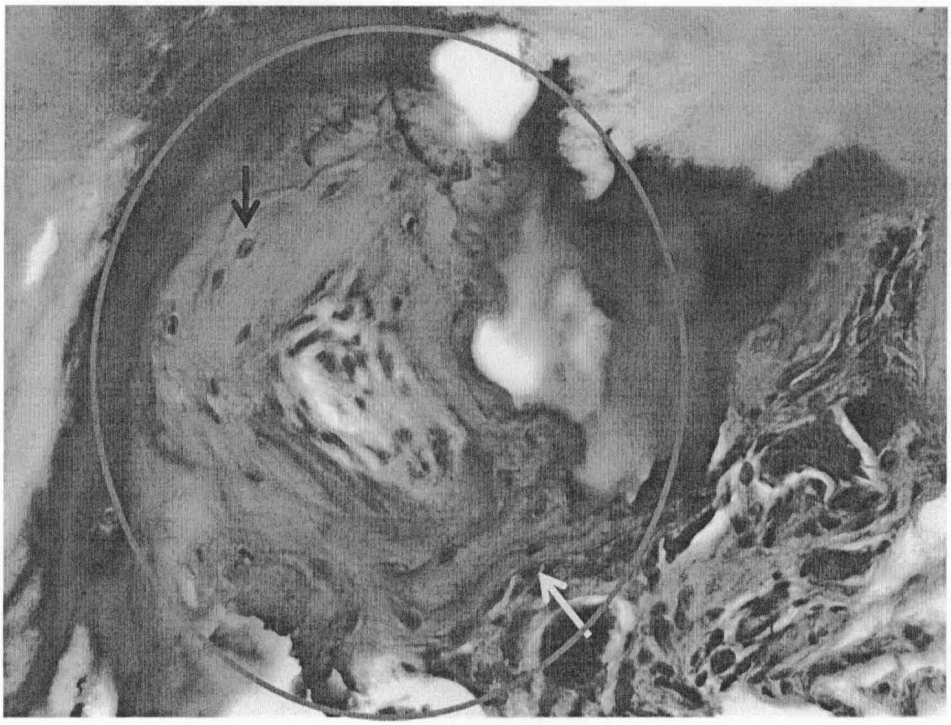


Figura 9

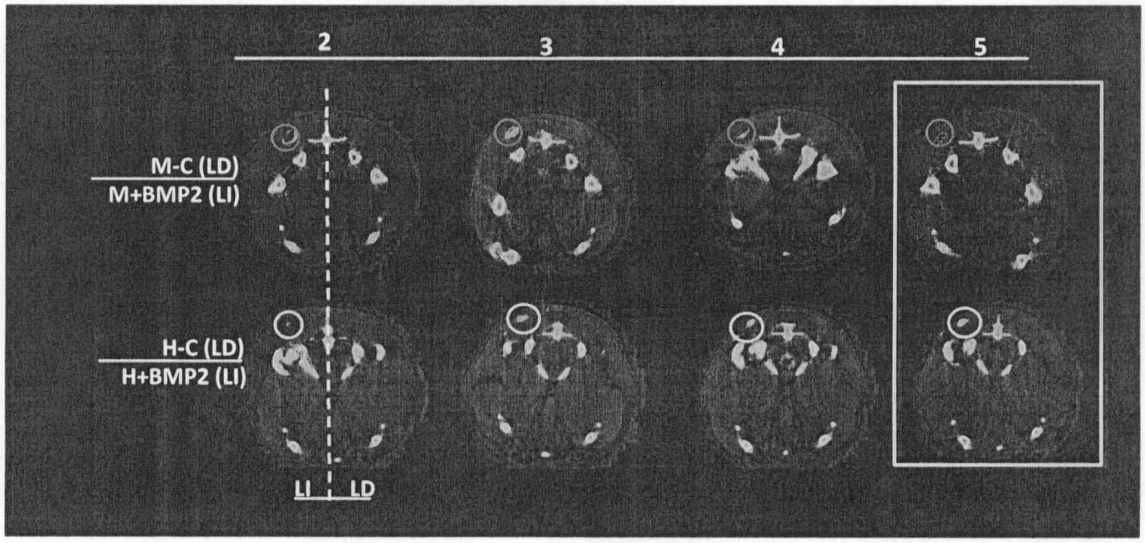


Figura 10

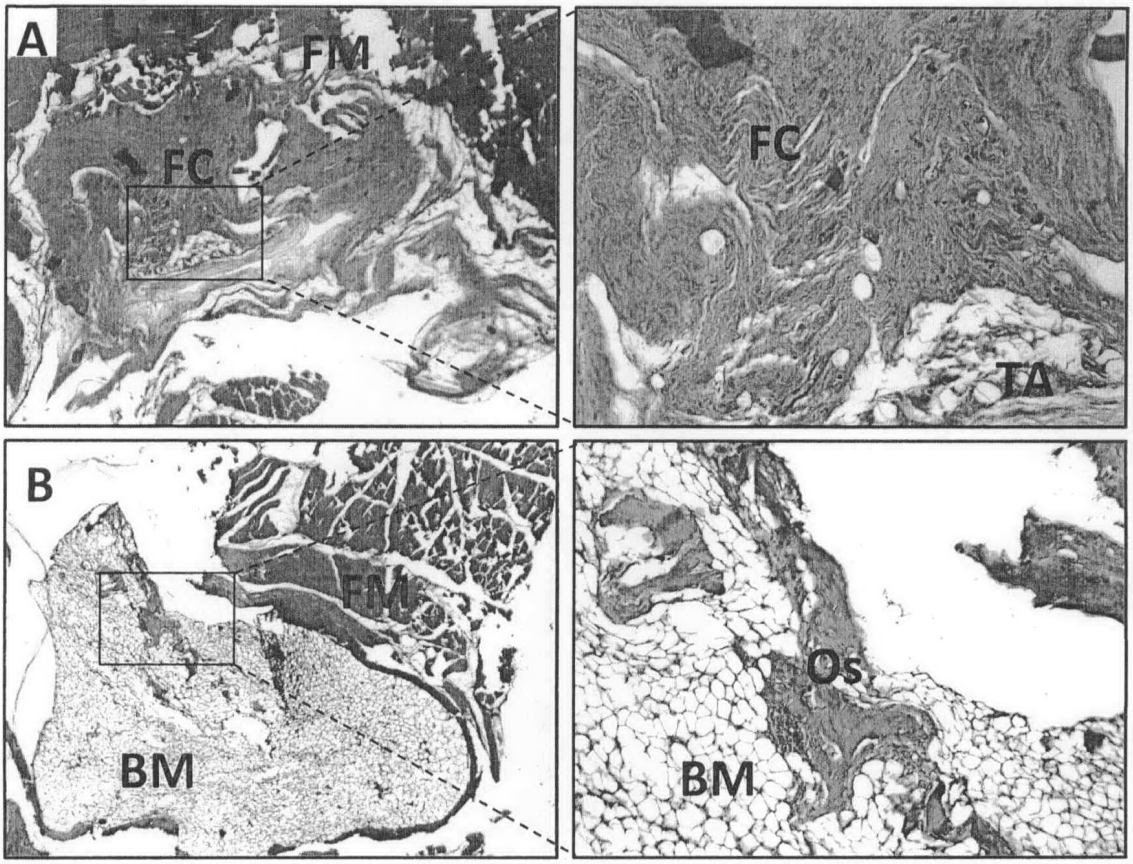


Figura 11

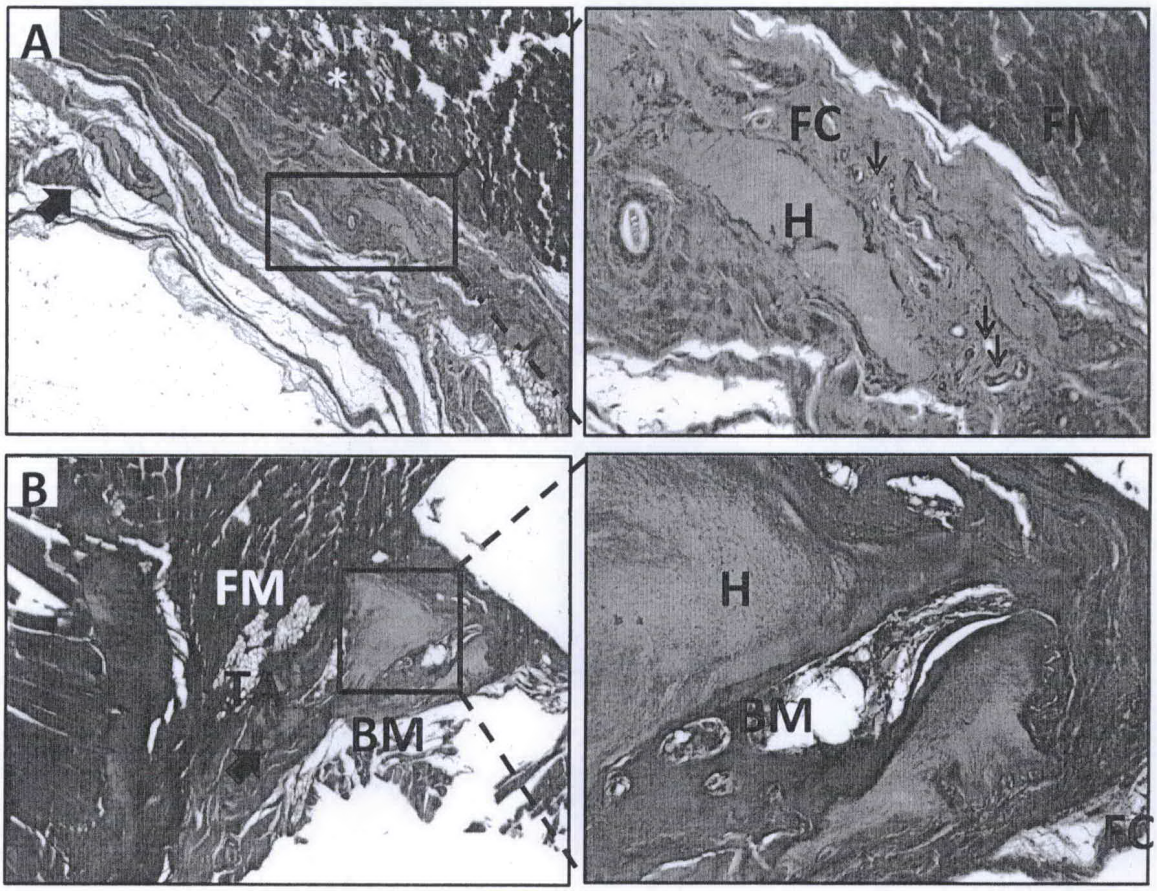


Figura 12

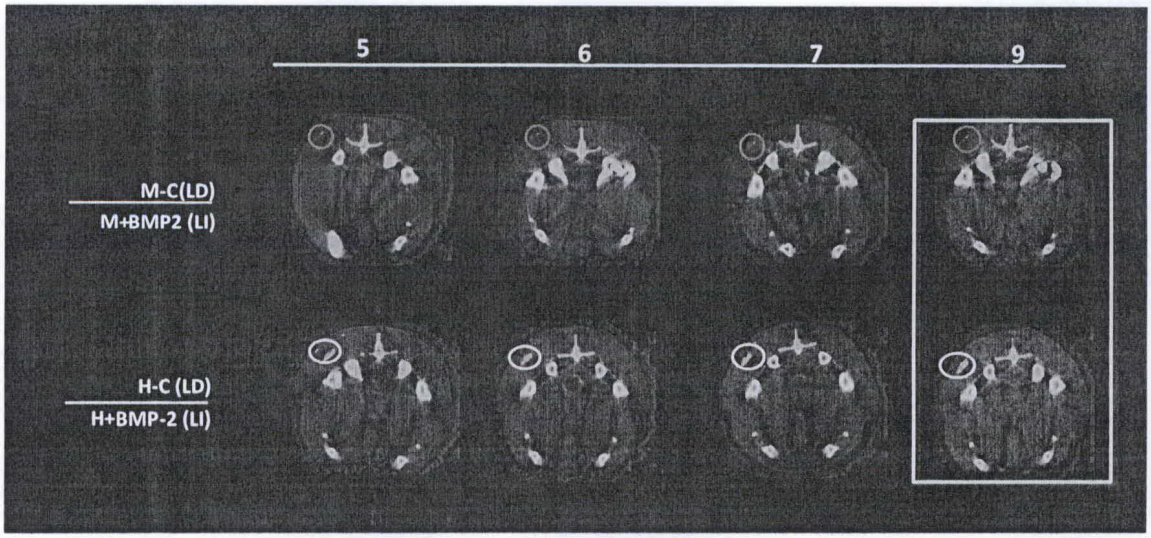


Figura 13

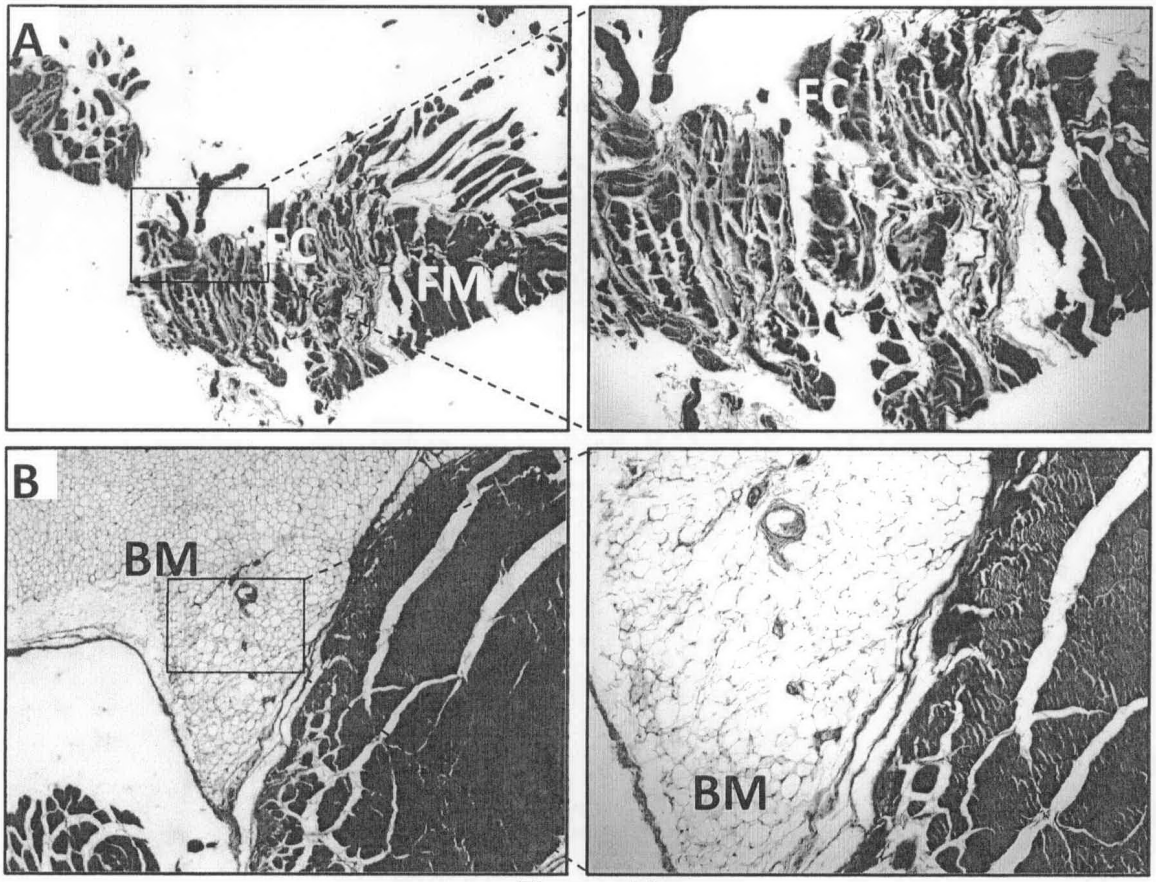


Figura 14

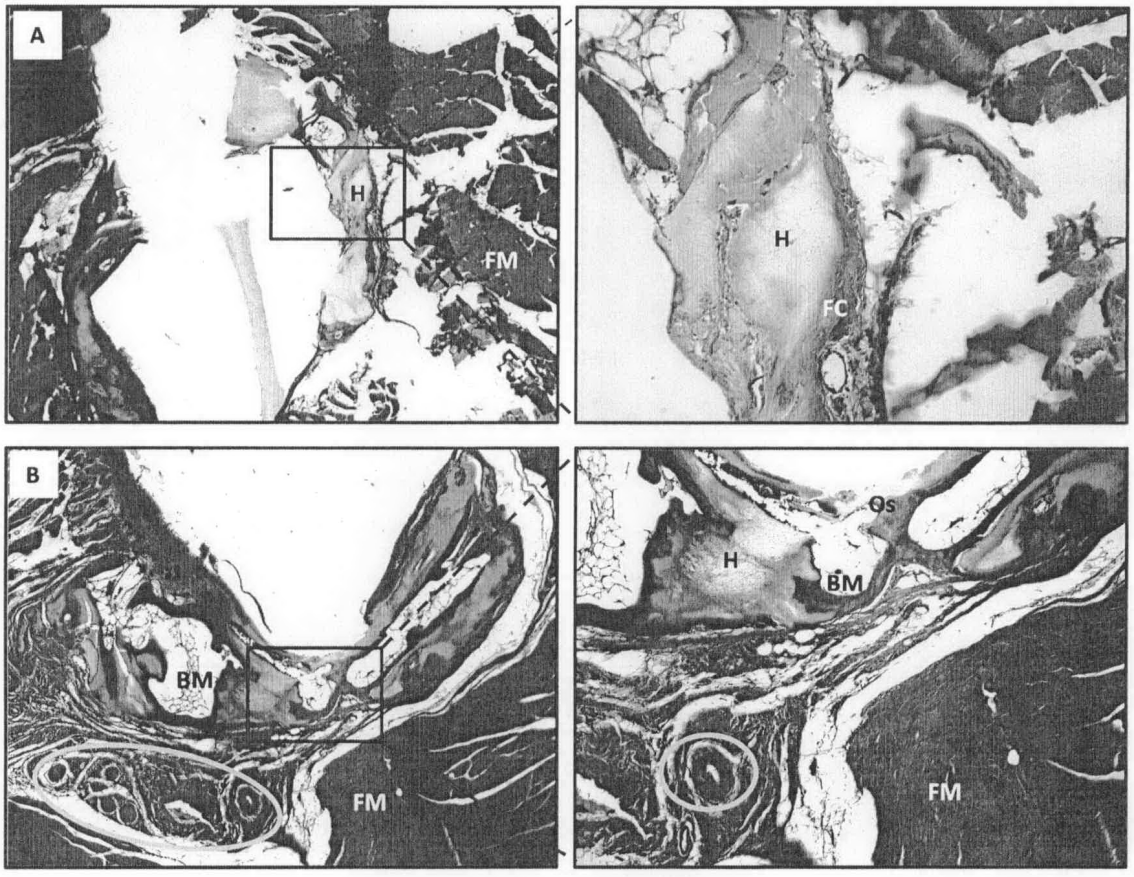


Figura 15

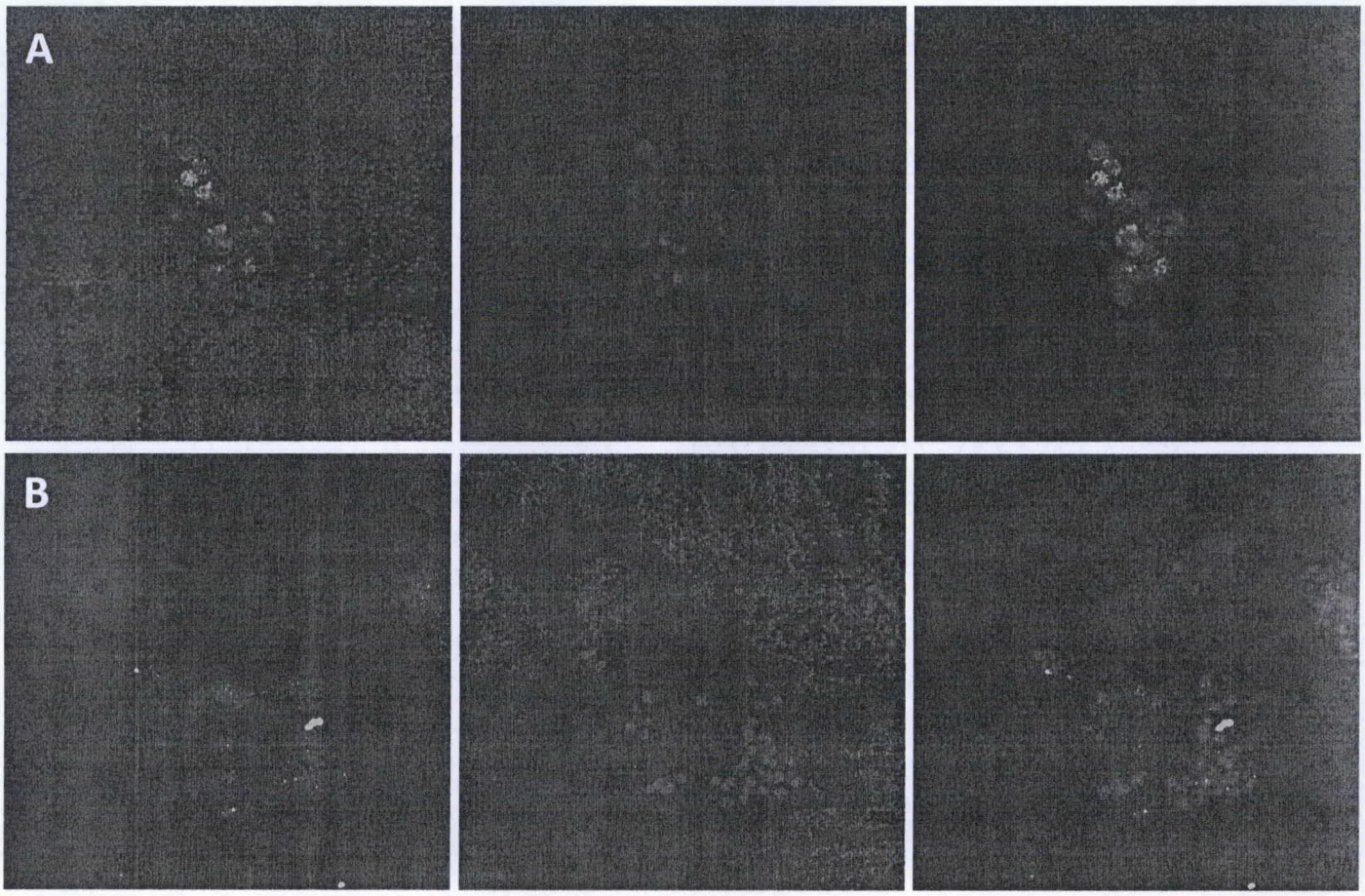


Figura 16

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201500459

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2015

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61L27/52*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	US 2013337082 A1 (BODEN SCOTT D et al.) 19.12.2013, párrafos [0005],[0006],[0011],[0088],[0106],[0124].	1-26
A	US 2009291113 A1 (SOULA REMI et al.) 26.11.2009, párrafos [0019]-[0021],[0025],[0026],[0036],[0048],[0049].	1-26
A	US 2003206937 A1 (GERTZMAN ARTHUR A et al.) 06.11.2003, párrafos [0027],[0050],[0066].	1-26
A	WO 2013124855 A1 (UNIV BEN GURION) 29.08.2013, párrafos [0006],[0009],[0045],[0050],[0051].	1-26

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	**Examinador**	**Página**
09.07.2015	S. González Peñalba	1/4

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

A61L

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

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.07.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-26	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-26	**SI**
	Reivindicaciones		**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	US 2013337082 A1 (BODEN SCOTT D et al.)	19.12.2013
D02	US 2009291113 A1 (SOULA REMI et al.)	26.11.2009
D03	US 2003206937 A1 (GERTZMAN ARTHUR A et al.)	06.11.2003
D04	WO 2013124855 A1 (UNIV BEN GURION)	29.08.2013

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

La presente solicitud de patente hace referencia, tal y como ha sido presentada, a un hidrogel bioactivo que comprende al menos un polímero aniónico, al menos un agente reticulante catiónico, al menos un glicosaminoglicano y al menos dos proteínas. El polímero aniónico y el agente reticulante son de origen natural y están entrecruzados por interacciones de tipo electrostático y una de las proteínas es un agente bioactivo del grupo de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) (reivindicación 1). El polímero aniónico es goma gelano y/o goma arábiga (reivindicaciones 2 y 3), el agente reticulante catiónico es espermidina y/o espermina (reivindicaciones 4 y 5). El glicosaminoglicano es condroitín sulfato, ácido hialurónico y/o dermatán sulfato (reivindicaciones 6 y 7), una de las proteínas es albúmina (reivindicaciones 8 y 9) y la BMP se selecciona de homodimérica o heterodimérica (reivindicaciones 10 y 11). Se reivindica también el método para elaborar los hidrogeles bioactivos (reivindicaciones 12-22), una composición farmacéutica que comprende el gel bioactivo (reivindicación 23), un producto sanitario que comprenda dicho gel (reivindicación 24), y el uso de dicho hidrogel (reivindicaciones 25 y 26).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 divulga compuestos y composiciones para formar huesos y cartílagos, dichos compuestos son derivados de carboxamida (Noggin blocker) y las composiciones comprenden también factores de crecimiento tales como proteínas morfogénicas óseas (BMP) (véase párrafos [0005], [0006]), además de una matriz que puede ser un hidrogel (véase párrafos [0011] y [0088]). Las proteínas morfogénicas óseas son entre otras BMP-7 o BMP-14 y la matriz de hidrogel puede ser una matriz de polímero/copolímero de colágeno, de hialurónico o de condroitín sulfato (véase párrafo [0106]). Las formulaciones pueden ser formulaciones de liberación prolongada y contener proteínas tales como albúmina, y gomas tales como goma gelano, goma arábiga, entre otras (véase párrafo [0124]).

El documento D02 describe un implante constituido por una composición osteogénica que comprende un factor de crecimiento osteogénico, una sal soluble de un catión al menos divalente y un soporte orgánico (véase párrafos [0019]-[0021]). El soporte orgánico es un hidrogel (véase párrafos [0025] y [0026]), que puede estar formado por ácido hialurónico o condroitín, entre otros (véase párrafo [0036]); polímeros catiónicos para formar la sal soluble de un catión al menos divalente, pueden ser, entre otros, espermina (véase párrafo [0048]) y el factor de crecimiento son proteínas del tipo BMP (véase párrafo [0049])

El documento D03 hace referencia a una composición ósea maleable que se aplica a un hueso defectuoso para promover el crecimiento de hueso nuevo que comprende un nuevo compuesto, que induce el crecimiento óseo, de material óseo de aloinjerto liofilizado parcialmente desmineralizado. Comprende además un hidrogel viscoso, basado en un material de alto peso molecular, que actúa como portador o vehículo de liberación para el agente DBM (matriz de hueso parcialmente desmineralizada) (véase párrafo [0027]). El hidrogel puede contener un derivado del ácido hialurónico (véase párrafo [0050]) y pueden añadirse también proteínas morfogénicas óseas (BMP) (véase párrafo [0066]).

EL documento D04 se refiere a un hidrogel para su utilización en reparación o regeneración de tejido dañado de mamífero (véase párrafos [0006] y [0009]), que se obtiene mezclando un polisacárido sulfatado con al menos un polipéptido bioactivo de modo que formen un bioconjugado, mezclar dicho bioconjugado con un material capaz de formar un hidrogel y aplicarlo a un tejido dañado, repitiendo las etapas anteriores hasta obtener el número de compartimentos de hidrogel deseados (véase párrafo [0006]). El polisacárido sulfatado puede comprender glicosaminogicanos, tales como ácido hialurónico (véase párrafo [0045]). El péptido bioactivo puede ser una BMP (véase párrafo [0050]). Las uniones entre el polipéptido bioactivo y el polisacárido sulfatado pueden ser interacciones electrostáticas (véase párrafo [0051]).

Por lo tanto, la presente solicitud de patente, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica y tal y como ha sido presentada, parece poseer novedad y actividad inventiva ya que no se ha encontrado ningún documento que posea las características técnicas reivindicadas. Los componentes del hidrogel bioactivo aparecen en distintos documentos, pero no se ha encontrado un documento que posea el conjunto de componentes reivindicado, en el que aparezca el polímero aniónico y el agente reticulante catiónico entrecruzados por interacciones de tipo electrostático. Ni tampoco, en los documentos citados, existen sugerencias que dirijan al experto hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-26. Por lo que, las reivindicaciones 1-26 parecen cumplir los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.