

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 988**

51 Int. Cl.:
C08G 63/48 (2006.01) **A61K 9/00** (2006.01) **C08G 81/00** (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01) **A61K 9/06** (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)
C12N 11/04 (2006.01) **A61L 24/00** (2006.01)
C12N 11/06 (2006.01) **A61L 24/04** (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01) **A61L 26/00** (2006.01)
G01N 33/544 (2006.01) **A61L 27/26** (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01) **A61L 27/52** (2006.01)
G01N 33/546 (2006.01) **A61L 31/04** (2006.01)
G01N 33/549 (2006.01) **A61L 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00910049 .6**
96 Fecha de presentación: **01.02.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1181323**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

54 Título: **BIO-MATERIALES FORMADOS POR REACCIÓN DE ADICIÓN NUCLEÓFILA A GRUPOS INSATURADOS CONJUGADOS.**

30 Prioridad:
01.02.1999 US 118093 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
**Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
ETH-ZENTRUM HG E 49
8092 ZÜRICH, CH y
UNIVERSITÄT ZÜRICH**

72 Inventor/es:
**HUBBELL, Jeffrey, A.;
ELBERT, Donald;
LUTOLF, Matthias;
PRATT, Alison;
SCHOENMAKERS, Ronald;
TIRELLI, Nicola y
VERNON, Brent**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofia**

ES 2 368 988 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bio-materiales formados por reacción de adición nucleófila a grupos insaturados conjugados

5 **Antecedentes de la Invención**

La presente invención se relaciona con bio-materiales formados mediante reacciones por adición nucleófila a grupos conjugados insaturados, y con los usos de esos bio-materiales.

10 Los bio-materiales sintéticos, incluyendo los hidrogeles poliméricos, se pueden usar en una diversidad de aplicaciones, incluyendo aplicaciones farmacéuticas y quirúrgicas. Estos se pueden usar, por ejemplo, para aplicar moléculas terapéuticas a un sujeto, como adhesivos o selladores, como andamios de diseño de tejidos y curación de heridas, y como dispositivos de trasplante celular.

15 Aunque se ha hecho mucho progreso en el campo de los bio-materiales poliméricos, se deben hacer desarrollos adicionales, con el propósito de que esos bio-materiales se usen de manera óptima en el cuerpo. Por ejemplo, la formación de bio-materiales en la presencia de materiales biológicos sensibles es difícil de conseguir porque los componentes de los bio-materiales no exhiben un alto grado de auto-selectividad.

20 **Antecedentes de la Invención**

25 Se han desarrollado nuevos bio-materiales poliméricos, incluyendo hidrogeles poliméricos, para tratamientos médicos. Estos son únicos en su uso de reacciones por adición entre un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada, para polimerizar o reticular dos o más componentes de una manera que se pueda realizar en la presencia de materiales biológicos sensibles. Esto incluiría la formación de bio-materiales en la presencia de fármacos, incluyendo proteínas y ADN, la formación de bio-materiales en la presencia de células y agregados celulares, y también la formación de bio-materiales *in vivo* ya sea adentro del cuerpo, o sobre la superficie del cuerpo. Es posible formar estos bio-materiales en la presencia de materiales biológicos sensibles debido a la elevada auto-selectividad de las reacciones por adición entre nucleófilos fuertes e insaturaciones conjugadas, que se emplean. El nucleófilo fuerte de interés particular en el método descrito en la presente es el tiol.

35 En la formación del bio-material en la presencia de los materiales biológicos sensibles, se pueden mezclar juntos dos o más componentes líquidos, y reaccionar para formar ya sea un sólido elástico, un sólido visco-elástico (como un gel sólido típico, por ejemplo, un gel como gelatina), un líquido visco-elástico (como un gel típico que se puede inducir a fluir, por ejemplo, un gel como petrolato), un líquido visco-elástico que esté formado de micro-partículas de gel (tal como un gel Carbopol^{MR}), o hasta un líquido viscoso de una viscosidad considerablemente más alta que cualquiera de los dos componentes precursores que se mezclen juntos. La conversión química de los precursores al material final es tan selectiva que ésta se puede realizar en la presencia del material biológico sensible, incluyendo el caso cuando el material biológico es el cuerpo mismo.

40 Se ha desarrollado un familia novedosa de polímeros sintéticos potencialmente muy bio-miméticos. Estos polímeros pueden: (i) convertirse de precursores líquidos a bio-materiales poliméricos lineales o reticulados, ya sea en el laboratorio o *in situ* en un sitio de implantación; (ii) ser hidrogeles o materiales más sustancialmente que no se hinchen; (iii) presentar moléculas bio-activas que sirvan como sitios de adhesión, para proporcionar tracción para invasión celular; (iv) presentar moléculas bio-activas que sirvan como sitios de sustrato de proteasa, para hacer que el material se degrade en respuesta a las enzimas, tales como colagenasa o plasmina, que producen las células durante la migración celular; (v) presentar sitios de fijación de factores de crecimiento, para hacer que el material interactúe con los factores de crecimiento de una manera bio-mimética, por medio de fijarlos y después liberándolos según la demanda celular; y (vi) permitir la aplicación de fármacos de proteína mediante la hidrólisis o la degradación enzimática de los grupos contenidos adentro de la estructura base de los polímeros que forman el gel.

55 De conformidad con lo anterior, en un primer aspecto la invención destaca un método para hacer un bio-material, que envuelve combinar dos o más componentes precursores del bio-material bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, en donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre un nucleófilo fuerte y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila. La funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y el bio-material no comprende albúmina no procesada. En adición, el enlace o grupo conjugado insaturado no es una maleimida ni una vinilsulfona.

60 En una modalidad del primer aspecto de la invención, los componentes se seleccionan a partir del grupo que consiste de oligómeros, polímeros, proteínas o péptidos bio-sintéticos, péptidos o proteínas naturalmente ocurrentes, péptidos o proteínas procesados naturalmente ocurrentes, y polisacáridos. El polímero puede ser poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), alcohol poli(etilen-co-vinílico), ácido poli(acrílico), ácido poli(etilen-co-acrílico), poli(etil-oxazolona), poli(vinilpirrolidona), poli(etilen-co-vinilpirro-lidona), ácido poli(maleico), ácido poli(etilen-co-maleico), poli(acrilamida), o copolímeros de bloque de óxido de poli(etileno)-óxido de co-poli(propileno). El péptido puede comprender un sitio de adhesión, un sitio de fijación de factores de crecimiento, o un sitio de fijación de proteasa.

5 En otra modalidad, los componentes se funcionalizan para que comprendan un nucleófilo fuerte o un grupo conjugado insaturado, o un enlace conjugado insaturado. De preferencia el nucleófilo fuerte es un tiol, o un grupo que contenga un tiol. De preferencia el grupo conjugado insaturado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio, por ejemplo, 2- o 4-vinilpiridinio. En otra modalidad, un componente tiene una funcionalidad de cuando menos tres.

10 En todavía otras modalidades del primer aspecto de la invención, el método también comprende combinar los componentes precursores con una molécula que comprenda un sitio de adhesión, un sitio de fijación de factores de crecimiento, o un sitio de fijación de heparina, y también comprende ya sea un nucleófilo fuerte o un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado. De preferencia el nucleófilo fuerte es un tiol, o el enlace conjugado insaturado o el grupo conjugado insaturado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio.

15 En todavía otras modalidades del primer aspecto de la invención, el bio-material es un hidrogel. El bio-material también puede ser degradable. El bio-material se puede hacer en la presencia de moléculas biológicas sensibles, o en la presencia de células o tejidos. El bio-material también se puede hacer adentro o sobre el cuerpo de un animal.

20 En todavía otras modalidades del primer aspecto de la invención, el método comprende además combinar los componentes precursores con un acelerador, antes de la polimerización. El método también puede comprender mezclar los componentes precursores con un componente que comprenda cuando menos un enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado, y cuando menos un grupo reactivo de amina. También se puede aplicar un componente adicional al sitio de polimerización de la superficie de la célula o el tejido, el componente adicional comprendiendo cuando menos un enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado, y cuando menos un grupo reactivo de amina.

25 En un segundo aspecto, la invención destaca un bio-material formado mediante la combinación de dos o más componentes precursores de un bio-material, bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, en donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre un nucleófilo fuerte y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila. La funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y el bio-material no comprende albúmina no procesada, y el enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado no es una maleimida ni una vinilsulfona.

35 En una modalidad del segundo aspecto de la invención, los componentes se seleccionan a partir del grupo que consiste de oligómeros, polímeros, proteínas o péptidos bio-sintéticos, péptidos o proteínas naturalmente ocurrientes, péptidos o proteínas procesados naturalmente ocurrientes, y polisacáridos. El polímero puede ser poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), alcohol poli(etilen-co-vinílico), ácido poli(acrílico), ácido poli(etilen-co-acrílico), poli(etil-oxazolona), poli(vinilpirrolidona), poli(etilen-co-vinilpirro-lidona), ácido poli(maleico), ácido poli(etilen-co-maleico), poli(acrilamida), o copolímeros de bloque de óxido de poli(etileno)-óxido de co-poli(propileno). El péptido puede comprender un sitio de adhesión, un sitio de fijación de factores de crecimiento, o un sitio de fijación de proteasa.

40 En otra modalidad del segundo aspecto de la invención, los componentes se funcionalizan para que comprendan un nucleófilo fuerte o un grupo conjugado insaturado, o un enlace conjugado insaturado. De preferencia el nucleófilo fuerte es un tiol, o un grupo que contenga un tiol. De preferencia el grupo conjugado insaturado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio, por ejemplo, 2- o 4-vinilpiridinio. En otra modalidad, un componente tiene una funcionalidad de cuando menos tres.

45 En todavía otras modalidades del segundo aspecto de la invención, el método también comprende combinar los componentes precursores con una molécula que comprenda un sitio de adhesión, un sitio de fijación de factores de crecimiento, o un sitio de fijación de heparina, y también comprende ya sea un nucleófilo fuerte o un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado. De preferencia el nucleófilo fuerte es un tiol, o el enlace conjugado insaturado o el grupo conjugado insaturado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio.

50 En todavía otras modalidades del segundo aspecto de la invención, el bio-material es un hidrogel. El bio-material también puede ser degradable. El bio-material se puede hacer en la presencia de moléculas biológicas sensibles, o en la presencia de células o tejidos. El bio-material también se puede hacer adentro o sobre el cuerpo de un animal.

55 En todavía otras modalidades del segundo aspecto de la invención, el método comprende además combinar los componentes precursores con un acelerador, antes de la polimerización. El método también puede comprender mezclar los componentes precursores con un componente que comprenda cuando menos un enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado, y cuando menos un grupo reactivo de amina. También se puede aplicar un componente adicional al sitio de polimerización de la superficie de la célula o el tejido, el componente adicional comprendiendo cuando menos un enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado, y cuando menos un grupo reactivo de amina.

60 En un tercer aspecto, la invención destaca un método para aplicar una sustancia terapéutica a una célula, tejido, órgano, sistema orgánico, o cuerpo de un animal, el método envolviendo poner en contacto a la célula, tejido, órgano,

sistema orgánico o cuerpo con el bio-material del segundo aspecto de la invención, en donde el bio-material contiene una sustancia terapéutica, por medio de la cual se aplica la sustancia terapéutica a la célula, tejido, órgano, sistema orgánico, o cuerpo de un animal.

5 En una modalidad, la sustancia terapéutica se selecciona a partir del grupo que consiste de proteínas, moléculas orgánicas naturalmente ocurrientes o sintéticas, moléculas de ácido nucleico, por ejemplo ADN o ARN, y una partícula viral. En otra modalidad, la sustancia terapéutica es un profármaco. En todavía otra modalidad, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico anti-sentido.

10 En un cuarto aspecto, la invención destaca un método para regenerar un tejido, que envuelve introducir un andamio a un sitio, bajo condiciones que permitan el crecimiento interno de las células. El andamio puede comprender el bio-material del segundo aspecto de la invención.

15 En las modalidades del cuarto aspecto de la invención, el andamio se ha sembrado previamente con células. El tejido se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de hueso, piel, nervio, vaso sanguíneo, y cartílago.

20 En un quinto aspecto, la invención destaca un método para evitar adhesiones, trombosis, o restenosis, que envuelve poner en contacto un sitio con los componentes precursores del bio-material del segundo aspecto de la invención; y polimerizar los componentes en el sitio.

25 En un sexto aspecto, la invención destaca un método para sellar un flujo de fluido o gas, el método comprendiendo los pasos de poner en contacto un sitio adentro del cuerpo de un animal, con los componentes precursores del bio-material del segundo aspecto de la invención, que pueden comprender además un componente que incluya cuando menos un enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado, y cuando menos un grupo reactivo de amina; y polimerizar los componentes en el sitio.

En las modalidades preferidas del sexto aspecto de la invención, el sitio es un pulmón, vaso sanguíneo, piel, la barrera de la dura, o el intestino.

30 En un séptimo aspecto, la invención destaca un método para encapsular una célula o tejido, que envuelve combinar los componentes precursores de un bio-material con una célula o tejido; y polimerizar los componentes, en donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-seleccionada entre un nucleófilo fuerte y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, y en donde el bio-material polimerizado encapsula a la célula o el tejido.

35 En un octavo aspecto, la invención destaca un método para hacer un bio-material, que envuelve combinar dos o más componentes precursores del bio-material, bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, en donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre una amina y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila, en donde la funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y en donde el bio-material no comprende albúmina no procesada, y el enlace o grupo conjugado insaturado no es una maleimida ni una vinilsulfona.

45 En un noveno aspecto, la invención destaca un bio-material formado mediante la combinación de dos o más componentes precursores del bio-material, bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, en donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre una amina y un enlace conjugado insaturado o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila, en donde la funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y en donde el bio-material no comprende albúmina no procesada, y el enlace o grupo insaturado no es una maleimida ni una vinilsulfona.

50 Con "bio-materiales" se quiere decir material que se reserva para contacto con el cuerpo, ya sea sobre la superficie de éste, o implantado adentro de éste. De preferencia, el bio-material se forma mediante una reacción por adición conjugada entre un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada.

55 Como se usan en la presente, las palabras "polimerización" y "reticulación" se usan para indicar un enlace de múltiples moléculas de componentes precursores, para dar como resultado un incremento sustancial en el peso molecular. "Reticulación" también indica ramificación, típicamente para producir una red de polímeros.

60 Con "auto-selectiva" se quiere decir que un primer componente precursor de la reacción reacciona mucho más rápido con un segundo componente precursor de la reacción que con otros compuestos presentes en la mezcla en el sitio de la reacción, y el segundo componente precursor reacciona mucho más rápido con el primer componente precursor que con otros compuestos presentes en la mezcla en el sitio de la reacción. La mezcla puede contener otros materiales biológicos, por ejemplo, fármacos, péptidos, proteínas, ADN, células, agregados celulares, y tejidos. Como se usa en la presente, un nucleófilo fuerte se fija de preferencia a una insaturación conjugada, en lugar de a otros compuestos biológicos, y un grupo conjugado insaturado se fija de preferencia a un nucleófilo fuerte, en lugar de a otros compuestos biológicos.

65

- 5 Cuando se desea el grado más elevado de auto-selectividad en los métodos de la invención, el nucleófilo selecto es un tiol. Cuando no se requiere el nivel más elevado de selectividad en los métodos de la invención, se puede usar una amina como el nucleófilo fuerte. Se pueden alterar las condiciones que se utilizan para completar la reacción auto-selectiva de la presente invención, para incrementar el grado de auto-selectividad, como se proporciona en la presente. Por ejemplo, si se usa una amina como el nucleófilo fuerte en la formación de un bio-material, mediante la selección de una amina con un pK bajo, y la solución precursora final que se va a polimerizar se formula de tal manera que el pH está cerca del pK, se favorece la reacción de la insaturación con la amina que se proporciona, y de esta manera se consigue la auto-selectividad.
- 10 Con "nucleófilo fuerte" se quiere decir una molécula que es capaz de donar un par de electrones a un electrófilo en una reacción de formación de enlace polar. De preferencia el nucleófilo fuerte es más nucleófilo que el H₂O al pH fisiológico. Los ejemplos de nucleófilos fuertes son tioles y aminas.
- 15 El nucleófilo fuerte preferido para usarse en la presente invención es un tiol, puesto que éste exhibe alta auto-selectividad. En las proteínas que se encuentran afuera de las células están presentes muy pocos tioles estéricamente accesibles. Las aminas también pueden ser útiles y auto-selectivas, especialmente cuando la reacción de formación de bio-material se conduce en la presencia de moléculas biológicas sensibles que no llevan aminas, por ejemplo, muchos fármacos.
- 20 Con "enlace conjugado insaturado" se quiere decir la alternación de enlaces múltiples de carbono - carbono, carbono - heteroátomo, o heteroátomo - heteroátomo con enlaces individuales, o el enlace de un grupo funcional a una macromolécula, tal como un polímero sintético o una proteína. Esos enlaces pueden experimentar las reacciones por adición.
- 25 Con "grupo conjugado insaturado" se quiere decir una molécula o una región de una molécula, que contiene una alternación de enlaces múltiples de carbono - carbono, carbono - heteroátomo, o heteroátomo - heteroátomo con enlaces individuales, que tienen un enlace múltiple que puede experimentar las reacciones por adición. Los ejemplos de grupos conjugados insaturados incluyen, pero no están limitados a acrilamidas, quinonas, y vinilpiridinos, por ejemplo, 2- o 4-vinilpiridinio.
- 30 Con "péptido sustancialmente puro", "polipéptido sustancialmente puro", o "proteína sustancialmente pura", se quiere decir un polipéptido que se ha separado de los componentes que naturalmente acompañan a éste. Como se usan en la presente, los términos péptido, polipéptido, y proteína se usan de manera intercambiable. Típicamente, el polipéptido es sustancialmente puro cuando éste está cuando menos el 60 por ciento, en peso, libre de las proteínas y las moléculas orgánicas naturalmente ocurrientes con las cuales éste está naturalmente asociado. De preferencia, el polipéptido es cuando menos 75 por ciento, de más preferencia cuando menos 90 por ciento, y de mayor preferencia cuando menos 99 por ciento, en peso, puro. Se puede obtener un polipéptido de interés sustancialmente puro, por ejemplo, mediante la extracción de una fuente natural (por ejemplo, una célula, agregado celular, o tejido), mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifique el polipéptido deseado, o mediante la síntesis química de la proteína. Se pueden hacer ensayos sobre la pureza mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía de columna, electrofóresis de gel de poliacrilamida, electrofóresis de gel de agarosa, densidad óptica, o análisis HPLC.
- 35 Una proteína está sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados cuando ésta se separa de esos contaminantes que la acompañan en su estado natural. De esta manera, una proteína que se sintetiza o produce químicamente en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina ésta naturalmente, estará sustancialmente libre de sus componentes naturalmente asociados. De conformidad con lo anterior, los polipéptidos sustancialmente puros incluyen aquellos derivados a partir de organismos eucarióticos, pero sintetizados en *E. Coli* u otros procariones.
- 40 Con "ácido nucleico purificado" se quiere decir una molécula de ácido nucleico que esté libre de los genes que, en el genoma naturalmente ocurriente del organismo a partir del cual se derivó el ácido nucleico de la invención, flanquean el gen. El término incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora dentro de un vector; dentro de un plásmido o virus autónomamente duplicador; o dentro del ADN genómico de un procarionte o eucariote; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un genómico o un fragmento de ADNc producido mediante PCR o digestión de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. Este también incluye ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica la secuencia de polipéptidos adicional.
- 45 Con "funcionalizar" se quiere decir modificar de una manera que de cómo resultado la unión de un grupo o fracción funcional. Por ejemplo, una molécula se puede funcionalizar mediante la introducción de una molécula que haga a la molécula un nucleófilo fuerte o una insaturación conjugada. De preferencia una molécula, por ejemplo PEG, se funcionaliza para convertirse en un tiol, amina, acrilato, o quinona.
- 50 Las proteínas en particular también se pueden funcionalizar de manera efectiva mediante la reducción parcial o completa de los enlaces de disulfuro, para crear tioles libres.
- 55
- 60
- 65

5 Con “funcionalidad” se quiere decir el número de sitios reactivos en una molécula. Como se usa en la presente, la funcionalidad de un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada será cada una de cuando menos dos. La mezcla de dos componentes, por ejemplo, un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada, con funcionalidades de dos cada uno, dará como resultado un bio-material polimérico lineal, y la mezcla de dos componentes con funcionalidades de cuando menos dos cada uno, uno de los componentes teniendo una funcionalidad de más de dos, dará como resultado un bio-material reticulado.

10 Con “sitio de adhesión” se quiere decir una secuencia de péptidos a la cual se fija una molécula, por ejemplo, un receptor promotor de adhesión en la superficie de una célula. Los ejemplos de sitios de adhesión incluyen, pero no están limitados a, la secuencia RGD de la fibronectina, y la secuencia YIGSR de la laminina. De preferencia los sitios de adhesión están incorporados dentro del bio-material de la presente invención.

15 Con “sitio de fijación de factores de crecimiento” se quiere decir una secuencia de péptidos a la cual se fija un factor de crecimiento, o una(s) molécula(s) que fija(n) un factor de crecimiento. Por ejemplo, el sitio de fijación de factores de crecimiento puede incluir un sitio de fijación de heparina. El sitio fijará la heparina, que a su vez fijará los factores de crecimiento de fijación a la heparina, por ejemplo, bFGF, VEGF, BMP, o TGF β .

Con “sitio de fijación de proteasa” se quiere decir una secuencia de péptidos que es un sustrato para una enzima.

20 Con “ácido nucleico anti-sentido” se quiere decir una secuencia de ácidos nucleicos, sin importar la longitud, que es complementaria al gen de cadena de codificación que codifica una proteína de interés. De preferencia, el ácido nucleico anti-sentido es capaz de disminuir la actividad biológica de la proteína de interés cuando está presente en una célula. De preferencia, la disminución es de cuando menos el 10 por ciento, con relación a un control, de más preferencia el 25 por ciento, y de mayor preferencia el 100 por ciento.

25 Con “actividad biológica” se quiere decir eventos funcionales mediados por una proteína de interés. En algunas modalidades, ésta incluye eventos que se han ensayado mediante la medición de las interacciones de un polipéptido con otro polipéptido. Esta también incluye hacer ensayos sobre el efecto que tiene la proteína de interés en el crecimiento, la diferenciación, la muerte, la migración, la adhesión, las interacciones con otras proteínas, la actividad enzimática, la fosforilación o desfosforilación de proteínas, la transcripción, o la traslación de las células.

30 Con “molécula biológica sensible” se quiere decir una molécula que se encuentra en una célula, o en un cuerpo, o que se puede usar como un producto terapéutico para una célula o un cuerpo, que puede reaccionar con otras moléculas en su presencia. Los ejemplos de moléculas biológicas sensibles incluyen, pero no están limitados a, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, y fármacos. En la presente invención los bio-materiales se pueden hacer en la presencia de materiales biológicos sensibles, sin afectar adversamente los materiales biológicos sensibles.

35 Como se usa en la presente, con “regenerar” se quiere decir volver a crecer una porción, o todo un tejido. Por ejemplo, la presente invención destaca métodos para regenerar el hueso después de trauma, remoción de tumor, o fusión espinal, o para regenerar la piel para ayudar a la curación de úlceras diabéticas del pie, llagas de presión, e insuficiencia venosa. Otros tejidos que se pueden regenerar incluyen, pero no están limitados a nervios, vasos sanguíneos, y tejido de cartílago.

40 Con “trasplante celular” se quiere decir trasplantar una célula, agregado celular, o tejido dentro de un sujeto. El bio-material de la presente invención se puede usar para aislar células, agregados celulares, o tejidos trasplantados en el sujeto, del sistema de defensa del sujeto, mientras que se permite el transporte selectivo de las moléculas requeridas para la función celular normal.

50 **Breve Descripción de los Dibujos**

La Figura 1 es una gráfica del efecto del cambio de residuos aminoácidos adyacentes a la cisteína sobre la velocidad de la adición de conjugado en los acrilatos (PEG - acrilato).

55 La Figura 2 es una representación esquemática de una reacción por adición de conjugado, que se usa como un modelo para estudiar la cinética de la adición de un tiol (en la cisteína) al acrilato en el diacrilato PEG.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto del pH sobre la reacción por adición entre un tiol (en la cisteína) y el diacrilato PEG.

60 La Figura 4 es una gráfica del efecto de diferentes contenidos de PEGDA sobre la absorbencia por mol de reactivo, el coeficiente de extinción promedio (es decir, la absorbencia dividida entre la suma de PEGDA y la concentración de cisteína; esta suma se mantiene constante a 2.5×10^{-3} M).

65 La Figura 5 es una gráfica que muestra el efecto que tiene la influencia estérica de los grupos cerca del sitio de la insaturación conjugada sobre la reacción entre un tiol (en la cisteína) y un acrilato, crotonoato, o dimetilacrilato de un

PEG funcionalizado de conformidad con lo anterior.

La Figura 6 es una gráfica que muestra el efecto de la incorporación de una secuencia de péptidos RGD adentro de los hidrogeles de la presente invención, sobre la adherencia y propagación de las células.

La Figura 7 es una gráfica que muestra la liberación de mioglobina de las esponjas de colágeno incluido en hidrogel (Helistat). Note que en el día 14, se añadió plasmina a los materiales y esto llevó a la liberación de más mioglobina de los hidrogeles sensibles a la plasmina.

La Figura 8 es una curva de esfuerzo - tensión para un gel sólido al 75 por ciento, preparado en un sistema acuoso. Los geles se prepararon usando tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y diacrilato de PEG 570 en sólido al 75 por ciento en solución salina regulada en el pH con fosfato a un pH de 9.0. Los geles mostraron aproximadamente el 37 por ciento de deformación 2 Mpa de resistencia Máxima cuando se sometieron a cargas compresivas.

La Figura 9 muestra curvas de tensión - esfuerzo para un gel sólido al 75 por ciento preparado en un sistema acuoso con diferentes contenidos de triacrilato de pentaeritritol reemplazando el diacrilato de PEG 570. Los geles se prepararon usando tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y diacrilato de PEG 570, y triacrilato de pentaeritritol en sólido al 75 por ciento en solución salina regulada en el pH con fosfato a un pH de 9.0. Los geles mostraron que la rigidez del gel se manipuló por el contenido del triacrilato hidrófobo.

La Figura 10 es una gráfica que muestra el efecto de la adición de partículas inorgánicas o tensoactivos a los geles sobre la resistencia máxima de los geles. Se compararon los geles preparados en el sistema acuoso en sólido al 75 por ciento (geles sólidos al 75 por ciento), con aquellos en los que se añadió BaSO₄ al 10 por ciento, o cuando se añadió un tensoactivo, monooleato de sorbitán (Emulsión) al 1 por ciento. También se compararon los geles obtenidos a partir de los precursores reaccionados previamente, con los geles obtenidos por medio de los precursores tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y diacrilato de PEG 570 (precursores reaccionados previamente).

La Figura 11 es una gráfica que muestra el efecto de la adición de partículas inorgánicas o tensoactivos a los geles, sobre la rigidez de los geles. Se compararon los geles preparados en el sistema acuoso en sólido al 75 por ciento (geles sólidos al 75 por ciento), con aquellos en los que se añadió BaSO₄ al 10 por ciento, o cuando se añadió un tensoactivo, monooleato de sorbitán (Emulsión) al 1 por ciento. También se compararon los geles obtenidos a partir de los precursores reaccionados previamente, con los geles obtenidos por medio de los precursores tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y diacrilato de PEG 570 (precursores reaccionados previamente).

La Figura 12 es una curva de tensión - esfuerzo para un gel preparado en un sistema acuoso cargado con sílice ahumado (14 nm). Los geles se prepararon usando tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y diacrilato de PEG 570 en solución salina regulada en el pH con fosfato a un pH de 9.0, reforzada con partículas de sílice ahumado (14 nm).

La Figura 13 muestra una curva de tensión - esfuerzo para un gel sólido al 10 por ciento, preparado en un cosolvente de N-metilpirrolidona/PEG 400. Los geles se prepararon usando tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y diacrilato de PEG 570 en sólido al 10 por ciento en N-metilpirrolidona/PEG 400.

La Figura 14 muestra los módulos elástico y de complejo (G' y G'') para el tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y el diacrilato de PEG 570. Se mezclaron el tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y el diacrilato de PEG 570 con 1 SH a una proporción de 1 C=C, sin regulador del pH con pH de 9.0 de solución salina regulada en el pH con fosfato. Se puso la mezcla en un remolino, y después se determinaron los módulos elástico y de complejo con el tiempo mediante reología.

La Figura 15 muestra los módulos elástico y de complejo (G' y G'') a 37°C para el tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y el diacrilato de PEG 570 activados con solución salina regulada en el pH con fosfato a un pH de 9.0. Se mezclaron el tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol y el diacrilato de PEG 570 con 1 SH a una proporción de 1 C=C, y se añadió la solución salina regulada en el pH con fosfato a un pH de 9.0. Se puso la mezcla en un remolino, y después se determinaron los módulos elástico () y de complejo con el tiempo mediante reología.

Descripción Detallada

I. Síntesis o Aplicación *In vivo* de los Bio-materiales

El sistema de reacción química que se usó para la formación del bio-material

Se ha desarrollado un esquema de reacción química novedoso mediante el cual polimerizar o reticular (las palabras se usan como sinónimos en la presente) dos o más componentes precursores de un bio-material *in situ*, o en la presencia de materiales biológicos sensibles, de una manera muy auto-selectiva. Comúnmente se mezclan juntos dos componentes precursores. Estos dos componentes precursores son auto-selectivos en sus velocidades de reacción (es

5 decir, un primer componente precursor reacciona mucho más rápido con un segundo componente precursor que con otros componentes en el material biológico sensible, y el segundo componente precursor reacciona mucho más rápido con el primer componente precursor que con otros componentes en el material biológico sensible). Cuando ambos componentes precursores tienen una funcionalidad de cuando menos dos, y cuando uno de ellos tiene una funcionalidad mayor que dos, el sistema reaccionará auto-selectivamente para formar un bio-material reticulado. La palabra 'funcionalidad' se usa en la presente en el sentido que se usa en la ciencia de polímeros (es decir, el número de sitios reactivos). De esta manera, la mezcla de dos componentes con funcionalidades de dos cada uno dará como resultado un bio-material polimérico lineal, y la mezcla de dos componentes con funcionalidades de cuando menos dos cada uno, uno de los componentes teniendo una funcionalidad de más de dos, dará como resultado un bio-material reticulado.

15 Cuando ambos componentes precursores tienen una funcionalidad de dos, el resultado será un bio-material polimérico lineal. Ambas situaciones pueden ser útiles. En bio-materiales reticulados los componentes pueden ser muy hidrófilos, y el material global puede permanecer aún como un sólido intacto, sin dispersarse a lo largo del cuerpo. Si se desea ese sistema no dispersante para un bio-material polimérico lineal, éste es útil si cuando menos un componente precursor es hidrófobo, de tal manera que el bio-material resultante también sea insoluble en agua o en fluidos corporales. También son posibles otros planteamientos, por ejemplo, cuando los dos componentes precursores interactúan de otra manera para volverse insolubles, o cuando uno o ambos precursores responden al pH, la temperatura u otros estímulos para volverse más o menos solubles, o cuando un componente precursor es un polication y el otro componente precursor es un polianión, o cuando un componente precursor se enlaza fuertemente por el hidrógeno al otro.

20 El sistema de reacción química de la presente invención hace uso de las reacciones por adición, en las que un componente posee un nucleófilo fuerte y el otro componente posee una insaturación conjugada, o una insaturación conjugada. De interés particular en esta invención como nucleófilos fuertes son los tioles. De preferencia, el sistema hace uso de reacciones por adición de conjugados entre un tiol y una insaturación conjugada (por ejemplo, un acrilato o una quinona). Este sistema de reacción se puede hacer para que sea auto-selectivo, queriendo decir sustancialmente no reactivo con otros grupos químicos que se encuentran en la mayoría de los compuestos biológicos sensibles de interés (la mayoría de fármacos, péptidos, proteínas, ADN, células, agregados celulares, y tejidos). Este es particularmente útil cuando uno o ambos componentes son parte de un polímero u oligómero, sin embargo, en la presente también se indican otras posibilidades.

25 Las proteínas contienen la cisteína de aminoácidos, cuya cadena lateral termina en un tiol. A pesar de esto, hay muy pocos tioles libres adentro de la proteína: la mayoría de las proteínas contienen un número par de residuos de cisteína, y entonces éstos se ponen en pares y forman reticulaciones de disulfuro entre diferentes regiones de la proteína. Algunas proteínas contienen un número non de residuos de cisteína, y la mayoría de éstos están presentes como dímeros enlazados por disulfuro, nuevamente dando como resultado que ningún residuo de tiol libre esté presente en la proteína nativa. De esta manera, hay muy pocos tioles libre en la proteína. Algunas moléculas de transferencia de electrones importantes, tales como glutatona, contienen un tiol libre, pero estas moléculas generalmente están restringidas en su localización espacial al interior de una célula. De conformidad con lo anterior, las estructuras conjugadas insaturadas presentadas afuera de la célula serán sustancialmente no reactivas con la mayoría de las proteínas en condiciones casi fisiológicas. Las aminas también son nucleófilos, aunque no tan buenos nucleófilos como los tioles. El pH del ambiente de la reacción es importante en esta consideración. En particular, las aminas no protonadas son generalmente mejores nucleófilos que las aminas protonadas. A un pH fisiológico, las aminas de la cadena lateral de la lisina son casi exclusivamente protonadas, y en consecuencia no muy reactivas. La amina alfa del término N de péptidos y proteínas tiene un pK mucho más bajo que la amina épsilon de la cadena lateral; de conformidad con lo anterior, a un pH fisiológico es más reactiva para conjugar adiciones que las aminas épsilon de la cadena lateral de lisina.

30 No obstante, el tiol es sustancialmente más reactivo que la amina no protonada. Como se declaró, el pH es importante en esta consideración: el tiol desprotonado es sustancialmente más reactivo que el tiol protonado. En conclusión, las reacciones por adición que envuelven una insaturación conjugada, tal como un acrilato o una quinona, con un tiol para convertir dos componentes precursores en un bio-material, frecuentemente se realizarán mejor (queriendo decir más rápido, más auto-selectiva) a un pH de aproximadamente 8, en donde la mayoría de los tioles de interés son desprotonados (y de esta manera más reactivos), y en donde la mayoría de las aminas de interés todavía están protonadas (y por lo tanto menos reactivas). Cuando se usa un tiol como el primer componente, es altamente deseable una estructura de conjugado que sea selectiva en su reactividad para el tiol con relación a las aminas.

35 Si las estructuras conjugadas se mantienen afuera de las células, hay muy pocos nucleófilos reactivos con los cuales reaccionar para inducir toxicidad. Uno puede realizar típicamente esta restricción espacial por medio de hacer que el componente conjugado sea de alto peso molecular, sea hidrófilo, o ambos.

40 El polietilenglicol (PEG) proporciona un bloque de construcción muy conveniente. Uno puede comprar o sintetizar fácilmente los PEGs lineales (queriendo decir con dos extremos) o ramificados (queriendo decir más de dos extremos), y después funcionalizar los grupos extremos de PEG para introducir ya sea un nucleófilo fuerte, tal como un tiol, o una estructura conjugada, tal como un acrilato o una quinona. Cuando estos componentes ya sea se mezclan uno con el

5 otro, o se mezclan con un componente correspondiente, se formará un material de hidrogel. Uno puede hacer reaccionar un componente PEG con un componente no PEG, controlando el peso molecular o la hidrofiliia de cualquier componente, para manipular las características mecánicas, la permeabilidad, y el contenido de agua del bio-material resultante. Estos materiales generalmente son útiles en implantes médicos, como se describe con mayor detalle posteriormente.

10 En la formación de bio-materiales, especialmente bio-materiales que se desea que se degraden *in vivo*, los péptidos proporcionan un bloque de construcción muy conveniente. Este es directo para sintetizar péptidos que contienen dos o más residuos de cisteína, y este componente puede servir entonces fácilmente como el componente precursor nucleófilo de un bio-material, especialmente un bio-material de hidrogel. Por ejemplo, un péptido con dos residuos de cisteína libres formará rápidamente un hidrogel cuando se mezcle con un triacrilato de PEG a un pH fisiológico o ligeramente más alto (por ejemplo, 8 o 9; la gelación también procederá bien a un pH aún más alto, pero a costa potencial de la auto-selectividad). Cuando se mezclan juntos los dos componentes precursores líquidos, éstos reaccionan durante un período de unos pocos minutos para formar un gel elástico, que consiste de una red de cadenas de PEG, que llevan los nodos de la red, con los péptidos, como enlaces de conexión. Los péptidos se pueden seleccionar como sustratos de proteasa, con el propósito de hacer a la red capaz de ser infiltrada y degradada por las células, muy parecido a como lo harían en una red basada en proteínas. La gelación es auto-selectiva, queriendo decir que el péptido reacciona mayormente con el componente PEG y ningún otro componente, y el componente PEG reacciona mayormente con el péptido y ningún otro componente; si se desea, uno puede diseñar e incorporar agentes bio-funcionales para proporcionar el enlace químico a otras especies (por ejemplo, una superficie de tejido). Estos geles son operacionalmente simples para formarse: uno mezcla dos precursores líquidos, uno que contenga el péptido y el otro que contenga el PEG funcional. Debido a que en este ejemplo la solución salina fisiológica puede servir como el solvente, y debido a que se genera calor mínimo por la reacción, y debido a que ni el triacrilato de PEG ni el péptido pueden difundir rápidamente las células internas, la gelación se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, en contacto directo con el tejido, sin toxicidad desfavorable. Está claro que se pueden usar polímeros diferentes al PEG, ya sea telequímicamente modificados o modificados en sus grupos laterales.

Sitios de Proteasa

30 Una característica especial del esquema de reticulación química de esta invención es que éste es auto-selectivo, queriendo decir que éste no reacciona con otras características sobre los péptidos o proteínas. De esta manera, uno puede emplear péptidos como un componente, como se describió anteriormente, y no reaccionar químicamente con grupos laterales en el péptido aparte de los residuos de cisteína. Esto significa que se pueden incorporar una diversidad de péptidos bio-activos adentro de la estructura del bio-material resultantes. Por ejemplo, se puede diseñar un péptido que se use como un ditiol para propósitos de reticulación, para que sea un sustrato para una enzima que use la migración celular a través de los tejidos y remodelar tejidos (por ejemplo, como un sustrato para plasmina, elastasa o metaloproteinasas de matriz (MMPs), tales como colagenasa). Las características de degradación de los geles se puede manipular por medio de cambiar los detalles del péptido que sirve como los nodos de reticulación. Uno puede hacer un gel que sea degradable por colagenasa, pero no plasmina, o por plasmina, pero no colagenasa. Además, es posible hacer que el gel se degrade más rápido o más lento, en respuesta a una enzima, simplemente por medio de cambiar la secuencia de aminoácidos con el propósito de alterar el K_m o k_{cat} , o ambos, de la reacción enzimática. Uno puede de esta manera hacer un bio-material que sea bio-mimético, en el sentido de que éste sea capaz de ser remodelado por las características de remodelación normales de las células.

Sitios de Adhesión

45 Uno puede incorporar sitios de péptido para la adhesión de células, a saber péptidos que se fijan a receptores promotores de adhesión en las superficies de las células adentro de los bio-materiales de la presente invención. Este se dirige para incorporar una diversidad de esos péptidos promotores de adhesión, tal como la secuencia RGD de la fibronectina, o la secuencia YIGSR de la laminina. Como anteriormente, esto se puede hacer, por ejemplo, simplemente por medio de mezclar un péptido que contenga cisteína con diacrilato o triacrilato de PEG, diacrilamida o triacrilamida de PEG, o diquinona o triquinona de PEG, unos pocos minutos antes de mezclar con el resto del componente precursor que contiene tiol. Durante este primer paso, el péptido promotor de adhesión llegará a estar incorporado dentro de un extremo del PEG funcionalizado de manera múltiple con una insaturación conjugada; cuando se añade el multitiol restante al sistema se formará una red reticulada. De esta manera, por ejemplo, cuando se mezcla un péptido de adhesión que contiene una cisteína con un triacrilato de PEG (en, por ejemplo, 0.1 mol de péptido por mol de grupo extremo de acrilato), y después se añade un péptido de sustrato de proteasa que contiene dos residuos de cisteína, para formar la red tridimensional (en, por ejemplo, equimolar menor de 0.1 mol de péptido por mol de grupo extremo de acrilato), el material resultante será altamente bio-mimético: la combinación de sitios de adhesión incorporados y sitios de proteasa permite que una célula establezca tracción en el material a medida que degrada una trayectoria para su migración, exactamente como lo haría de manera natural la célula en la matriz extracelular *in vivo*. En este caso, el sitio de adhesión está incorporado suspendido dentro del material. Uno también puede incorporar el sitio de adhesión directamente en la estructura base del material. Esto se puede hacer en más de una manera. Una manera sería incluir dos o más tioles (por ejemplo, cisteína) en el péptido o proteína de adhesión. Uno puede sintetizar alternativamente el péptido de adhesión (por ejemplo, usando química de fase de solución) directamente sobre un polímero, tal como PEG, e incluir cuando menos un tiol (por ejemplo, cisteína) o insaturación conjugada por extremo de cadena.

Sitios de fijación de factores de crecimiento

5 Uno puede incrementar adicionalmente la naturaleza biométrica de los bio-materiales de la presente invención, especialmente cuando éstos se forman a partir de componentes solubles en agua, con el propósito de ser hidrogeles, mediante la incorporación de dominios de fijación de factores de crecimiento. Por ejemplo, se pueden emplear péptidos de fijación de heparina para fijar la heparina, que a su vez se puede emplear para fijar factores de crecimiento de fijación a la heparina, tales como bFGF, VEGF, BMP o TGF β . En sí, si el factor de crecimiento de fijación a la heparina, la heparina, y el péptido de fijación a la heparina activado se mezclaran con el PEG activado (de manera similar a la que se describió en la sección precedente), el gel resultante liberaría lentamente el factor de crecimiento, reteniendo la mayoría de éste hasta que una célula invasora liberara el factor de crecimiento por la degradación del gel. Esta es una de las funciones naturales de la matriz extracelular *in vivo*, para servir como un depósito para factores de crecimiento que llegan a liberarse en la lesión por la actividad celular local. Otra manera relacionada para secuestrar los factores de crecimiento de fijación a la heparina sería más directamente a través del uso de mímicos de heparina covalentemente incorporados, por ejemplo, péptidos con cadenas laterales negativamente cargadas, que directamente fijan los factores de crecimiento. Por otra parte, puesto que el material mismo en una red, éste se puede usar para liberar un factor de crecimiento que esté simplemente incorporado físicamente, y se libera lentamente mediante degradación o difusión, o una combinación de los mismos. Se debe entender que debido a que la química de la gelación es auto-selectiva, el factor de crecimiento mismo y los otros péptidos bio-activos no se modifican químicamente con el propósito de destruir su actividad biológica. Este aspecto importante de la auto-selectividad hace obvia la necesidad, por ejemplo, de encapsular el factor de crecimiento en partículas de polímero (para protegerlo mediante lo mismo de la química de la gelación, si la química de la gelación fuera a reaccionar con grupos laterales que esté presentes libres en el factor de crecimiento, tal como las aminas épsilon presentes en las cadenas laterales de la lisina en la proteína).

25 Aplicación de Fármacos desde Hidrogeles Formados Mediante Reacciones por Adición de Conjugados

Los hidrogeles son particularmente útiles para la aplicación de productos terapéuticos de proteínas. Los hidrogeles son bio-compatibles, y proporcionan un ambiente suave para las proteínas, con el propósito de minimizar la desnaturalización de las proteínas. Las reacciones por adición de conjugados con tioles se utilizan para la producción de geles en la presencia de proteínas, debido a la auto-selectividad de estas reacciones, en comparación con las reacciones por sustitución nucleófila, las reacciones de radicales libres, o las reacciones que envuelven aminas para reactividad. De esta manera, las proteínas se atrapan físicamente adentro de los geles. Adicionalmente, se pueden incorporar segmentos degradables adentro de los polímeros que forman el hidrogel, y por medio de la degradación de los segmentos adentro del gel, las proteínas se liberarán a medida que el gel se degrade. Una modalidad particularmente útil de la invención ocurre en el caso cuando la reacción por adición de conjugados misma lleva a una estructura que es particularmente propensa a la hidrólisis.

40 En la mayoría de los casos, los fármacos de proteínas o productos terapéuticos de peso molecular elevado, tales como oligonucleótidos o genes anti-sentido, se liberan desde los materiales hidrófobos degradables, tales como el ácido poliláctico. Sin embargo, describimos más materiales hidrófilos, tales como polietilenglicol reticulado funcionalizado con tioles, con insaturaciones conjugadas, o ambos. Existen otros ejemplos, incluyendo polietilenglicol fotorreticulado (Pathak y colaboradores, *Journal of the American Chemical Society* 114:8311-8312, 1992) y polietilenglicol reticulado mediante reacciones por sustitución nucleófila (Zhao y colaboradores, *Polymer Preprints* 38:526-527, 1997; WO 99/2270; WO 99/34833, y WO 99/14259). La reticulación por medio de químicas por adición de conjugados con tioles exhibe excelente auto-selectividad, en el sentido de que la reacción entre el grupo conjugado y otros grupos, tales como aminas, en proteínas, será bastante lenta. Cuando la proteína que se va a incorporar contiene un tiol libre, éste se hará reaccionar con el sistema del bio-material, a menos que éste se proteja o haga reaccionar de otra manera.

50 Una ventaja adicional para el uso de bio-materiales formados mediante la adición de conjugados con tioles, para encapsular y liberar proteínas surge debido a la química de los grupos generados mediante la reticulación por adición de conjugados. Si el grupo conjugado es un acrilato, entonces en el sistema está presente un éster relativamente inestable. Si el acrilato se sometiera a la reticulación de radicales libres, se ha encontrado que esos geles se degradan solamente muy lentamente a un pH de 7.4 y a 37°C, con un gel que se degrada durante el período de aproximadamente un año. Sin embargo, si el grupo acrilato se hace reaccionar con un tiol, el éster del grupo acrilato se hidroliza con una vida media de aproximadamente 3 semanas, produciendo geles que se degradan durante aproximadamente 3 semanas (como se describe posteriormente). Mientras que en el caso de la reticulación de radicales libres, se deben incluir grupos especiales entre el polietilenglicol y el acrilato, para promover la degradación del gel (tal como oligómeros de ácido poliláctico; Pathak, *supra*), no se requieren grupos especiales entre el acrilato y el polietilenglicol en el caso de la reticulación por adición de conjugados. Uno puede emplear enlazadores más estables entre la insaturación conjugada y el polímero, y entonces incorporar un dominio que sea degradable por hidrólisis, tal como un oligómero de ácido glicólico, ácido láctico, caprolactona épsilon, o carbonato de trimetileno, entre el polímero y la insaturación conjugada, para obtener la degradación del bio-material mediante la degradación de estos dominios.

Aplicaciones Bio-Médicas para los Hidrogeles

- Los hidrogeles son materiales poliméricos que se hinchan altamente con agua. Para muchas aplicaciones, los hidrogeles son especialmente útiles. Los hidrogeles son de interés para miríadas de aplicaciones bio-médicas. Estas incluyen, pero no están limitadas a aplicaciones de barreras (preventivos de adhesión, selladores), dispositivos de aplicación de fármacos, diseño de tejidos y andamios para curación de heridas, materiales para encapsulación y trasplante celular, materiales para el aumento quirúrgico de tejidos, y materiales para selladores y adhesivos. A continuación se da una lista de aplicaciones incompleta pero ilustrativa para los hidrogeles en bio-medicina:
1. Son deseables los hidrogeles para la prevención de adhesiones, para minimizar las adhesiones no deseadas postoperatorias u otras adhesiones postraumáticas. Esas adhesiones pueden ser proteínicas o celulares, o ambas. Por ejemplo, las adhesiones abdominopélvicas postoperatorias pueden llevar a dolor crónico, obstrucción del intestino, e infertilidad. Como un segundo ejemplo, la adhesión no deseada entre las plaquetas de la sangre y la superficie de la pared del vaso sanguíneo después de la angioplastia de balón en el sistema vascular puede llevar a trombosis y restenosis. Los materiales curados *in situ* sobre un sitio quirúrgico puede ser útil para evitar las adhesiones postoperatorias, especialmente cuando estos materiales se degradan durante un período de muchos días a semanas. Los materiales curados *in situ* sobre una arteria lesionada puede ser útil para evitar la trombosis sobre el sitio del trauma vascular asociado con la intervención de catéteres, el despliegue de un stent, o cirugía.
 2. Los hidrogeles como pegamentos o selladores son deseables para sellar fugas en tejidos que aíslan (fase de gas o líquido) cavidades que contengan fluidos. Algunos ejemplos son los vasos sanguíneos, la piel, el pulmón, la barrera dura, y el intestino. Los materiales pueden ser útiles internamente, por ejemplo, para sellar fugas de aire en el pulmón, y externamente, por ejemplo, para cerrar incisiones en la piel.
 3. Los hidrogeles también pueden ser útiles como dispositivos de aplicación de fármacos localizada. Un fármaco puede ser cualquier molécula biológicamente activa, por ejemplo, un producto natural, fármaco sintético, proteína (tal como factores de crecimiento o enzimas), o material genético. Las propiedades funcionales ese fármaco deben ser conservadas por su portador. El fármaco se puede liberar mediante mecanismos difusivos, o mediante la degradación del portador del gel, a través de una diversidad de mecanismos (tal como hidrólisis o degradación enzimática), o mediante otros mecanismos de detección (por ejemplo, hinchazón inducida por el pH). Dado que muchos fármacos contienen grupos reactivos, es importante que el material que sirve como el portador no reaccione con el material de una manera indeseable; en sí, la alta auto-selectividad de las reacciones entre las insaturaciones conjugadas y los tioles es muy útil en la encapsulación de fármacos.
 4. Los hidrogeles como andamios son deseables para el diseño de tejidos y aplicaciones de curación de heridas: regeneración de nervios, angiogénesis, y reparación y regeneración de piel, huesos y cartílagos. Esos andamios se pueden introducir al cuerpo sembrados previamente con células, o pueden depender de la infiltración celular desde afuera del material en los tejidos cerca del bio-material implantado. Esos andamios pueden contener (a través de enlaces covalentes o no covalentes) moléculas interactivas con células como péptidos de adhesión y factores de crecimiento.
 5. Los hidrogeles también tienen aplicaciones bio-médicas como dispositivos de trasplante celular. Esos dispositivos sirven para aislar células (por ejemplo, aloinjerto o xenoinjerto) del sistema de defensa de un anfitrión (inmunoprotección), mientras permite el transporte selectivo de moléculas tales como oxígeno, dióxido de carbono, glucosa, hormonas, e insulina y otros factores de crecimiento, habilitando así a las células para retener sus funciones normales, y para proporcionar beneficios deseados, tales como la liberación de una proteína terapéutica que se pueda difundir a través de la membrana de hidrogel de inmunoprotección al receptor.
 6. Los hidrogeles pueden responder a su ambiente. Estos se pueden diseñar para incrementar la formación de la red, y de esta manera la unión, entre el gel y el tejido porque cuando se inyectan inicialmente los componentes se originan en agua y son solubles en agua. Después de la transición los estímulos activos (por ejemplo, la temperatura o el pH) uno o ambos precursores se vuelven insolubles en agua, dando un contenido de agua promedio más bajo, y dando como resultado una rigidez incrementada y propiedades mecánicas mejoradas del gel resultante.
- En algunos de estos ejemplos citados anteriormente, es deseable formar hidrogeles terapéuticos en su destino final en el cuerpo. Por lo tanto son de interés los materiales implantables que se pueden inyectar en la fase líquida a un sitio objetivo, en donde éstos se puedan transformar entonces en materiales sólidos. La forma de ese implante puede corresponder con la topografía del tejido, y un implante relativamente grande se puede aplicar a través de métodos mínimamente invasivos. Frecuentemente, se puede conseguir una buena adhesión al sustrato del tejido subyacente, por ejemplo, por medio de la penetración íntima de los precursores líquidos dentro de la textura en la superficie del tejido, o por medio de la interpenetración de fase para formar una red de polímeros interpenetrante entre la red de polímeros del bio-material y los materiales extracelulares del tejido natural, que también son una red de polímeros. Uno también puede diseñar materiales adicionales para jugar un papel como agente de acoplamiento para mejorar la adhesión. Por ejemplo, uno puede diseñar un agente de acoplamiento heterobifuncional con un éster activado (tal como un derivado de éster activado de N-succinimidilo) o un grupo epóxido en un extremo, y una estructura conjugada que reaccione lentamente

5 con las aminas en el otro extremo. Ese agente reaccionaría con las proteínas en la superficie del tejido cuando se aplique a la superficie del tejido, y entonces inmovilizaría los grupos conjugados para incorporación química dentro de la red del bio-material, durante la polimerización o reticulación. Este paso de tratamiento previo introduciría mediante lo mismo, sobre la superficie del tejido, grupos químicos que pueden participar en la reticulación auto-selectiva entre los dos componentes de la solución precursora final.

10 Hay muchas maneras para formar bio-materiales que incluyan hidrogeles. Sin embargo, los materiales hechos en contacto con materiales biológicos sensibles, incluyendo células o tejido, o reservados para implantación u otro contacto con el cuerpo, se someten a restricciones especiales. En el texto que sigue se considera la situación de la formación de un hidrogel de bio-material, debido a la utilidad especial de los hidrogeles de bio-material. Los planteamientos generalmente son los mismos para materiales no de hidrogel, y se debe entender que los planteamientos descritos a continuación se pueden generalizar. El proceso de formación de la red debe proceder en condiciones relativamente suaves con respecto al sistema solvente, la temperatura y la exotermia, y el pH. Los precursores y productos (de las reacciones de gelación y de degradación de gel) deben ser sustancialmente no tóxicos, con tóxico siendo definido como
15 que induce una reacción del tejido médicamente inaceptable en un contexto médicamente relevante.

20 Los planteamientos descritos en la presente que usan reacciones por adición de conjugados con tioles, para formar bio-materiales, simplifican el proceso de la formación de gel (no se requieren cambios de luz o temperatura), y añaden grandemente a la utilidad por medio de ser auto-selectivo (en general sin reaccionar con proteínas que estén incorporadas como productos bio-farmacéuticos, o que estén presentes en las superficies de células y tejidos). Además, debido a la auto-selectividad, es posible incorporar mucho más flexiblemente péptidos dentro del bio-material mismo, por ejemplo, como sitios de disociación de proteasa (para proporcionar la degradación), sitios de adhesión celular, o sitios de fijación de heparina o de factores de crecimiento.

25 Existen numerosas aplicaciones en la medicina en donde se desea la reticulación *in situ*, pero en donde no se desean los hidrogeles. Estas pueden incluir aplicaciones en donde se desea un material de alta resistencia. Se pueden formar hidrogeles de alta resistencia, pero en general los materiales no de hidrogel pueden ser más resistentes. Estos materiales se pueden obtener ya sea mediante reticulación, usando el esquema de esta invención, en la presencia de un solvente no acuoso de baja toxicidad, tal como etilacetato, un PEG de bajo peso molecular, o a partir de reticulación
30 pura sin ningún solvente, a partir de precursores líquidos. Por ejemplo, se puede formar un material fuerte, hidrolíticamente degradable, a partir de un diacrilato de caprolactona poli(épsilon) de bajo peso molecular (que es un líquido) como un componente hidrófobo. Esos materiales pueden ser ya sea bio-materiales lineales poliméricos, o bio-materiales poliméricos reticulados. Esto también se puede conseguir mediante el uso de precursores que exhiban sensibilidad al pH, a la temperatura, o a otros estímulos que se puedan manipular. De la misma manera, los precursores
35 experimentarán una transición de solubles a insolubles después/durante la aplicación. Esto permitirá un manejo fácil, pero permite la mejora de las propiedades mecánicas mediante el uso de materiales no de hidrogel (bajo contenido de agua).

40 Es posible preparar materiales estructurales con resistencia mecánica significativa *in situ*, usando adición de conjugados con tioles. Si se usan una densidad de reticulación alta y/o un contenido de agua bajo, se pueden obtener geles o materiales con alta resistencia mecánica. Se pueden combinar precursores multifuncionales, de bajo peso molecular con solubilidad en agua limitada o ninguna solubilidad, para formar materiales reticulados fuertes. Estos precursores insolubles o parcialmente solubles se pueden combinar, si son líquidos, mediante dispersión en medio acuoso, con o sin la ayuda de emulsionantes. Este emulsionante pueden ser tensoactivos no tóxicos o mínimamente
45 tóxicos, tales como monooleato de sorbitán, o éste puede ser una proteína tal como albúmina. Las partículas inorgánicas también pueden ayudar en la dispersión en agua de esos precursores. Se pueden modificar las propiedades mecánicas de los geles estructurales obtenidos mediante este método, mediante la adición de partículas inorgánicas, aditivos hidrófilos o hidrófobos, o mediante el uso de precursores de peso molecular de múltiples modos (precursores con múltiples pesos moleculares discretos). La adición de partículas inorgánicas incrementa la rigidez del material reticulado, y puede incrementar la resistencia máxima y la resistencia a la fatiga del material. La adición de aditivos hidrófilos se puede usar para incrementar el contenido de agua, y para suavizar los materiales. Dependiendo de la composición química, la adición de aditivos hidrófobos se puede usar para reducir el contenido de agua del gel, y se puede usar para endurecer y/o fortalecer los materiales. Esto también se puede usar para mejorar la elasticidad. La densidad de reticulación se puede afectar mediante el peso molecular de los precursores originales. El incremento del
50 peso molecular puede reducir la densidad de reticulación, y usarse para modular las propiedades mecánicas del bio-material final.

II. Química de la Reticulación

60 Como se usa en la presente, el símbolo **P** se emplea para indicar la parte de una molécula que se encuentra entre dos sitios reactivos (sentido telequémico) o que se injerta con sitios reactivos (sentido injertado). Con los polímeros telequémicos, **P** se encontrará entre dos nucleófilos fuertes, tal como dos tioles, o entre dos insaturaciones conjugadas (por ejemplo, en el caso de un diacrilato de PEG o un ditiol de PEG, **P** es una cadena PEG). En el caso de una triquinona o un tritiol de PEG, **P** es un PEG ramificado de tres brazos. En el caso de un bloque copolimérico de acrilato-
65 (oligómero de ácido láctico)-PEG -(oligómero de ácido láctico)-acrilato o quinona-(oligómero de ácido láctico)-PEG-

(oligómero de ácido láctico)-quinona, **P** es el copolímero de bloque de (oligómero de ácido láctico)-PEG-(oligómero de ácido láctico). En el caso de un copolímero de injerto (por ejemplo, polilisina-injerto-(acrilato de PEG) o polilisina-injerto-(quinona de PEG), o polilisina-injerto-(tiol de PEG)), en el que la geometría del polímero es como una botella-cepillo con las puntas de las cerdas conteniendo ya sea las insaturaciones conjugadas o el nucleófilo fuerte, **P** es polilisina-injerto-(PEG). **P** también puede presentar los grupos reactivos en las cadenas laterales: todo polímero que lleve alcoholes o aminas en las cadenas laterales se acrilata fácilmente, por ejemplo, con el propósito de presentar múltiples grupos conjugados insaturados para la reacción por adición de conjugados. Los polímeros que contienen ácidos carboxílicos se pueden derivatizar para exponer, por ejemplo, grupos de quininas. **P** no necesita ser polimérico en el sentido usual de la palabra. Por ejemplo, en el caso del diacrilato o diquinona de etilenglicol, **P** es la unidad de etileno. En el caso de un péptido, por ejemplo, YCXXXXXXCY (SEQ ID NO: 1) o CXXXXXXC (SEQ ID NO: 2), en donde C es la cisteína del aminoácido y X e Y son otros aminoácidos, de tal manera que XXXXXX (SEQ ID NO:3), pueda ser una secuencia que funcione como un sustrato para una proteasa tal como colagenasa, **P** es XXXXXX. La longitud de XXXXXX o el número de X (por ejemplo, X_n) puede ser cualquier longitud o número (n=0). En el caso del ditiol de 1,2-etileno, **P** es el etileno. De esta manera **P** es la parte molecular del componente precursor que está interpuesto entre los dos o más grupos reactivos en el componente precursor. Frecuentemente esto es conveniente cuando éste es polimérico u oligomérico, pero en ningún caso es necesario; las moléculas pequeñas también son de interés y uso. Los ejemplos de pequeñas moléculas que se pueden usar incluyen, pero no están limitadas a azúcares reducidos o compuestos análogos tales como manitol, eritritol, pentaeritrol, trimetilolpropano, y glicerol, que pueden estar total o parcialmente acrilatados, o pueden reaccionar con ácido beta-mercaptopropiónico para dar tioles. Los ácidos di- o multicarboxílicos, tales como EDTA, ácido cítrico, ácido succínico, y ácido sebásico, se pueden convertir a quinonas.

Definición de la reacción tipo Michael

Se hace referencia a la reacción por adición 1,4 de un nucleófilo en un sistema insaturado de conjugados, como una reacción tipo Michael. El mecanismo de adición puede ser puramente polar, o proceder a través de un estado(s) intermedio parecido a radical; los ácidos Lewis o las especies de enlace de hidrógeno apropiadamente diseñadas pueden actuar como catalizadores. El término conjugación puede referirse tanto a la alternación de enlaces múltiples de carbono-carbono, carbono- heteroátomo, o heteroátomo-heteroátomo con enlaces individuales, o al enlace de un grupo funcional a una macromolécula, tal como un polímero sintético o una proteína. Se hace referencia a los enlaces dobles separados por una unidad de CH o CH₂, como enlaces dobles homo-conjugados.

La adición tipo Michael a grupos conjugados insaturados puede tener lugar en rendimientos buenos a cuantitativos a la temperatura ambiente o temperatura corporal, y en condiciones suaves, con una amplia diversidad de nucleófilos (Pathak, supra; Mathur y colaboradores, Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics, C36:405-430, 1996; Moghaddam y colaboradores, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 31:1589-1597, 1993; y Zhou, supra). Se han usado grupos conjugados insaturados, tales como vinilsulfonas (Pathak, supra) o acrilamidas (Mathur, supra), para enlazar el PEG o polisacáridos a proteínas, a través de reacciones tipo Michael con grupos amino o mercapto.

La innovación de la presente invención consiste en el hecho de que se proporciona rápidamente una gelación bio-compatible de precursores de bio-material para formar un bio-material, mediante el uso de una amplia variedad de compuestos conjugados insaturados que reaccionan con tioles de una manera auto-selectiva. La cinética de la formación de geles y las propiedades mecánicas y de transporte del producto se hacen a la medida de las necesidades de la aplicación. La posibilidad de incorporar material proteínico o de peptidilo se contempla principalmente con el propósito de obtener un material proteolíticamente degradable, o para procesos de reconocimiento específicos adentro de éste, pero principalmente mediante la reacción con residuos de cisteína intencionalmente incorporados; la gelación de proteína pura está fuera del alcance de la presente invención, puesto que ésta no da como resultado un bio-material. Los grupos tales como maleimidas y vinilsulfonas son útiles en estas reacciones de reticulación, pero éstos tienden a ser menos útiles que otros, debido a una velocidad de reactividad relativamente alta con las aminas, con relación a otros nucleófilos según se comparan con algunos de los sistemas conjugados descritos posteriormente. En sí, el uso de insaturaciones conjugadas que despliegan reactividad global más lenta, incluye quinonas y acrilatos.

Estructuras conjugadas insaturadas

Es posible realizar las reacciones por adición tipo Michael en una amplia variedad de compuestos conjugados insaturados. En las estructuras que se muestran posteriormente, una estructura oligomérica o polimérica se indica cómo **P**. En la presente también se describen diferentes posibilidades para la identidad específica de **P**. **P** se puede acoplar a grupos conjugados insaturados reactivos, en estructuras tales como aquellas numeradas del 1 al 20.

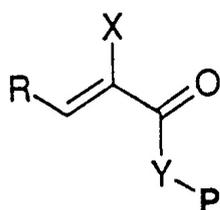
En los dibujos se pretende que **P** termine con un grupo CH₂, CH o C.

Los enlaces dobles reactivos se pueden conjugar a uno o más grupos carbonilo en una cetona lineal, estructura de éster o amida (1,2), o a dos en un sistema de anillo, como en un derivado maleico o paraquinoide (3,4,5,6,7,8,9,10). En el último caso el anillo se puede fusionar para dar una naftoquinona (6,7,10) o una 4,7-bencimidazolediona (8) (Pathak, supra), y los grupos carbonilo se pueden convertir a una oxima (9,10). El enlace doble se puede conjugar a un enlace

doble de heteroátomo - heteroátomo, tal como una sulfona (11), un sulfóxido (12), un sulfonato o una sulfonamida (13), un fosfonato o fosfonamida (14). Finalmente, el enlace doble se puede conjugar a un sistema aromático deficiente en electrones, tal como un ion de 4-vinilpiridinio (15). Se pueden usar enlaces triples en conjugación con enlaces múltiples basados en carbonilo o heteroátomo (16,17,18,19,20).

5

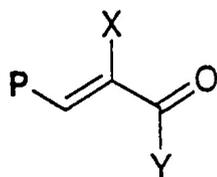
Estructuras Químicas:



1

X = H, CH₃ R = H Y = NH, O, 1,4-Ph
 CN, COOW R = H, W, Ph Y = NH, O, 1,4-Ph

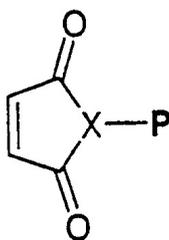
W = Cadena C1-C5 alifática lineal



2

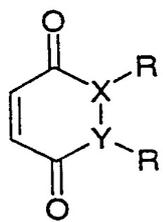
X = CN, COOW Y = OW, Ph

W = cadena C1-C5 alifática lineal



3

X = N, CH

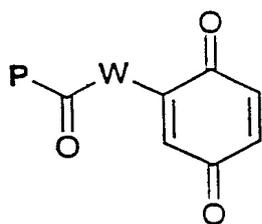


4

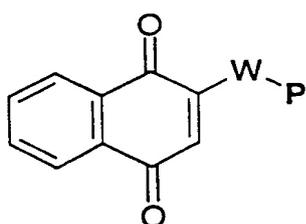
A X = CH Y = CH R = H, W-P (W= NH, O, nihil)

B X = N Y = N R = H, P

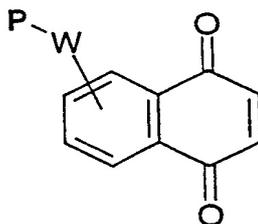
C X-Y = C=C R = W-P (W= NH, O, nihil)



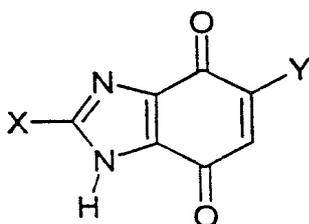
5



6

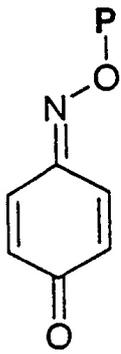


7

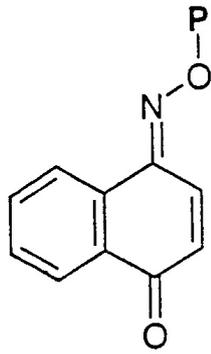


8

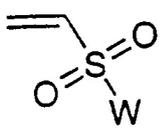
X, Y = H, P
 P, P
 P, H
 P, cadena alifática



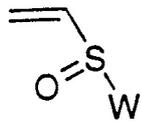
9



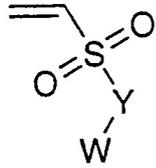
10



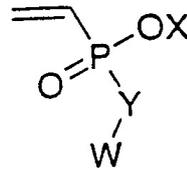
11



12

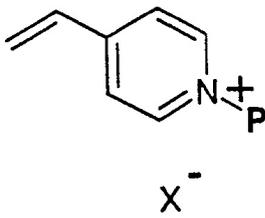


13



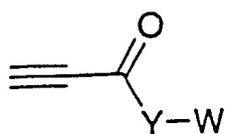
14

Y = O, NH
 X = ión de metal alcalino
 o alcalino térreo, P
 W = P, 1,4-Ph-P

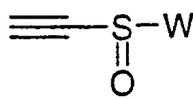


15

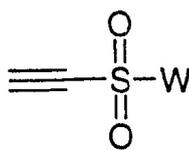
X = halógeno, sulfonato



16



17

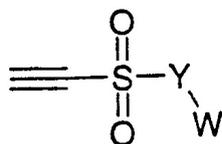


18

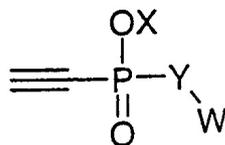
Y = O, NH

X = ión de metal alcalino
o alcalino térreo, P

W = P, 1,4-Ph-



19



20

5 Las estructuras tales como 1 y 2 se basan en la conjugación de un enlace doble de carbono-carbono, con uno o más grupos de retiro de electrones. Uno de ellos siempre es un carbonilo, incrementando la reactividad que pasa de una amida a un éster, y después a una estructura de fenona. La adición nucleófila es más fácil después de la disminución del impedimento estérico, o del incremento de la potencia de retiro de electrones en la posición alfa: $\text{CH}_3 < \text{H} < \text{COOW} < \text{CN}$.

10 La reactividad más alta que se obtiene mediante el uso de las dos últimas estructuras se puede modular por medio de variar el volumen de los sustituyentes en la posición beta, en donde tiene lugar el ataque nucleófilo; la reactividad disminuye en el orden de $\text{P} < \text{W} < \text{Ph} < \text{H}$. De manera que la posición de **P** también se puede usar para sintonizar la reactividad hacia los nucleófilos. Esta familia incluye algunos compuestos para los cuales se conoce mucho sobre su toxicología y uso en la medicina. Por ejemplo, los polímeros solubles en agua con acrilatos y metacrilatos en sus términos se polimerizan (mediante mecanismos de radicales libres) *in vivo*, en selladores de hidrogel y cementos de huesos, respectivamente. De esta manera, se han visto polímeros que contienen acrilato y metacrilato en el cuerpo antes en productos químicos, pero para usarse con un esquema de reacción química dramáticamente diferente.

20 Las estructuras 3-10 exhiben muy alta reactividad hacia los nucleófilos, debido tanto a la configuración *cis* del enlace doble, como a la presencia de dos grupos de retiro de electrones.

25 Las cetonas insaturadas reaccionan más rápido que las amidas o las imidas, debido a la electronegatividad más fuerte de estos grupos carbonilo. De manera que los derivados de ciclopentendiona reaccionan más rápido que los maleimídicos (3), y las para-quinonas reaccionan más rápido que las hidrazidas maleicas (4) y también más rápido que las ciclohexanonas, debido a la conjugación más extendida. La reactividad más elevada la muestran las naftoquinonas (7).

30 **P** se puede colocar en posiciones en donde éste no reduzca la reactividad del grupo insaturado, esto es, en la parte opuesta del anillo (3,5), en otro anillo (7,8) o enlazado a O a través de una mono-oxima de para-quinona (9,10). **P** también se puede enlazar al enlace doble reactivo (6,8), si se va a disminuir la velocidad de adición nucleófila.

35 La activación de enlaces dobles a la adición nucleófila se puede obtener también por medio del uso de grupos de retiro de electrones basados en heteroátomos. De hecho, los análogos de cetonas (11,12), ésteres y amidas (13,14) que contienen heteroátomos, proporcionan un comportamiento electrónico similar. Las estructuras 13 y 14 también se pueden usar como grupos fácilmente hidrolizables, que puedan promover una degradación rápida del gel. La reactividad hacia la adición nucleófila se incrementa con la electronegatividad del grupo, que es en el orden de $11 > 12 > 13 > 14$, y se mejora por medio del enlace con un anillo aromático. También se puede obtener una activación fuerte de los enlaces dobles, usando grupos de retiro de electrones basados en anillos aromáticos. Cualquier estructura aromática que contenga un catión parecido a piridinio (por ejemplo, derivados de quinolina, imidazol, pirazina, pirimidina, piridazina, y compuestos similares que contengan sp^2 - nitrógeno) polariza fuertemente el enlace doble, y hace posibles las adiciones tipo Michael rápidas.

45 Los enlaces triples de carbono - carbono, conjugados con grupos de retiro de electrones basados en carbono o heteroátomo, pueden reaccionar fácilmente con nucleófilos de azufre, para dar productos de la adición simple y doble. La reactividad se ve influenciada por los sustituyentes, como para los compuestos análogos que contienen doble enlace.

La formación de agregados ordenados (liposomas, micelas) o la separación de fase simple en ambiente de agua,

incrementa la concentración local de grupos insaturados, y en consecuencia la velocidad de la reacción. En este caso, lo último depende también del coeficiente de separación de los nucleófilos, que se incrementa para las moléculas con carácter lipofílico mejorado.

5 Nucleófilos

Los nucleófilos que son útiles son aquellos que son reactivos hacia grupos conjugados insaturados por medio de reacciones por adición. La reactividad del nucleófilo depende de la identidad del grupo insaturado, como se describe con mayor detalle en otro lugar en la presente, pero la identidad del grupo insaturado primero está limitada por su reacción con agua a un pH fisiológico. De esta manera, los nucleófilos útiles generalmente serán más nucleófilos que el H₂O a un pH fisiológico. Los nucleófilos preferidos serán los que se encuentran comúnmente en los sistemas biológicos, por razones de toxicología, pero unos que no se encuentren comúnmente libres en los sistemas biológicos afuera de las células. De esta manera, aunque pueden haber ejemplos en los cuales se puedan emplear aminas como nucleófilos efectivos, el nucleófilo más preferido es el tiol.

Los tioles están presentes en los sistemas biológicos afuera de las células en forma de pares, como enlaces de disulfuro. Cuando se desea el grado más elevado de auto-selectividad (por ejemplo, cuando se incorpora una proteína terapéutica, cuando la reacción de gelación se conduce en la presencia de tejido y no es deseable la modificación química de ese tejido), entonces un tiol representará el nucleófilo fuerte de elección.

Existen otras situaciones, sin embargo, cuando pudiera no ser necesario el nivel más elevado de auto-selectividad. Estas incluirían situaciones cuando no está incorporada ninguna proteína terapéutica, y cuando la reacción de gelación se conduce *in situ*, pero cuando el enlace químico al tejido es ya sea deseable o sea indeseable. En estos casos, una amina puede servir como un nucleófilo adecuado. Aquí, se pone atención particular al pH, en el sentido de que la amina desprotonada es un nucleófilo mucho más fuerte que la amina protonada. De esta manera, por ejemplo, la amina alfa en un aminoácido típico (pK tan bajo como 8.8 para la asparagina, promedio de 9.0 para todos los 20 aminoácidos comunes, excepto la prolina) tiene un pK mucho más bajo que la amina épsilon de cadena lateral de la lisina (pK de 10.80). En sí, si se pone atención particular al pK de una amina que se use como el nucleófilo fuerte, se puede obtener una auto-selectividad sustancial. Las proteínas tienen únicamente una amina alfa (en el término N). Mediante la selección de una amina con un pK bajo, y entonces la formular la solución precursora final de tal manera que el pK esté cerca de ese pK, uno puede favorecer la reacción de la insaturación proporcionada con la amina proporcionada, en lugar de otras aminas presentes en el sistema. En casos en donde no se desea ninguna auto-selectividad, uno necesita poner atención al pK de la amina usada como el nucleófilo, sin embargo, para obtener velocidades de reacción que sean aceptablemente rápidas, uno debe ajustar el pH de la solución precursora final, de tal manera que se desprotonen un número adecuado de estas aminas.

En resumen, los tioles son el nucleófilo fuerte preferido de esta invención, por razones del pH en la solución precursora, y la máxima auto-selectividad, pero existen situaciones en las que las aminas también servirán como nucleófilos fuertes útiles; la utilidad de los nucleófilos particulares depende de la situación contemplada y de la cantidad de auto-selectividad deseada.

El concepto de grupo nucleófilo es extendido en la presente, de tal manera que el término se usa algunas veces para incluir no solamente los grupos funcionales mismos (por ejemplo, tiol o amina), pero también moléculas que contienen el grupo funcional (por ejemplo, residuo de cisteína o cistilo, o residuo de lisina o lisilo).

Los grupos nucleófilos pueden estar contenidos en moléculas con gran flexibilidad en su estructura global. Por ejemplo, se puede presentar un nucleófilo difuncional en la forma de Nuc-**P**-Nuc, en donde **P** se usa en el sentido descrito en la presente, y Nuc se refiere al nucleófilo. De la misma manera, un polímero ramificado **P** se puede derivar con un número de nucleófilos para crear **P**-(Nuc)_i, en donde i=2 sería útil. Nuc no se necesita desplegar en los términos de cadena de **P**, por ejemplo, se puede contemplar una estructura de repetición: (**P**-Nuc)_i, en donde i=2 sería útil. Claramente, no todos de los **P** o de Nuc en esa estructura no necesitan ser idénticos. Solamente es necesario que un precursor nucleófilo contenga más que o igual a dos de esos grupos Nuc.

De la misma manera, se pueden formar estructuras similares de **P** y los grupos conjugados insaturados descritos en detalle anteriormente. Únicamente es necesario que un precursor conjugado insaturado contenga más que igual a dos de esos grupos conjugados insaturados.

Se debe notar y entender que no es necesario que ambos componentes precursores, por ejemplo, tanto el componente precursor nucleófilo como el componente precursor conjugado insaturado, sean de hecho poliméricos en el sentido usual de la palabra. Únicamente importa la funcionalidad. En la práctica, esto es conveniente si cuando menos un componente es polimérico en el sentido usual de la palabra, pero esto no es absolutamente necesario. Por ejemplo, resultan materiales útiles de la reacción de un triacrilato de PEG con dicisteína, y de la misma manera, resultan materiales útiles de la reacción de un tritio de PEG y un diacrilato de peso molecular bajo. Finalmente, también resultan materiales útiles para algunas aplicaciones, por la reacción de una dicisteína y un diacrilato de peso molecular bajo.

En la práctica, es conveniente y útil que uno o más de los componentes precursores sea polimérico en el sentido usual de la palabra. En estos casos, **P** pueden ser polímeros hidrófilos sintéticos, líquidos poliméricos hidrófobos sintéticos, polímeros hidrófobos sintéticos que sean solubles en solventes de toxicidad aceptable o influencia biológica para la aplicación contemplada, proteínas o péptidos bio-sintéticos, proteínas naturalmente ocurrientes o proteínas procesadas naturalmente ocurrientes, o polisacáridos.

Polímeros hidrófilos

En las modalidades preferidas, el polímero sintético **P** puede ser poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), alcohol poli(etilen-co-vinílico), ácido poli(acrílico), ácido poli(etilen-co-acrílico), poli(etil-oxazolona), poli(vinilpirrolidona), poli(etilen-co-vinil-pirrolidona), ácido poli(maleico), ácido poli(etilen-co-maleico), poli(acrilamida), o copolímeros de bloque de óxido de poli(etileno)-óxido de co-poli(propileno). Esta no es una lista detallada puesto que también se pueden usar otros polímeros hidrófilos.

P también pueden ser copolímeros, copolímeros de bloque, copolímeros de injerto, o copolímeros aleatorios. Los bloques, que se polimerizan en los extremos de los polímeros hidrófilos, pueden estar compuestos de, por ejemplo, ácido láctico, ácido glicólico, épsilon - caprolactona, oligómeros de ácido lacti-co-glicólico, carbonato de trimetileno, anhídridos, y aminoácidos, por ejemplo, para conferir degradabilidad por medios hidrolíticos o enzimáticos. Esta lista no es detallada; también se pueden usar otros oligómeros para los copolímeros de bloque.

Los copolímeros aleatorios se pueden basar en alcohol vinílico, tal como alcohol poli(N-vinilpirrolidon-co-vinílico) o alcohol poli(etilen-co-vinílico), con diferentes composiciones, se pueden derivar con grupos conjugados insaturados, tales como acrilatos, benzoquinonas, naftoquinonas y otros. Los copolímeros de alcohol vinílico se pueden funcionalizar con grupos $(CH_2)_nCOOH$, mediante la reacción con ácidos α -bromo-carboxílicos. Los polímeros resultantes o copolímeros de ácido acrílico o metacrílico se pueden usar para la unión de los grupos quinona. La composición de comonómeros y el grado de funcionalización no tienen influencia dramática en las velocidades de reacción, a menos que éstos determinen la solubilidad o la transición de fase. Por otra parte, éstos determinan las propiedades mecánicas finales.

Se debe notar que un componente **P** hasta puede ser un sólido, tal como una partícula coloidal ya sea con nucleófilos o sitios de insaturación conjugada sobre ésta.

Proteínas y proteínas bio-sintéticas

P puede ser una proteína. La proteína puede ser una proteína naturalmente ocurrente o recombinante. En términos generales, las proteínas recombinantes son material de aminoácidos de cualquier longitud, generado a través de tecnología de ADN recombinante. Los ejemplos de los componentes que éstos pueden tener incluyen secuencias de péptidos que codifican los sitios de degradación para las proteasas, secuencias de péptidos para otras señales biológicas y secuencias no bio-interactivas.

También puede ser **P** cualquier proteína naturalmente ocurrente. Más específicamente, una proteína naturalmente ocurrente está compuesta de muchos **Ps** que están separados por nucleófilos. Por ejemplo, albúmina de suero, una proteína de 584 aminoácidos, contiene 5.7 por ciento de cisteína, 9.9 por ciento de lisina, y 3.1 por ciento de tirosina. Las secuencias de aminoácidos que ocurren entre, por ejemplo, cisteína, tirosina y lisina, conforman distintos **Ps**. Aunque la albúmina en su estado natural puede ser menos que útil para los propósitos de reticulación mediante reacciones por adición de conjugados entre insaturaciones conjugadas y tioles en la proteína, la albúmina se puede procesar rápidamente mediante reducción, con el propósito de formar un poli(aminoácido) con algunos o todos sus residuos de cisteína libres, o ésta se puede derivar químicamente para introducir múltiples grupos tiol.

Péptidos

En algunos casos, **P** puede ser un péptido o un polipéptido, en donde el nucleófilo es la cisteína de aminoácido, que da como resultado los péptidos de estructuras similares a $H_2N-CXXXXXCXXXXC-COOH$ (SEQ ID NO: 4) o $H_2N-CXXXXC-COOH$ (SEQ ID NO: 5), en donde es la representación de una letra de la cisteína, y X representa cualquier aminoácido excepto cisteína, en una modalidad, o Acetil-NH-YXXXXYXXXXY-COOH (SEQ ID NO: 6), en donde Y es la representación de una letra de la tirosina, y X representa cualquier aminoácido excepto cisteína o tirosina, en otra modalidad. La longitud de XXXXX (SEQ ID NO: 7) o el número de X (por ejemplo, X_n) puede ser de cualquier longitud o número ($n=0$). Es particularmente útil cuando las secuencias en los dominios que se muestran como XXXXX anteriormente, son sustratos para las enzimas que están envueltas en la migración de células (por ejemplo, como sustratos para enzimas tales como colagenasa, plasmina, o elastasa), aunque no se deben limitar los dominios a éstos. En los ejemplos se describe una de esas secuencias particularmente útil, como un sustrato para la enzima plasmina. Se puede aprender una diversidad de esos péptidos por un estudio de la literatura de estas enzimas. Por ejemplo, ese estudio muestra sitios de sustrato para la importante plasmina de proteasa (Tabla 1; SEQ ID NOS: 8-24):

Tabla 1. Sitios de Sustrato de Plasmina que se encontraron en el Fibrin(ógeno) (Fg)**

Sitios de Arginilo							
P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Cadena y sitio Fg	Referencia
G	P	R+	V*	V*	E-	α 19	3
N	N	R+	D-	N	T	α 104	2.4
Y	N	R+	V*	S	E-	α 110	2
Q	M*	R+	M*	E-	L*	α 239	1
G	F*	R+	H+	R+	H+	α 491	5
G	Y	R+	A*	R+	P	β 42	2.3
Sitios de Lisilo							
Y	Q	K+	N	N	K+	α 78	3
L*	I*	K+	M*	K÷	P	α 206	1.2
N	F*	K+	S	Q	L*	α 219	1
E-	W	K+	A*	L*	T	α 230	1
S	Y	K+	M*	A*	D	α 583	5
T	Q	K+	K÷	V*	E-	β 53	3
R+	Q	K+	Q	V*	K+	β 130	2
Q	V*	K+	D-	N	E-	β 133	4
L*	I*	K+	A*	I*	Q	γ 62	4
T	L*	K+	S	R+	K+	γ 85	2.3
S	R+	K+	M*	L*	E-	γ 88	2

Ref. 1: Takagi T. y R.F. Doolittle, Biochemistry 14:5149, 1975; Ref. 2: Hantgan R.R., y colaboradores, Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Tercera Edición. Editado por R.W. Colman y colaboradores, J.B. Lippincott Company; Philadelphia, 1994; Ref. 3: Takagi T. y R.F. Doolittle, supra; Ref. 4: Nomura S., y colaboradores, Electrophoresis 14:1318-1321, 1993; Ref. 5: Ständer L, y colaboradores, Biochemical and Biophysical Research Communications 215:896-902 (1995).

* Indica un aminoácido hidrófobo: +/- indica una cadena lateral cargada, ya sea catiónica (+) o aniónica (-).

** Código de aminoácido de una sola letra: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina.

5 Dado que la plasmina es una enzima importante en la migración de células y remodelación de tejidos/coágulos, estos sustratos o partes de estos sustratos representan secuencias útiles adentro de los sitios indicados anteriormente como XXXXX en P.

10 De la misma manera, la colagenasa es una enzima importante en la migración de células y la remodelación de tejidos. Un estudio de la literatura sobre la colagenasa indica también una diversidad de sitios de sustrato, que representan identidades útiles para XXXXX en P (Tabla 2; SEQ ID NOS: 25-31):

Tabla 2. Sitios de Sustrato de Colagenasa que se encontraron en el Colágeno

P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Tipo y sitio de Colágeno	Ref.
P	Q	G	I*	A*	G	Becerro y pollo 1 (I): cartílago humano 1 (II)	6
P	Q	G	L*	L*	G	Becerro 2 (I)	6
P	Q	G	I*	L*	G	Pollo 2 (I)	6
P	Q	G	L*	A*	G	Pollo 2 (I): piel humana 1 (III)	6
P	L*	G	I*	A*	G	Hígado humano 1 (III)	6
P	L*	G	L*	W	A*	Humano	7
P	L*	G	L*	A*	G	Humano	8

Ref. 6: Netzel-Arnett S., y colaboradores, The Journal of Biological Chemistry 266:6747-6755, 1991; Ref. 7: Upadhye S. y V.S. Ananthanarayanan, Biochemical and Biophysical Research Communications 215:474-482, 1995; Ref. 8: Liko Z., y colaboradores, Biochem Biophys Res Commun 227:351-35, 1996.

15 El uso de los sitios de degradación de enzimas adentro de P, ya sea en el componente precursor de nucleófilo (más fácilmente, puesto que se puede usar la cisteína en la secuencia para proporcionar un tiol como un nucleófilo), o como el componente precursor conjugado insaturado, es que la velocidad de resorción o remodelación del bio-material puede estar ligada a la velocidad y el progreso de la curación, por ejemplo, como se indica por la infiltración celular.

20 Es particularmente poderoso notar que la velocidad de la resorción del bio-material se puede modular por medio de ajustes a la secuencia de oligopéptidos, con el propósito de alterar el K_m y el k_{cat} del sitio de sustrato. Por ejemplo, un estudio de la literatura sobre la enzimología de los sitios de sustrato de la colagenasa muestra que es posible ajustar la

velocidad de degradación de los sustratos por medio del diseño de la secuencia de los sustratos (Tabla 3: SEQ ID NOS: 32-38):

Tabla 3. Diseño de Secuencias de Péptidos Sensibles a la Colagenasa (Matriz metaloproteínasa I)

No.	Secuencia	Kcat/Km relativos a aquellos de PQGIAG
1	GPQGIAGQ	100% (normal)
2	GPVGIAGQ	30% (lento)
3	GPQGVAGQ	9% (más lento)
4	GPQGRAGQ	<5% (muy lento)
5	GPQGIASQ	130% (rápido)
6	GPQGIFGQ	>300% (más rápido)
7	GPQGIWGQ	>700% (muy rápido)

Netzel-Arnett S., y colaboradores, The Journal of Biological Chemistry 266:6747-6755, 1991.

Aceleradores

Se hace referencia a los nucleófilos que reaccionan de manera deficiente como teniendo una vida media de pseudo primer orden de más de aproximadamente 15 minutos (con el grupo conjugado insaturado presente en exceso; las reacciones más lentas pueden ser útiles en algunas circunstancias médicas), a un pH generalmente definido como un pH de más de 5 y menos de 9, y a una temperatura mayor que 25°C y menor que 40°C. Se hace referencia a los iniciadores de radicales como moléculas orgánicas o solubles en agua que experimentan la escisión espontánea homolítica, térmica o fotoquímicamente iniciada, de los enlaces de carbono - heteroátomo o heteroátomo - heteroátomo, para producir radicales basados en carbono o heteroátomo. Se debe entender que el uso de esos iniciadores de radicales como aceleradores, aunque no se prefiere, es superior a la polimerización, en el sentido de que la concentración de radicales libres que se emplea puede ser mucho más baja. La velocidad de adición de nucleófilos que reaccionan deficientemente a los grupos conjugados insaturados se puede mejorar mediante la presencia de sustancias aceleradoras; estas pueden ser iniciadores de radicales, fotosensibilizadores; (solos o en combinación con iniciadores de radicales; Pathak, supra), ácidos Lewis de bajo peso molecular (Pathak, supra), catalizadores de estado sólido caracterizados por la acidez Lewis, o por la presencia de iones de amonio cuaternario, tales como una resina de Amberlyst (Pathak, supra), o receptores de enlace de hidrógeno, basados en urea N,N-disustituida o estructuras peptídicas (Pathak, supra). En el último caso, el mecanismo de aceleración se basa en la estabilización mediante el enlace de hidrógeno del estado de transición parecido a enolato, después del ataque del nucleófilo en la olefina conjugada; con este propósito se pueden usar anti-cuerpos hechos a la medida (Pathak, supra).

En un experimento típico se mezcla rápidamente una solución concentrada (típicamente mayor que o igual al 10 por ciento en peso/peso, pero simplemente a una concentración suficientemente alta para conseguir el comportamiento deseado) de un derivado de P que contiene un número de grupos conjugados insaturados mayor que uno por residuo de P, con una solución concentrada (>10 por ciento, pero simplemente a una concentración suficientemente alta para conseguir el comportamiento deseado) de un compuesto que contiene un tiol o amino adecuado (especialmente tioles, en aplicaciones en donde pudiera no requerirse el grado más alto de auto-selectividad), con un número de especies nucleófilas mayor que dos. Se puede introducir una especie aceleradora en cantidades catalíticas (<1-2 por ciento en peso/peso) durante la etapa de mezclado. Se pueden usar temperaturas más elevadas (hasta de 60 C) durante un tiempo más corto, después de mezclar para activar la reacción de reticulación. Para situaciones cuando se va a inyectar el material dentro del cuerpo, y después se va a permitir que reaccione *in situ* para formar el bio-material final, pudieran ser aceptables temperaturas de inyección de hasta aproximadamente 50°C.

III. Formación de la red de polímeros

Funcionalidad

Utilizando la terminología de la ciencia de polímeros, los polímeros se pueden hacer mediante la reacción de monómeros con una funcionalidad de 2. Las redes reticuladas de polímeros se pueden hacer si algunos o todos los monómeros tienen una funcionalidad mayor que 2. Las moléculas se describen en la presente como teniendo una funcionalidad mayor que o igual a 2 (monómeros y macrómeros), las cuales se pueden hacer reaccionar juntas para formar una red reticulada, en donde la funcionalidad se define en términos de reacciones por adición. Como se usa en la presente, polimerización se refiere a la reacción de monómeros o macrómeros, algunos o todos de los cuales tienen una funcionalidad mayor que 2. El término monómeros en la presente no está limitado a moléculas pequeñas, sino que también se puede referir a polímeros y bio-polímeros.

Los monómeros descritos son de dos clases, que cuando se hacen reaccionar juntas forman un bio-material lineal o reticulado. Se requiere que ambas clases de monómeros se mezclen juntas para que ocurra la reticulación (inmediatamente a continuación se describen diferentes planteamientos para mezclado). Una clase de monómero contiene 2 o más grupos conjugados insaturados (por lo tanto, una funcionalidad de 2 o más), de preferencia

conjugados. La otra clase de monómero contiene 2 o más nucleófilos (por lo tanto, una funcionalidad de 2 o más), de preferencia nucleófilos que son nucleófilos más fuertes que otros presentes como otros componentes del sistema, por ejemplo, tioles cuando se comparan con aminas que pueden estar presentes como componentes deseablemente no reactivos del sistema.

5 Cuando se mezclan juntos monómeros precursores solubles en agua (a los que se hace referencia como la solución precursora final), se forman geles o redes lineales o ramificados, y esas reacciones pueden proceder en agua a concentraciones de sal y pH fisiológicos o casi fisiológicos. No es necesario que los monómeros sean enteramente solubles en agua, y de hecho algunas veces es benéfico que éstos no sean solubles en agua. En esos casos, pudieran no obtenerse geles como el material final, sino más bien materiales que se hinchan menos con agua, más hidrófobos. Estos pueden ser particularmente útiles en la aplicación de fármacos hidrófobos, y en la formación de materiales con resistencia estructural sustancial. Únicamente es necesario que los dos componentes sean ya sea solubles uno en el otro, o cuando menos finamente dispersibles uno en el otro, probablemente en la presencia de un agente emulsionante. De esta manera, los dos componentes pueden llegar a acercarse lo suficiente uno al otro para reaccionar, para formar el material lineal o reticulado.

También es posible trabajar con soluciones de monómeros formados en una solución diferente al agua. Por ejemplo, se conoce el uso de N-metilpirrolidona (NMP) como un solvente en sistemas de bio-material inyectables, y en sí es posible, cuando uno desea trabajar con los componentes precursores en solución, pero con componentes precursores que no sean libremente solubles en agua, para emplear ciertos solventes orgánicos que sean aceptables para usarse con el material biológico sensible bajo consideración.

25 Cuando se está incorporando un fármaco en el laboratorio o en una línea de fabricación, entonces existe gran flexibilidad en la selección de este solvente orgánico, puesto que cuando menos se removerá la mayoría de éste antes de que se proporcione el implante al sujeto. Cuando se está formando un material en la piel, entonces también existe mucha de la flexibilidad, debido a la baja toxicidad a la piel de muchos solventes orgánicos, incluyendo NMP, acetona, etanol, isopropanol, y acetato de etilo. Cuando se está formando un material en el cuerpo, entonces la lista de solventes aceptables es considerablemente más pequeña, y está dominada por las preocupaciones de toxicidad. En esos casos, la NMP es un solvente orgánico particularmente favorable. La toxicidad del sistema de solventes también se puede modular mediante el empleo de un sistema de solventes mezclados, que comprenda el solvente orgánico y agua, para reducir la concentración global de solvente orgánico, pero que todavía proporcione buena solubilidad o dispersabilidad en el sistema de solventes mezclados.

35 El mezclado para formar la solución precursora final puede ocurrir mediante muchos medios. Más directamente, una solución contiene el componente precursor nucleófilo, y una solución contiene el componente precursor conjugado insaturado. Estos dos componentes se formulan en solvente y sistemas reguladores del pH, de tal manera que el pH y las concentraciones obtenidas después del mezclado sean apropiados para la reacción química que procederá. Ese mezclado pudiera ocurrir en un mezclador estático a la función de dos jeringas, por ejemplo.

40 Se pueden visualizar otros planteamientos de mezclado. Por ejemplo, el mezclado puede ocurrir entre partículas finas de cada una de las dos soluciones precursoras en un rocío de aire. Una solución se puede preparar a partir de ambos componentes precursores, pero a un pH, por ejemplo, tal que la reacción no proceda, o proceda únicamente de manera lenta. Después de la colocación de la solución precursora mezclada previamente, se puede ajustar el pH (por ejemplo, mediante el cambio de temperatura, o mezclando con ácido o base, o mediante una reacción química para crear un ácido o base, o la difusión de un ácido o base), para dar como resultado una condición final en la solución precursora final, que sea apropiada para que proceda la reacción química. Otro planteamiento puede ser preparar la solución precursora final a una temperatura tal que la reacción no proceda o proceda únicamente de manera muy lenta, ya sea relacionada con la energía de activación de la reacción, o con un regulador del pH con características sensibles a la temperatura, o ambos. Después del calentamiento o enfriamiento (más útilmente el calentamiento) a la temperatura de aplicación final (por ejemplo, a la temperatura corporal después de la inyección), las condiciones en la solución precursora final serán apropiadas para que proceda la reacción química.

Aplicaciones médicas

55 Puesto que los bio-materiales son útiles como implantes o dispositivos médicos, o para la aplicación de fármacos en humanos, el sistema de moléculas que se use en la solución precursora debe satisfacer ciertos criterios. Estos incluyen:

60 1. La velocidad de la reacción tipo Michael debe ocurrir durante un período de tiempo clínicamente relevante, a una temperatura y pH clínicamente relevantes. Generalmente, es deseable la gelación durante un período de menos de aproximadamente 15 minutos, a un pH generalmente de más de 7 y de menos de 9, y a una temperatura mayor de 25 y menor de 40°C.

65 2. La reacción debe ser suficientemente auto-selectiva, con consideraciones de auto-selectividad que incluyan las siguientes. Para la formación de geles en la presencia de fármacos que contengan aminas, o en donde es indeseable la reacción con componentes celulares y tejidos, la insaturación conjugada debe reaccionar muy lentamente con las

5 aminas al pH de aplicación de la solución precursora final. De preferencia, se desea una velocidad de reactividad de la insaturación conjugada para el nucleófilo de reactividad intencional a la amina, en este caso el nucleófilo de reactividad no intencional o indeseable, en exceso de diez y más, de preferencia aún más alta. Típicamente, el planteamiento de la adición tipo Michael entre insaturaciones conjugadas y tioles no será útil para fármacos que contengan ellos mismos insaturaciones de conjugados o tioles. Las excepciones incluyen casos cuando la reactividad del grupo sobre el fármaco es considerablemente menor que la reactividad sobre el grupo correspondiente en el precursor del bio-material, y casos cuando esas reacciones no son dañinas, por ejemplo, cuando el injerto a la red del bio-material no es dañina.

10 3. Los reactivos deberán ser estables en el agua, cuando las soluciones precursoras se preparen en agua. Se define estable como haciendo reacción lentamente, definiéndose lentamente como suficientemente lento como para permitir la reacción entre los dos componentes para proceder y todavía dar como resultado la formación del bio-material deseado.

15 4. La reacción de adición en la solución precursora final no deberá ser exotérmica hasta el punto de provocar daño al tejido, rompimiento del fármaco u otros resultados dañinos al material biológico bajo consideración. La temperatura de la solución gelante generalmente no se deberá elevar por arriba de los 60°C durante la gelación, y de preferencia son deseables temperaturas de reacción máximas aún más frías.

20 5. Los componentes de la solución precursora no deberán ser tóxicos a concentraciones que disuelven la solución precursora final a medida que se aplica, definiéndose la palabra tóxico como lo que induce una reacción médicamente inaceptable del tejido en un contexto médicamente relevante.

Los criterios que se definen anteriormente en esta sección limitan la identidad de las moléculas que pudieran ser útiles en la solución precursora, por medio de limitar la identidad del grupo químico que se usa para la reticulación.

25 **Bio-funcionalidad adicional**

Un fuerte beneficio del uso de las reacciones de adición que se describen en la presente, es que se pueden incorporar otros grupos bio-funcionales bio-activos dentro del bio-material, por ejemplo, para proporcionar sitios para la fijación de receptores promotores de la adhesión sobre la superficie de la célula o sitios para la fijación del factor del crecimiento.

30 *Péptidos de adhesión*

35 Se ha identificado una variedad de péptidos promotores de la adhesión como si fueran los dominios activos de las proteínas promotoras de la adhesión tal como la fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno, el factor de von Willebrand, osteonectina, y así por el estilo. Estos péptidos se pueden incorporar fácilmente dentro del bio-material, cuando se diseñan con un nucleófilo fuerte en la cadena de péptidos, tal como la cisteína. En los ejemplos se demuestra este ejemplo. A continuación se muestra una lista parcial de los péptidos que serían de interés (Tabla 4: SEQ ID NOS:39-49):

40 **Tabla 4: Secuencias del Dominio de Fijación Celular de las Proteínas de Matriz Extracelular**

Proteína	Secuencia	Papel
Fibronectina	RGDS	Adhesión de la mayoría de las células, por medio de $\alpha 1$
	LDV	Adhesión
	REDV	Adhesión
Vitronectina	RGDV	Adhesión de la mayoría de las células, por medio de $\alpha v 1$
Laminina A	LRGDN	Adhesión
	IKVAV	Extensión de neurita
Laminina B1	YIGSR	Adhesión de muchas células, por medio del receptor de laminina 67 kD
	PDSGR	Adhesión
Laminina B2	RNIAEIIKDA	Extensión de neurita
Colágeno I	RGDT	Adhesión de la mayoría de las células
	DGEA	Adhesión de plaquetas, otras células
Trombospondina	RGD	Adhesión de la mayoría de las células
	VTXG	Adhesión de plaquetas
Después de Yamada, Y., y Kleinman, H.K., Curr. Opin. Cell Biol 4:S19,1992.		

45 Estos péptidos son potencialmente útiles para el control de una diversidad de reacciones celulares, tal como la unión de células, la migración y el crecimiento excesivo sobre un superficie del material (especialmente cuando el material no es degradable o se degrada lentamente), la migración celular a través de un material (esencialmente cuando el material es más fácilmente degradable mediante la incorporación de los sustratos de proteasa dentro de uno de los dos componentes precursores), y la inducción de fenotipos celulares particulares (por ejemplo, el estímulo a un macrófago para liberar los factores de crecimiento benéficos, pero no para formar las células gigantes de un cuerpo extraño). Los

5 péptidos que se muestran en la Tabla 5 (SEQ ID NOS: 50-57) se fijan a los receptores superficiales de la célula que son glico-proteínas. Existen otras de estas secuencias de péptidos que se fijan a los proteoglicanos que contienen sulfato de heparina y sulfato de condroitina de la superficie de la célula, que se llaman péptidos fijadores de heparina familiar. Estos también se pueden incorporar para conferir adhesión celular por medio de la fijación a estos componentes de la superficie de la célula.

Tabla 5: Secuencias del Dominio de Fijación del Proteoglicano de las Proteínas de Matriz Extra-celular

Proteína	Secuencia
<u>x</u> BB <u>x</u> B <u>x</u>	Secuencia de consenso
PRR <u>AR</u> V	Fibronectina
YE <u>K</u> PGSPPRE <u>V</u> VP <u>R</u> PRPGV	Fibronectina
RPSLAKKQRF <u>R</u> HRNRKGY <u>R</u> SQR <u>G</u> HSRGR	Vitronectina
RIQNLLK <u>I</u> TNLR <u>I</u> KFVK	Laminina
K(<u>β</u>)FAKLAARLYRKA	Anti-trombina III
KHKGRD <u>V</u> ILK <u>K</u> D <u>V</u> R	Molécula de adhesión de la célula neuronal
YKK <u>I</u> KKL	Factor 4 de la plaqueta

Las referencias para las primeras cinco entradas se dan en Massia, S.P., y Hubbell, J.A., J. Biol. Chem. 267:10133-10141, 1992; la secuencia de la anti-trombina III de Tyler-Cross, R. y colaboradores, Protein Sci. 3:620-627, 1994; la secuencia de la molécula de adhesión de la célula neuronal de Kallapur, S.G., y Akeson, R.A., J. Neurosci. Res. 33:538-548, 1992; secuencia del factor 4 de la plaqueta de Zucker, M.B., I.R., Proc. Soc. Biol. Med. 198, 693-702, 1991. "x" indica un aminoácido hidrófobo. Los aminoácidos básicos se muestran subrayados.

10 Se deberá notar que el método práctico para la incorporación del péptido de adhesión mediante el método de la presente invención es mucho más sencillo que el estado de la técnica (Pathak, *supra*). Mediante ese método, como se
 15 usa en la técnica anterior (tomando el ejemplo de la formación de un Péptido-PEG-Acrilato), se debe sintetizar un PEG heterobifuncional, con un éster activado en un extremo y un acrilato en el otro extremo. Esto se deberá inyectar en el péptido, y purificarse. Este agente es útil entonces ya sea para la incorporación mediante el método de esta invención o
 20 mediante la polimerización de los grupos extremos de acrilato, por ejemplo, en un diacrilato de PEG como lo enseñan Hubbell y colaboradores. En contraste, el presente método de incorporación es mucho más sencillo. El nucleófilo (por ejemplo, cisteína con un tiol libre) que contiene el péptido, simplemente se mezcla con el diacrilato de PEG (o la estructura no saturada del conjugado de PEG multi-funcional), se permite que haga reacción durante un período corto de tiempo, y después se agrega el resto de un multi-nucleófilo diferente o se foto-polimeriza el sistema. No existe una
 25 síntesis de un agente hetero-bifuncional, y no hay purificación después del acoplamiento. Esto es posible debido a la auto-selectividad del sistema.

Péptidos de Fijación del Factor de Crecimiento

25 Un segundo tipo de bio-funcionalidad que es útil en los bio-materiales, son las estructuras que fijan los factores de crecimiento. Estas se pueden usar en la administración y liberación controlada de los factores de crecimiento. Se puede encontrar un ejemplo excelente para los factores de crecimiento fijadores de heparina, los cuales incluyen FGFa, FGFb, VEGF, TGFβ, y BMP. Es correcto incorporar los péptidos que fijan la heparina (como se describe anteriormente, y más adelante). Se puede agregar la heparina a esta mezcla, junto con el factor de crecimiento. Debido a la auto-selectividad
 30 del sistema, no se esperaría que ocurriera la reacción química con la heparina y el factor de crecimiento. De este modo, si se mezclara un péptido fijador de heparina que contiene un solo tiol libre en un residuo de cisteína con la heparina y un factor de crecimiento fijador de heparina, y si se mezclara estos componentes con, por ejemplo, un triacrilato de PEG, y si esto se mezclara con un péptido de sustrato de proteasa con dos tioles mediante la incorporación de dos
 35 residuos de cisteína (cada uno en ambos lados del dominio del sustrato), el resultado sería el siguiente bio-material biomimético: el bio-material sería biodegradable mediante las proteasas asociadas con la célula, y el factor de crecimiento estaría fijo dentro del bio-material mediante la fijación no covalente a la heparina, la cual a su vez está fija de manera no covalente al péptido fijador de heparina, el cual, a su vez, se fija de manera covalente al bio-material de hidrogel. De manera alternativa, uno podría funcionalizar la heparina directamente de manera que contenga un solo nucleófilo fuerte y que se fije químicamente de manera directa dentro de la red del polímero. Otra manera relacionada para secuestrar
 40 los factores de crecimiento fijadores de heparina sería más directa mediante el uso de los mímicos incorporados de manera covalente (por ejemplo, péptidos con cadenas laterales cargadas negativamente) que fijan directamente los factores de crecimiento.

45 Ahora siguen ejemplos particulares que describen la preparación de las composiciones de la invención, y los métodos de la invención. Estos ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar la invención, y no se deberán considerar como limitantes.

Ejemplo 1: Preparación de Reactivos Básicos**Acrilación del diol de poli(etilenglicol)**

5 Se agregó polietilenglicol, peso mol. 8000 (50 gramos, 6.24 mmol, 12.5 mmol grupos hidroxilo, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos) a tolueno (500 mls) y se secó mediante destilación azeotrópica. Se enfrió esta mezcla a 0°C y se agregaron 100 mls de diclorometano anhídrico (Aldrich). Se agregó trietilamina (2.61 mls, 18.75 mmol, 1.5 eq. Basado en grupos hidroxilo, Aldrich), seguido por la adición por goteo de cloruro de acrililo (2.03 mls, 18.75 mmol, 1.5 eq., Aldrich). Se mantuvo la reacción bajo Ar durante toda la noche en la oscuridad. Se filtró el producto y después se recuperó mediante precipitación en hexano con agitación. Se volvió a disolver el producto en 75 mls de diclorometano y se precipitó nuevamente en hexano con agitación. Se secó el producto durante toda la noche bajo vacío. El producto se disolvió en 500 mls de agua con 25 gramos de NaCl, y se ajustó el pH a un pH 6. Se extrajo la solución con diclorometano (Aldrich) 3 veces (no se deberá agitar vigorosamente la primera extracción con diclorometano para evitar la formación de una emulsión). Las fracciones de diclorometano se combinaron y se agregaron al hexano de agitación. Se recuperó el producto mediante filtración y se secó bajo vacío durante toda la noche. Mediante 1H-NMR, se acrilata el 80 por ciento de los alcoholes sobre el polietilenglicol (se hace referencia al producto como diacrilato de polietilenglicol).

Acrilación del tiol de poli(etilenglicol)

20 El triacrilato de PEG (PEG-3A) es un PEG armado triple con núcleo de glicerol, Las anotaciones del peso molecular (PEG-2500-3A PEG-3500-3A) se refieren al peso molecular promedio total y no al peso molecular de un solo brazo. La acrilación se realizó usando exactamente las mismas proporciones molares de reactivos, como se describe para el diol de PEG.

25 Crotonilación y dimetilacrilación del diol de poli (etilenglicol)

Se sintetizaron de manera simultánea PEG-8000 (PEG-8000-2C) de crotonoilo (crotonilo, $-\text{OOC}-\text{CH}=\text{CHCH}_3$) y PEG-8000 (PEG-8000-2DMA) de dimetacrililoilo (dimetilacrililoilo, $-\text{OOC}-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) en reacciones lado a lado. Se disolvieron 27 gramos de PEG-8000 (3.375 mmol, 6.75 mmol grupos hidroxilo; Aldrich) en benceno y se destilaron de manera azeotrópica hasta que el destilado apareció transparente. Se permitió que la solución de PEG-benceno se enfriara a la temperatura ambiente. Después, se transfirieron 100 mls de la solución de manera anhídrida a un matraz de separación de fondo redondo. Se agregó trietilamina (1.1 mls a la muestra de 100 mls y 1.7 mls a la muestra más grande (150 mls), 3 equivalentes que se basan en los grupos de hidroxilo; Aldrich) a cada matraz. Se agregó por goteo crotonoilo-Cl (1.2 mls, 3 equivalentes que se basan en grupos hidroxilo; Fluka) a la muestra de 150 mls. Se agregó por goteo el dimetacrililoilo-Cl (0.9 mls, 3 equivalentes que se basan en grupos hidroxilo; Fluka) a la muestra de 100 mls. Se corrieron las reacciones 20 horas en la oscuridad. Se filtraron las soluciones a través de papel y se precipitaron en hexano. Se secaron al vacío los dos precipitados. Se determinaron los grados de modificación mediante 1H NMR para que fueran el 85 por ciento para el PEG-8000-2C y 89 por ciento para el PEG-8000-2DMA (por grado de esterificación)

40 Preparación de PEG de bis(benzoquinonas)*PASO A) Preparación de PEG de bis-carboxilo*

45 Se disolvieron 17 gramos (5 mmol) de 3400 PEG en 500 mls de tolueno y se secaron mediante destilación azeotrópica; se agregaron 15 mls 1M de solución de THF de óxido term-but de potasio (15 mmol) y se refleja la mezcla de reacción durante 10 minutos, después se enfrió a la temperatura ambiente, después se agregaron 5.4 mls (50 mmol) de 2-bromoacetato de etilo; se agitó la solución durante 24 horas a 40°C, después se filtró para remover el KBr, se concentró en el evaporador giratorio y se precipitó en éter de dietilo frío. Después se disolvió el sólido en 250 mls de 0.2 N NaOH (el pH se mantuvo en 12 mediante adición por goteo de 4 N NaOH); se agitó la solución durante 12 horas, y después se disminuyó el pH a 4 mediante adición por goteo de HCl concentrado, se extrajo con diclorometano; se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se precipitó en éter de dietilo frío. Se determinó el grado de modificación mediante 1H NMR.

55 PASO B) Preparación de PEG de bis(2,5-dimetoxianilida de carboxilo)

Se disolvieron 10 gramos (2.8 mmol, 5.7 meq) de PEG de 2400 bis-carboxilo en 200 mls de THF junto con 2.0 gramos (6 mmol) de 2,5-dimetoxianilina (recristalizada tres veces a partir de hexano); después se agregaron 0.73 gramos (5.8 mmol) de carbodiimida de diisopropilo y se agitó la solución durante 24 horas a la temperatura ambiente. Se filtró la urea de diisopropilo precipitado, se evaporó el THF en el evaporador giratorio; después se volvió a disolver el polímero en tolueno, se filtró la solución y después se precipitó en éter de dietilo frío. Se repitió el procedimiento dos veces. Se determinó el grado de modificación mediante 1H-NMR.

PASO C) Preparación de PEG de bis(2,5-hidroxianilida de carbonilo)

65 Se disolvieron 5 gramos (1.4 mmol, 5.2 meq) de PEG de 3400 bis (2,5-dimetoxianilida de carboxilo) en 50 mls de

diclorometano seco en atmósfera de nitrógeno seco; después se agregaron 1.2 gramos (6 mmol, 0.82 mls) de yodotrimetilsilano y se agitó la solución durante 24 horas a la temperatura ambiente. Después se lavó la solución de diclorometano con agua hasta alcanzar la neutralidad, se secó sobre sulfato de sodio, se concentró a un volumen pequeño y se precipitó en hexano. Se determinó el rendimiento de la reacción mediante ¹H-NMR

5 *PASO D) Preparación de PEG de bis(2,5-benzoquinonas de carboxamida)*

10 Se disolvieron 5 gramos (1.4 mmol, 5.6 meq) de PEG de 3400 bis(2,5-hidroxianilida de carbonilo) en 50 mls de etanol y 1.2 gramos (7.4 mmol) de cloruro de hierro (III). Se agitó la solución durante 24 horas a la temperatura ambiente, después se agregaron 150 mls de diclorometano y 150 mls de agua y se separaron dos gases; se lavó la fase de diclorometano tres veces con agua, después se concentró y se precipitó en éter de dietilo frío. Se determinó el rendimiento de la reacción mediante ¹H-NMR.

15 **Preparación del copolímero de bloque de α,ω -bis(benzo-quinonas) poli(ácido láctico)-PEG-poli(ácido láctico) (ejemplo con 2.5 unidades monoméricas de ácido láctico por extremo de PEG)**

15 *PASO A) Preparación del copolímero en bloque de poli(ácido láctico)-PEG-poli(ácido láctico)*

20 Se mezclaron juntos 17 gramos (5 mmol) de diol de PEG 3400 seco, 3.60 gramos (0.025 mmol) de dl lactida y 15 mls de octanoato estañoso, bajo atmósfera de nitrógeno seco. Se agitó la mezcla de reacción a 200°C durante 2 horas y se enfrió subsecuentemente a la temperatura ambiente. Se disolvió el sólido resultante en diclorometano y se precipitó en éter de dietilo frío.

PASOS B al E

25 Los Pasos B a E son análogos a los pasos A al D en la preparación de PEG de bis(benzoquinonas).

Preparación de poli(etilen-co-vinil alcohol-co-2-oxivinil-(2',5'-benzoquinonas)acetamida)

30 *PASOS A) al D) Preparación de poli(etilen-co-vinil alcohol-co-2-oxivinil-ácido acético)*

Estas preparaciones son análogas a los PASOS A al D en la preparación de PEG de bis(benzoquinonas).

Preparación de PEG de bis(4-vinilpiridilo)

35 Se hicieron reaccionar 10 gramos (2.7 mmol) de triflato de 3400 PEG recientemente preparado, durante 24 horas a 0°C con 0.75 gramos (8 mmol) de piridina de 4-vinilo, en 30 mls de NMP seco. Se precipitó la solución en éter de dietilo frío, se volvió a disolver el sólido en diclorometano y se precipitó nuevamente en éter de dietilo frío.

40 **Síntesis del péptido**

45 Se sintetizaron los péptidos en un sintetizador de péptidos Pioneer de Perspective Biosystems (Framingham, Massachusetts, Estados Unidos), usando el esquema de protección Fmoc estándar. Se disociaron los péptidos a partir de resina, usando 8.8 mls de ácido trifluoroacético (Perspective Biosystems), 0.5 mls de agua, 0.5 mls de fenol (Aldrich), y 0.2 mls de triisopropilsilano (Aldrich) por gramo de resina, durante 2 horas a la temperatura ambiente. Se precipitó la solución en éter, y se recuperó el producto mediante filtración, y se secó bajo vacío. Se purificaron los péptidos mediante cromatografía C18, y las fracciones que contenían el producto se identificaron mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los péptidos se almacenaron bajo Ar a -20°C.

50 Antes de la aplicación, los péptidos que contenían cisteína se manipularon húmedos en soluciones acídicas y/o soluciones degasificadas, o se secaron bajo vacío o bajo argón tanto como fue posible para evitar la oxidación.

Ejemplo 2: Formación de gel mediante reacciones de adición de conjugados

55 **Geles que se forman mediante adición de conjugados con un tri-tiol de peso molecular bajo y una insaturación enlazada por PEG: tris-(3-mercaptopropionato) de trimetilolpropano y diacrilato de PEG**

60 Se disolvieron 50 mgs de PEG-8000-2A a 0.1 g mls en 500 microlitros de 4:1 50 mM regulador del pH de bicarbonato (pH 8.4):acetonitrilo. Se agregaron 1.1 microlitros de tris-(3-mercaptopropionato) de trimetilol-propano (1.25 equivalentes que se basan en acrilatos) y se mezcló la solución mediante someterla a remolino. El tris-(3-mercapto-propionato) de trimetilolpropano no se pudo mezclar perfectamente en la solución, sino que formó una suspensión de gotitas pequeñas en la fase acuosa. El material no se geló en dos horas, sino que se dejó descansar durante toda la noche. Aproximadamente a las 12 horas después de la adición del tris-(3-mercaptopropionato) de trimetilolpropano, se había formado un material reticulado sólido. Se agregó agua al material, el cual se hinchó con el agua pero no se disolvió (escala de tiempo: semanas antes de que se desechara finalmente el gel debido a la contaminación).

De igual manera, se formó un gel de concentración más elevada de PEG y con propiedades mecánicas más fuertes, por medio de disolver primero 0.2 gramos de PEG-8000-2A en 750 microlitros de agua sin regulación de pH y 250 microlitros de acetona. Se agregaron 4.4 microlitros de tris(3-mercapto-propionato) de trimetilolpropano (1.25 equivalentes que se basan en grupos de acrilato). Mientras que el tris(3-mercap-topropionato) de trimetilolpropano es soluble en acetona a estas concentraciones (4.4 microlitros de tris(3-mercapto-propionato) de trimetilolpropano/250 microlitros acetona), todavía formó una suspensión visiblemente insoluble con la solución de PEG después de someterla a remolino. Después de 24 horas, se había formado un material insoluble en agua altamente reticulado.

10 **Geles que se forman mediante la adición de conjugados con un nucleófilo enlazado con péptido y una insaturación del conjugados enlazada con PEG**

15 Se diseñó el péptido GCYKNRDCG (SEQ ID NO:58) para ser sensible a la hidrólisis mediante la plasmina de la enzima, para contener más de un tiol (cisteína) para la reacción de adición con los grupos no saturados del conjugados, y para que sea muy soluble en agua. Se sintetizó el péptido de conformidad con los métodos que se describieron anteriormente. El péptido fue extremadamente soluble en agua, hasta cuando menos 120 mgs/ml.

20 Los geles se formaron a partir de PEG-2500-3A y GCYKNRDCG, así como a partir de PEG-3500-3A y GCYKNRDCG. Los geles se habían formado a tres proporciones de acrilatos con sulfhidrilos (1:1, 1.1:1, y 1.25:1). Los geles se formaron en 10 mM de suero regulado con fosfato con trietanolamina para ajustar el pH a 8.0-9.0, como se probó mediante tiras de papel pH (las reacciones de formación de gel se realizaron a 50 microlitros y escalas más bajas). Los geles se habían estado haciendo mediante: disolver previamente el péptido y después agregar la solución del péptido al PEG-3A; por medio de disolver previamente el PEG-3A y agregar su solución al péptido; y por medio de disolver previamente las dos soluciones y después mezclarlas en las proporciones apropiadas.

25 Se ha usado el siguiente protocolo para la formación del gel a la escala de 40 microlitros. La cantidad de PEG-2500-3A que se pesó en un Eppendorf varió debido a las cualidades viscosas del material que lo hacen de alguna manera difícil de manejar. Sin embargo, el volumen del regulador del pH que se agrega al PEG-2500-3A se ajusta siempre para dar la misma concentración final sobre una base de masa/volumen.

30 Se pesaron 2.5 mgs de GCYKNRDCG dentro de un tubo de Eppendorf. Se pesaron 7.0 mgs de PEG-2500-3A dentro de un tubo de Eppendorf separado. Se agregaron 62 microlitros de suero regulado con fosfato (PBS) TEA (10 mM PBS con 13 microlitros de trietanolamina/ml) al PEG-2500-3A para dar una solución de 4.5 mgs/40 microlitros. Se permitió que la solución de PEG reposara hasta que se hubo disuelto el PEG-3A (menos de cinco minutos). Se agregaron 40 microlitros de la solución de PEG-3A al péptido, el cual se disolvió de manera extremadamente rápida. La punta de la pipeta que se usó para la transferencia, se usó para agitar la mezcla durante aproximadamente 3 segundos. Se retiró una muestra de 1 microlitro para probar el pH mediante un tira de papel (rango de pH 1-11). El pH fue de aproximadamente 8.0. Después de 20-30 minutos, se formó un gel.

40 **Control de la velocidad de gelación mediante la modulación de la carga cercana a un nucleófilo (por ejemplo, tiol)**

45 Se sintetizaron dos péptidos sensibles a la colagenasa (MMP-1): GCDDGPQGIWGQDDCG (SEQ ID NO: 59) y GCRDGPQGIWGQDRCG (SEQ ID NO: 60), usando las técnicas Fmoc estándares que se describieron en el Ejemplo 1. En un péptido, el tiol (en cisteína, C) estuvo cerca de un residuo que llevaba la carga negativa (ácido aspártico, D) cuando estuvo cerca del pH neutral, el pH de interés. En el otro péptido, el tiol estuvo cerca de un residuo que llevaba la carga positiva (arginina, R) cuando estuvo cerca del pH neutral. Se hizo reaccionar cada péptido de manera separada con acrilato que contenía los polímeros de PEG a un pH de 8. La velocidad de la adición de conjugados fue seguida por el consumo de los tioles mediante el uso de DTNB, reactivo de Ellman. Los resultados se muestran en la Figura 1. El intercambio de D -> R (carga negativa -> carga positiva) cerca del tiol, incrementó el velocidad de la reacción de manera que la vida media del consumo del tiol durante la formación del gel disminuyó casi 3 veces. Esto se consiguió mediante el diseño a fin de incrementar la probabilidad de que el tiol exista en la forma S-, la cual participa en la adición de conjugados y por tanto para incrementar la velocidad de la reacción y la gelación.

55 **Dilatación (contenido de agua) de los geles que se fabrican mediante la adición de conjugados**

60 Se hicieron los geles con 0.1 gramos/ml, 0.15 gramos/ml, y 0.2 gramos/ml de PEG-2500-3A a una escala de 20 microlitros. Los geles contenían 1.1 acrilatos por sulfhidrilo en el componente del péptido (nucleófilo), GCYKNRDCG. Para la formación del gel, se ajustaron los reguladores de pH del suero regulado con fosfato para dar cuenta por la acidez agregada del péptido adicional en los geles de concentración más elevada y para dar reacciones a un pH de 8.0-8.5. Se hicieron los geles por cuadruplicado.

Tabla 6. Geles de adición de conjugados para estudios de dilatación

	PEG-2500-3A (mg)	GCKYNRDCG (mg)	Trietanolamina (l/ml)	% agua en gel dilatado
10%	2.0	1.1	13.0	96.5%
15%	3.0	1.7	20.1	95.8%
20%	4.0	2.2	26.0	94.8%

5 Los geles se dilataron en 10 mM PBS, pH 7.3 durante 48 horas antes de que se hicieran las primeras mediciones de peso húmedas. Se pesaron los geles en húmedo cuatro veces durante tres días consecutivos sin ningún incremento significativo en las masas húmedas durante este tiempo. Después se empaparon los geles en agua desionizada, con intercambios de la fase de solución, durante cuatro días después de lo cual se liofilizaron los geles a fin de obtener las masas secas. Los contenidos de agua que se basaron en las masas secas máximas posibles (debido a la variabilidad en las masas secas reales), fueron todas de aproximadamente el 95 por ciento en masa de los geles dilatados.

10

Geles que se formaron mediante la mezcla de dos componentes en polvo

15

20

25

30

35

Los precursores del material también se pueden administrar en los tejidos en el estado seco. Por ejemplo, se puede formular el ditio de PEG como un polvo, el tetraacrilato de PEG se puede formular como un polvo, uno o el otro, pero de preferencia los dos componentes que contienen componentes reguladores del pH de manera que cuando los componentes en polvo se mezclan y se disuelven en agua, solución salina o fluidos fisiológicos, se forma una solución a un pH tal que ocurre la reacción de los dos componentes precursores, por ejemplo, pH 8. Estos componentes en polvo se pueden rociar sobre un superficie del tejido, ya sea junto con una corriente acuosa o sin una. En el caso de que los polvos se rocíen con una corriente acuosa, los componentes del polímero se disuelven en la corriente acuosa junto con la capa de fluidos biológicos sobre la superficie del tejido, y después reaccionan para formar el implante de bio-material final. En el caso de la aplicación de los componentes en polvo a la superficie del tejido, los precursores poliméricos y los componentes reguladores del pH se disuelven en los fluidos biológicos y forman una solución precursora, que puede reaccionar para formar el implante de bio-material final. En el caso en donde los fluidos biológicos proporcionen la humedad para la disolución de los componentes precursores poliméricos, la concentración de los componentes precursores poliméricos puede ser elevada, dando como resultado un implante de bio-material fuerte y buena adhesión al tejido. En la aplicación de las corrientes de polvo, los polvos se pueden mezclar juntos y después aplicarse como una sola mezcla en polvo a la superficie de tejido húmeda, o se pueden mezclar en un rocío a partir de los dos componentes. Los componentes en polvo se pueden formar mediante los métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica de tecnología de polvos, tal como precipitación, esmerilado, fresado, liofilización, secado por rocío, y así por el estilo. Las partículas pequeñas llevarán a una disolución más efectiva y rápida, ya sea en una corriente acuosa o en la humedad en la superficie del tejido. Se deberán mezclar los dos componentes precursores poliméricos juntos a una proporción tal que los componentes de tiol y los componentes de acrilato sean aproximadamente equivalentes sobre una base de un mol de tiol por mol de acrilato. Además, la naturaleza del implante de bio-material se puede controlar mediante la adición de otros agentes a los polvos precursores, tal como partículas que sean lentas para disolverse en la solución acuosa o formadores de gas, los cuales llevarán a la formación de poros dentro del implante del material después de la cura.

Ejemplo 3: Protocolos generales para inmovilizar los péptidos y probar la actividad con las células en el cultivo

40

Inmovilización de péptidos en geles en los cuales se inmoviliza el péptido mediante la adición de conjugados y el gel se forma mediante la adición de conjugados

45

50

Se disolvieron 13.9 mgs de PEG-2500-3A en 69.5 microlitros (5.0 mgs/25 microlitros) de PBS•TEA (10 mM PBS que contenía 13 microlitros de trietanolamina/ml) que contenía GCGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 61) a una concentración de 3.2 mgs de GCGYGRGDSPG/ml). Se disolvieron 7.0 mgs de GCKYNRDCG en 65 microlitros de PBS•TEA (2.7 mgs/25 microlitros). Se filtró el GCKYNRDCG a través de un filtro de 0.22 micrones. Después de 9 minutos de tiempo de reacción, se filtró la solución de PEG-2500-3A/GCGYGRGDSPG a través de un filtro de 0.22 micrones. Tan pronto como la filtración estuvo completa, se agregaron equivalentes (25 microlitros) de las dos soluciones a las paredes de placas de 96 cavidades de poliestireno tratado de cultivo de tejido de fondo plano de Corning. A medida que se agregaba la segunda de las dos soluciones precursoras, se usó la punta de la pipeta para agitar la mezcla durante 2-3 segundos. Después se permitió que los geles se asentaran a 37°C.

55

Resistencia de las células en los geles que se fabricaron mediante adición de conjugados que carecía de péptidos de adhesión incorporados

60

Los geles de adición de conjugados se fabricaron con 0.1 gramos/ml de PEG-2500-3A y 1.1 acrilatos por sulfhidrido en GCKYNRDCG. Se dilataron los geles durante 24 horas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (algunos en condiciones libres de suero y algunos en suero bovino fetal al 10 por ciento) que contenía agentes antibióticos y antimicóticos al 1 por ciento. Se sembraron fibroblastos de prepucio humano (pasaje 7; que se pasaron con tripsina/EDTA) sobre los geles. A partir de puntos de tiempo de dos horas a 48 horas, las células permanecieron redondas y no se

extendieron. Las células se acumularon cada vez más. El comportamiento celular fue independiente del suero en el medio. Las células de control se sembraron sobre el cultivo de tejido que se trató con poliestireno se extendió de manera normal.

5 **Interacción de células con los geles que se fabricaron mediante adición de conjugados que contenía péptidos de adhesión incorporados.**

10 Los geles de adición de conjugados se fabricaron con PEG-2500-3A, GCYKNRDCG, y un péptido que contenía RGD (GCGYGRGDSPG) que se incorporó de una manera colgante. Los geles se fabricaron con 0.1 gramos de PEG-2500-3A/ml y 1.1 acrilatos por sulfhidrilo en GCYKNRDCG. Los geles se dilataron por más de 36 horas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (algunos en condiciones libres de suero y algunos en suero bovino fetal al 10 por ciento) que contenía agentes antibióticos y anti-micóticos al 1 por ciento. Cuando se incorporó el péptido RGD en uno de cada 12 acrilatos del PEG-2500-3A, fibroblastos de prepucio humano (pasaje 8, que se pasaron mediante tripsina/EDTA) se adhirieron a los geles (tanto aquellos que se dilataron en condiciones libres de suero, como aquellos en el medio que contenía suero). A las 6 horas después de haberse sembrado, se distribuyeron las células de manera uniforme sobre la superficie del gel, y se extendió aproximadamente el 50 por ciento de las células sembradas (en las dos condiciones de medio).

20 **Interacciones de las células con las redes de polietilenglicol**

Se probaron las interacciones de las células con las redes de polietilenglicol por medio de sembrar células humanas sobre los geles usando métodos de cultivo de tejidos estándares. Se compraron los fibroblastos de prepucios humanos o las células endoteliales de la vena umbilical humana con Clonetics (San Diego, California, Estados Unidos). Se cultivaron los fibroblastos en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco que contenía suero bovino fetal al 10 por ciento y antibióticos al 1 por ciento (todos de GIBCO BRL, Grand Island, New York, Estados Unidos) a 37°C y CO₂ al 5 por ciento. Se cultivaron las células endoteliales en medio M199 con suero bovino fetal al 10 por ciento y antibióticos al 1 por ciento (todos de GIBCO BRL). Por cada 50 mls de medio, se agregaron 100 g/ ml de heparina (Sigma, San Luis, Missouri, Estados Unidos) y 3 mgs de complemento de crecimiento celular endotelial (Becton Dickinson Labware, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). Se removieron las células a partir de los sustratos del cultivo usando Tripsina/EDTA (GIBCO BRL), se centrifugó en el medio de cultivo celular normal antes de sembrarlas sobre los geles de polietilenglicol.

Ejemplo 4: Análisis químico de los productos de reacción

35 **La cinética de reacción se midió con reactivo de Ellman**

Se usó reactivo de Ellman para medir la concentración de tioles en una solución. El ensayo utilizó una solución de 40 mgs de nitrobenzotioles de dinitrobenzotiol (Sigma) en 10 mls de 0.1 M regulador de pH de fosfato de pH 8 (reactivo de Ellman). Se probó una solución por la presencia de tioles mediante la adición de la solución a 3 mls del regulador de pH de fosfato. Se agregó el reactivo de Ellman (100 l) y se mezcló. Después de 15 minutos, se midió la absorbancia de la solución en 412 nm. Se asumió un coeficiente de absorción molar de 14150.

45 Usando la cisteína del aminoácido, el reactivo de Ellman no reveló ninguna formación del enlace de disulfuro detectable a pH 10 por 30 minutos a la temperatura ambiente. Si se agregó cisteína a un exceso de diacrilato de PEG, peso molecular 8000, en las mismas condiciones, la concentración de tioles cayó a 0.2 por ciento del valor original en segundos, y no disminuyó adicionalmente a los 30 minutos, lo que demuestra la desaparición rápida de los tioles en la presencia del diacrilato de PEG. En la Figura 2 se muestra la reacción de la adición de conjugados entre el diacrilato de PEG y la cisteína del aminoácido.

50 El péptido con la secuencia de aminoácidos Ac-GCGYGRGDSP-NH₂ (SEQ ID NO: 62) se probó de manera similar. Se disolvió el diacrilato de PEG en el regulador de pH de fosfato a un pH de 8 a una concentración de 25 mol en 1 ml. Se agregó el péptido (1 mol) a la solución de diacrilato de PEG, y se monitoreó la desaparición de los tioles usando el reactivo de Ellman (vea Figura 3). Se realizó la reacción a diferentes pH y, adicionalmente, se evaluó la formación de los enlaces del disulfuro por medio de disolver el péptido a las mismas concentraciones pero en la ausencia del diacrilato de PEG. La vida media para la reacción fue de aproximadamente 3 minutos a un pH de 7.4, y solamente unos pocos segundos a un pH de 8, a la temperatura ambiente.

60 Otro método para seguir en línea la reacción entre los tioles y el diacrilato de PEG es monitorear la absorbancia de la mezcla de reacción a 233 nm. A esta longitud de onda, la absorbancia se debe en principio a cuatro sustancias: los componentes del tiol, las impurezas del disulfuro en el componente del tiol, el acrilato y el producto (el éster propiónico de -alquilio). Los experimentos se condujeron en 10⁻² M suero regulado con fosfato a diferentes temperaturas entre los 20°C y los 37°C.

65 Al realizar los experimentos a diferentes proporciones de reactivos, pero manteniendo constante la concentración molar total de los grupos reactivos (Figura 4), se pueden calcular los coeficientes de extinción de todas las especies que se

ajustan a los valores de absorción, antes y después de la reacción. Este procedimiento permitió seguir de manera independiente la evolución en tiempo de la concentración de los reactivos y los productos: PEGDA y la cisteína mostraron un solo comportamiento exponencial, con las mismas constantes cinéticas y esto probó que la reacción fue de primer orden para cada reactivo. Se habían registrado las veces de vida media entre 2 y 10 minutos, dependiendo de la temperatura y la concentración de los reactivos. En la Tabla 7, se alistan las constantes cinéticas.

Tabla 7: Constantes cinéticas de primer orden para la reacción de PEGDA-cisteína a diferentes contenidos de PEGDA, con un concentración acumulativa total de 2.5×10^{-3} M

Fracción equivalente de PEGDA	k (min ⁻¹)
0.18	0.14
0.33	0.12
0.46	0.06
0.57	0.10
0.75	0.28
0.82	0.32
0.88	0.42
0.95	0.59

También se valoró la reacción del diacrilato de PEG con las aminas primarias. El diacrilato de PEG se mezcló con un péptido con la secuencia de aminoácidos GDGSGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 63), la cual contiene solamente una amina primaria en el termino amina del péptido. Se midió la presencia de aminas usando el ensayo de fluorescamina. Se disolvió la fluorescamina (Sigma) en acetona seca a 1.5 mgs/ml. Se agregó el péptido (1 mg) a 100 μ l de 0.1 M regulador de pH de fosfato a pH de 8. El diacrilato de PEG, peso mol. 8000 (100 mgs) se disolvió a 900 μ l en 0.1 M regulador de pH de fosfato a un pH de 8 y se mezcló con la solución del péptido. Se tomaron muestras de la reacción y se agregaron 100 μ l de 1.5 mgs de fluorescamina en acetona seca, y se elevó a 1 ml con 50 mM de regulador de pH de borato a un pH de 9.

Se midió la intensidad de fluorescencia usando un espectrofluorímetro, y se calcularon las concentraciones mediante la comparación con una curva estándar que se produjo usando la glicina del aminoácido. La vida media para la reacción de la amina con un acrilato fue de aproximadamente 90 minutos a un pH de 8 y 37°C.

Producción de aductores de PEG-péptido valorados usando cromatografía de exclusión de tamaño

Se realizó la cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna Shodex OHpak SB-803 (Showa Denko, Tokio, Japón), usando detección de rayos ultravioleta, midiendo la absorbancia desde 200-400 nm. El levigante fue suero regulado con fosfato 810 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl, pH 7.4). El diacrilato de PEG tuvo una absorbancia máxima a 205 nm, mientras que el péptido que se usó, GCGYGRGDS (SEQ ID NO: 64) tuvo una absorbancia máxima a 220 y 270 nm, debido a la presencia de enlaces de amida, y una tirosina. El diacrilato de PEG se disolvió en 0.1 M regulador del pH de fosfato a un pH de 8 a una concentración de 25 μ mol en 1 ml. Se separó una muestra de la solución usando la cromatografía de exclusión de tamaño, y el polietilenglicol que se levigó como un solo pico con una absorbancia máxima a 205 nm, y sin absorbancia a 220 o 270 nm. Después, se agregó el péptido (1 mg) a la solución de diacrilato de PEG, y se hizo reaccionar a la temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se separó una muestra usando la cromatografía de exclusión de tamaño, y se detectó un solo pico, con absorbancia máxima a 205, 220, y 270 nm, con el mismo tiempo de retención que el diacrilato de PEG. Esto indicó que el péptido reaccionó con el diacrilato de PEG. Se realizaron estudios similares usando cromatografía C18, usando un gradiente desde agua al 95 por ciento con ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento, acetonitrilo al 5 por ciento hasta agua al 40 por ciento con ácido trifluoroacético al 0,1 por ciento, acetonitrilo al 60 por ciento. El péptido Ac-GCGYGRGDSP-NH₂, se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 20 por ciento, mientras que el PEG o el diacrilato de PEG-3400 se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 40 por ciento. La incubación de 1 mol del péptido por 2 moles de diacrilato de PEG-3400 en agua regulada por pH a un pH de 8 llevó a la desaparición del pico relacionado con el péptido que se leviga a acetonitrilo al 20 por ciento, con la emergencia de bandas de absorbancia a 220 y 270 nm que se levigaron conjuntamente con el pico de PEG a acetonitrilo al 40 por ciento. La recolección de los picos y el análisis mediante la espectrometría de masa MALDI-TOF indicó que el pico asociado con PEG contenía una mezcla de diacrilato de PEG-3400 sin modificar, y una especie nueva con el peso molecular que fue la suma del diacrilato de PEG-3400 y los pesos moleculares del péptido.

Análisis de la cinética de reacción de PEGs terminados en acrilato, crotonilato y dimetilacrilato con la cisteína.

Se mezcló la cisteína del aminoácido en solución (0.1M fosfato, pH 8) con PEGs funcionalizados (PEG-8000-2A, PEG-8000-2C, y PEG-8000-2DMA) de manera que los tioles y los grupos no saturados conjugados estaban inicialmente en concentraciones equimolares (20 micromolar). En la presencia de las funcionalidades del dimetacrilato, la velocidad de consumo del tiol fue esencialmente cero durante la escala de tiempo que se siguió (10 minutos). En la presencia de las funcionalidades del crotonilato menos obstructoras de manera espacial (una sustitución de metilo en el enlace doble), se incrementó la velocidad de consumo del tiol. En la presencia de los acrilato todavía menos obstructores, la

concentración de tioles disminuyó de manera más rápida, pero no fue hacia la terminación en el curso de tiempo que se siguió. Vea Figura 5.

5 En un experimento similar en donde la concentración de los grupos no saturados conjugados fue diez veces aquella de los grupos de tiol, el consumo de tioles por parte de los acrilatos fue extremadamente rápido. La reacción se completó por medio de tomar la primera muestra en el tiempo de 1 minuto (no se muestran los datos).

Ejemplo 5: Demostración de la hidrólisis del enlace que se forma entre un péptido que contiene cisteína y los polímeros acrilatados

10

Hidrólisis en la solución

15 Se disolvió el péptido Ac-GCGYGRGDSP-NH₂ en agua desionizada, y se disolvió el diacrilato de PEG-8000 en agua desionizada regulada por pH con 10 mM HEPES y 115 mM trietanolamina a un pH de 8. Después de mezclar 1 mol del péptido por 2 moles del diacrilato de PEG-8000, la reacción fue seguida por cromatografía C18, usando un gradiente desde agua al 95 por ciento con ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento, acetonitrilo al 5 por ciento hasta agua al 40 por ciento con ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento, acetonitrilo al 60 por ciento. El péptido Ac-GCGYGRGDSP-NH₂, se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 20 por ciento, mientras que el PEG o el diacrilato de PEG-3400 se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 40 por ciento. Rápidamente, desapareció el pico de péptido libre a acetonitrilo al 20 por ciento, y después se levigó conjuntamente el péptido con el pico de PEG a acetonitrilo al 40 por ciento. Después se incubó la solución que contenía el aductor de PEG-péptido a 37°C, y se hicieron inyecciones cromatográficas C18 en puntos de tiempo tardíos para detectar la hidrólisis del péptido a partir del polímero. Esta se midió por medio de conservar la disminución en la señal a 273 nm que se levigó conjuntamente con el pico de PEG, y la reaparición del pico de péptido libre a aproximadamente acetonitrilo al 20 por ciento. La espectrometría de masa MALDI-TOF del pico nuevo que se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 20 por ciento, reveló un producto de peso molecular que correspondió con el peso molecular del péptido original más 72 unidades de masa. Esto indicó que el pico nuevo contenía péptido modificado con ácido propiónico, el cual fue el producto que se esperaba después de la adición de conjugados entre la cisteína sobre el péptido y un grupo de acrilato, seguido por la hidrólisis del éster del acrilato modificado. Se encontró que la vida media para la hidrólisis del éster entre el péptido y el PEG fue de 4.86 días. Esto corresponde con la vida media de la hidrólisis de aproximadamente 3 semanas a un pH de 7.4.

30

Degradación de los geles que se forman mediante la reacción de polímeros que contienen tioles y acrilatos

35 Se disolvió triacrilato de PEG-3400 en 50 mM solución salina regulada por pH de HEPES, pH 8 a una concentración del 20 por ciento (p/v). Se disolvió ditio de PEG-3400 (Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama, Estados Unidos) en 1 mM solución salina regulada por pH de MES, pH 5.6 a una concentración del 20 por ciento (p/v). Se mezclaron las soluciones a una proporción de 1 acrilato: 1 tiol. Los geles se formaron después de unos cuantos minutos a 37°C, y se transfirieron los geles a tubos que contenían 10 mM solución salina regulada por pH de HEPES a un pH de 7.4, y se incubaron a 37°C. La solución salina regulada por pH de HEPES se reemplazó diariamente durante la primera semana, y se evaluó diariamente la presencia de un gel restante en el tubo. Se encontró que los geles sólidos se habían ido de los tubos después de aproximadamente 3 semanas, con los geles sólidos ausentes de los tubos entre 18 y 24 días después de la reticulación. Esto se comparó con los geles que se formaron a partir del diacrilato de PEG-8000 mediante reticulación de radicales libres (Pathak, *supra*), los cuales todavía están presentes después de 4 meses a un pH de 7.4, 37°C.

45

Degradación de los geles que se formaron mediante la reacción de moléculas que contienen tioles y acrilatos

50 Se disolvieron 13.9 mgs de PEG-2500-3A en 69.5 microlitros (50 mgs/25 microlitros) de PBS•TEA (10 mM PBS que contenía 13 microlitros de trietanolamina/ml). Se disolvieron 7.0 mgs de GCKKKGKCYKNRDCG (SEQ ID NO: 65) en 65 microlitros de PBS•TEA (2.7 mgs/25 microlitros). Se agregaron los equivalentes (25 microlitros) de las dos soluciones a las cavidades de una placa de 96 cavidades de poliestireno tratado de cultivo de tejido de fondo plano de Corning. A medida que se agregaba la segunda de las dos soluciones precursoras, se usó la punta de la pipeta para agitar la mezcla durante 2-3 segundos. Después se permitió que los geles se asentaran a 37°C. Después se transfirieron los geles a tubos que contenían 10 mM solución salina regulada por pH de HEPES, pH 7.4. Se incubaron los geles a 37°C, y se siguió visualmente la desaparición de los geles sólidos. Entre los días 14 y 21, todos los geles sólidos habían desaparecido, lo que indica que se habían degradado mediante la hidrólisis del enlace de éster entre el péptido y el PEG.

55

Control de la velocidad de la hidrólisis por medio del cambio en el medio ambiente local

60 Se disolvieron 13.9 mgs de PEG-2500-3A en 69.5 microlitros (5.0 mgs/25 microlitros) de PBS•TEA (10 mM PBS que contenía 13 microlitros de trietanolamina/ml). Se disolvieron 7.0 mgs de GCKKKGKCYKNRDCG (SEQ ID NO: 65) en 65 microlitros de PBS•TEA (2.7 mgs/25 microlitros). Se agregaron los equivalentes (25 microlitros) de las dos soluciones a las cavidades de una placa de 96 cavidades de poliestireno tratado de cultivo de tejido de fondo plano de Corning. A medida que se agregaba la segunda de las dos soluciones precursoras, se usó la punta de la pipeta para agitar la mezcla durante 2-3 segundos. Después se permitió que los geles se asentaran a 37°C. Después se transfirieron los

65

geles a tubos que contenían 10 mM solución salina regulada por pH de HEPES, pH 7.4. Se incubaron los geles a 37°C, y se siguió visualmente la desaparición de los geles sólidos. Se agregaron las lisinas extras que se encontraron en el péptido ("GKKKK...") a modo de proporcionar nucleófilos adicionales al medio ambiente local del enlace de éster. Adicionalmente, la naturaleza catiónica de los grupos también podría llevar a una elevación del pH local. Se espera que la combinación de estos dos efectos mejore la velocidad de la hidrólisis del enlace de éster entre el péptido y el polímero.

Ejemplo 6: Demostración de la hidrólisis de la plasmina de los geles que se formaron mediante la adición de conjugados con un péptido que contiene dos residuos de cisteína con una secuencia de sustratos de plasmina en medio, y la carencia de hidrólisis de un péptido sustituido

Síntesis de geles mediante adición de conjugados

Debido a que las enzimas y los péptidos son quirales, se alteró la estereoquímica de GCYKNRDCG para hacer un nucleófilo estable a la plasmina para los geles formado mediante adición de conjugados. Este péptido estable a la plasmina fue: GCY-DLys-N-DArg-DCG (SEQ ID NO: 66). La secuencia no se alteró de otra manera a fin de mantener las propiedades de solubilidad al agua extremadamente buenas del GCYKNRDCG.

Se usó el HPLC C18 analítico (gradiente de acetonitrilo lineal de más de 0.1 por ciento TFA en agua) para confirmar la estabilidad a la plasmina relativa del GCY-DLys-N-DArg-DCG. Se ejecutaron los siguientes ejemplos: plasmina; GCYKNRDCG; plasmina + GCYKNRDCG; GCY-DLys-N-DArg-DCG; y plasmina + GCY-DLys-N-DArg-DCG. La plasmina (micromolar) estuvo presente al 1/1000 la concentración del péptido (milimolar) y por tanto no afectó los cromatogramas de absorbancia sobrepuestos. La sobreposición de los rastros (absorbancia a 220 nm o 278 nm) de las levigaciones del péptido contra aquellas del péptido – plasmina, demostraron que la mayoría del péptido GCYKNRDCG se degradó en aproximadamente 1 hora a 37°C. El péptido GCY-DLys-N-DArg-DCG sin embargo, no se vio afectado por la plasmina a las 24 horas, y permaneció sin afectación durante el tiempo de vida de la plasmina en la muestra (muestra que se inyectó para C18 a las 2 semanas).

Demostración de la sensibilidad a la plasmina y la resistencia a la plasmina

Se fabricaron los geles de conformidad con el protocolo de 40 microlitros que se dio anteriormente. Algunos contenían el péptido GCYKNRDCG con Lys y Arg en la configuración en L. Otros contenían el GCY-DLys-N-DArg-DCG en su lugar. Todos se expusieron a 0.2 unidades de plasmina en 200 microlitros y se incubaron a 37°C. La configuración L-lys, L-Arg del péptido se degradó rápidamente mediante la enzima. En un caso, después de 6 horas no quedaba ningún gel. No se ha mostrado que el gel de configuración GCY-DLys-N-DArg-DCG se degrade mediante plasminólisis.

Ejemplo 7: Incorporación de péptidos dentro de geles de polietilenglicol que se formaron mediante fotopolimerización

Síntesis del gel

Se permitió que el diacrilato de polietilenglicol de peso mol. 8000 (230 mgs/ml) se disolviera en solución salina regulada por pH de HEPES (10 mmol HEPES, Sigma, 8 gramos/ litro NaCl, pH 7.4) durante 1 hora. Se agregó trietanolamina (Aldrich, 15.3 l/ml), y se ajustó el pH de la solución a un pH de 8 con 6N HCl. Se disolvieron los péptidos que contenían cisteína en 116.5 l de solución salina regulada por pH de HEPES, y se agregaron a 8700 de la solución de PEG con remolino. Después de 5 minutos, se agregaron 3.5l de pirrolidona de N -vinilo y 10 µl de una solución de 10mM de Eosina Y, seguido por remolino. Se formaron los geles mediante la exposición a la luz a 75 mW/cm² durante 1 minuto (Cermax Xenon Lightsource, que transmite luz entre 470 y 520 nm; ILC Technology, Sunnyvale, California, Estados Unidos). Se permitió que los geles se dilataran en solución salina regulada por pH Tris, pH 7.4 (4.36 gramos Tris HCl, 0.64 gramos base de Trizma, 8 gramos NaCl, 0.2 gramos KCl por 1 litro, todos de Sigma) durante 36 horas.

La interacción de las células con los geles de PEG que contenían los péptidos se incorporaron mediante la adición de conjugados en los cuales se forma el gel mediante fotopolimerización.

Se prepararon los geles de PEG como se describió anteriormente, usando el péptido GCGYGRGDSPG. La mayoría de las células tienen receptores que reconocen la secuencia GRGDSPG, y las células interactuarán con las superficies que despliegan péptidos que contienen RGD inmovilizados. Para probar las interacciones de las células con los geles de PEG que contienen los péptidos que se incorporaron mediante la adición de conjugados, se formaron los geles y se sembraron células endoteliales de vena umbilical humana sobre los geles. Se observó el cambio en la forma de las células en la superficie, lo cual indica que las células estaban interactuando con los péptidos en la superficie. Se hace referencia al cambio en la forma como diseminación, y hace referencia al cambio en la forma de las células de esféricas a planas y poligonales en la superficie. No ocurrió ninguna diseminación celular en los geles de PEG sin el péptido, y se confirmó la especificidad del péptido GCGYGRGDSPG mediante la comparación con los geles que contenían el péptido GCGYGRD~~G~~SPG, el cual contiene los mismos aminoácidos, pero en una secuencia diferente, y el cual no tiene actividad biológica. Se sembraron las células sobre los geles a una concentración de 400 células por mm², y se contó el

número de células diseminadas por área a diferentes tiempos (vea Figura 6). Los experimentos se realizaron usando el medio de cultivo celular normal. Las células solamente se pudieron diseminar sobre los geles que contenían el péptido GCGYGRGDSPG, el cual se incorporó dentro de los geles utilizando una reacción de adición de conjugados.

5 **Ejemplo 8: Formación de geles sensibles al pH usando reacciones de adición de conjugados**

10 Se sintetizó el péptido GCCGHHHHGCCG (SEQ ID NO: 67) como se describió anteriormente. Se disolvió el péptido (10 mgs) en 15 μ l de 10 mM suero regulado con fosfato, pH 7.4 y 25 μ l etanol. Se ajustó el pH de la solución a un pH de 5.8 usando 1N NaOH, y después se agregó diacrilato de PEG, peso mol. 400 (7.5 Aldrich). Se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos. Se formó un hidrogel, que demostró aproximadamente un incremento del 50 por ciento en diámetro después del cambio de un pH de 7.4 a un pH de 5.8.

15 Se polimerizaron los geles como esferas por medio de agregar la solución gelante de arriba de 1 ml de ciclohexano que contenía 94 mgs de Hypermer B239 (ICI Surfactants, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), con sometimiento a remolino a 37°C durante 10 minutos. Se produjeron esferas con diámetros que fluctuaban entre 10 a 20 μ m, lo cual demostró aproximadamente un incremento del 50 por ciento en el diámetro después del cambio de un pH de 7.4 a un pH de 5.8.

20 **Ejemplo 9: Formación de partículas para las aplicaciones de administración de proteínas**

25 Se disolvió triacrilato de PEG-3400 en 50 mM solución salina regulada por pH de HEPES, pH 8 a una concentración del 20 por ciento (p/v), con albúmina al 2 por ciento (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Se disolvió el ditioi de PEG-3400 (Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama, Estados Unidos) en 1 mM solución salina regulada por pH de MES, pH 5.6 a una concentración del 20 por ciento (p/v). Se mezclaron las soluciones a una proporción de 1 acrilato: 1 tiol. Se agregó rápidamente la solución líquida (50 μ l) a 1 ml de ciclohexano que contenía 100 mgs Hypermer B239 (ICI Surfactants, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), con agitación rápida. Se calentó la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Después se lavaron las esferas que contenían la proteína, polimerizadas, con ciclohexano adicional para remover los tensoactivos, seguido por secado al vacío para remover el ciclohexano. Después se volvieron a suspender las partículas en solución salina regulada por pH de HEPES, pH 7.4. Se midió la liberación de la proteína a partir de las microesferas por medio de cambiar diariamente el medio en el que se volvieron a suspender, y se evaluó la proteína en el medio para volver a suspender usando la cromatografía de exclusión de tamaño combinada con la detección de rayos ultravioleta a 280 nm. Las concentraciones de proteína en el medio para volver a suspender se determinaron a partir de la curva estándar de concentración para la albúmina a 280 nm.

35 **Ejemplo 10: Apuntando las microesferas de triacrilato de PEG a células y tejidos que usan los péptidos incorporados por medio de la adición de conjugados**

40 Se formaron las microesferas por medio de la reticulación de adición de conjugados del triacrilato de PEG y el péptido GCYdKNdRDCG (SEQ ID NO: 68) como en el Ejemplo 7, pero adicionalmente también se incluye el péptido GCGYGRGDSPG en la mezcla de reacción, a una proporción de 1 GCGYGRGDSPG para 8 GCYdKNdRDCG. Se probó el péptido bio-activo para ver su capacidad para localizar las microesferas para las superficies de las células, en comparación con las microesferas que no contenían ningún péptido bio-activo.

45 **Ejemplo 11: Encapsulación del fármaco y administración mediante los geles que se fabricaron mediante la adición de conjugados**

50 Debido a que las condiciones para formar los geles de PEG mediante la adición de conjugados son bastante benignas (temperatura ambiente a 37°C, pH de aproximadamente 8.0, en solvente acuoso), se incorporan fármacos tales como fármacos de proteínas dentro de los geles para la administración. Estas condiciones benignas no desnaturalizan a la mayoría de las proteínas. El fármaco se incorpora en un número de maneras. En un método, la proteína u otro fármaco (soluble en agua, etanol, acetonitrilo u otro solvente tanto para el PEG como para el péptido sensible a la enzima y el cual se puede intercambiar por un regulador de pH acuoso) se entrapa en los espacios del poro del gel durante la formación del gel. Debido a que las cisteínas libres son relativamente raras en la proteínas naturales, uno necesita preocuparse solamente por la minoría de casos en los que la proteína se reticulará al gel. También, la selectividad de la reacción es bastante buena debido a que la adición de los compuestos no saturados conjugados a otros neutrófilos en las proteínas (hidroxilos y aminas) es extremadamente lenta en comparación con los sulfhidrilos. Cuando el fármaco es más grande que los espacios del poro en su estado dilatado, como lo controla el peso molecular y las concentraciones de los precursores, entonces el fármaco no se difunde hacia afuera del gel a una velocidad apreciable sino que más bien se libera mediante la degradación enzimática superficial del gel.

60 **Control difusivo y degradante de la liberación de proteínas: Liberación de mioglobina después del entrapamiento en los espacios de poro del gel**

65 Se liberó mioglobina de la proteína (17,000 Da) a partir de los hidrogeles que se fabricaron mediante la adición de conjugados entre los tioles y los acrilatos. Se mezcló PEG-3500-3A a 0.2 gramos/ml en PBS, pH 7.4 con una solución

del péptido sensible a la plasmina GCYKNRDCG, de manera que la concentración de tioles y acrilatos fue la misma y la concentración final de PEG-3500-3A fue del 10 por ciento (solución precursora). A algo de la solución precursora, se agregó mioglobina (5.2µl de 9.8 mgs/ ml solución de mioglobina por 195 µl de solución precursora). Se seleccionó la mioglobina como una proteína modelo para los factores de crecimiento, tal como BMP-2, debido a su tamaño similar. Se hicieron 200 alícuotas de solución precursora con y sin mioglobina sobre esponjas de colágeno hemostático. A algunas esponjas de control se agregaron 5.2 µl de los 9.8 mgs/ml de solución de mioglobina, sin precursores de gel. A algunas esponjas, se agregó PBS en lugar de mioglobina. Después de que los geles se hubieron solidificado dentro de las esponjas, se incubó cada muestra en 4 mls de 10 mM PBS, pH 7.4, que contenía azida de sodio al 0.1 por ciento, para evitar la contaminación bacteriana y fungal. A las 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 7 días, y 13 días, se removió la fase de solución de cada muestra y se reemplazó con PBS fresco con azida de sodio al 0.1 por ciento. Después del día 13, se reemplazaron las soluciones con 0.08 unidades de plasmina en 4 mls de PBS, marcándose la discontinuidad mediante la línea vertical en la Figura 7. Se desarrollaron las soluciones usando el microensayo de proteína Bradford de BIORAD y se compararon con la curva estándar que se hizo a partir de las soluciones de mioglobina de concentración conocida. Las muestras con la mioglobina dentro del material del hidrogel mostraron una liberación retardada de la mioglobina (difusión limitada) pero liberaron, después de la degradación del hidrogel mediante la plasmina de la enzima, una cantidad total de proteína sin diferencia con el total que se liberó a partir de las esponjas solas (sin hidrogel) (no se muestran los datos).

Liberación empleando sitios de afinidad incorporados

En otro método, los fármacos tal como la heparina que fija los factores de crecimiento, se separan de manera electrostática dentro del gel. Este método es efectivo para entrapar compuestos de peso molecular relativamente bajo que de otra manera se difunden afuera del gel a través de sus poros, especialmente en el estado dilatado del gel. La separación se consigue en una variedad de métodos.

En un primer planteamiento, uno incluye durante la formación del gel, mediante la adición de conjugados, un péptido fijador de heparina que contienen una o más cisteínas (es decir, el péptido puede ser colgante o servir como reticulante), heparina, y el factor de crecimiento fijador de heparina. En un segundo planteamiento, uno fabrica sus propias proteínas no naturales con técnicas biológicas moleculares y diseña regiones fijadoras de heparina en donde ninguna (o en donde solamente unas de poca afinidad) existía antes. En un tercer planteamiento, uno fabrica proteínas no naturales que contienen cisteínas sin impares. Después uno acopla de manera covalente la proteína por medio de este enlazador de cisteína al gel durante el proceso de formación del gel. En un cuarto planteamiento, uno diseña tanto una cisteína impar, como una región sensible a la enzima dentro de una proteína no natural. Esta proteína también se incorpora de manera covalente dentro de los geles de adición de conjugados en la formación del gel, pero esta proteína se libera en la presencia de la proteasa apropiada, la cual puede ser la misma que degrada el volumen del gel o una enzima diferente. En un quinto caso, uno fabrica un mimico de la heparina que contiene un tiol, por ejemplo, un residuo cys, o una insaturación conjugada y la incorpora de manera covalente dentro del material en la presencia de un factor de crecimiento fijador de heparina, de manera que el factor de crecimiento se separa de manera electrostática.

Incorporación de la afinidad del factor de crecimiento y separación de los factores de crecimiento para la liberación prolongada

Las proteínas fijadoras de heparina que incluyen los factores de crecimiento fijadores de heparina se fijan de manera no covalente al material en la formación del material. Si la proteína que se va a fijar no contiene una secuencia fijadora de heparina nativa, se construye una proteína de fusión (usando técnicas biológicas moleculares e iniciando a partir del nivel del ADN), para contener la secuencia de la proteína nativa y un dominio de fijación de heparina sintético.

Por ejemplo, el factor de crecimiento del nervio (NGF) se expresa como un proteína de fusión en la *E. Coli* de manera que la proteína contiene un dominio de fijación de heparina en el término N y la secuencia de NGF en el término C de la proteína. Esto se consigue por medio de construir un gen sintético que contiene el ADN que codifica para la proteína de fusión deseada. La secuencia de la proteína que se va a expresar es como sigue:

*MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMKDPKRLYRSRKL*PVELESSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWV
 GDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTT
 THTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVRZ (SEQ ID NO: 69)

en donde la región en cursivas es la etiqueta de la Histidina que se deriva a partir del vector de expresión, y la región subrayada es el sitio de disociación de la trombina. Los aminoácidos que aparecen en negritas denotan la secuencia de fijación de la heparina.

El plásmido de clonación que se usa para el ensamble del gen es el pUC18. La secuencia de ADN del gen es como sigue de 5' a 3':

GAATTCCCATGGCATATGAAAGACCCGAAACGTCTGTACCGTTCTCGTAAACTGCCCGT

GGAAGCTCGAGAGCTCTTCCCACCCGATTTTCCATCGTGGCGAGTTCTCCGTGTGTGACT
 CTGTCTCTGTATGGGTAGGCGATAAAACCACTGCCACTGATATCAAAGGCAAAGAGGT
 GATGGTGTGGGAGAAGTAAACATTAACAACCTCTGTATTCAAACAGTACTTCTTCGAA
 ACTAAGTGCCGTGACCCGAACCCGGYTAGACTCTGGGTGTGCGGGCATCGATTCTAAA
 5 CACTGGAAGCTTTACTGCACCACTACTCACACTTTCGTTAAAGCGTTGACTATGGATGG
 TAAACAGGCTGCCTGGCGTTTCATCCGTATCGATACTGCATGCGTGTGTGTACTGTCCC
 GTAAAGCTGTTTCGTTAAGGATCC (SEQ ID NO: 70).

10 Este gen se insertó entre los sitios EcoRI y HindIII en la región de clonación poli-enlazadora de pUC18. Después del ensamble, se insertó este gen dentro del vector de expresión. Después se realizó la expresión y la purificación.

15 Usando la síntesis de péptidos Fmoc estándar que se describió anteriormente en el Ejemplo 1, se sintetizó un péptido de fijación de heparina, tal como el GCGHKA)FAKLAARLYRKA (SEQ ID NO: 71; vea Tabla 5). Para la formación del material, se incubó previamente el péptido con el precursor no saturado conjugado; la proteína de fusión se incubó previamente con la heparina; después se agregó el complejo de proteína de fusión-heparina a la insaturación del péptido de manera que el péptido se acopló de manera covalente a la insaturación conjugada y simultáneamente la heparina formó un puente no covalente entre el péptido y la proteína. Después se agregó el precursor reticulante que contenía el tiol, y se formó el material con la proteína de fijación de heparina en todo respecto.

20 Incorporación covalente de las proteínas y potencial para la liberación que se controla de manera enzimática

25 Se construyó una proteína de fusión para que contuviera la proteína de interés y en un término, una secuencia de peptidilo corta degradable mediante una enzima, tal como la plasmina, y una cisteína lejos del sitio para la proteólisis. La cisteína permite la incorporación covalente de la proteína en el material en la formación del material. El sitio para la proteólisis permite la liberación de la proteína en su forma nativa a una velocidad que se determina mediante la actividad celular, por ejemplo, la activación de las proteasas tales como la plasmina o la colagenasa que se usan en la migración de las células. Se puede controlar la liberación de la proteína mediante la misma o una enzima diferente que la que degrada el material mismo. También existen casos en donde se desea la fijación covalente de la proteína al material sin liberación enzimática. En estos casos, la proteína se diseña iniciando a partir del nivel del ADN para 30 contener una cisteína impar (por ejemplo, en uno de los términos de la proteína), pero sin un sitio nuevo para la proteólisis.

35 Por ejemplo, se modificó el ADN para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) usando la mutagénesis dirigida al sitio para introducir una cisteína cerca del término N de la proteína. Se usaron técnicas biológicas moleculares para sintetizar, purificar y plegar la proteína. Se incubó la proteína con triacrilato de PEG con acrilatos en exceso de tioles en la proteína. Se agregó un péptido sensible a la plasmina que contenía dos tioles (GCYKNRDCG) para reticular el material con el factor de crecimiento que se incorporó todo a través.

40 Ejemplo 12: Liberación de fármacos (que incluyen fármacos sin proteína) a partir del material por medio de profármacos enlazados de manera covalente, los cuales se pueden liberar como fármacos mediante la proteólisis

45 Se describe otro método para la incorporación covalente de profármacos dentro de un material. Uno puede liberar un profármaco a partir de un material en donde el material sea soluble. Se usan modificaciones de peso molecular grandes para modular el tiempo de circulación, poner en objetivo el profármaco, tolerancia inmune y modo de captación celular. Se desea un enlace portador-fármaco estable para el transporte. Sin embargo, es de interés un enlace que se pueda disociar después de la llegada a la ubicación deseada. Es apropiado un enlace de amida en donde un constituyente del enlace sea un aminoácido en L que reconozca una enzima proteolítica. Kopecek y colaboradores (Pato, J., M. Azori, K. Ulbrich, y J. Kopecek, Makromol. Chem. 185:321-237, 1984) han publicado mucho con respecto a estos portadores de fármaco macromoleculares solubles degradables de manera enzimática. Sin embargo, aparece poco trabajo con respecto a la liberación de fármacos controlada de manera enzimática a partir de materiales sólidos, tales como los hidrogeles. La liberación a partir de un material sólido sirve para localizar la liberación de fármacos a un sitio deseado, por ejemplo, el sitio de la formación del material. La liberación a partir de un material sólido en donde la liberación del fármaco se realiza mediante la actividad extracelular, tal como la expresión de las enzimas proteolíticas, controla la 55 velocidad de liberación de manera que la actividad celular (por ejemplo, la migración de las células) determina la velocidad de la liberación.

60 Los grupos funcionales de un fármaco (tal como los fármacos anti-cáncer doxorubicina o daunorubicina) están protegidos con la excepción de los grupos funcionales de amina. Los grupos de amina en el fármaco se acoplan a un aminoácido o péptido mediante la formación de un enlace de amida. El aminoácido o péptido se seleccionan para que sean de terminal amino degradable con el aminoácido (Y) o el péptido (XXXXY; SEQ ID NO: 72), debido a el enlace de amida que une el aminoácido o el péptido al fármaco, mediante una enzima proteolítica, tal como la plasmina que disocia la terminal amino a la lisina y la arginina. Ya sea que se incluya el tiol (por ejemplo, cisteína) en el péptido

5 acoplado o se acopla después al aminoácido o porción del péptido del conjugado de péptido-fármaco. Se les quita la protección al fármaco y los grupos funcionales del péptido (para dar SH-XXXXY-fármaco). En la formación del material, el conjugado tiol-péptido-fármaco se acopla de manera covalente al material a modo de adición de conjugados del tiol sobre una insaturación conjugada en el precursor del material. El fármaco se libera a partir del material mediante la actividad enzimática, tal como la plasminólisis, que disocia el enlace de amida (Y-fármaco) que enlaza el fármaco al material.

10 De manera alternativa, los grupos funcionales de un fármaco (tal como el diclofenaco antagonista de la prostaglandina) se protegen con la excepción de los grupos funcionales de carboxilo. Se activan los grupos carboxilo y se acoplan a un péptido mediante la formación de un enlace de amida en el término amino del péptido. El péptido se diseñó para contener un tiol (por ejemplo, cisteína) y para que fuera de terminal carboxilo degradable para el péptido, en consecuencia en el enlace de amida que une el péptido al fármaco, mediante una enzima proteolítica que disocia la terminal carboxilo en los aminoácidos específicos (Y). Se quita la protección del fármaco y los grupos funcionales del péptido. En la formación del material, el conjugado de tiol-péptido-fármaco (fármaco-YXXXX-SH se acopla de manera covalente al material a modo de adición de conjugados del tiol sobre una insaturación conjugada en el precursor del material. El fármaco se libera a partir del material mediante la actividad enzimática que disocia el enlace de amida (fármaco-Y) que enlaza el fármaco al material.

20 **Ejemplo 13: Regeneración de Tejidos**

Formación de hueso ectópico (subcutáneo) en ratas

25 Se fabricaron los materiales esencialmente de conformidad con el Ejemplo 3, pero bajo condiciones estériles y con el PEG-3500-3A, una proporción molar de acrilatos: tioles de 1:1, y una proporción molar de GCGYGRGDSPG: acrilatos de 1/2. Al tiempo de la formación del gel, se agregó un factor de crecimiento humano recombinante, el BMP-2, el cual induce la formación de hueso, a la solución precursora a una concentración de 250 g/ml de solución precursora. Se agregó la solución precursora a las esponjas de colágeno hemostático (Helistat; 8 milímetros diámetro, aproximadamente 3.5 milímetros altura). Se agregó la solución precursora hasta que las esponjas no pudieron absorber más solución (aproximadamente 160 l). Se permitió que los geles se solidificaran en las esponjas. Se lavaron brevemente los geles con PBS, después se mantuvieron húmedos de manera mínima hasta la implantación de manera subcutánea en ratas. Se removieron los implantes después de dos semanas, se fijaron, y se mancharon con hematoxilina y eosina. Los materiales se infiltraron bien mediante células con muy poco material residual restante y formación de hueso promovida (mineralización y formación de médula ósea) y vascularización. Esto indica que los materiales pueden liberar bio-moléculas activas (por ejemplo, factores de crecimiento) y se pueden infiltrar mediante células *in vivo*.

Regeneración de hueso

40 Los materiales del hidrogel pueden ser útiles en la regeneración de hueso en una variedad de situaciones de curación, por ejemplo, después de un trauma, remoción de tumores, o fusión espinal. En un ejemplo, el material de hidrogel, por ejemplo, como se describió anteriormente, se aplica en el espacio dentro de una jaula de fusión espinal, que contiene dentro de ese material una proteína morfogenética de hueso, tal como una BMP-2, TGF- β , o BMP-7. Esta formulación bio-activa es útil para mejorar la probabilidad de la fusión espinal exitosa dentro de la jaula. El uso de un material así puede circunvenir algunas de las dificultades con los métodos quirúrgicos actuales, tales como el llenado del espacio dentro de la jaula con aloinjerto de hueso amorfo (que se asocia con la transmisión de enfermedades y el costo elevado) y el llenado del espacio con autoinjerto de hueso, por ejemplo, que se obtuvo a partir de la cresta ilíaca (que se asocia con mortalidad adicional y costos de hospital).

Regeneración de piel

50 El material de hidrogel puede ser útil en la curación y regeneración de la piel, por ejemplo, en el cierre de úlceras en el pie de diabéticos, llagas por presión, y úlceras por insuficiencia venosa. Un hidrogel, por ejemplo, como se describió anteriormente, se puede usar para liberar factores de crecimiento que mejoran el cierre de estas heridas, tales como factor de crecimiento de células endoteliales vasculares, un TGF β , activina, factor de crecimiento de queratinocito, factor de crecimiento que se deriva de la plaqueta, factor de crecimiento epidérmico, o un número de otros factores de crecimiento. Se pueden incorporar estos factores de crecimiento dentro del hidrogel ya sea mediante entrapamiento o mediante afinidad bio-específica (por ejemplo, mediante afinidad por la heparina).

60 **Ejemplo 14: Hidrogel y Materiales No de Hidrogel para Llevar Cargas Estructurales**

Materiales estructurales que se forman mediante reacciones de adición de conjugados

65 Se combinaron tetraquis(3-mercaptopropionato)(QT) de pentaeritritol (424 mgs) y 997 mgs de diacrilato de polietilenglicol 570 (PEGDA) puro y se mezclaron bien mediante someterlos a remolino. Se removieron las burbujas de aire mediante sonicación. Se agregó solución de PBS 0.01 M que se preparó a un pH de 9.0 (10 mM PBS ajustado a

un pH de 9.0 con trietanolamina (EtOH₃N) que se mezcló con un volumen igual de 10 mM PBS ajustado a un pH de 9.0 con 1N NaOH) (473 mgs) a los precursores mezclados. Se volvió a someter a remolino la mezcla durante aproximadamente 2 minutos para mezclar bien y dispersar los precursores en la solución acuosa. Después del remolino, se sonificó nuevamente la mezcla para remover las burbujas de aire. A la temperatura ambiente, el material se geló en aproximadamente 20 a 30 minutos. El gel resultante demostró una resistencia final de aproximadamente 2 MPa y aguantó deformaciones de aproximadamente 35 por ciento en compresión (Figura 8).

Control de las propiedades mecánicas mediante hidrofobia (triacrilato de pentaeritritol)

Se mezclaron QT y el triacrilato de pentaeritritol a una proporción de 489 mgs para 596 mgs (mezcla 1). Se mezclaron el QT y PEGDA 570 a la proporción que se indicó anteriormente (mezcla 2). Se combinaron 100 mgs de la mezcla 1 con 650 mgs de la solución 2 y se agregaron 250 mgs de PBS a un pH de 9.0 y la mezcla completa se sometió a remolino para mezclarla. Se prepararon geles similares para 200, 300, y 400 mgs de la mezcla 1. A estos se les agregaron 550, 450 y 350 mgs de la mezcla 2, respectivamente. A todos estos se les agregaron 250 mgs del regulador del pH activador. Los geles resultantes demostraron una modulación de las propiedades mecánicas usando la adición de un coprecursor hidrófobo. Un incremento en el contenido del TA hidrófobo incrementó la rigidez del gel resultante (Figura 9).

Variación de la proporción de tioles con acrilatos

Se combinaron el QT y PEGDA 570 puros para conseguir proporciones de tiol para acrilato de 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.3 por medio de agregar la cantidad apropiada de QT para 1000 mgs de PEGDA 570 y agregando PBS 9.0 en una cantidad para hacer geles sólidos al 75 por ciento en peso. Como un ejemplo, para la proporción de tiol de 0.8 a acrilato, se agregaron 343 mgs de QT a 1000 mgs de PEGDA. Se mezclaron los dos componentes mediante remolino y después se agregaron 448 mgs de PBS 9.0. Nuevamente se sometió a remolino la mezcla y se permitió que se gelara. A las proporciones de tiol/acrilato desde 1, los geles resultantes exhibieron decrementos significativos en la resistencia final. A las proporciones desde 1.0 a 1.3, los geles fueron menos sensibles a los cambios en la proporción de tiol/acrilato. La tabla más adelante (Tabla 8) presenta las resistencias finales que se obtuvieron en cada una de las proporciones de tiol/acrilato.

Tabla 8: Resistencias finales de los geles con diferentes proporciones de tiol/acrilato

Tiol/Acrilato	Resistencia Final
.8	0.89 ± 0.79
.9	0.64 ± 0.07
1.0	2.21 ± 0.12
1.1	2.29 ± 0.13
1.2	1.93 ± 0.24
1.3	1.82 ± 0.23

Control de propiedades mecánicas mediante la adición de partículas

Se combinaron los precursores, QT y PEGDA 570 como se describió anteriormente. Antes de la adición del regulador del pH activador (PBS a pH 9.0), se agregaron partículas de BaSO₄ al 10 por ciento en peso, fixe de equilibrio (0.8 µg), a los precursores mezclados. Se agregó el regulador del pH activador y después se sometieron a remolino las mezclas completas y después se permitió que se gelaran. Se usaron las mismas cantidades de precursores, como se anotó en el ejemplo anterior. Los geles que resultaron de la adición del BaSO₄ mostraron algún incremento en la resistencia final e incremento sustancial en la rigidez (Figuras 10 y 11). También se prepararon geles de QT y PEGDA 570 que se cargaron con partículas de sílice ahumadas (14 nm). Se combinaron 424 mgs de QT con 997 mgs de PEGDA. Antes de la adición del regulador del pH de PBS con un pH de 9.0, se cargó el regulador del pH con sílice ahumado al 10 por ciento. Se agregaron 250 mgs de la mezcla de PBS-sílice ahumado a la mezcla de QT/PEGDA y después se sometieron a remolino para mezclarlos. Los geles que resultaron a partir de la adición del sílice ahumado, mostraron incrementos significativos en la resistencia final. La Figura 12 presenta la curva de tensión esfuerzo para los geles de sílice ahumado en la compresión de sub falla. A 4 MPa en compresión, estos geles no habían fallado.

Mejoramiento de las propiedades mecánicas mediante el uso de emulsionantes

Se prepararon los geles mediante la adición de monooleato de sorbitán al regulador del pH de PBS a un pH de 9.0 a 4 por ciento en peso antes de la adición del regulador del pH a los precursores mezclados, QT y PEGDA 570. Después se agregó la mezcla de tensoactivo/regulador del pH a un pH de 9.0 a los precursores mezclados. De otra manera se usaron las mismas cantidades y procedimientos, como se notó anteriormente. Los geles resultantes exhibieron un incremento similar en la resistencia final en comparación con los geles con partículas inorgánicas que se agregaron pero sin el incremento asociado en rigidez (Figuras 10 y 11).

Preparaciones de materiales en solventes que incluyen solventes orgánicos

Se combinaron QY y PEGDA en las proporciones que se indicaron anteriormente. Estos precursores se disolvieron después al 10 por ciento en peso en pirrolidona de N-metilo (NMP) y después se permitió que se gelaran. Después de que los geles se curaron durante 24 horas, se colocaron en agua desionizada para permitir el intercambio de solventes. Durante el intercambio de solventes, se redujo el volumen de los geles en 60 por ciento a un volumen de equilibrio nuevo. Los geles equilibrados resultantes mostraron una respuesta elástica suave a la compresión a cargas bajas y un incremento en la rigidez con alta deformación en la compresión. La Figura 13 muestra un curva típica de tensión esfuerzo para este material.

Modulación de las propiedades mecánicas mediante la adición de aditivos hidrófilos

Se combinaron el QT y PEGDA 570 en las proporciones que se indicaron anteriormente. Se disolvió poli(vinil-pirrolidona) (40,000 MW) (PVP) en el regulador del pH del PBS con un pH de 9.0 al 1, 7, y 13 por ciento. Estas mismas cantidades de la mezcla precursora y la solución de regulador del pH/PVP se combinaron como se indicó anteriormente. Se sometió a remolino la mezcla y se permitió que se gelara. Estos geles demostraron la manipulación de las propiedades mecánicas debido a la adición del aditivo hidrófilo. La adición del PVP incrementó la dilatación de equilibrio del gel y un incremento en el contenido de PVP incrementó adicionalmente la dilatación. Una adición de PVP también dio como resultado un gel más suave, más débil.

Cinética de la gelación de QT y PEGDA 570

Se combinaron el Qt y PEGDA puros en las proporciones que se indicaron anteriormente. Después de mezclar el QT y PEGDA 570 mediante remolino, no se agregó regulador del pH sino que en su lugar se colocaron 100 microlitros de la mezcla entre placas de 20 milímetros de un reómetro CVO 120 con un intervalo de 100 μm a la temperatura ambiente. Las mezclas se mantuvieron a la temperatura ambiente mientras que el módulo elástico, el módulo del complejo y la viscosidad se siguieron con el tiempo que usa el corte a 1 Hz con una amplitud de esfuerzo de 0.3. Con el progreso de la reacción, los dos precursores combinados mostraron un punto de gel, que se define por el tiempo cuando el módulo elástico se hace mayor que el módulo del complejo, de aproximadamente 14 horas. La Figura 14 muestra estos dos módulos para los precursores que se combinan con el tiempo.

Después, se combinaron más de dos precursores como se describió anteriormente y se agregó el regulador del pH de PBS a un pH de 9.0, como se describió anteriormente. Después de mezclar los precursores y el regulador del pH, se colocó la mezcla entre las placas del reómetro a 37°C. La frecuencia y la amplitud fueron las mismas que en el procedimiento anterior. Con la adición del regulador del pH, la cinética de la gelación se incrementó de manera dramática. A los 37°C el punto de gelación ocurrió en aproximadamente 11 minutos. La figura 15 presenta los módulos para los precursores que se activaron con el regulador del pH con pH de 9.0.

Bio-compatibilidad de los geles en los sitios del tejido

Los precursores, QT, PEGDA 570, los reguladores del pH, y el monooleato de sorbitán se filtraron esterilizados. Se esterilizaron las partículas Blanc Fixe mediante autoclave. Se prepararon espigas de gel usando los precursores, Blanc Fixe y monooleato de sorbitán. Se prepararon otras espigas solamente los dos precursores. Las espigas de gel que se prepararon con solamente los dos precursores, se prepararon usando el mismo procedimiento que se citó anteriormente, excepto que la mezcla activada y sometida a remolino se colocó en moldes para formar espigas antes de la gelación y se prepararon las espigas de gel que contenían la partícula inorgánica y el tensoactivo por medio de combinar los procedimientos que se describieron anteriormente. Las espigas se implantaron dentro de los músculos dorsales derecho e izquierdo de conejos. También se usaron espigas de referencia de polietileno. Después de 4 semanas se realizaron las secciones histológicas de los implantes y el tejido circundante. Con los dos tipos de geles que se probaron, no hubo diferencias significativas aparentes en comparación con los materiales de referencia. Se asociaron macrófagos raros, fibroblastos y neovasos con las espigas de gel que se implantaron. No se indujo necrosis, degeneración ni ninguna otra señal de intolerancia por parte de estas composiciones de gel.

Se puede mejorar la toxicidad y la bio-compatibilidad de los precursores de peso molecular bajo por medio de hacer reaccionar previamente los precursores a cantidades que resultan en precursores de peso molecular más elevado con los grupos funcionales restantes. El QT se había funcionalizado 10 veces en exceso de PEG-DA 570. El resultado de este proceso es un acrilato tetrafuncional que consiste de cada tiol del QT que se cubre con un diacrilato que deja un acrilato terminal libre. Una reacción similar con el QT en exceso da una clavija que se cubre en cada extremo con tres tioles libres que dan un tiol hexafuncional. La combinación de estos precursores con una proporción 1:1 de tiol a acrilato, da geles similares como los que se obtuvieron mediante la aplicación directa del QT y PEGDA 570 (refiérase a las Figuras 10 y 11, que anotan los valores de HT y QA).

Control de las propiedades mecánicas mediante la preparación de los materiales a partir de los precursores de peso molecular mezclado

- 5 Los sistemas reticulados de polímero funcional final han mostrado que las propiedades mecánicas se pueden manipular mediante el uso de distribuciones de peso molecular de múltiples modos. Al incluir un contenido molar bajo de un precursor de peso molecular elevado en un sistema de peso molecular bajo, tiene un efecto sinérgico que da propiedades mecánicas mejoradas que se pueden conseguir mediante cualesquiera de los pesos moleculares solos. Las redes que contienen solamente cadenas cortas son quebradizas y las redes que contienen solamente el componente más grande tienen una resistencia final muy baja. Mientras tanto, los sistemas de modo doble que tienen predominantemente las cadenas pequeñas con una proporción molar pequeña del componente más grande, muestran redes con una resistencia final elevada en comparación con el sistema de peso molecular más grande y con extensibilidad mejorada en comparación con el sistema de un solo modo de cadena corta (Pathak, supra, Llorente, M.A. y colaboradores, J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed., 19:621, 1981)
- 10
- 15 El contenido molar bajo de un precursor de peso molecular más grande (es decir, PEGDA 20,000 o PEVAL 20,000) puede reemplazar algo del PEGDA 570, lo que crea un sistema de dos modos. Se pueden combinar los tres sistemas precursores (es decir, QT, PEGDA 570 y PEGDA 20,000) en un sistema acuoso a un pH que proporciona suficiente cinética de reacción. Los resultados son geles más fuertes. El equilibrio hidrófilo/ hidrófobo de este tercero (precursor de peso molecular más grande) también se puede aprovechar para propiedades moduladas adicionales.
- 20

Ejemplo 15: Preparación de Materiales que Responden a las Condiciones Ambientales**Sensibilidad a la temperatura de los precursores**

- 25 Si los precursores son sensibles a la temperatura (es decir, solubles por debajo a la temperatura crítica por debajo de los 37°C e insoluble por arriba de la misma temperatura) pero que todavía poseen grupos no saturados de tiol o conjugados, se pueden usar para preparar geles con manipulación sencilla durante el mezclado, pero muestran las propiedades incrementadas que exhibieron los geles que se obtuvieron con los precursores hidrófobos. Para este propósito, se pueden usar grupos funcionales ya sea telequémico o injertados sobre poli(N-isopropilacrilamida), poli(propilenglicol-co-etilenglicol), u otros polímeros sensibles a la temperatura. Los precursores se pueden disolver en agua a una temperatura por debajo de la temperatura crítica. Las soluciones precursoras se pueden combinar y se permite que se gelen. Si el gel experimenta un incremento en la temperatura por arriba de la temperatura crítica, entonces el gel experimentará una transición a un estado más hidrófobo. La transición puede o no puede asociarse con la sinéresis dependiendo del diseño de los precursores sensibles a la temperatura y las concentraciones originales.
- 30
- 35

Sensibilidad al pH de los precursores

- 40 Si los precursores son sensibles al pH (es decir, solubles por arriba o por debajo de un pH crítico) pero todavía poseen tiol o grupos no saturados conjugados, se pueden usar para preparar geles con manipulación sencilla durante el mezclado pero muestran las propiedades mejoradas que exhibieron los geles que se obtuvieron con los precursores hidrófobos. Para este propósito se pueden usar grupos funcionales ya sea telequémicos o injertados sobre poli(N-isopropilacrilamida-co ácido acrílico), poli(N-isopropil-acrilamida-co dimetilamino-metacrilato) o poli(ácido acrílico), u otros polímeros sensibles al pH. Se puede alterar la solubilidad de estos materiales mediante el pH. Las soluciones precursoras se pueden combinar y se permite que se gelen. Un cambio de pH en el medio ambiente, cambia la hidrofobicidad del gel por medio de protonar o desprotonar el gel. La transición se puede o no se puede asociar con la sinéresis, dependiendo del diseño de los precursores sensibles al pH y las concentraciones originales.
- 45

Otras modalidades

- 50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eidgenoessische Technische Hochschule Zuerich

<110> Universitaet Zuerich

- 55 <120> BIO-MATERIALES FORMADOS POR REACCIÓN DE ADICIÓN NUCLEÓFILA A GRUPOS INSATURADOS CONJUGADOS

<130> K53353_8

- 60 <140> PCT/US00/02608
<141> 2000-02-01

- 65 <150> 60/118,093
<151> 1999-02-01

<160> 74

5 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>

<223> Based on Homo sapiens

15 <221> VARIANT
 <222> (1)...(10)

<223> Xaa=any amino acid except Cys

20 <400> 1

Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Tyr
 1 5 10

25 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

30 <223> Based on Homo sapiens

<221> VARIANT
 <222> (1)...(8)
 <223> Xaa=any amino acid except Cys

35 <400> 2

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5

40 <210> 3
 <211> 6

<212> PRT

45 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Based on Homo sapiens

50 <221> VARIANT
 <222> (1)...(6)
 <223> Xaa=any amino acid except Cys

<400> 3

55 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT

60

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 5
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa=any amino acid except Cys
 10 <400> 4
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(7)
 <223> Xaa=any amino acid except Cys
 25 <400> 5
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5
 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <221> VARIANT
 <222> (2)...(6)
 <223> Xaa=any amino acid except Cys or Tyr
 <221> VARIANT
 <222> (8)...(12)
 <223> Xaa=any amino acid except Cys or Tyr
 <221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa=acetylated Tyrosine
 50 <400> 6
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <221> VARIANT

<223> Based on Homo sapiens
 <400> 1
 5 Gly Phe Arg His Arg His
 1 5
 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 15 <400> 13
 Gly Tyr Arg Ala Arg Pro
 1 5
 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 25 <400> 14
 Tyr Gln Lys Asn Asn Lys
 1 5
 30 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 15
 40 Leu Ile Lys Met Lys Pro
 1 5
 <210> 16
 <211> 6
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 50 <400> 16
 Asn Phe Lys Ser Gln Leu
 1 5
 55 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

<223> Based on Homo sapiens
 <400> 17
 5 Glu Trp Lys Ala Leu Thr
 1 5
 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 15 <400> 18
 Ser Tyr Lys Met Ala Asp
 1 5
 <210> 19
 20 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 19
 Thr Gln Lys Lys Val Glu
 30 1 5
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 40 <400> 20
 Arg Gln Lys Gln Val Lys
 1 5
 <210> 21
 45 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 50 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 21
 Gln Val Lys Asp Asn Glu
 1 5
 55 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 22
 5 Leu Ile Lys Ala Ile Gln
 1 5
 <210> 23
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 15 <400> 23
 Thr Leu Lys Ser Arg Lys
 1 5
 20 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 24
 Ser Arg Lys Met Leu Glu
 30 1 5
 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens, Bos taurus and Gallus gallus
 40 <400> 25
 Pro Gln Gly Ile Ala Gly
 1 5
 45 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 26
 50 Pro Gln Gly Leu Leu Gly
 1 5
 <210> 27
 <211> 6
 55 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <400> 27

Pro Gln Gly Ile Leu Gly
 1 5
 <210> 28
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Gallus gallus and Homo sapiens
 10 <400> 28
 Pro Gln Gly Leu Ala Gly
 1 5
 15 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 29
 Pro Leu Gly Ile Ala Gly
 1 5
 25 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Pro Leu Gly Leu Trp Ala
 30 1 5
 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 40 1 5
 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 32
 50 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5
 <210> 33
 <211> 8
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

<400> 33
 Gly Pro Val Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5
 5
 <210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 34
 15
 Gly Pro Gln Gly Val Ala Gly Gln
 1 5
 <210> 35
 <211> 8
 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 25
 <400> 35
 Gly Pro Gln Gly Arg Ala Gly Gln
 1 5
 30
 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 36
 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Ser Gln
 1 5
 40
 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 45
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 50
 <400> 37
 Gly Pro Gln Gly Ile Phe Gly Gln
 1 5
 55
 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 60
 <223> Based on Homo sapiens

<400> 38
 Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln
 1 5

5 <210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

<400> 39

15 Arg Gly Asp Ser
 1

<210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Based on Homo sapiens

25 <400> 40

Arg Glu Asp Val
 1

30 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 35 <223> Based on Homo sapiens

<400> 41

Arg Gly Asp Val
 1

40 <210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

<400> 42

50 Leu Arg Gly Asp Asn
 1 5

<210> 43
 <211> 5
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Based on Homo sapiens

60 <400> 43

Ile Lys Val Ala Val
 1 5
 5 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 44
 Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5
 15 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 45
 25 Pro Asp Ser Gly Arg
 1 5
 30 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 35 <400> 46
 Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ala
 1 5 10
 40 <210> 47
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 47
 Arg Gly Asp Thr
 1
 50 <210> 48
 <211> 4
 <212> PRT
 55 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 60 <400> 48

Asp Gly Glu Ala
 1
 5 <210> 49
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> Based on Homo sapiens
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(4)
 <223> Xaa=any amino acid
 15 <400> 49
 Val Thr Xaa Gly
 1
 20 <210> 50
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <221> VARIANT
 <222> 1,4,6
 30 <223> Xaa=Met, Leu, Ala, Ile, Val, Phe, or Pro
 <221> VARIANT
 <222> 2,3,5
 <223> Xaa=Arg or Lys
 35 <400> 50
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 40 <210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 51
 Pro Arg Arg Ala Arg Val
 1 5
 50 <210> 52
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 55 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 <400> 52
 60

ES 2 368 988 T3

Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
1 5 10 15
Pro Gly Val

<210> 53
<211> 28
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Based on Homo sapiens
10 <400> 53

Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys Gln Arg Phe Arg His Arg Asn Arg Lys
1 5 10 15
Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg Gly Arg
20 25

15 <210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Based on Homo sapiens

<400> 54

Arg Ile Gln Asn Leu Leu Lys Ile Thr Asn Leu Arg Ile Lys Phe Val
1 5 10 15
25 Lys

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Based on Homo sapiens

35 <221> MOD_RES
<222> 2
<223> Xaa=bAla

<400> 55
Lys Xaa Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala
1 5 10

40 <210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Based on Homo sapiens

<400> 56

50 Lys His Lys Gly Arg Asp Val Ile Leu Lys Lys Asp Val Arg
1 5 10

<210> 57
<211> 8

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> Based on Homo sapiens

 <400> 57

 Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu
 1 5
 10
 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

 <400> 58
 20
 Gly Cys Tyr Lys Asn Arg Asp Cys Gly
 1 5

 <210> 59
 <211> 16
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Based on Homo sapiens
 30
 <400> 59

 Gly Cys Asp Asp Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Asp Asp Cys Gly
 1 5 10 15
 35
 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

 <400> 60

 Gly Cys Arg Asp Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Asp Arg Cys Gly
 1 5 10 15
 45
 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

 <400> 61

 Gly Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly
 1 5 10
 60
 <210> 62
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> Based on Homo sapiens

 <221> MOD_RES
 <222> (1)...(10)
 <223> Xaa at position 1 is acetylated Gly. Xaa at position 10 is amidated proline.
 10
 <400> 62

 Xaa Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Xaa
 1 5 10

 15 <210> 63
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 20 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

 <400> 63

 Gly Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly
 25 1 5 10

 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

 35 <400> 64

 Gly Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser
 1 5

 40 <210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 45 <223> Based on Homo sapiens

 <400> 65
 Gly Lys Lys Lys Lys Gly Cys Tyr Lys Asn Arg Asp Cys Gly
 1 5 10

 50 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 55 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

 <221> VARIANT
 <222> (1)...(9)
 60 <223> Xaa at position 4 is D-Lys. Xaa at position 6 is D-Arg.

<400> 66

Gly Cys Tyr Xaa Asn Xaa Asp Cys Gly
 1 5

5 <210> 67
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

<400> 67

Gly Cys Cys Gly His His His His His Gly Cys Cys Gly

15 1 5 10

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

25 <400> 68

Gly Cys Tyr Lys Asn Arg Asp Cys Gly
 1 5

30 <210> 69
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> Based on Homo sapiens

<400> 69

```

*****
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1                    5                    10                    15
Arg Gly Ser His Met Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Arg Ser Arg Lys
      20                    25                    30
Leu Pro Val Glu Leu Glu Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly
      35                    40                    45
Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr
      50                    55                    60
Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val
      65                    70                    75                    80
Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys
      85                    90                    95
Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys
      100                    105                    110
His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu
      115                    120                    125
Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr
      130                    135                    140
Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg
      145                    150                    155
    
```

ES 2 368 988 T3

5 <210> 70
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Based on Homo sapiens

10 <400> 70

```

gaattcccat ggcatatgaa gacccgaaac gtctgtaccg ttctctgtaa ctgcccgtgg      60
aactcgagag ctcttcccac ccgattttcc atcgtggcga gttctccgtg tgtgactctg      120
tctgtatggg taggcgataa aaccactgcc actgatatca aaggcaaaga ggtgatggtg      180
ctgggagaag taaacattaa caactctgta ttcaaacagt acttcttctga aactaagtgc      240
cgtgaccoga acccggtaga ctctgggtgt cgcggcatcg attctaaaca ctggaactct      300
tactgcacca ctactcacac ttctgttaaa gcgttgacta tggatggtaa acaggctgcc      360
  
```

```

tggcgtttca tccgtatcga tactgcatgc gtgtgtgtac tgtcccgtaa agctgttcgt      420
taaggatcc                                     429
  
```

15 <210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Based on Homo sapiens

20 <221> MOD_RES
 <222> 5
 <223> Xaa=bAla

<400> 71

```

Gly Cys Gly Lys Xaa Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys
 1           5           10           15
Ala
  
```

30 <210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Based on Homo sapiens

40 <221> VARIANT
 <222> (1)...(5)
 <223> Xaa at position 1 is any amino acid containing or modified with a thiol group. Xaa at positions 2, 3, and 4 is any amino acid. Xaa at position 5 is any amino acid modified with a drug.

45 <400> 72

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1           5
  
```

50 <210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> based on Homo sapiens

5 <400> 73
Gly Lys Lys Lys Lys
1 5

10 <210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> based on Homo sapiens

<400> 74
Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para hacer un biomaterial, que comprende dicho método combinar un primer componente precursor que comprende al menos dos neoclófilos con un segundo componente precursor que comprende al menos dos enlaces insaturados o al menos dos grupos insaturados conjugados bajo condiciones que permiten la polimerización dichos primero y segundo componente precursor, para formar dicho bio-material a través de una reacción auto selectiva entre un neoclófilo fuerte y un enlace insaturado conjugado o un grupo insaturado conjugado, por adición nucleófila, y en donde dicho biomaterial no comprende albúmina sin procesar, y dicho enlace o grupo insaturado no es una maleimida o una vinil sulfona.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde dichos componentes son seleccionados del grupo que consiste en oligómeros, polímeros, proteínas o péptidos bio-sintéticos, péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, péptidos o proteínas que ocurren naturalmente procesados, y polisacáridos.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, donde dicho nucleófilo fuerte es seleccionado del grupo que consiste en un tiol o un grupo que contiene un tiol.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nucleófilo fuerte es es un amino.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, donde dicho grupo insaturado conjugado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio, preferiblemente 2- ó 4-vinilpiridinio.
6. El método de la reivindicación 2, donde dicho polímero es seleccionado del grupo que consiste en copolímeros en bloques de poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(etilen-co-alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-ácido acrílico), poli(etil-oxazolina), poli(vinilpirrolidona), poli(etilen-co-vinilpirro-lidona), poli(ácido maleico), poli(etilen-co-ácido maleico), poli(acrilamida), y poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de propileno).
- 30 7. El método de la reivindicación 1, donde uno de dichos componentes tiene una funcionalidad de al menos tres.
8. El método de la reivindicación 2, donde dicho péptido comprende un sitio de adhesión, sitio de enlace de factor de crecimiento, o sitio de enlace de proteasa.
- 35 9. El método de la reivindicación 1, comprendiendo además la combinación de dichos componentes precursores con una molécula que comprende un sitio de adhesión, un sitio de enlace de factor de crecimiento, o un sitio de enlace de heparina, y también comprende ya sea un nucleófilo fuerte o un enlace insaturado conjugado o un grupo insaturado conjugado.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, donde dicho nucleófilo fuerte es un tiol o dicho enlace insaturado conjugado o grupo insaturado conjugado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinil piridinio.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, donde dicho bio-material es un hidrogel.
12. El método de la reivindicación 1, donde dicho bio-material es degradable.
13. El método de la reivindicación 1, donde dicho bio-material es hecho en presencia de moléculas biológicas sensibles..
- 50 14. El método de la reivindicación 1, donde dicho bio-material es hecho en presencia de células o tejidos.
15. El método de la reivindicación 1, donde se incorporara una sustancia terapéutica a dicho biomaterial
- 55 16. El método de la reivindicación 1, comprendiendo además combinar dichos componentes precursores con un acelerador antes de la polimerización.
17. El método de la reivindicación 1, comprendiendo además mezclar dichos componentes precursores con un componente que comprende al menos un enlace insaturado conjugado o grupo insaturado conjugado y al menos un grupo reactivo amina.
- 60 18. El método de la reivindicación 14, comprendiendo además aplicar un componente adicional a la célula o superficie de tejido, el componente adicional comprendiendo al menos un enlace insaturado conjugado o grupo insaturado conjugado y al menos un grupo reactivo amina.
- 65 19. Un biomaterial obtenible por un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

20. The biomaterial of claim 19, wherein said therapeutic substance is selected from the group consisting of proteins, naturally occurring or synthetic organic molecules, viral particles, and nucleic acid molecules.
- 5 El biomaterial de la reivindicación 19, donde dicha sustancia terapéutica es seleccionada del grupo que consiste proteínas o moléculas sintéticas orgánicas que ocurren naturalmente, partículas virales y moléculas ácido nucleicas.
21. El método de la reivindicación 20, donde dicha sustancia terapéutica es un pro-fármaco.
- 10 22. El método de la reivindicación 20, donde dicha molécula de ácido nucleico es ADN o ARN.
23. El método de la reivindicación 20, donde dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico anti-sentido.
- 15 24. Un andamiaje apropiado para regenerar un tejido, dicho andamiaje comprende un biomaterial tal como el reivindicado en la reivindicación 19.
- 20 25. El andamiaje de la reivindicación 24, donde dicho andamiaje ha sido pre sembrado con células.
26. El método de la reivindicación 24, donde dicho tejido es seleccionado del grupo que consiste en hueso, piel, nervio, vasos sanguíneos y cartilago.
- 25 27. El uso de los componentes biomateriales de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 para la preparación de un material medicinal para prevenir adhesiones, trombosis or restenosis.
28. El uso de los componentes biomateriales de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 para la preparación de un material medicinal para sellar fugas en el tejido que aisla fluido en fase de gas o líquido que contiene cavidades.
- 30 29. El uso según la reivindicación 28, en donde dicho fluido líquido o flujo de gas es un líquido o flujo de gas en un pulmón, vaso sanguíneo, piel, barrera dura e intestino.
30. El uso de los componentes de biomaterial de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 para preparar un material medicinal para la encapsulación de una célula o tejido.
- 35 31. El uso de los componentes de material biológico de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 para preparar un material medicinal para los dispositivos de administración de fármacos.
- 40 32. El uso de la reivindicación 31, en el que el fármaco contenido en el dispositivo de administración del fármaco es una proteína, un fármaco sintético o material genético.
33. El uso de los componentes de material biológico de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 para preparar un material medicinal para un implante inyectable en el cuerpo.
- 45 34. Una combinación de dos o más componentes precursores para la formación del biomaterial tal y como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23.
35. La combinación de la reivindicación 34, en la que dos o más componentes precursores se presentan en un estado seco.
- 50 36. La combinación de la reivindicación 35, en donde al menos uno de dichos componentes precursores se añade a los componentes de amortiguación de tal manera que cuando dos o más componentes precursores se mezclan y se disuelven en agua, fluidos salinos o fisiológicos se forma una solución a un pH de tal manera que ocurre una reacción de los dos o más componentes precursores.
- 55 37. La combinación de la reivindicación 34, en el que dos o más componentes precursors se proporcionan en forma de soluciones, las soluciones se formulan en los sistemas de solvencia y de amortiguación de tal manera que cuando las soluciones se mezclan el pH y las concentraciones obtenidas son adecuadas para que proceda la reacción de los componentes precursores.

FIGURA 1

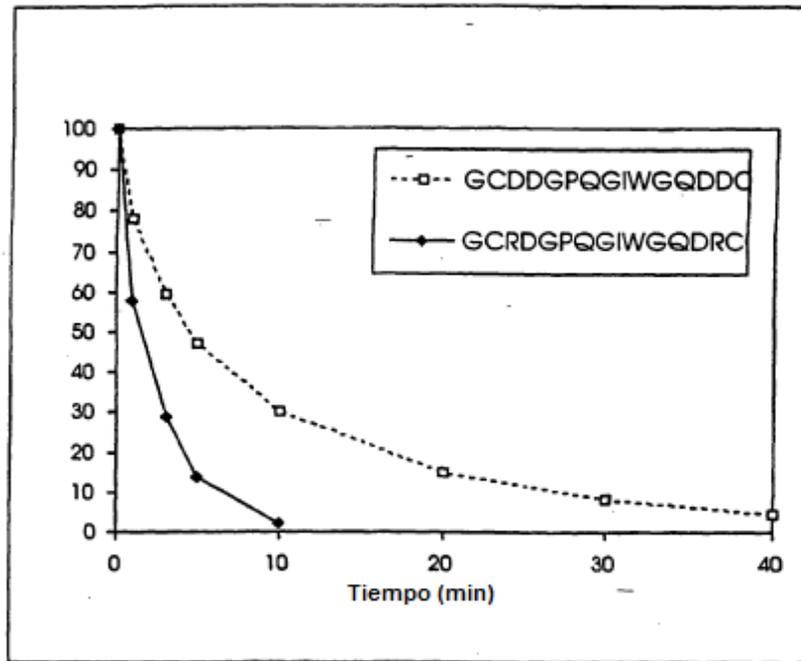


Figura 2

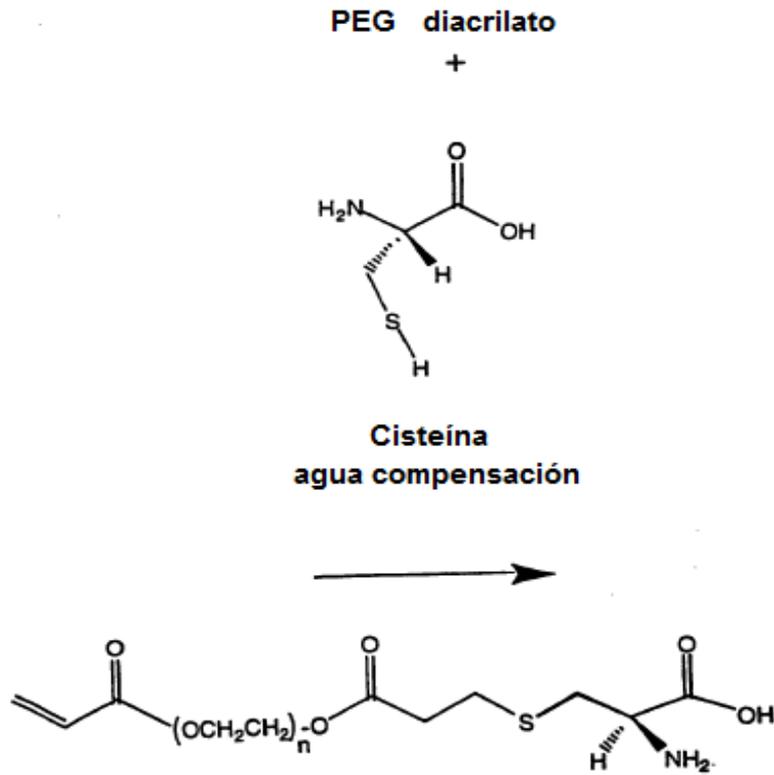


Figura 3

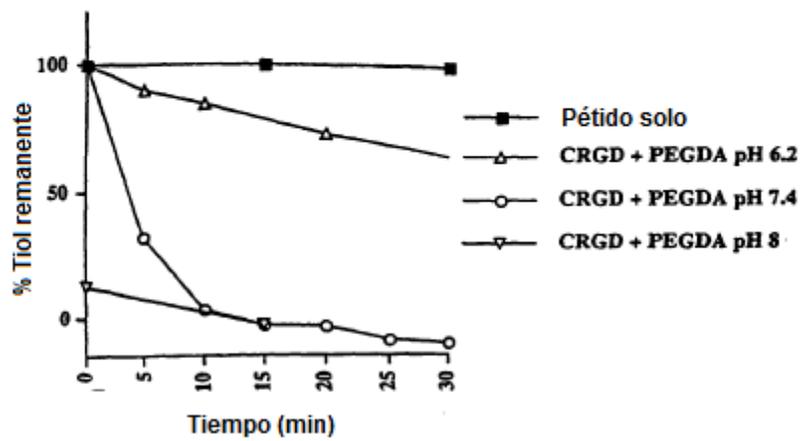


Figura 4

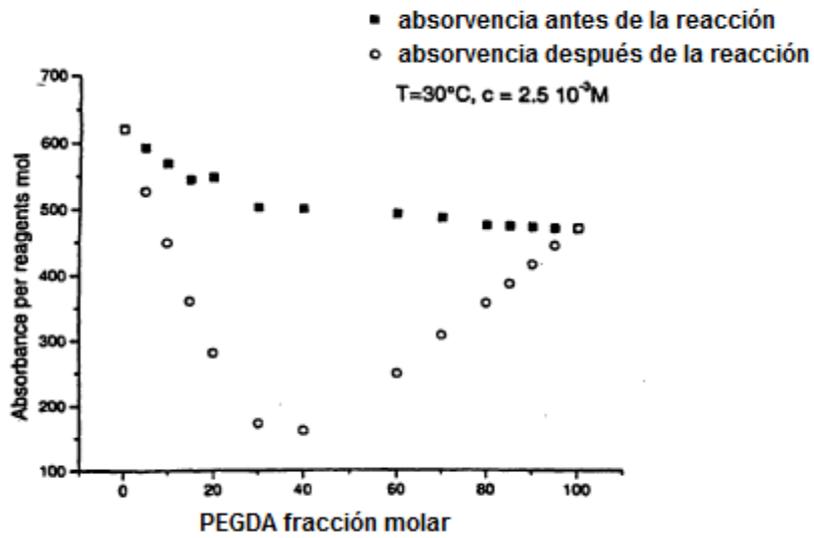


Figura 5

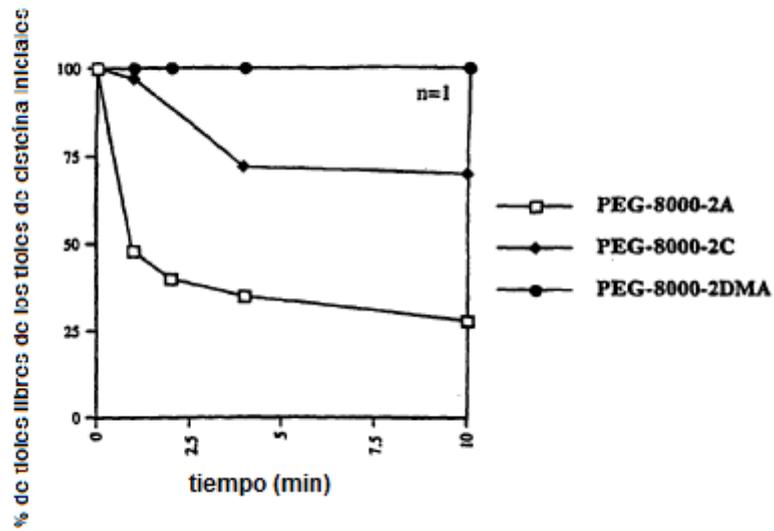


Figura 6

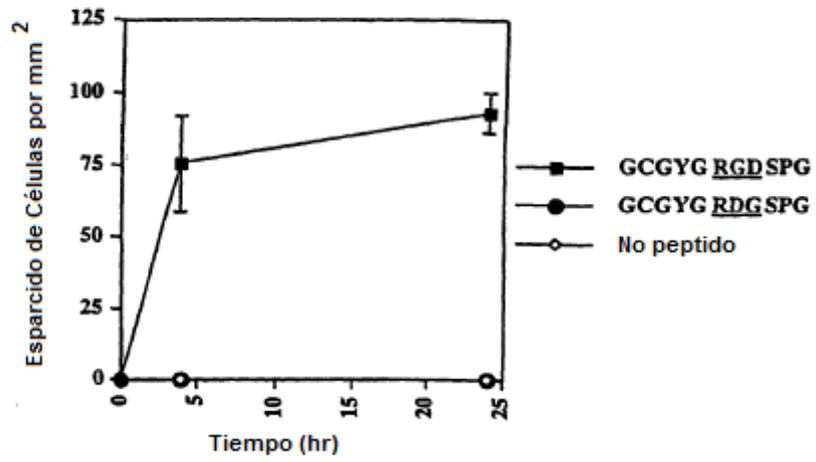


Figura 7

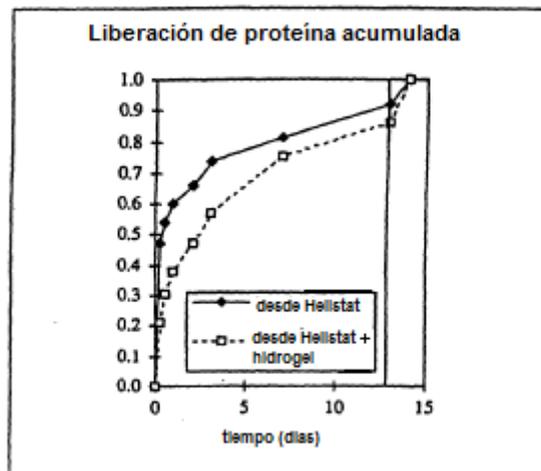


Figura 8

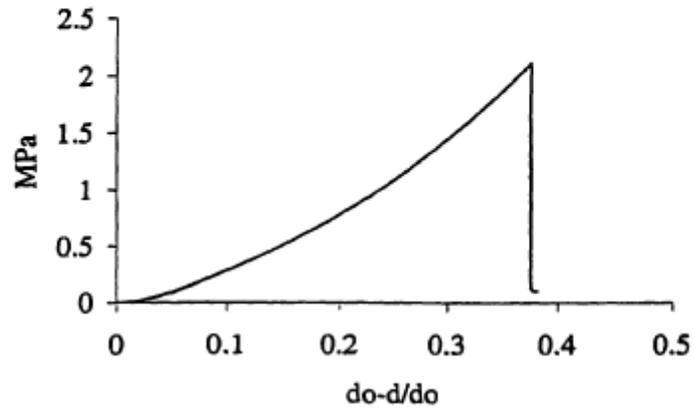


Figura 9

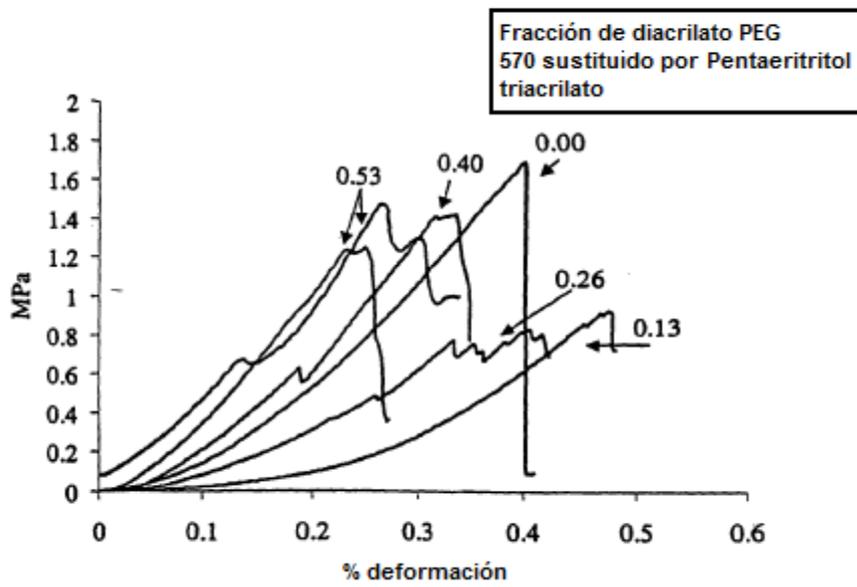


Figura 10

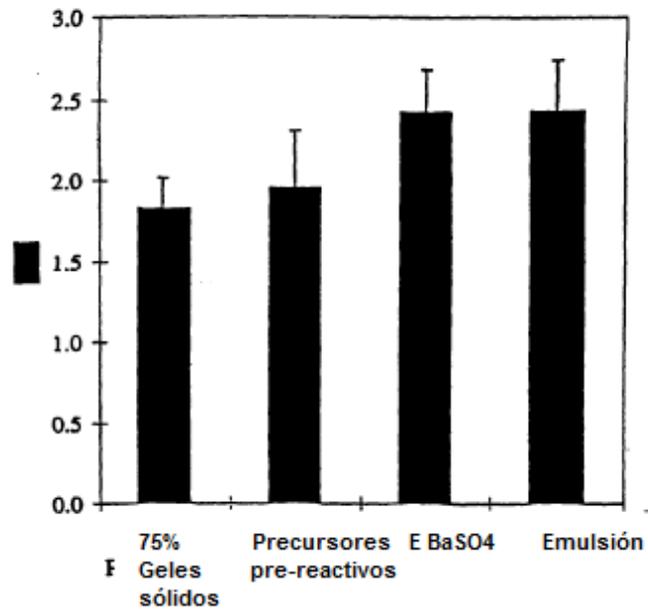


Figura 11

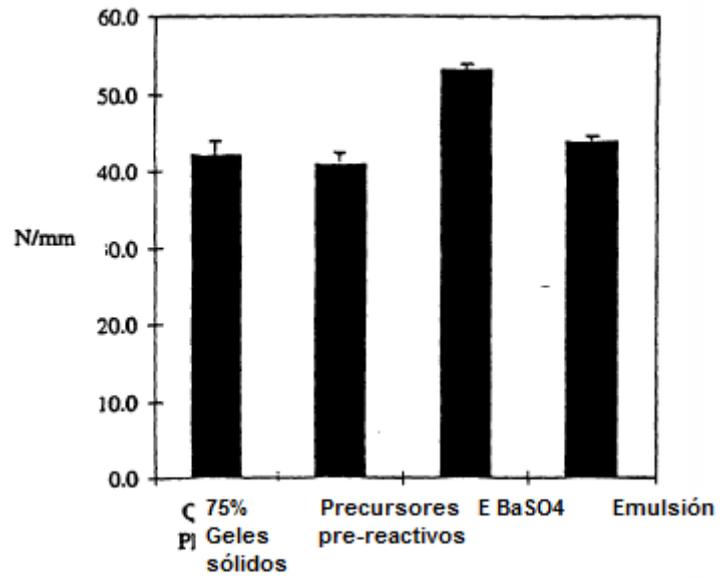


Figura 12

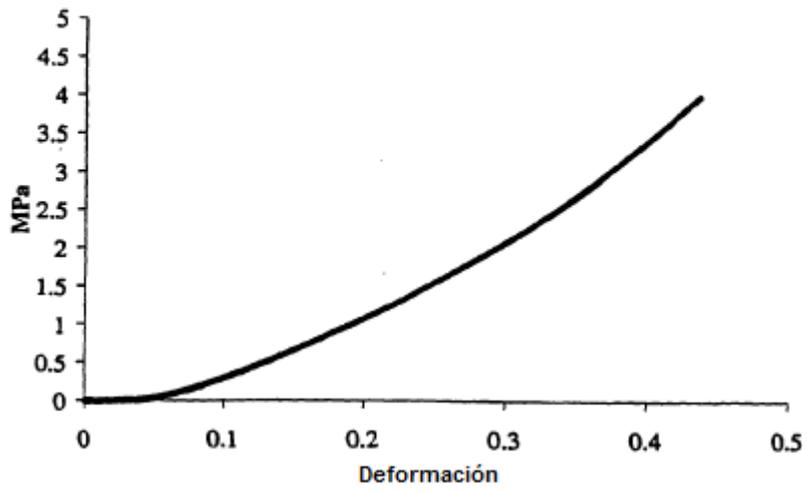


Figura 13

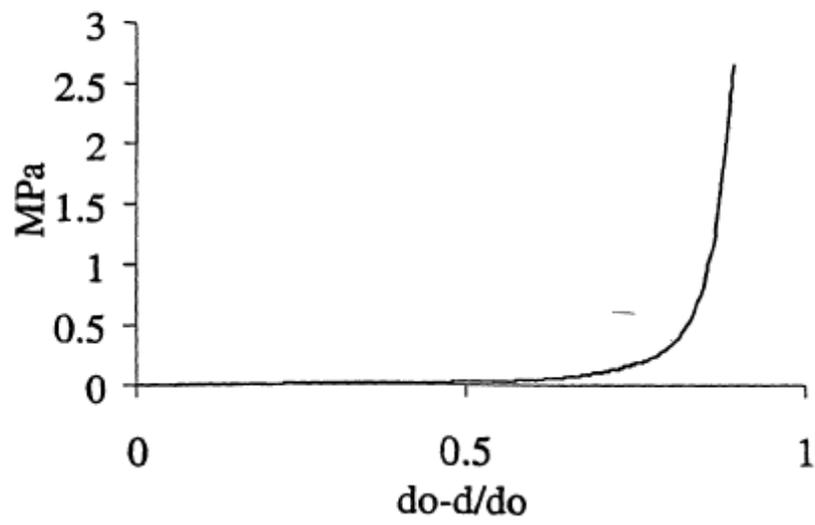


Figura 14

