



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 371 501**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 9/14 (2006.01)
A61P 17/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08075902 .0**
96 Fecha de presentación : **05.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2047866**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

54 Título: **Tejidos de unión y proteínas de reticulación con compuestos de naftalimida.**

30 Prioridad: **05.11.2003 US 517618 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es: **PHOTOBIO MED CORPORATION**
2454 Walnut Ridge Street
Dallas, Texas 75229, US

72 Inventor/es: **Utecht, Ronald E.;**
Kloster, Kaia L.;
Judy, Millard M.;
Vaska, Kevin J. y
Matthews, James L.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 501 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

Tejidos de unión y proteínas de reticulación con compuestos de naftalimida.

5 Antecedentes

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU., número de serie 60/517.618, titulada “*Tejidos de unión y proteínas de reticulación con compuestos de naftalimida*” presentada el 5 de noviembre de 2003, teniendo a Ronald E. Utecht, Kaia L. Kloster, Millard M. Judy, Kevin J. Vaska, y James L. Matthews, como
10 inventor(es).

La presente invención se refiere a compuestos naftalimida y a su uso en unión de tejidos y reticulación proteica. Esta invención se refiere también a la reparación arterial, la conservación de diámetros lumbales internos ampliados y la administración local de fármacos, materiales para el cuidado de la piel, protectores solares y cosméticos.
15

El cierre de heridas en los tejidos del cuerpo manteniendo bajos niveles de inflamación con la resultante formación de granuloma y alcanzando permeabilidad contra fugas a través de las paredes de las estructuras lumbales, tales como vasos sanguíneos, sigue siendo un problema importante en la práctica quirúrgica y de traumatología. Las prácticas actuales de cierre con participación de suturas o dispositivos mecánicos, tales como clips, grapas o clavos, tienen como
20 resultado la introducción de materiales extraños, que son fuente de reacciones de cuerpo extraño y de inflamación, y la formación de agujeros a través de paredes lumbales por el agente de cierre, que sirven como posibles vías de pérdida de líquido postoperatoria y de pérdida de la permeabilidad luminal.

Desde el catgut a los polímeros sintéticos, las suturas han sido la herramienta tradicional para la reparación vascular. Sin embargo, se pueden formar fístulas y granulomas como resultado de la intolerancia al material de sutura. Las técnicas de sutura también pueden dar como resultado luces residuales más pequeñas y reducción de la perfusión. Estos efectos secundarios pueden conducir a necrosis, trastornos de la cicatrización y, en última instancia, a dehiscencias en la herida. Además, las fugas por los puntos de punción con la aguja pueden suponer un problema, especialmente en aplicaciones cerebrales o en pacientes con problemas para lograr la hemostasia (es decir, hemofílicos o pacientes
30 sometidos a terapia anticoagulante). Por último, las técnicas de sutura son tediosas y lentas, y requieren un esfuerzo concertado por parte del cirujano, lo que contribuye a los gastos generales.

Se han propuesto accesorios mecánicos, como grapas y clip vasculares, para facilitar la reparación de tejidos. Aunque sí acortan los tiempos de operación, los gastos asociados y el potencial riesgo de fallo del clip plantean
35 preguntas con respecto a sus beneficios sobre las suturas. Además, algunas grapas tienen que extraerse y pueden estar asociadas con mayores molestias para el paciente.

Experimentos de soldadura tisular con láser térmico han dado cuenta de resultados mixtos en la consecución de unir tejidos. Se han intentado numerosas longitudes de onda infrarrojas, incluidas las de los láseres de Nd:YAG, argón y CO₂. La soldadura láser ha demostrado ser una metodología exigente, en la que una exposición insuficiente da lugar a una unión ineficaz de los tejidos y las altas temperaturas están asociadas con la destrucción del tejido. De hecho, la necesaria desnaturalización de las proteínas (con temperaturas en el tejido en el intervalo de 60-80°C) y los daños térmicos colaterales parecen ser los principales factores limitantes para esta técnica.
40

La inflamación derivada del material extraño por los agentes de cierre de heridas puede dar lugar a, por ejemplo, cicatrización suficiente como para obstaculizar seriamente su función, tal como imponiendo una barrera para el flujo de sangre laminar en un vaso sanguíneo que posiblemente conduzca a la formación de coágulos y a complicaciones posteriores, o degradando los efectos deseados de los cosméticos en la cirugía plástica o de reparación de traumatismos de la piel.
45

Los adhesivos tisulares que comprenden especies de proteínas, polímeros sintéticos y materiales biológicos se han recomendado para la reparación de heridas con el fin de eliminar o reducir al mínimo los efectos mecánicos o de cuerpo extraño. Los sistemas basados en proteínas, tales como soluciones y aerosoles de fibrina, ofrecen hemostasia, pero poco con respecto a la resistencia manteniendo las superficies opuestas juntas. Pegamentos poliméricos sintéticos, tales como polilactatos y poliglicolatos, ofrecen resistencia mecánica, pero sus productos de unión química en el tejido
50 son tóxicos e inflamatorios. Los cementos acrílicos ofrecen resistencia, pero se limitan a uso externo en las heridas de la piel, porque son tóxicos y, como película, impiden la migración de especies moleculares y celulares a través de superficies unidas. Se han usado adhesivos tisulares que incorporan agentes de reticulación de proteínas a base de aldehídos, tal como BioGlue™. Sin embargo, la difusión de largo plazo de las especies de aldehído alejándose del sitio de la unión conduce a la inflamación perjudicial y a la formación de granuloma.
60

También se conoce el concepto de “parche”. Diversos procedimientos de reparación vascular, particularmente el cierre por endarterectomía carótida, han utilizado numerosos materiales de parche. Es importante tener en cuenta que este tipo de parches requiere que estén perfectamente adaptados y extensa sutura para reparar el sitio de la lesión. Sin embargo, hay algunos beneficios asociados. El uso de un parche ayuda a evitar la estenosis residual y disminuye la probabilidad de reestenosis. Además, un parche facilita el cierre en estas condiciones difíciles y sufre menos trombosis perioperatoria. El tamaño y la forma del parche son importantes para el éxito a largo plazo. Un parche que es demasiado grande puede conducir a aumentos en la tensión parietal y, en última instancia, a dilatación o rotura. Grandes
65

ES 2 371 501 T3

desviaciones del tamaño nativo del lumen también pueden conducir a aumentos en la turbulencia del flujo sanguíneo, a menudo asociados con tasas de cizalladura bajas y la progresión del proceso aterosclerótico en las arterias que están predispuestas. La experiencia sugiere que un parche de panhandle largo, con extremos más pequeños sirve mejor que un parche ovalado para maximizar los beneficios y evitar posibles riesgos.

Lo que se necesita es un procedimiento para aplicar un parche sobre una lesión arterial que logre competencia estructural y hemostasia sin fugas de sangre a través de la pared luminal y del parche, crecimiento de tejido granulomatoso en el lumen del vaso, disminución del área de luminal debido a la reacción de cuerpo extraño e inicio de formación de coágulos intraluminales.

La tecnología anterior de unión de tejidos usando reticulación biomolecular con 4-amino-1,8-naftalimida ha logrado con éxito el cierre de tejido sin producir reacciones inflamatorias ni penetración por objetos extraños. (Las patentes de EE.UU. números 5,235,045; 5,565,551; 5,766,600; 5,917,045; y 6,410,505. Esta tecnología de unión de tejidos requiere la aplicación de luz con una longitud de onda dentro del espectro de absorción de 400-500 nm (luz azul) a la fotoquímica en las superficies de tejidos o biomateriales a fin de iniciar el proceso de unión fotoquímica. La reducción al mínimo de los requisitos de luz facilitaría la facilidad de uso para los médicos.

Por lo tanto, lo que también se necesita es un medio para unir dos superficies de tejido o una superficie de tejido a un biomaterial compatible para efectuar el cierre de heridas que no introduzca un material que induzca una reacción inflamatoria o ponga en peligro la integridad estructural de una pared luminal. Lo que se necesita además es un medio de fijación de dos superficies de tejido o una superficie de tejido y un biomaterial compatible que no requiera la aplicación directa de la luz a las superficies de tejidos que se están uniendo.

También existen preocupaciones sobre el mantenimiento a largo plazo de la luz arterial abierta después de la dilatación con globo durante la angioplastia coronaria transluminal percutánea ("PTCA"), que está limitada por procesos que conducen a re-oclusión en 3 a 6 meses. La PTCA ha sido una de las modalidades de tratamiento primario de revascularización de estenosis arteriales. Sin embargo, dos aspectos de la PTCA han motivado a los cardiólogos a buscar métodos alternativos de tratar la estenosis coronaria. (1) Las complicaciones isquémicas agudas relacionadas con lesiones en los vasos y el propio procedimiento PTCA, y (2) la aparición de reestenosis tardías o la recurrencia del cierre del sitio tratado.

La aparición de reestenosis, o la recurrencia del cierre del vaso dilatado en los 3-6 meses de tratamiento, es el principal problema producido por el tratamiento de PTCA y parece estar relacionada con una lesión vascular. Los daños en la pared del vaso pueden conducir a la administración de factores trombogénicos, quimiotácticos y factores de crecimiento. La denudación endotelial estimula la agregación de las plaquetas, la formación de trombos y la activación de los macrófagos, linfocitos y células de músculo liso. Las plaquetas activadas liberan mitógenos adicionales, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF"), el factor de crecimiento del fibroblasto ("FGF") y el factor de crecimiento epidérmico ("EGF"). Otro factor que contribuye a la pérdida de diámetro luminal es el proceso pasivo de rebobinado elástico. La naturaleza elástica de la vasculatura estimula el retorno a sus dimensiones originales y puede representar una pérdida significativa de ganancia de diámetro inicial. La excesiva respuesta reparadora, agravada por el rebobinado elástico, puede convertirse en oclusiva en sí misma, propagando la recurrencia sintomática, incluyendo la angina de pecho y la isquemia del miocardio. Alteraciones en reología local, tales como la turbulencia y elevados tensiones de cizalladura, también se han asociado con el proceso de reestenosis.

Una disminución significativa en los números y las tasas de re-oclusión se ha obtenido mediante el uso de un dispositivo mecánico de forma cilíndrica, un stent, que mantiene el lumen expandido contra retroceso y remodelación. Los stents, que son normalmente de un metal biocompatible, se incorporan dentro de la pared vascular tras el re-crecimiento del endotelio vascular y no son extraíbles. Esta característica puede comprometer el retratamiento o tratamiento de porciones distales del vaso con el stent. Los stents metálicos puede iniciar una respuesta inmunógena y trombogénica, tales como una respuesta de cuerpo extraño con inflamación. Por otra parte, los stents metálicos tienen una flexibilidad limitada, lo que dificulta su colocación en vasos más pequeños. Dado que los stents metálicos son permanentes, su presencia continua puede interferir con las intervenciones futuras y puede producir corrosión, perforación y posibles aneurismas. Individualmente, los diversos metales que se están empleando pueden causar una reacción alérgica.

En un intento de abordar los problemas mencionados anteriormente se han desarrollado stents de segunda generación. Los stents metálicos temporales abordan la cuestión de la permanencia, pero se ha asociado un traumatismo excesivo con el proceso de extracción. En un intento de reducir la trombogenicidad se han empleado revestimientos de stent, tales como células endoteliales sometidas a ingeniería genética o varios polímeros. Polímeros como nylon, silicona, poliuretano y fibrina se han analizado con resultados mixtos. Aunque los datos sugieren una reducción en la formación de trombos, todavía se tienen que abordar otros problemas, incluidos la infección por donantes, la optimización de la formulación y administración y la respuesta inmunológica. Los stents compuestos enteramente de material polimérico ofrecen una alternativa a los stents metálicos. Sin embargo, las técnicas de despliegue que requieren de calor, tales como la requerida para la policaprolactona, pueden causar la desnaturalización de los tejidos adyacentes y la aparición de productos ácidos de la degradación de polímeros biodegradables puede causar una respuesta inflamatoria significativa. Una consideración adicional con los stents biodegradables es el potencial de atrofia de los elementos musculoesqueléticos en la pared arterial durante el tiempo que el stent está colocado, que puede conducir a la dilatación aneurismática una vez que el stent se ha degradado. Por último, los stents de polímero son intrínsecamente más débiles que sus homólogos metálicos y puede ser necesario más volumen para alcanzar la fuerza circunferencial adecuada.

ES 2 371 501 T3

Se pueden usar fármacos capaces de inhibir la formación de trombos y/o la proliferación de la neointima, pero la administración sistémica de varios agentes farmacéuticos adecuados y prometedores no ha podido demostrar significación clínica en la reducción de la reestenosis. Esto podría resultar de un fracaso en la consecución de las dosis locales adecuadas debido al efecto tóxico de la elevada administración sistémica. La administración local tiene como resultado elevadas concentraciones locales (hasta diez veces las concentraciones sistémicas) al tiempo que evitan la toxicidad. Los revestimientos poliméricos o revestimientos de stent pueden utilizarse para incorporar o fijar fármacos garantizando una administración local del fármaco controlada y sostenida en el sitio de la lesión vascular.

Los stents recubiertos con fármacos actualmente están comercializados y se utilizan cada vez más. Fijando agentes farmacéuticos antitrombóticos o antiproliferativos a la superficie del stent se han notificado reducciones en las tasas de reestenosis. Sin embargo, el modo de fijación del fármaco puede alterar la actividad biológica del compuesto, posiblemente debido a un enmascaramiento de los sitios activos o a cambios conformacionales indeseables. Además, generalmente, los stents, cubren menos del 10% de los segmentos de pared de los vasos en los que se implantan, lo que tiene como resultado una administración no uniforme en la pared arterial. Informes recientes indican una tasa de reacciones alérgicas y de respuestas oclusivas trombóticas a los stents recubiertos desfavorablemente alta.

Por lo tanto, lo que se necesita es un procedimiento para estabilizar la pared vascular dilatada sin la introducción de un cuerpo extraño, y, también, para mantener el diámetro de una arteria expandida mediante dilatación con globo con el fin de restablecer y mantener el flujo de sangre. Lo que se necesita también es un procedimiento para proporcionar una administración local de fármacos dirigida al sitio de la expansión arterial. Idealmente, este procedimiento debería minimizar los riesgos de reestenosis y la respuesta inmunitaria. Este procedimiento también sería útil para la administración local de medicamentos, materiales de cuidados de la piel, protectores solares y cosméticos de la piel y a otros sitios anatómicos, físicos, quirúrgicos y médicos.

25 **Resumen**

La presente invención está dirigida a compuestos de naftalimida y a su uso en la unión de tejidos y la reticulación de proteínas. La presente invención se refiere también a la reparación arterial, la conservación de diámetros lumenales internos ampliados y la administración local de fármacos, materiales para el cuidado de la piel, protectores solares y cosméticos. En particular, la presente invención utiliza compuestos de naftalimida, que producen a un agente adhesivo cuando se aplican a la superficie de un biomaterial y son activados un agente activador. La presente invención también se refiere particularmente a biomoléculas marcadas con naftalimida que pueden utilizarse para unir las superficies de tejidos sin activación directa de la zona tisular de contacto con un agente activador, tal como energía de la luz.

Un aspecto de la presente invención se refiere particularmente a compuestos de naftalimida. Al realizar la activación con un agente activador en un entorno independiente de la presencia o ausencia de oxígeno, los compuestos de naftalimida generan especies activadas. La especie activada puede causar cambios estructurales en los lípidos y cualquier proteína y polipéptido asociados, extra o intracelular o transmembrana, lo que conduce a polimerización y reticulación.

Los compuestos de la presente invención son biomoléculas sustituidos con naftalimida. El compuesto de naftalimida puede ser una 4-amina-1,8-naftalimida o una naftalimida modificada, tal como bradsilo. La biomolécula es quitosana. La biomolécula sustituida con naftalimida puede estar en forma de gel y dentro de un intervalo de pH compatible. Cuando se irradia con luz en el intervalo de absorción de 400-500 nm, la especie forma una especie químicamente reactiva que, tras el contacto, une los tejidos conjuntivos y el biomaterial colagenoso y a otros tejidos conjuntivos. El resto de quitosana biomolecular de la fotoquímica puede proporcionar favorablemente un entorno que se estabilice y proteja las especies reactivas, derivadas mediante reacción fotoquímica, hasta el contacto con un sustrato de tejido conjuntivo. Así, la biomolécula marcada con naftalimida es capaz de unir tejidos con o sin irradiación posterior de la zona tisular en la que se realizó el contacto.

Una realización de la presente invención, en la que la especie de unión de tejidos químicamente reactiva se forma en ausencia del sustrato de tejido y es suficientemente duradera, obvia la necesidad de iluminación directa de las superficies de tejido cubierto fotoquímicamente durante la unión. La biomolécula marcada con naftalimida actúa como adhesivo que permite la administración controlada del compuesto de unión de tejidos y facilita la unión en ausencia de una compresión excesiva. Esto es esencial en las aplicaciones vasculares, en las que es imperativo evitar la unión intraluminal que podría producir obstrucción del flujo sanguíneo. La presente invención también proporciona hemostasia inmediata y promueve la cicatrización primaria en ausencia de proliferación excesiva o inflamación. El uso de las biomoléculas marcadas con naftalimida de la presente invención también tiene el potencial de reducir los tiempos de operación.

Los compuestos naftalimida de la presente invención pueden esterilizarse mediante autoclave de vapor estándar para un uso biológico seguro sin perder la capacidad de unir tejidos.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a procedimientos para estabilizar la forma expandida de un vaso dilatado tras angioplastia. La administración de un compuesto de naftalimida en una región arterial expandida, seguida de activación por un agente activador, puede iniciar la reticulación de proteínas dentro de la pared arterial y causar el mantenimiento de la configuración postangioplastia de la luz. El uso de los compuestos de naftalimida dentro de la arteria expandida crea, preferentemente una luz vascular relativamente suave, lo que limita

la activación del proceso de coagulación y la formación de trombos que, de lo contrario, sería el resultado de la cicatrización de las disecciones arteriales de la íntima y la media. La proximidad de la unión tisular se determina por la longitud del puente estructural, o resto espaciador, entre los dos anillos de naftalimida reactivos. Dicha posición cercana limita la exposición de elementos subendoteliales a la sangre en circulación y de factores vasoactivos factores asociados con el proceso de reestenosis. La sustitución de los stents metálicos o poliméricos actualmente utilizados por este “stent” endógeno no metálico eliminaría favorablemente los problemas postoperatorios asociados con estos dispositivos implantados y reduciría los costes del dispositivo.

Otra realización de la presente invención se refiere a procedimientos para administrar un agente de fármaco en un sitio objetivo en una superficie de tejido, tal como una pared arterial. Un agente farmacéutico, tal como un agente anti-reestenosis, puede anclarse fotoquímicamente a la pared arterial a través de un enlace covalente entre el agente farmacéutico y el compuesto de naftalimida en un sitio inerte, preservando así la actividad biológica del agente. El compuesto de naftalimida, después, es activado fotoquímicamente por un agente activador y se une al colágeno y a otras proteínas en la pared arterial. La unión del agente farmacológico al tejido limita el lavado por reperfusión. La escisión de la fijación liberará al agente farmacológico para la potencial interacción celular, si se desea. Esta fijación fotoquímica de un agente farmacológico en áreas específicas de tejido puede utilizarse en asociación con varias aplicaciones para proporcionar la administración local de medicamentos, productos para el cuidado de la piel, protectores solares y cosméticos para la piel, y a muchos otros sitios anatómicos, físicos, quirúrgicos o médicos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación generalizada del marcaje de quitosana con un compuesto de naftalimida (brasililo).

La Figura 2 muestra cuatro estructuras representativas (I)-(IV) de compuestos 4-amino-1,8-naftalimida no-azo.

La Figura 3 es una representación del proceso para la fijación de heparina a un sustrato de tejido usando con un compuesto de naftalimida.

La Figura 4 muestra dos compuestos de protectores solares de ejemplo que tienen grupos funcionales de ácido sulfónico.

La Figura 5 muestra un ejemplo de un proceso que se utiliza para fijar un compuesto protector solar que tiene un grupo funcional ácido sulfónico a quitosana.

La Figura 6 muestra un ejemplo de una estructura de quitosana que tiene un compuesto protector solar y un compuesto de naftalimida fijados covalentemente.

La Figura 7 muestra seis compuestos protectores solares de ejemplo que tienen grupos funcionales alcohol.

La Figura 8 muestra cuatro compuestos protectores solares de ejemplo que tienen grupos funcionales amina.

La Figura 9 muestra un ejemplo de un proceso que se utiliza para fijar un compuesto protector solar que tiene un grupo funcional alcohol o amina a quitosana.

La Fig. 10 muestra los efectos de varias cantidades de activación lumínica sobre las fuerzas de unión entre muestras de tejido pericárdico unido a un compuesto marcado con naftalimida.

La Figura 11 muestra los efectos de varias cantidades de activación lumínica y compresión sobre las fuerzas de unión entre muestras de tejido pericárdico unido a un compuesto marcado con naftalimida.

La Figura 12 muestra las fuerzas de unión con varias cantidades de compresión entre muestras de tejido pericárdico y secciones de la arteria carótida y la aorta torácica.

La Figura 13 muestra la viabilidad de las células de músculo liso vascular expuestas a dosis supra fisiológicas de quitosana y un compuesto marcado con naftalimida.

La Fig. 14 muestra la viabilidad de las células endoteliales de la vena umbilical humana expuestas a dosis supra fisiológicas de quitosana y un compuesto marcado con naftalimida.

La Figura 15 muestra los perfiles transversales de segmentos arteriales viables sometidos a reparación simulada de lesión vascular postangioplastia y a estabilización del diámetro arterial expandido mediante un compuesto de naftalimida.

La Fig. 16 muestra la captación y la retención de un compuesto de naftalimida hidrófilo en muestras de pared arterial en diferentes métodos de administración y después de su lavado.

ES 2 371 501 T3

La Fig. 17 muestra la captación y la retención de un compuesto de naftalimida lipófilo en muestras de pared arterial en diferentes métodos de administración y después de su lavado.

La Figura 18 muestra una comparación de la captación y la retención de compuestos de naftalimida hidrófilos y lipófilos en muestras de pared arterial en diferentes métodos de administración y después de su lavado.

La Figura 19 muestra un ejemplo de un compuesto 4-amino-1,8-naftalimida hidrófilo dimérico.

La Figura 20 muestra un ejemplo de una biomolécula marcada con naftalimida.

La Figura 21 muestra un ejemplo de un compuesto 4-amino-1,8-naftalimida lipófilo dimérico.

La Figura 22 muestra ejemplos de tres isómeros (A, B y C) de un compuesto 4-amino-1,8-naftalimida hidrófilo dimérico.

La Figura 23 se muestra un ejemplo de un compuesto 4-amino-1,8-naftalimida hidrófilo monomérico.

La Figura 24 muestra la adhesión de una biomolécula modificada de protección solar sobre la piel con el tiempo.

20 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Un aspecto de la presente invención se refiere a compuestos de naftalimida y a su uso en aplicaciones de unión de tejidos y de reticulación de proteínas. Los compuestos de naftalimida pueden ser activados en presencia simultánea de un agente activador y un tejido o proteína diana, causando que los compuestos de naftalimida se conviertan en agentes adhesivos e inicien la reticulación de proteínas. Los compuestos de naftalimida pueden estar unidos a quitosana, creando compuestos marcados con naftalimida. Estos compuestos marcados con naftalimida también pueden ser activados por un agente activador antes de su contacto con el tejido y de realizar la posterior unión de tejidos en condiciones “oscuras”, o en ausencia de iluminación directa del tejido.

Los compuestos de naftalimida son útiles para unión de tejidos y en particular para aplicaciones tales como reparación arterial y estabilización de una pared arterial expandida. Además, los compuestos de naftalimida pueden unirse a agentes farmacéuticos, proporcionando una administración dirigida de los agentes farmacéuticos a superficies de tejido.

Como se usa en el presente documento, la palabra “colorante” es intercambiable con la palabra “compuesto”, en lo que se refiere a 1,8-naftalamidas no azo. Véase las patentes de EE.UU. n° 5,235,045; 5,565,551; 5,766,600; 5,917,045; y 6,410,505; el contenido de cada una de estas patentes se incorpora por referencia en el presente documento.

Un “compuesto no azo” o colorante es uno que no posee un grupo funcional que tiene dos átomos de nitrógeno conectados por un doble enlace.

Un “nucleófilo” es cualquier grupo que puede ser desplazado de una molécula por un nucleófilo. Ejemplos de nucleófilos incluyen halógenos, ésteres de sulfonato y sales de amonio cuaternario.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “valencias no satisfechas” significan menos de trivalente. Por lo tanto, cualquier átomo de nitrógeno que sea menor que trivalente o tri-coordinado contiene valencias no satisfechas.

El “agente activador” como se usa en el presente documento indica un medio o un agente que es capaz de activar, excitar o sensibilizar a un compuesto fotoactivo. El agente activador puede ser energía irradiada, energía electromagnética, láser, corriente eléctrica, electrones, neutrones térmicos o químicos. El espectro electromagnético puede incluir luz visible, luz de xenón, luz, láser luz, luz cercana a infrarrojos y ultravioleta. El láser u otra energía de radiación puede ser continua o pulsada. La energía de pulsada usada es tal que la energía suministrada tiene un número múltiple de pulsos cortos de energía relativamente alto, pero al mismo tiempo, tiene una tasa de energía promedio mucho más baja. El láser podría ser un láser de helio-cadmio, láser de ion argón, un láser de estado sólido, un láser de descarga de gas, láser de kriptón, láser de colorante bombeado de iones de argón, o láser de vapor de metal de cátodo hueco o láser de diodo de semiconductores y otros. Incluso podrían usarse fuentes tales como fuente de lámpara de filamento convencionales con filtración adecuada, una fuente de lámpara de arco con filtración adecuada, incluso una lámpara de xenón de pulsos de flash con filtración adecuado, o semiconductores de emisión de luz como diodos GaN y ZnSe.

La expresión “tejido corporal” como se usa en el presente documento debe entenderse que incluye “fluido corporal,” glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, crioprecipitados de plasma sanguíneo, otras proteínas de plasma, médula ósea, piel, pared de los vasos sanguíneos, vaina del nervio, cartílago del menisco, cartílago articular femoral, córnea, ligamento, tendón y otros tejidos de un animal o un ser humano.

El término “animal” como se usa en el presente documento indica cualquier animal; esto incluye seres humanos y otros animales domésticos y de granja.

ES 2 371 501 T3

El término “vehículo” como se usa en el presente documento indica un vehículo, una solución que contiene, agua, tampones, suero, proteínas del suero, lipoproteínas, bio-membranas artificiales, micelas, liposomas, anticuerpos monoclonales, carbohidratos, ciclodextranos, disolventes orgánicos u otras soluciones farmacéuticamente aceptables, o compatibles. El transportador o vehículo usado es farmacéuticamente compatible en cuanto a que es relativamente no tóxico para las células normales y los tejidos normales y no reacciona con el soluto o con el agente terapéutico contenido en él.

La expresión “cantidad eficaz” como se usa en el presente documento indica la concentración o el nivel del compuesto que puede alcanzar un fin particular, tales como la reticulación, sin producir síntomas tóxicos pronunciados.

El término “derivado” como se usa en el presente documento indica un compuesto que deriva de otro compuesto base y, por lo general, mantiene la estructura general del compuesto base.

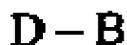
En general, las reacciones covalentes iniciadas por la forma activada de estos colorantes pueden causar una alteración química de los residuos de aminoácidos, las proteínas y los péptidos, de su conformación y función, y pueden reticular los aminoácidos, péptidos y proteínas. Por lo tanto, esta clase de colorantes puede utilizarse para unir las especies moleculares y biomoleculares deseadas a péptidos, proteínas, células y tejidos biológicos, así como a otros sustratos fisiológicos que contiene nucleófilos u otros grupos reactivos, y a reticular péptidos, proteínas, tejidos y otros sustratos que contiene nucleófilos u otros grupos reactivos selectivamente tras la aplicación de un agente activador, tal como radiación electromagnética con la longitud de onda correspondiente en el espectro de absorción del espectro de absorción del colorante. Además, injertos o materiales protésicos que contienen nucleófilos u otros grupos reactivos pueden unirse a la naftalimida activada. Véase la patente de Estados Unidos nº 5,235,045.

El espectro de absorción de la radiación electromagnética adecuado incluye el ultravioleta pasando por la luz visible hasta el infrarrojo cercano y las energías K-alfa, etc. de absorción de rayos X del sustituyente halógeno molecular. Otros agentes activadores incluyen los neutrones térmicos que podrían utilizarse para activar los colorantes de 1,8-naftalimida que contienen boro.

El reparto de colorantes 1,8-naftalimida no azo en las regiones hidrófobas o hidrófilas de un tejido y la capacidad de activar las reacciones químicas covalentes con residuos de aminoácido nucleófilos permite la reticulación de péptidos o proteínas situados extra o intracelularmente o asociados con la membrana de dos capas selectivamente al realizar la activación. No se produce reticulación fotoquímica hasta que el colorante ha sido activado por un agente activador, como la luz.

Una realización de la presente invención es una especie de compuesto en la que un compuesto de naftalimida se acopla a una porción biomolecular. La naftalimida se une covalentemente a través de la porción 4-amino a través de una cadena de carbono fotoquímicamente inerte en las posiciones de las especies amino desaciladas en los monómeros de quitosana. La reacción fotoquímica de las especies de naftalimida produce una especie química tisular que reacciona covalentemente con especies químicas de tejido conectivo biológico. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la porción biomolecular proporciona un entorno que estabiliza y protege las especies reactivas hasta el contacto con un sustrato de tejido conectivo.

La biomolécula marcada con naftalimida puede representarse como:



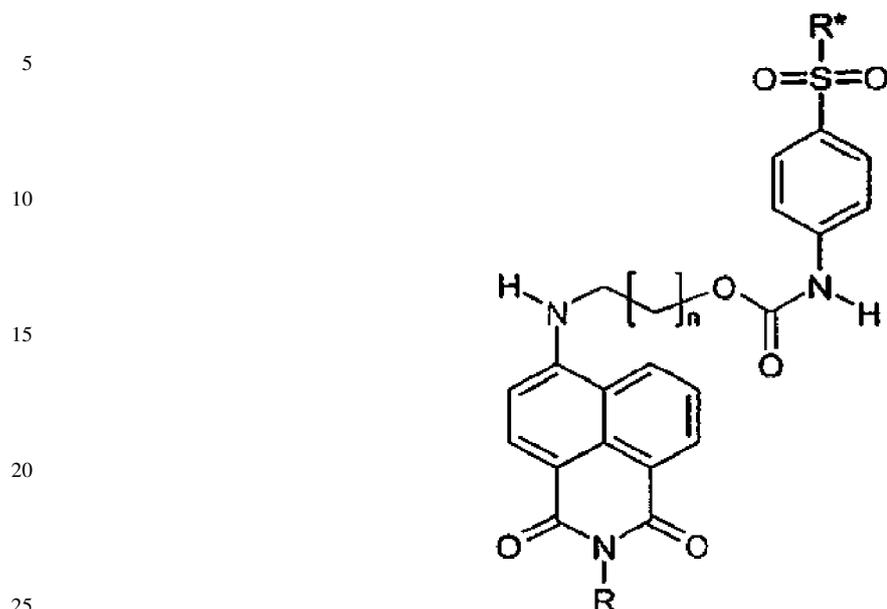
en la que D es el compuesto de naftalimida o molécula o colorante y B es quitosana.

La quitosana macromolecular debería estar presente en forma parcialmente desacilada. La quitosana deriva de la desacetilación de quitina. La quitosana macromolecular utilizada debe estar desacetilada al menos el 70%, más preferentemente desacetilada el 85% o más.

En una realización preferida, el compuesto de naftalimida o molécula D es un compuesto de 4-amino-1,8-naftalimida que se representa como cualquiera de las cuatro estructuras (I)-(IV) mostradas en la figura 2, en las que R, R' y Q son grupos alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que tienen entre 2 y 200 carbonos, que opcionalmente tienen uno o más grupos éter, amida o amina, y X es un hidrógeno, un halógeno, un éster sulfonato o una sal de amonio cuaternario. Las estructuras (I)-(IV) puede representar compuestos de naftalimida hidrófilos o lipófilos. Cuando el sustituyente X es hidrógeno, el compuesto es hidrófilo. Cuando el sustituyente X es un nucleófilo, como un halógeno, un éster sulfonato o una sal de amonio cuaternario, el compuesto es hidrófobo o lipófilo. La biomolécula B preferentemente está unida al compuesto de naftalimida en uno de los grupos 4-amino, o en un extremo de uno de los grupos R o R'.

ES 2 371 501 T3

En otra realización preferida, el compuesto de naftalimida D tiene la estructura:



que es una mezcla de estereoisómeros, en la que

n es un número entero entre 1 y 20;

R se selecciona del grupo constituido por CH₃, C₄H₉, C₆H₁₃, (CH₂)₂N(CH₃)₃⁺, CH₂COOH, (CH)₂CH₂(CH₃)₂COOH, y (CH)₂CH₂(CH₃)₂COOCH₃; y

R* es un enlace entre D y B.

40
45

Una realización preferida también está dirigida a quitosana que ha sido marcada con una naftalimida modificada denominada bradsilo. El cloruro de bradsyl, una naftalimida reactiva oscura, es una marca fluorescente estructuralmente similar al cloruro de dansilo y que tiene un nombre según la IUPAC de 2-(2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-benzo [de]isoquinolin-6-ilamino)-etiléster de ácido (4-clorosulfonyl-fenil)-carbámico. El marcaje de quitosana con Bradsilo da lugar a Bradsilo quitosana, una molécula con características de unión mejoradas. La figura 1 muestra la estructura de Bradsyl, así como una representación generalizada del marcaje de quitosana con Bradsyl. Un espaciador hidrófobo rígido (un anillo aromático) aleja la naftalimida del esqueleto de la quitosana, mientras que el grupo butilo terminal hidrófobo tiende a tirar aún más de la naftalimida hacia el entorno hidrófobo. Sin desear quedar vinculado a teoría alguna, esta tendencia probablemente maximiza la interacción de naftalimida con entornos de tejido hidrófobos y sitios de reacción fotoquímica productivos dentro del tejido, estimulando la unión en la interfaz tejido-carga y dando lugar a fuertes enlaces con una cantidad mínima de compresión.

50
55

El bradsilo y derivados de bradsilo pueden utilizarse para marcar la quitosana. Un experto en el campo puede variar los componentes estructurales de la molécula de bradsilo para adaptar las propiedades a los resultados deseados. El separador entre la naftalimida y el grupo reactivo oscuro de bradsilo puede variarse de longitud y carácter. Alcanos más largos y más cortos pueden unirse a la parte inferior de la naftalimida. El extremo hidrófobo neutro puede cambiarse a un grupo con una carga positiva o negativa, o a un extremo hidrófilo con o sin una carga positiva o negativa. Por último, otros derivados pueden utilizar los aminoácidos o derivados de aminoácidos. El compuesto bradsilquitosana se puede denominar alternativamente quitosana modificada con bradsilo, quitosana marcada con bradsilo o quitosana soluble en ácido marcada con bradsilo.

60
65

Las biomoléculas marcadas con naftalimida de la presente invención son capaces de unirse a sustratos proteínicos, con o sin irradiación posterior de las secciones de tejido que contactaron con el gel adhesivo. Los compuestos marcados con naftalimida pueden “activarse” antes del contacto con el sustrato a través de irradiación o luz ambiental. Preferentemente, los compuestos marcados con naftalimida primero son irradiados con luz azul en la gama de longitud de onda de alrededor de 400 nm a alrededor de 500 nm. Los compuestos marcados con naftalimida “activados”, a continuación, se aplican en las secciones de sustrato para su unión. Preferiblemente, una compresión mínima de por lo menos aproximadamente 0,025 kg/cm² se aplica a las secciones de sustrato durante al menos aproximadamente un minuto y más preferentemente durante al menos aproximadamente cinco minutos. La irradiación adicional no es necesaria, eliminando la necesidad de iluminación directa de los sustratos unidos.

ES 2 371 501 T3

Pueden usarse numerosas permutaciones en el protocolo de activación (es decir, las concentraciones de biomoléculas y del compuesto de naftalimida, presión, intensidades de luz y tiempos de exposición) para mejorar la fuerza global de adherencia y mejorar la reproducibilidad.

5 Realizaciones preferidas se refieren a la utilización de compuestos de 4-amino-1,8-naftalimida en la creación de un “stent” endógeno, o la estabilización de una pared arterial expandida después de la angioplastia, y administración local de fármacos a través de la fijación de agentes farmacológicos a superficies de tejido por medio de compuestos de naftalimida. Compuestos de naftalimida que pueden utilizarse de conformidad con estas realizaciones preferidas incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. n.º 5,235,045, 5,565,551, 5,766,600, 5,917,045 y 6,410,505 y los EE.UU. solicitud de patente ser. N.º 10/176,824, el contenido de cada uno de los cuales se incorpora por referencia en este documento. Estos compuestos de naftalimida son particularmente útiles para aplicaciones que implican estabilización diámetros arteriales expandidos y administración local de fármaco.

15 Preferiblemente, el compuesto de naftalimida debe ser una 4-amino-1,8-naftalimida no-azo. El compuesto de naftalimida puede ser monomérico, dimérico, hidrófilo o lipófilo. El compuesto de naftalimida puede tener una de las estructuras (I)-(IV) mostradas en la figura 2, en las que R, R', y Q son grupos alquilo de cadena ramificada o de cadena lineal que tienen de 2 a 200 de átomos de carbono y, opcionalmente, que tienen uno o más grupos de éter, amida o amina. Las estructuras (I)-(IV) puede representar compuestos de naftalimida hidrófilos o lipófilos. Cuando el sustituyente X es hidrógeno, el compuesto es hidrófilo. Cuando el sustituyente X es un nucleófilo, como un halógeno, un éster de sulfonato o una sal de amonio cuaternario, el compuesto es hidrófobo o lipófilo.

20 Una realización preferida de la presente invención está dirigida a la utilización de compuestos de naftalimida en la estabilización del diámetro expandido de una pared arterial. El compuesto de naftalimida debe ser infundido en la pared arterial después de que el inflado del globo haya deformado la pared y ampliado el lumen del vaso. La irradiación de luz a través de la pared transparente del globo, tal como por una fibra óptica suministrada dentro del globo, efectúa entonces la formación de un “stent” endógeno mediante reticulación de placas endógenas y de las proteínas de la pared. Al realizarse la reticulación en el estado dilatado, se mantiene la configuración postangioplastia de la luz. La proximidad de la unión al tejido se determinará por la longitud del puente estructural entre los dos anillos de naftalimida reactivos. Se han preparado longitudes moleculares de 6 a 50 angstroms como moléculas de naftalimida simples. Las moléculas más largas pueden sintetizarse mediante la fijación de los grupos de naftalimida a macromoléculas apropiadas.

25 Hay muchos beneficios en el uso de los compuestos naftalimida de conformidad con la presente invención para producir un “stent, endógeno” en comparación con la angioplastia tradicional. Después de la angioplastia, la arteria se estira y la placa endógena se fractura y libera, exponiendo el subendotelio a los factores vasoactivos y citocinas en circulación. Sin embargo, con la angioplastia tradicional, la arteria sufre reestenosis con retroceso elástico a sus dimensiones originales, con formación de neointima en respuesta a una lesión que reduce aún más el área luminal. Al mantener la configuración postangioplastia desdendiendo los pliegues de la íntima, hay menos retroceso elástico, se mantiene la compresión de la media y la placa y se limita la formación de la neointima, lo que da como resultado una mayor área luminal.

30 Una realización más preferida de la presente invención está dirigida al uso de compuestos de naftalimida para la administración local de cualquier agente farmacológico adecuado en las regiones de tejido o arteria. En particular, una realización preferida abarca la administración local de agentes farmacológicos en la superficie luminal de la pared arterial tras angioplastia coronaria con globo, para reducir la reestenosis. Los compuestos de naftalimida pueden utilizarse no sólo para reticulación de las proteínas y estabilizar la pared arterial dilatada, sino también para unir los agentes anti-reestenosis a los componentes dirigidos de la pared arterial inmediatamente después de una angioplastia con globo. Medicamentos anti-reestenosis, como la heparina, taxol, sirolimus y otros agentes farmacológicos adecuados, pueden fijarse a la pared arterial a través de los compuestos naftalimida. Los compuestos de naftalimida también se pueden utilizar para fijar los agentes farmacológicos a tejidos en otros sitios anatómicos, físicos, quirúrgicos y médicos para tratar diversas afecciones.

35 Un dispositivo preferido para lograr inmovilización local de los fármacos anti-reestenosis a la pared arterial idealmente incluye un catéter vascular multifuncional con capacidad de dilatación del globo, la capacidad de ofrecer al agente anti-reestenosis en medio acuoso a sitios a lo largo de la interfaz de contacto entre el globo expandido y la superficie luminal, una fibra óptica con su punta situada en el eje del globo que puede emitir luz uniformemente sobre la superficie arterial en contacto con el globo para activación fotoquímica y un canal de perfusión para mantener el flujo de sangre a través del dispositivo a las regiones más allá del lugar en el que está el globo.

40 Como se muestra en la figura 3, un medicamento anti-reestenosis, como la heparina (con m unidades de repetición), está unido covalentemente al compuesto de naftalimida por un fijador (longitud n). La posterior activación con luz da como resultado la creación de un sitio reactivo (*) que rápidamente se une a sustratos de tejido adyacente. Esto proporciona un medio de anclaje de la molécula de heparina dentro de la pared arterial. Esto minimizará la pérdida de heparina, u otros potenciales agentes farmacéuticos, para lavado por reperfusión, resultando en una mejor administración local de fármacos. Mediante posterior escisión endógena natural del fijador, el agente farmacológico puede liberarse para la potencial interacción celular, si se desea. A través de la naturaleza y la identidad de las especies químicas que comprenden los enlaces de fijación (por ejemplo, polipéptido, poliéster, etc.), la tasa de escisión del por hidrólisis simple y otro escisión enzimática puede ser modulada, así, controlar la velocidad y la duración de la administración de fármacos. Puede ser conveniente la retención en forma unido para algunos agentes farmacológicos.

Una realización más preferida de la presente invención está dirigida al uso de compuestos de naftalimida para la administración local y la fijación de fármacos, materiales de cuidado de la piel, protectores solares y cosméticos para la piel. Para lograr esto, una biomolécula que se ha marcado con un compuesto de naftalimida también se modifica con un compuesto adicional que tenga la propiedad funcional deseada. Después de un contacto físico con la piel, la biomolécula modificada y su compuesto funcional fijado están fijados a la superficie de tejido. De esta manera, compuestos tales como protectores solar se pueden liberar localmente y fijar a la piel para aumentar su tiempo de residencia, su resistencia al agua, la transpiración y roce, su cobertura y su eficacia.

El producto puede representarse como:

D-B-F

en el que D es una molécula de naftalimida, como se ha definido anteriormente, B es quitosana y F es una molécula funcional de un agente farmacológico, un material de cuidado de la piel, un protector solar, tal como un bloqueante de UV, o un cosmético.

En particular, existen tres ejemplos preferidos de tipos de compuestos protectores solares que pueden unirse a biomoléculas marcadas con naftalimida y fijarse a la piel: los compuestos que contienen grupos funcionales ácido sulfónico, los compuestos que contienen grupos funcionales alcohol y los compuestos que contienen grupos funcionales amina.

Ejemplos preferidos de compuestos protectores solares que contienen grupos funcionales ácido sulfónico incluyen ácido fenilbencimidazol sulfónico y sulisobenzona, que se ilustran en la figura 4. El grupo funcional ácido sulfónico se utiliza para unir estos compuestos a una biomolécula como quitosana. En un ejemplo específicos, como se muestra en la figura 5, el ácido de fenilbencimidazol sulfónico se convierte en el derivado de cloruro de sulfonilo, que está directamente unido al grupo de amina primaria de la quitosana, para dar el compuesto protector solar unido. La molécula o compuesto de naftalimida, aunque no se muestra en la figura 5, también está ligado a la biomolécula. La Figura 6 muestra un ejemplo representativo de la unión covalente del agente protector solar y de naftalimida a una representación esquemática de una estructura de quitosana. El agente protector solar, u otro compuesto funcional, y la molécula de naftalimida se pueden unir en cualquier orden o simultáneamente. Se prefiere aproximadamente un compuesto de naftalimida por cien unidades de monómero de azúcar, pero esta relación puede ser mayor o menor. Se prefiere aproximadamente un protector solar por diez unidades de monómero de azúcar para obtener una protección eficaz, pero esta relación puede ser mayor o menor para proporcionar un perfil de protección solar eficaz deseado.

Ejemplos preferidos de compuestos de protección solar que contienen grupos funcionales alcohol incluyen salicilato de trietanolamina, homosalato, dioxibenzona, oxibenzona, salicilato de octilo y avobenzona, como se ilustra en la figura 7. Ejemplos preferidos de compuestos de protección solar que contienen grupos funcionales amina incluyen padimato O, antranilato de mentilo, octocrileno y ácido p-aminobenzoico, como se ilustra en la figura 8. Compuestos en ambos grupos pueden unirse a succinil quitosana mediante la formación de un grupo funcional éster o amida. En un ejemplo específico, como se muestra en la figura 9, quitosana está modificado por anhídrido succínico para formar succinil quitosana. El carboxilato formado se convertiría en un éster o una amida utilizando a un agente activador como EDC. El compuesto de naftalimida, aunque no se muestra en la figura 9, también está unido a la biomolécula.

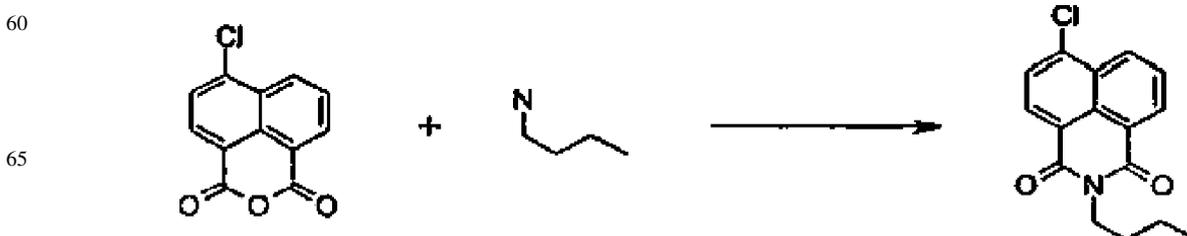
En algunos de los siguientes ejemplos se usan compuestos de naftalimida que no están unidos a quitosana. Dichos ejemplos se incluyen como antecedentes de la presente invención.

50

Ejemplo 1

Síntesis de bradilo

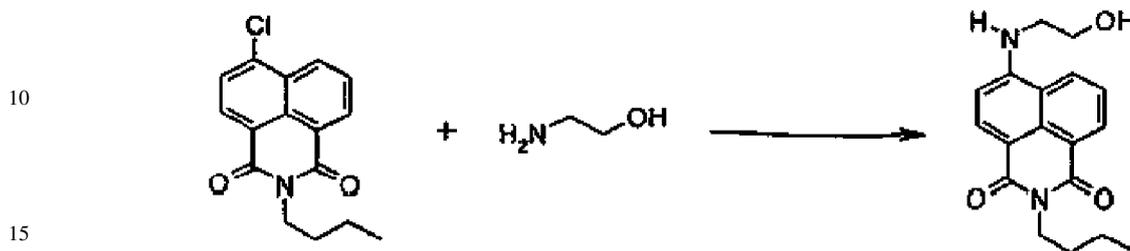
La primera etapa consiste en la síntesis de 4-(2'-aminoetil)amino-N-butil-1,8-naftalimida. A una solución de anhídrido 4-bromo-1,8-naphtálico (2,30 g, 9.9 mmol) en etanol (100 ml) se añadió 1-butilamina (0,73 g, 10,0 mmol). La mezcla se agitó en 68°C. durante 24 horas. A continuación se muestra el esquema de la reacción general.



ES 2 371 501 T3

A continuación, se añadió 2-aminoetanol (6,0 g, 100 mmol). El calentamiento siguió durante otras 48 horas, tras lo cual se retiró el disolvente por evaporación a presión reducida. La recristalización del sólido resultante amarillo en tolueno dio 4-(2'-aminoethyl)amino-N-butil-1,8-naftalimida (1,75 g, 56%) en forma de cristales de color amarillo, con un punto de fusión de aproximadamente 128-132°C. El esquema general de reacción se muestra a continuación.

5

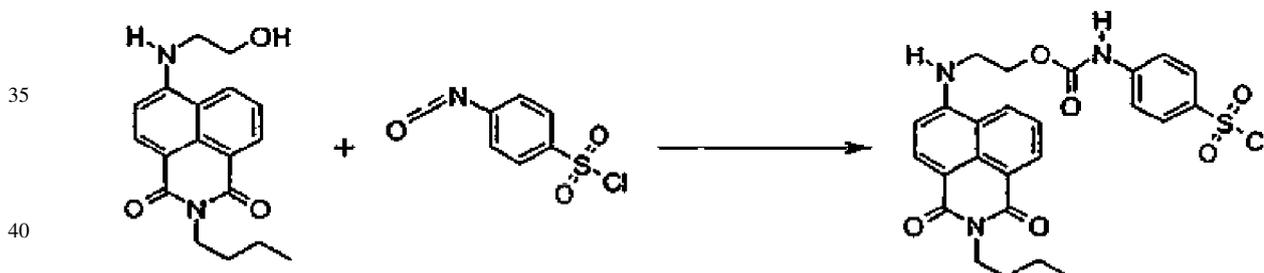


Datos experimentales para 4-(2'-aminoetil)amino-N-butil-1,8-naftalimida: $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3350-2800 (a, N-H str.), 1685 (C=O), 1640 (C=O), 1587, 1359, 782. RMN de ^1H (CDCl_3): δ 8,59 (d, $J=7,4$ Hz, 1H, C7-H), 8,47 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, C2-H), 8,19 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, C5-H), 7,63 (d, $J=8,4$ Hz, de d, $J=7,4$ Hz, 1H, C6-H), 6,72 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, C3-H), 6,17 (br, t, 1H, NH), 4,17 (d, $J=7,3$ Hz, de d, $J=7,7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3,43 (d, $J=6,1$ Hz, de t, $J=5,3$ Hz, 2H, NH-CH_2), 3,19 (d, $J=6,2$ Hz, de d, $J=5,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 1,35-1,8 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, NH_2), 0,97 (t, $J=7,3$ Hz, 3H, CH_3), m/z : 313 (M+H+1, 23), 312 (M+H; 100), 295 (31), 281 (25), 268 (51), 238 (24), 224 (63).

25

La etapa siguiente generó Bradsyl, o 4-(2-[{4-clorosulfonilfenil}-aminocarboniloxi]etil)amino-N-butil-1,8-naftalimida. A una solución de 4-(2'-hidroxietil)amino-N-butil-1,8-naftalimida (1,70 g, 5,4 mmol), preparado anteriormente, en THF anhidro (50 mL), se agregó isocianato p-clorosulfonilfenilo (2,18 g, 10 mmol). La mezcla resultante se agitó en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas, y la mezcla se sometió después a vacío, se filtró para costear el uretano como un sólido amarillo. A continuación se muestra el esquema de la reacción general.

30



Datos experimentales para 4-(2-[{4-clorosulfonilfenil}-aminocarboniloxi]etil)amino-N-butil-1,8-naftalimida: $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3426, 3299 (N-H str.), 3195, 3121, 3058, 2970, 2868 (C-H str.), 1741, 1703 (imida C=O str.), 1636 (uretano C=O str.), 1593, 1551, 1470, 1357, 1174, 777. RMN de ^1H (DMSO-d_6): δ 9,85 (s, s, 1H, NHCO_2), 8,73 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, C7-H), 8,44 (d, $J=7,0$ Hz, 1H, C5-H), 8,29 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, C2-H), 7,3-7,8 (m complejo, 5H, $\text{ClSO}_2\text{C}_6\text{H}_4$, C6-H), 6,89 (d, $J=8,5$ Hz, 1H, C3-H), 4,41 (ta, $J=4,6$ Hz, de d, $J=7,3$ Hz, 2H, O- CH_2), 4,01 (t, $J=6,7$ Hz, 2H, N- CH_2Pr), 3,71 (ta, $J=4,6$ Hz, 2H, CH_2NH).

50

Ejemplo 2

Síntesis de quitosana marcado con Bradsyl

55

Para sintetizar el compuesto de quitosana marcado con bradsilo, la quitosana se solubiliza preferentemente en un ácido como ácido acético o ácido láctico. Por ejemplo, 2 g de quitosana (Sigma, St. Louis, Mo.) y 40 ml de ácido acético al 10% se combinaron y se dejó a la quitosana solubiliza durante la noche.

60

A continuación, 100 mg de la naftalimida, tales como Bradsyl, se disolvieron en 1 ml de acetona o DMSO. Después, la solución de naftalimida se añadió lentamente, con agitación, a la solución de quitosana. Si se añadiera demasiado rápidamente, la quitosana precipitaría. Inmediatamente después de agregar la naftalimida, se añadió KOH 6 M lentamente, con agitación, hasta que el pH de la solución fue de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 determinado con tiras de pH. Cuando se superó el pH previsto, no se realizó retrotitulación. El pH se vigiló a lo largo de aproximadamente 3 a 4 horas, añadiendo más base según fuera necesario para mantener el pH entre 8 y 9. La mezcla se dejó agitar a este pH durante la noche.

65

ES 2 371 501 T3

A continuación, se agregó 100 ml de ácido acético al 10%. La solución se agitó hasta que el quitosana modificado se disolvió por completo, o durante al menos de dos horas. La solución se centrifugó y se descartó cualquier material insoluble. El material insoluble consiste en exceso de naftalimida y quitosana insoluble o sobremodificado.

5 Para purificar la solución mediante precipitación alcalina, se agregó KOH 6 M al sobrenadante hasta que el pH fue de aproximadamente 8 a aproximadamente 9. La quitosana modificada se dejó precipitar durante al menos treinta minutos. Después, el precipitado se recogió mediante centrifugación.

10 Por último, la solución de quitosana modificada se añadió a tubos de diálisis con una jeringa y ambos extremos de los tubos se ataron. El tubo de diálisis se colocó en un matraz Erlenmeyer de 1 l y se añadió alrededor de 1 l de ácido acético al 10%. La muestra se dializó hasta que toda la quitosana se hubo resolubilizado, o al menos durante 12 horas. La solución dializada se descartó tras observar el color y se sustituyó con 1 l de agua desionizada. Después de 12 horas, la solución dializada se reemplazó con agua desionizada fresca y se dializó durante otras 12 horas. Por último, la muestra se dializó contra solución salina tamponada con fosfato ("PBS") durante 24 horas.

15 La concentración de quitosana en la mezcla homogénea modificada se determinó tomando una alícuota, normalmente 1 mL, y determinando el peso. Esta muestra se secó y se pesó el residuo. Los datos resultantes (masa de quitosana/masa de la muestra) dieron la concentración de sólidos, por lo general expresada como mg/g. Las muestras con concentraciones de quitosana entre 1 y 100 mg/g han mostrado una unión eficaz. Las muestras con concentraciones de quitosana entre 10 y 50 mg/g han mostrado la mayor eficacia.

20 La relación de modificación de bradsilquitosana se determinó tomando un alícuota de 1,00 ml y diluyéndola hasta 25,00 ml con ácido acético al 10%. La absorbancia óptica se midió a 450 nm. Después de la corrección para la dilución, se usó un coeficiente de extinción molar de $20.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para determinar la concentración de naftalimida en la muestra. La masa de quitosana en la muestra se utilizó para determinar la concentración de subunidades de azúcar, utilizando un peso molar equivalente de 180 g/mol. La relación de modificación se expresó como la relación entre subunidades de azúcar y los grupos de naftalimida unidos. Un número mayor indica un nivel inferior de modificación. Una bradsilquitosana con una relación de modificación de al menos 1500 (1 naftalimida por 1500 azúcares) ha demostrado ser eficaz en la unión de tejidos. Mejores resultados se obtienen con una relación de modificación de al menos 500. Los mejores resultados se obtienen con una relación de modificación de al menos 100.

Ejemplo 3

35 *Síntesis de quitosana marcada*

Se usaron reacciones de acoplamiento de amida estándar para unir varias naftalimidias a la quitosana.

40 Dos gramos de quitosana (Sigma) se disolvieron en 40 ml de ácido acético de 8%. Esta solución se diluyó con 160 ml de metanol y se trató con 1,4 g de anhídrido de succínico disuelto en 50 ml de acetona. Esta quitosana succinilada se purificó por repetidas precipitaciones básicas, seguida por solubilización en HCl 0,1 M. La naftalimida se unió a quitosana mediante reacciones de acoplamiento mediadas por cardodiimida. Una quitosana saturada en solución de HCl 0,1 M se diluyó cinco veces con metanol y naftalimida terminada en amina (con la estructura que se muestra en la figura 19) se añadió a esta solución. La adición de un reactivo de acoplamiento (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) resultó en la unión covalente de la naftalimida. Esta quitosana modificada se purificó mediante extracciones repetidas con DMF o por repetidas precipitaciones básicas, seguido de solubilización en HCl 0,1 M.

50 Ejemplo 4

Reticulación de las especies de naftalimida-quitosana

55 Se realizaron estudios para determinar si se producía reticulación en el gel naftalimida-quitosana después de fotoactivación. El gel se formó solubilizando quitosana (Biopolymer Engineering, Inc., Eagan, Minnesota) en PBS a 25 mg/mL, después realizando una dilución a 1:4. Se añadió compuesto sin naftalimida (con la estructura que se muestra en la figura 19) para realizar una concentración de 8 mM. A continuación, se dispensaron alícuotas 20 μl de esta solución sobre portaobjetos de vidrio limpios. Un grupo de estos portas se expusieron a activación con luz azul (mW/cm^2) durante 7 minutos. Un grupo de control de estos portaobjetos se mantuvo en la oscuridad hasta que secaron al aire. Se usaron 200 μl de H_2O para rehidratar las soluciones. Mientras que todos los controles rápidamente se redisolvieron, los especímenes que contenían naftalimida y expuestos a la activación con luz azul habían formado películas nítidas y duraderas, que no se redisolvían en agua.

65 Las películas de los especímenes tratados también fueron sometidas a agitación, tampón acetato al 1% SDS y H_2O a pH 4 y 6. Las películas de quitosana reticulada mantuvieron su configuración incluso después de una semana o más en las diversas soluciones. Observadas bajo el microscopio, estas películas tuvieron un aspecto muy distinto con características de tipo cristalinas. Los especímenes de control no mostraron estas características.

ES 2 371 501 T3

La formación de agregados también se detectó por cromatografía en una solución de quitosana modificada con naftalimida que había sido expuesta a la luz ambiental sólo, en lugar de una fuente de luz filtrada de lámpara de arco. La cromatografía líquida produjo tres picos distintos. El pico, a unos 1500 segundos era indicativo de materiales de quitosana nativa, mientras que los picos en períodos más cortos de tiempo representaban moléculas agregadas más grandes formadas por reticulación fotoquímica inducida por naftalimida.

Ejemplo 5

Efectos de la exposición a la luz en la unión de tejidos

Un ejemplo de quitosana marcada con naftalimida (con la estructura que se muestra en la figura 20) también demostró capacidad para unión de tejidos en condiciones “oscuridad”, o haber estado expuesto sólo a la luz de la sala durante la síntesis y procedimientos, en lugar de irradiación de luz azul. La figura 10 muestra los resultados utilizando distintas cantidades de activación lumínica. El compuesto marcado con naftalimida se denominó RXN1.

Se usó un modelo de detección selectiva de pericardio porcino. El pericardio se ha identificado como potencial material para parche biológico para la reparación arterial. Este tejido altamente colagenoso es fino y bastante translúcido, de modo que optimiza el potencial de penetración de luz, mientras que también está fácilmente disponible y es duradero.

Una fina película de la formulación de quitosana-naftalimida experimental (20 μ l) se aplicó en el pericardio. Algunas muestras de compuestos se prepararon completamente en luz roja, una longitud de onda a la que no hay ninguna absorción por naftalimida, y por lo tanto, se prepararon eficazmente en oscuridad (D). Otras se prepararon en luz de ambiente de laboratorio, y otras fueron objeto de irradiación con luz azul durante 5 minutos a 800 mW/cm² antes de aplicar al tejido (L). Después, el segmento de parche pericárdico se colocó sobre tejidos tratados en un área de superposición con “colas” de espesor sencillo que sobresalían por cada extremo. Algunas muestras de tejido, a continuación, se sometieron a irradiación con luz azul durante 5 minutos (-5). Todas las muestras se pinzaron a 5 kg/cm² durante 5 minutos. Después de que los tejidos se unieran, los tejidos se colocaron cuidadosamente en PBS durante al menos una hora antes del ensayo de resistencia a la tracción para garantizar que cualquier “adherencia” residual resultante de la deshidratación parcial no influiría en la resistencia a la tracción medida. Los ensayos de la resistencia a la tracción de la unión se realizaron mediante un sistema de carga incremental, mediante el cual la fuerza gradualmente se incrementó hasta el punto del fallo de la unión. Se anotaron las cargas máximas y se calcularon las fuerzas de unión como g/cm².

La unión se formó en luz ambiente de laboratorio, pero la ausencia de exposición a la lámpara de arco (R1-0) mostró fuerza significativa en comparación con la unión formada en luz ambiental con exposición a la lámpara de arco (R1-5). En particular, la unión formada en ausencia de exposición a la lámpara de arco tenía aproximadamente el 73% de la fuerza de la unión expuesta a la luz. La exposición de los compuestos a 5 minutos de irradiación de luz azul a 800 mW/cm² anterior a la aplicación al tejido, seguida por pinzamiento posterior a 5 kg/cm² de 5 minutos sin luz de arco de exposición a los tejidos pinzados, produjo la mayor fuerza de unión (LR1-0), aproximadamente el 58% superior a la de las uniones preparadas a luz ambiente luz sola (R1-0). Los enlaces más fuertes se obtuvieron cuando los compuestos se activaron antes de la aplicación y el tejido se irradió después también (LR1-5).

Las soluciones y uniones de tejidos que se han protegido de la luz ambiente totalmente (DR1-0) mostraron de forma coherente la menor fuerza de unión. Sin embargo, la exposición a la luz durante 5 minutos a 800 mW/cm² produjo un aumento aproximado de 50% en la fuerza de enlace (DR1-5).

Los resultados indican que tanto la exposición a la luz incidente de laboratorio como la exposición a la luz azul controlada antes a la aplicación del gel de unión para el tejido pueden producir mejoras en la fuerza de unión, eliminando el requisito de irradiar los tejidos durante el procedimiento de unión.

Ejemplo 6

Unión de tejidos con variación de luz y presión

Se usó quitosana marcada con bradsilo expuesta sólo a la luz de ambiente del laboratorio durante la síntesis y manipulaciones experimentales. El procedimiento de unión fue sustancialmente el mismo que se describe en el ejemplo 5, utilizando pericardio bovino alquilado (Veritas™ hojas, Synovis quirúrgicos, St. Paul, Minn.). Los resultados se muestran en la figura 11. La muestra, en la que ninguna presión exterior se aplicó a la unión solapada (tu-5) mostró pobres fuerzas de unión. La adición del peso de un portaobjetos de vidrio único, aproximadamente 0,025 kg/cm², que garantiza la aposición de los tejidos, mejoró sustancialmente el rendimiento. Significa que la fuerza de unión casi se duplicaba entre un minuto y cinco minutos de esta compresión mínima.

La irradiación con luz azul de las muestras de tejido, que va desde 1,25 a 5 minutos a 800 mW/cm², parecía reducir sistemáticamente la fuerza de unión en comparación con muestras con el mismo tiempo de compresión. Sin querer vincularnos a la teoría, es probable que la luz ambiental anterior a la aplicación de tejido produce especies químicas en el compuesto adhesivo que causan unión posterior en el entorno de tejido. Una luz adicional azul intensa pareció destruir estas uniones productivas o agotan las especies químicas.

ES 2 371 501 T3

Ejemplo 7

Unión a tejidos en reparación arterial

5 El adhesivo de bradsilquitosana se comprobó en la unión de un parche pericárdico bovino (Veritas™, Synovis Surgical, St. Paul, MN) a la adventicia o a la superficie externa de la aorta torácica y la arteria carótida de conejos. Se utilizó el procedimiento descrito en el ejemplo 3 anterior. Se probó una muestra con compresión mínima, o con un portaobjetos de vidrio encima, para aplicar una presión de aproximadamente 0,025 kg/cm² sobre el área de unión durante unos 5 minutos sin ninguna iluminación directa con luz azul de la región de unión del tejido. Otra muestra se sometió a compresión moderada, comprimiendo el tejido entre dos portaobjetos de vidrio con gomas de caucho, que se estima que aplica una presión de aproximadamente 1 kg/cm². Una tercera muestra usó un parche sobre láminas de pared arterial en oposición como soldadura a tope. Como se observa en la figura 12, con la compresión moderada se formaron fuerzas de unión de solapa de hasta aproximadamente 0,225 kg/cm² para la aorta torácica y de aproximadamente 0,150 kg/cm² para la arteria carótida. Las fuerzas de unión usando la soldadura a tope reforzada fueron de aproximadamente 0,150 kg/cm² y 0,075 kg/cm² para la aorta torácica y la arteria carótida, respectivamente. Las uniones de la aorta torácica fueron consistentemente más fuertes que los de la arteria carótida. Además, la compresión moderada pareció beneficiosa.

20 Aunque estas fuerzas de unión globales fueron notablemente inferiores a las observadas en las uniones de tejido pericardio-pericardio, todavía proporcionan adhesión significativa del parche a la adventicia arterial. Por lo tanto, los resultados apoyan la aplicación del gel de bradsilquitosana, con exposición a luz de laboratorio, en los parches arteriales. La aplicación está particularmente avalada para arterias pequeñas, con un diámetro de aproximadamente 3 mm o menos, para las que los cálculos de los valores de tensión circunferencial de la pared tangencial inferiores a 0,15 kg/cm² a una presión interna de 40 kPa son menores que los valores obtenidos en las uniones parche-adventicia arterial anteriores. Por tanto, el gel de bradsilquitosana es útil en la reparación sin suturas de vasos sanguíneos más pequeños.

Ejemplo 8

Pruebas de citotoxicidad del gel de bradsilquitosana

35 Las limitaciones principales de los bioadhesivos actuales se encuentran en fuerzas de unión insuficientes o en problemas de toxicidad. Aunque los adhesivos de bradsilquitosana demuestran una excelente fuerza de unión y reproducibilidad, estas nuevas formulaciones también fueron sometidas a pruebas de toxicidad. La citotoxicidad se evaluó usando un modelo de cultivo celular. Dos líneas celulares se expusieron a dosis variables de los adhesivos. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo espectroscópico basado en la absorción de luz MTT (sales de tetrazolio). También se prepararon pocillos control para determinar la toxicidad relativa.

40 Los resultados, mostrados en las Figuras 13 y 14, se obtuvieron en células cultivadas de músculo liso vascular ("CMLV") (Fig. 13) y en células endoteliales ("CE") (Fig. 14). Estas líneas celulares mostraron diversos grados de sensibilidad al adhesivo cuando se exponen a 40 µl del compuesto de ensayo en 100 µl de medio durante dos días. Se eligió la cantidad de 40 µl del compuesto de ensayo porque representa la cantidad de adhesivo usado por área unitaria que se aplica durante el protocolo de unión a tejido *ex vivo*. Esto no representa las fugas y desplazamiento, ya que los tejidos están solapados y comprimidos. Además, durante la unión de tejido sólo las células de la superficie están expuestas directamente. Las capas posteriores están expuestas por difusión a dosis más bajas. Por lo tanto, los ensayos de citotoxicidad representan la respuesta celular a dosis supra fisiológicas con contacto celular directo.

50 La adición de 12,5 mg/ml de gel de quitosana solo parece no tener ningún efecto perjudicial sobre la viabilidad celular. De hecho, la quitosana mostró una tendencia a potenciar el crecimiento, particularmente en CE, con un aumento del 354% sobre los controles. Esta característica es una ventaja en la reparación de heridas. Los resultados de bradsilquitosana fueron comparables con los de los pocillos control expuestos a medio solo o a 40 µl de PBS en 100 µl de media, lo que demuestra que la formulación es relativamente inocua con respecto a la toxicidad celular. Debido a que estos compuestos no requieren activación con luz azul después de su aplicación al tejido, esta variable no se analizó. Esta característica de los compuestos marcados con bradsilo protege los tejidos de cualquier toxicidad por luz azul perjudicial para la célula. Así, incluso a dosis supra fisiológicas, los compuestos marcados con bradsilo demuestran fuerzas de unión altas y un prometedor perfil de biocompatibilidad, que estimula sus aplicaciones en uniones de tejidos blandos y cierres de heridas.

Ejemplo 9

*Parches arteriales *in vitro* e *in vivo* (no forma parte de la presente invención)*

65 Se realizaron reparaciones *in vitro* con parches en segmentos de aorta de conejos sacrificados en una cámara de órgano usando quitosana marcada con bradsilo, según el protocolo aprobado por el University of South Dakota Institutional Animal Care and Use Committee y esencialmente como se describe en el Ejemplo 3 anterior. Se realizó una herida por punción a través de la pared arterial de los segmentos arteriales. Una vez depositados 20 µl del gel

ES 2 371 501 T3

adhesivo en la superficie arterial (Veritas™, Synovis Surgical, St. Paul, MN), el parche y las superficies arteriales se juntaron con moldeado suave de la superficie externa del parche para dar forma a la superficie cilíndrica externa del segmento arterial plegado hacia dentro. La presión estimada fue de aproximadamente 0,025 kg/cm². El suave contacto por moldeado se mantuvo durante 5 minutos, con toda la superficie del parche en contacto.

5

Aunque se notó un abultamiento del parche situado encima de la herida por punción, los segmentos del parche resistieron las presiones intraluminales superiores a 0,15 MPa antes de que se observaran fugas.

También se realizaron pruebas *in vivo* del parche bajo supervisión del University of South Dakota Institutional Animal Care and Use Committee. Después de anestesiarse a los animales, la aorta abdominal quedó expuesta entre las arterias renales y la bifurcación aorto-iliaca y se pinzaron temporalmente. Se usaron fórceps para coger y levantar la aorta, mientras que para realizar una abertura irregular longitudinal de 3 mm se usaron unas tijeras pequeñas. Todo ello se selló como se describe en el estudio *in vitro*. Después de 5 minutos de tiempo de unión, se retiraron las pinzas y se dejó que regresara el flujo y la presión de la sangre. En ninguno de los animales sometidos a ensayo (n = 6) se observó hemorragia durante la observación posterior con anestesia (aproximadamente de 30 minutos). Tras cada experimento, el animal fue sacrificado de acuerdo con el protocolo aprobado.

20

Los resultados apoyan el uso del gel de bradsilquitosana en la reparación vascular.

Ejemplo 10

Fabricación de un injerto vascular tubular (no forma parte de la presente invención)

Los siguientes experimentos se diseñaron para explorar la aplicación de la tecnología de bradsilquitosana para la fabricación de prótesis de biomaterial colagenoso, conformación tridimensional, unión y sellado de una forma tubular de pericardio (Veritas™, Synovis Surgical, St. Paul, MN). Láminas del pericardio de aproximadamente 4 cm de ancho y de longitudes variables se enrollaron sobre un mandrel de madera que tiene un diámetro exterior de aproximadamente 8 mm. Esto tuvo como resultado un tubo de 4 cm de longitud con un diámetro de 8 mm y regiones solapadas de 10, 20 o 30 mm, al que se aplicó el adhesivo de quitosana marcada con bradsilo. Después de la retirada del mandrel, estos tubos se montaron en una cámara de órgano para posteriores pruebas a presión de rotura. Con independencia del área superpuesta, se observaron promedios de presiones de rotura de aproximadamente 33,3 kPa.

Otro enfoque de la fabricación de un injerto vascular tubular implica la homogeneización de una matriz de colágeno purificada, acelular (Veritas™, Synovis Surgical, St. Paul, MN). Experimentos preliminares usaron bradsilquitosana (10 mg/ml) para la reticulación del homogeneizado reticulado Veritas™ en una relación de 1:1 entre el adhesivo y el homogeneizado. Esto tuvo como resultado la reticulación definitiva del homogeneizado, en el que el material reticulado conservaba la cohesividad durante el transcurso de 8-12 días en PBS a pH 7,4, mientras que los controles no reticulados se disociaron completamente tras la rehidratación. La tecnología de bradsilquitosana puede emplearse para reticular el homogeneizado tisular en las conformaciones cilíndricas deseadas de diámetros diferentes, con o sin bifurcaciones u otro diseño de prótesis.

Ejemplo 11

45

Penetración del compuesto de naftalimida de tejido arterial ateromatoso

El siguiente experimento se realizó para analizar la forma del compuesto, la concentración del compuesto y el tiempo de exposición del compuesto que proporcionan una penetración adecuada en el tejido para estabilizar la arteria expandida.

50

Estos experimentos usaron arteria carótida aterótica de conejos New Zealand White macho adultos jóvenes (3-6 meses).

Se crearon lesiones ateroscleróticas usando el modelo de desecación al aire (LeVein, 1982). Se extirparon de los animales donantes tiras de aproximadamente 4 cm de longitud de la arteria carótida derecha e izquierda. Estos segmentos se abrieron longitudinalmente y se dividieron en 8 rectángulos pequeños, que proporcionaron 16 segmentos para analizar de cada animal. Estas piezas arteriales se sumergieron en concentraciones altas o bajas de una solución de un compuesto de naftalimida lipófila (con la estructura que se muestra en la figura 21) o una solución de un compuesto de naftalimida hidrófila (una mezcla de los tres isómeros A, B y C que se muestra en la figura 22) durante períodos de 5, 15 o 30 minutos. La naftalimida lipófila se disolvió en Cremophor® a. 20% EL (BASF, Mount Olive, NJ), un disolvente lipófilo y un agente micelar, para proporcionar una solución madre acuosa (0,9 mM, determinada mediante densidad óptica). La solución de bis-naftalimida hidrófila se disolvió en PBS, un disolvente hidrófilo (solución de 0,9 mM). Los controles de disolvente incluyeron PBS y Cremophor®. Las concentraciones "bajas" se prepararon efectuando una dilución 1:2 de la solución madre.

65

Tras la incubación en solución, los segmentos arteriales se congelaron en nitrógeno líquido, se crioseccionaron y se examinaron mediante microscopía confocal. Las imágenes se analizaron usando el software comercial de análisis de

imagen. Los perfiles fluorescentes emitidos por los compuestos de naftalimida incorporados se usaron para determinar una intensidad media y la profundidad de la penetración del compuesto. Dado que cada animal proporcionó suficiente tejido para contribuir a todos los grupos experimentales, se usó un diseño estadístico apareado para el análisis de datos. Debido a la heterogeneidad de la varianza, se usó la estadística de Friedman, seguido de un ensayo de comparaciones múltiples de Newman Keul de Student modificado.

El análisis de los resultados mostró que la inmersión de los segmentos de arteria en compuesto hidrófilo, la bis-naftalimida, dio como resultado una penetración del compuesto desde el lado luminal a todas las concentraciones y tiempos de exposición analizados. Después de un tiempo de incubación de 5 minutos, la concentración baja había penetrado aproximadamente un 31% del espesor medial en comparación con el 41% observado con la concentración alta. Después de 15 minutos, las concentraciones bajas y altas penetraron un 54% y un 80% respectivamente. Después de 30 minutos de inmersión, las concentraciones bajas y altas penetraron un 77% y un 100% respectivamente, penetrando la alta concentración a los 30 minutos más allá de la pared medial hacia la capa adventicia externa, una penetración acumulada del 129%.

La penetración del compuesto lipófilo y la localización en el segmento de pared vascular ateromatoso difirieron considerablemente de la observada con la forma hidrófila, localizándose la primera principalmente en el componente parietal de la adventicia (aumentando con el tiempo y la concentración) en lugar de en el interior de la media. El mantenimiento de la compresión de este componente de la pared no es importante en la estabilización de la permeabilidad luminal tras la dilatación con globo. Los controles no mostraron prácticamente ninguna fluorescencia, después de que se filtrara la autofluorescencia.

Los resultados indicaban que la pared arterial había captado los compuestos de naftalimida.

Ejemplo 12

Unión de tejidos en tejido arterial ateromatoso

El experimento siguiente se realizó para examinar si, tras la exposición adecuada al compuesto y a radiación, se produciría suficiente interacción molecular entre las superficies lumbales en aposición de arteria carótida de conejo aterosclerótico y producirían un aumento significativo de las fuerzas de unión con respecto a los controles. Las arterias carótidas de conejo se dañaron y diseccionaron como se ha descrito en el Ejemplo 11 anterior. Los segmentos arteriales aislados se cateterizaron con un catéter de globo de 3,0 mm y se sometieron a un protocolo de inflado con globo normalizado (tres hinchamientos a 0,6 MPa con rampas de hinchamiento de 30 segundos, y, después, hinchamientos de un minuto con un periodo de descanso de un minuto entre ellas). Este protocolo se usó para producir lesiones arteriales que pueden ser características de las observadas tras la angioplastia *in vivo*. Cada arteria se abrió longitudinalmente, cada rectángulo se cortó en cuatro piezas, dando un total de ocho segmentos de tejido de cada animal. De esta manera, cada animal contribuyó a un experimento y tres grupos control, lo que permitió un diseño estadístico apareado.

El grupo experimental se preparó mediante inmersión de los segmentos en solución del compuesto hidrófilo (la misma solución usada en el ejemplo de 11, a una concentración de 0,9 mM) durante 30 minutos. Dos segmentos arteriales saturados se colocaron de modo que las superficies lumbales estuvieran en aposición en un área de superposición con colas de espesor sencillo que sobresalían de cada extremo. La preparación de tejido se envolvió en una fina lámina de poliuretano, entre portaobjetos de microscopio de vidrio y se pinzaron con clip finos de acero con muelle en forma de C. En función de la calibración de la deflección de la carga-muelle, se estimó que la presión resultante era de 3 kg/cm², suficiente para colocar el tejido en aposición estrecha. Después, el tejido luego se expuso a luz de 400-500 nm de longitud de onda de una lámpara de arco de 159 W durante 30 minutos a una intensidad de 800 mW/cm². La fuerza de dilatación de un catéter con globo de polietileno a 0,6 MPa es de aproximadamente de 15,75 kg/cm², que proporciona la presión suficiente para colocar en aposición las superficies del interior de la pared y las placas mediante dilatación con globo.

Los grupos control estaban constituidos por láminas ateromatosas empapadas con solución de naftalimida, pinzadas y mantenidas en oscuridad, y las láminas se pintaron con PBS sin naftalimida y se mantuvieron en oscuridad o se irradiaron. Las temperaturas de la solución se mantuvieron en 27°C.

Tras la exposición a la luz u oscuridad con los mismos tiempos de retención, se quitó el pinzamiento del tejido y se retiró del poliuretano. Las muestras fueron rehidratadas en solución salina antes del ensayo de las resistencias a la tracción (Instrumentos Sintech). Las "colas" de espesor sencillo de los segmentos de tejido superpuestos se aseguraron mediante asas neumáticas. Las asas se separaron mecánicamente de forma progresiva para incrementar la tensión en la zona de superposición. Los gráficos generados por ordenador de la carga de estrés proporcionaron la tensión máxima que se alcanzó antes de la separación de las superficies en aposición. Para el análisis se usaron estadística de Friedman y pruebas estadísticas de comparación múltiple de Student Neuman Keul.

Los grupos control fallaron de forma continua, con valores no superiores a 0,035 kg/cm², mientras que el dímero hidrófilo 1,8-naftalimida (MBM Gold 12-11-12, MicroBioMed Corp., Dallas, TX) dio fuerzas de unión de media 0,07 kg/cm² para los segmentos de la pared arterial. Los experimentos posteriores con segmentos de aorta torácica dieron fuerzas de unión de 0,122 kg/cm².

ES 2 371 501 T3

Los resultados indican que sí se produce reticulación entre los constituyentes proteicos de la pared arterial, que es necesaria mantener el diámetro expandido y reparar la disección de la íntima y la media, limitando de este modo una respuesta de reparación proliferativa y, en última instancia, la reestenosis.

5 Ejemplo 13

Estabilización in vitro de las dimensiones de la pared arterial dilatada

10 El siguiente experimento usó segmentos arteriales cilíndricos intactos perfundidos en una cámara de órgano para simular más estrechamente las condiciones *in vivo*. La cámara de órgano estaba equipada con una esfera de disección, cámara de vídeo y VCR para permitir aumentos de las imágenes de la arteria y almacenar las imágenes para su revisión posterior. A partir del análisis histológico se evaluó la capacidad de la técnica para reparar las disecciones de la íntima y la media inducidas por angioplastia.

15 Las arterias carótidas de conejo se dañaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 11, excepto porque la lesión producida era más pequeña (aproximadamente 1 cm). Después de 4 a 6 semanas de desarrollo de la placa, las carótidas se diseccionaron y extirparon como se indica en el Ejemplo de 11. El segmento de arteria aislado de 4 cm se montó sobre una cámara de órgano especializada mediante canulación de ambos extremos de la arteria con tubos a través de los que se hizo circular el perfundido de solución salina fisiológica a 37°C usando una bomba de dosificación con diafragma para mantener el suministro la solución de perfusión oxigenada y de nutrientes. Una mezcla de gas de oxígeno al 95%/dióxido de carbono de al 5% se introdujo en burbujas en el depósito de solución salina para generar perfusado oxigenado. Se fijó el segmento para mantener su longitud *in situ*. Después de montar la arteria, el vaso se perfundió durante 30 minutos para permitir que el tejido arterial se equilibrara. Las presiones intraluminales se midieron de forma continua usando un fisiográfico por ordenador.

20 A continuación, cada segmento arterial fue sometido a un inflado con globo estandarizado para similar una PTCA. Ambos diámetros de globo se escogieron de modo que se acercaran a la relación de 1,3:1,0 entre el diámetro máximo del globo y el diámetro del vaso "normal". El catéter de globo se introdujo en el lumen del vaso a través de un tabique permeable perforado por un introductor/eje provisto en el eje del catéter con globo. Se hizo avanzar al catéter hasta el globo de 2 cm llegó a la parte central del segmento arterial. El protocolo estándar de angioplastia incluyó tres hinchamientos a 0,6 mPa con rampas de hinchamiento de 30 segundos e hinchamientos de 60 segundos- Cada hinchamiento terminó con la liberación del mecanismo de hinchamiento, seguido de 30 para comprobar las presiones basales. Todo ello se grabó en vídeo de forma continua. Los cambios del diámetro exterior se registraron usando el software de detección de borde.

25 Después de la dilatación con globo, las arterias experimentales se llenaron con compuesto de naftalimida hidrófilo 12 mM durante 30 minutos asegurar la difusión del compuesto en el tejido. Se realizó un hinchamiento único final.

30 El segmento arterial se irradió a 800 mW/cm² durante un total de 45 minutos durante el hinchamiento del globo, rotándose la arteria dos veces para garantizar la irradiación de toda la circunferencia arterial. La irradiación intraluminal a través de una guía de fibra óptica mejoraría uniformemente la administración de luz y reduciría los tiempos de irradiación requeridos. Actualmente se dispone de tecnología para proporcionar luz intraluminal.

35 Los grupos control estaban constituidos por un grupo sin irradiación, un grupo con naftalimida sin irradiación y un grupo con solución salina en lugar del compuesto naftalimida.

40 Después del tratamiento, la solución de perfusión se cambió a glutaraldehído tamponado con fosfato, los tejidos fueron perfundidos y los tejidos se almacenaron después en la misma solución para fijar el tejido para el análisis microscópico óptico y de electrones.

45 Los análisis histológicos y morfométricos consistían principalmente en (1) determinación de la sección transversal, el área medial, el área de la íntima y el porcentaje de placa y (2) la determinación de la circunferencia luminal y de la circunferencia medial externa y otras dimensiones físicas, así como la evaluación histológica de las lesiones tisulares. Los análisis morfométricos cuantificaron las áreas luminal, de la placa y medial en las arterias control y tratadas fijadas por perfusión.

50 Se observó una variabilidad considerable en la extensión de la placa que se encuentra en los segmentos independientes del grupo. Aunque esta variabilidad dificultó más los análisis morfométricos, que se muestran en la figura 15, había fuerte tendencia al adelgazamiento medial en el grupo de luz/naftalimida. El espesor de la media representó el 5,5% - 2,2% del radio exterior frente al 9,2% + 2,2% en el grupo de PBS/oscuridad. Las áreas lumbales tendían a ser más grandes en los grupos que recibieron fotoquímica y luz.

55 Los resultados indican que sí se producía la estabilización del área dimensional del lumen dilatado por medios fotoquímicos, creando un "stent" endógeno.

ES 2 371 501 T3

Ejemplo 14

Retención de la pared arterial comprimida por reticulación

5 La compresión de la placa aterosclerótica y otros tejidos componentes debería tener como resultado un aumento del diámetro de lumen. El ejemplo 13 mostró el adelgazamiento de la pared medial y la ganancia del diámetro del lumen tras la unión fotoquímica en estado dilatado. Además, los experimentos anteriores con la piel superpuesta comprimida pintado con naftalimida e irradiada mostraban estabilización de la piel comprimida, con el espesor igual al 70% del de la sin comprimir. El siguiente experimento se realizó para determinar si se observaba retención similar de compresión
10 de tejido en el tejido vascular.

Las arterias coronarias porcinas se diseccionaron de corazones de cerdo frescos posmortem. Cada arteria se abrió longitudinalmente y se obtuvieron discos de 3 mm usando una biopsia de punción.

15 El grupo experimental (naftalimida/luz) se preparó mediante inmersión de los segmentos de los discos en solución del compuesto hidrófilo (MBM 15 mM, MicroBioMed Corp., Dallas, TX, una mezcla de 3 isómeros diméricos) durante 5 minutos. A continuación, el disco se envolvió en una lámina de poliuretano, entre los portaobjetos de vidrio del microscopio, y se colocó en un dispositivo de palanca diseñado para aplicar una fuerza controlada a la superficie del portaobjetos. Se aplicaron pesos de 5,3, 10,14 y 20,28 kg/cm². Se aplicó luz a longitudes de onda de 400-500
20 nm de una lámpara de arco sobre la superficie del espécimen a una intensidad de 800 mW/cm² durante 10 minutos. Los grupos control estaban constituidos por discos tratados con naftalimida sin irradiación lumínica y discos expuestos a soluciones salinas tamponadas sin naftalimida, expuestos a luz o mantenidos en oscuridad.

Tras la exposición a la luz o a oscuridad con los mismos tiempos de retención, se retiró el tejido del dispositivo de presión y de la envoltura y se hidrató en solución salina tamponada durante veinte horas antes de las últimas mediciones del diámetro, para asegurar que cualquier retención de compresión no se debía a una deshidratación parcial. Las medidas del diámetro se realizaron antes de cualquier compresión, inmediatamente después del tratamiento (antes de la rehidratación) y 20 horas después de la rehidratación. Para el análisis se usaron estadística de Friedman y pruebas estadísticas de comparación múltiple de Student Neuman Keul.
25

30 La fuerza de compresión inferior de 5,34 kg/cm² mostró una compresión significativa de los segmentos y después del periodo de rehidratación de 20 horas, el grupo tratado con naftalimida/luz mostró una compresión residual significativamente mayor en comparación con los controles (es decir, grupo de luz/naftalimida-19,4±8,4% vs. grupo de naftalimida/oscuridad 7,1±5,7%). Las fuerzas de compresión más altas demostraron ser demasiado altas para un uso práctico, ya que todas las fuerzas superiores producían daños en la pared y distorsión parietal irreversible. La fuerza menor usada fue comparable con valores que se podían conseguir con la dilatación con globo.
35

Los resultados indican que la reticulación fotoquímica de los constituyentes de la pared vascular durante la compresión puede dar lugar a una retención significativa de la compresión parietal antes y después de la rehidratación.
40

Ejemplo 15

Administración intraluminal de naftalimidias

En este experimento, la administración intraluminal a través del catéter y el lavado por reperfusión de estos compuestos de naftalimida se evaluaron para determinar su eficacia de unión a la pared vascular.

50 La administración local de estos compuestos de 1,8-naftalimida se logró mediante un catéter de infusión coronaria disponible comercialmente. (DISPATCH™, SciMed®, Maple Grove, MN). Este catéter incorpora muelles inflables que crean “compartimentos” para fármacos que permiten el contacto del fármaco con la pared arterial. Su capacidad de perfusión permite tiempos de difusión de fármacos más prolongados sin causar isquemia distal. Este sistema de administración local permite tiempos de permanencia comparables a los usados en los experimentos *in vitro* anteriores, en los que se demostró el éxito de la penetración del compuesto.
55

Para los experimentos *in vitro*, se recogieron arterias carótidas normales de conejos New Zealand White macho adultos jóvenes (3-6 meses) sacrificados. De cada uno se cortó una pequeña longitud de arteria para servir como tejido control no tratado (negativo) o empapado en inmersión (positivo) en los posteriores análisis fluorométricos. Los segmentos arteriales se cateterizaron y sometieron a un protocolo estándar de angioplastia con globo (descrito en el ejemplo 13) inflado a 0,6 MPa durante tres hinchamientos de un minuto y sumergidos en solución salina fisiológica (PSS) a 37°C. El catéter de globo estándar se reemplazó después con el catéter de infusión DISPATCH™ que se infló a una presión de 0,6 MPa. El puerto de infusión se cargó con 10 mM lipófila (MBM Yellow 06-06, MicroBioMed Corp., Dallas, TX) o compuesto de 1,8-naftalimida hidrófilo (MBM Gold 12-11-12, MicroBioMed Corp., Dallas, TX). Se usaron tres fuertes ráfagas cortas iniciales para promover el llenado uniforme de los “compartimentos de fármacos”. La infusión posterior a 1,59 cc/h mantuvo la administración del compuesto en un período de 30 minutos. Para asegurar la administración intraluminal, los segmentos arteriales se suspendieron en un cuenco y se aclararon continuamente enjuagarse con solución salina en lugar de inmersión para eliminar el potencial de administración de compuestos
65

ES 2 371 501 T3

desde cualquier ubicación, excepto desde dentro del lumen. También se realizaron experimentos de lavado en los que se perfundió PBS a presiones fisiológicas durante 10 minutos para evaluar la retención de compuesto. Uno de los segmentos control se sumergió en el compuesto y se usó como control positivo.

5 Todos los segmentos arteriales experimentales expuestos a los compuestos de naftalimida mostraron una tinción amarilla el tejido visible por examen macroscópico. Se desarrolló un ensayo fluorométrico para cuantificar la presencia compuesto residual en la pared arterial. Después de un breve aclarado y transferencia, los pesos comparables del tejido control y experimental se homogeneizaron (OMNI tejido Homogenizer, OMNI International, Warrenton, VA) en 4 ml de NaCl al 0,9%. Se preparó una curva estándar usando las concentraciones del compuesto conocidas. 40 μ l de cada uno de los homogeneizados desconocido se añadió a 250 μ l de NaCl al 0,9%. Los ensayos se realizaron por triplicado usando un lector de fluorescencia FL 500 Microplate Fluorescence Reader para determinar la fluorescencia de cada muestra. Después se usó regresión lineal para trazar la curva estándar y extrapolar las concentraciones (nmol del compuesto/g de tejido) de los desconocidos para los diversos tratamientos. La localización del compuesto dentro de la pared arterial se demostró mediante microscopia de fluorescencia. Para el análisis de los datos se usó el mismo sistema estadístico usado en experimentos anteriores, estadística de Friedman seguida de pruebas de comparación múltiple de Student Neuman Keul.

El uso del catéter DISPATCH™ dio lugar a la administración luminal eficaz de ambos compuestos de naftalimida tanto hidrófilos como lipófilos. La Fig. 16 muestra la retención del compuesto hidrófilo en la pared arterial, la figura 17 muestra la retención del compuesto lipófilo en la pared arterial, y la figura 18 es una comparación de ambos compuestos y de los métodos de tratamiento. Las zonas de mayor intensidad de compuesto se observaron en asociación con las lagunas aisladas en los muelles de administración, pero la concentración con se observó a lo largo de todo el lumen. La cantidad total de compuesto administrado fue diferente usando las formas hidrófilas y lipófilas, sin embargo, fue coherente con las distribuciones determinadas anteriormente mediante inmersión. Utilizando la forma hidrófila, administración intraluminal provocó una mayor administración del compuesto en cuatro de los cinco segmentos probados. El quinto de los animales, los valores de inmersión fueron superiores a los valores del catéter de administración. En generales, los valores de 1136 ± 749 nmol compuesto/g tejido se demostraron para compuestos de naftalimida hidrófilos administrados usando el sistema de catéter para administración local de fármaco DISPATCH™.

Dado que no se usó exposición a luz alguna para unir el tejido durante el experimento, el lavado (WO) del compuesto fue sustancial para las formas tanto lipófilas como hidrófilas. Después de 10 minutos de perfusión salina postadministración del compuesto, los niveles del compuesto lipófilo fueron $48,2\% \pm 38\%$ menores que con la administración intraluminal por sí sola. Los niveles del compuesto hidrófilo fueron $89,2\% \pm 8\%$ menores que los niveles de prelavado. Sin embargo, los niveles restantes fueron lo suficientemente altos como para permitir la observación directa de la fluorescencia y el color del tejido.

Los resultados indican que a administración intraluminal de la fotoquímica a los componentes de la pared arterial mediante DISPATCH™ o un sistema similar para lograr la estabilización de la compresión del tejido o para administración de fármacos es un sistema satisfactorio. El compuesto hidrófilo es la naftalimida de elección debido a que no sólo se localiza en regiones de la pared arterial sino también en proteínas unidas fotoquímicamente dentro de la pared.

Ejemplo 16

Administración local de fármacos mediante fijación fotoquímica

En este experimento, se analizó la fijación fotoquímica *in vitro* de la heparina a la pared arterial utilizando naftalimida.

Un ejemplo de un compuesto de naftalimida (que tiene la estructura que se muestra en la figura 23) se unió a enoxaparina (Lovenox®, Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ) y se biotiniló en una relación 1:1 mediante procedimientos estándar de biotinilación para proporcionar un medio de marcar la heparina para la localización histológica. La heparina se unió a la naftalimida como se muestra en la Figura 3 mediante unión covalente al compuesto de naftalimida.

Este compuesto de heparina modificado se aplicó después a la superficie luminal de las arterias coronarias de cerdo extirpadas. Secciones experimentales se irradiaron a 800 mW/cm^2 de luz azul a 400-500 nm durante 5 minutos. Las secciones control recibieron luz sin compuesto, el compuesto sin luz o ni el compuesto ni luz. A continuación, se sometió a todas las secciones a lavados secuenciales para eliminar la heparina que no se había unido. Se realizaron comparaciones en base a la coloración de las secciones. Los especímenes que habían recibido el compuesto de heparina/naftalimida e irradiación con luz azul de fotoactivadora mostraron una tinción fuerte a lo largo de la superficie luminal y, en menor grado, a lo largo de la pared arterial. Por lo tanto, se mostró la unión fotoquímica definitiva de la heparina a la pared, localizada principalmente en la superficie luminal, pero con penetración y unión sustanciales también a la media. No se pudo demostrar en los controles negativos la típica tinción marrón indicativa de la presencia de heparina residual. En todos los especímenes se observaron artefactos en forma de cierta tinción roja dentro de la íntima y el aspecto amarillento del espécimen del grupo que recibió compuesto/luz indicó la presencia de algo de naftalimida residual después de los lavados.

ES 2 371 501 T3

La activación con luz de la naftalimida, como se ha indicado anteriormente, tiene como resultado la escisión del grupo amino en la cuarta posición, lo que da lugar a la pérdida de su coloración amarilla típica. El aspecto del producto de biotilación localizado y la falta de color amarillo en la pared arterial del grupo experimental (heparina modificada con naftalimida más luz) proporcionaron pruebas adicionales del éxito de la unión con el tejido. La falta de color amarillo indicó el éxito de la modificación fotoquímica de la naftalimida, ya que la rotura del enlace en la posición 4-amino da lugar a la pérdida del color y libera el anillo de naftalimida y la heparina fijada para unirse al tejido.

Los resultados indican el éxito de la fijación fotoquímica de un agente farmacológico clínicamente útil, heparina, al tejido de la pared arterial con un compuesto 4-amino-1,8-naftalimida.

Ejemplo 17

Síntesis de quitosana modificada con protector solar

Para preparar cloruro de fenilbencimidazol sulfonilo, a 50 ml de dioxano seco se añadieron 0,5 g de ácido fenilbencimidazolsulfónico (274 g/mol) (1,8 mmol) y se agitó a reflujo hasta su disolución. Se añadieron a la reacción 0,21 g de cloruro de tionilo (3,6 moles) y la mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos. Después de de 30 minutos, el condensador de reflujo se reemplazó por un cabezal rígido y el disolvente se retiró mediante destilación hasta obtener un volumen final de 5 ml de remanentes en el frasco.

El cloruro de fenilbencimidazolsulfonilo se añadió después, gota a gota, a 1 gramo de quitosana que se había disuelto en 20 ml de ácido acético al 10%. Esta mezcla se agitó durante una hora, tras lo cual se aumentó el pH 8 mediante la adición, gota a gota, de KOH 1M con agitación. La mezcla se dejó reaccionar durante tres horas, tras las cuales la quitosana modificada se recogió mediante centrifugación, se redisolvió en ácido acético diluido y se dializó contra PBS.

Ejemplo 18

Fijación de biomolécula modificada con protector solar

Para comprobar la adhesión del protector solar a la piel y la penetración del protector solar en la piel, se recogió piel de 6 ratas hembra Sprague Dawley sin pelo. Se añadió naftalimida (50 mg de bradsilo en 1 ml de acetona) al mismo tiempo que el cloruro de fenilbencimidazolsulfonilo del ejemplo 17, produciendo una quitosana modificada con protector solar y naftalimida. El protector solar preparado anteriormente se aplicó en muestras de piel de 2 x 2 cm, se dejaron secar y después se lavaron para simular la acción de nadar. Un secado de 40 minutos y un lavado de 20 minutos constituyeron un ciclo. Muestras diferentes sufrieron hasta seis ciclos de secado/lavado. Las puntas de los guantes usados para aplicar el protector solar, los lavados de agua y una extracción de la protección solar de la piel con ácido láctico diluido se analizaron utilizando la fluorescencia de la molécula trazadora para determinar la cantidad de filtro solar que permaneció adherido a la piel.

El estudio de penetración también usó la molécula trazadora fluorescente fijada al protector solar. Después de varios ciclos de secado/lavado, las muestras se conservaron y procesaron para análisis de microscopia con fluorescencia. El trazador fluorescente demostró el grado de penetración del protector solar en la piel. La intensidad de la molécula trazadora fluorescente también se evaluó para determinar cuánto protector solar se había adherido a la piel.

Como se muestra en la figura 24, los resultados del estudio concluyen que, después de una serie de seis ciclos de secado/lavado, aproximadamente el 60% del protector solar seguía adherido a la piel. La mayoría del 40% restante del protector solar se había perdido en la punta del guante durante su aplicación o en el primer lavado con agua. La microscopia con fluorescencia verificó que el protector solar sólo se adhería a la superficie epidérmica de la piel u no penetraba en la piel.

Referencias citadas

Los siguientes documentos de patentes de EE.UU. y publicaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

Patentes de EE.UU.

Patentes de EE.UU. concedidas a

5,235,045 Lewis, *et al.*

5,565,551 Lewis, *et al.*

5,766,600 Lewis, *et al.*

ES 2 371 501 T3

5,917,045 Lewis, *et al.*

6,410,505 Lewis, *et al.*

5

Otras publicaciones

LeVeen, R., Wolf, G., Villanueva, T. New rabbit atherosclerosis model for the investigation of transluminal angioplasty. *Invest Radiol*, vol. 17, pp. 470-75, 1982.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 371 501 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un compuesto 4-amino-1,8-naftalimida para usar en un procedimiento para estabilizar la pared de una arteria que tiene proteínas en la pared arterial, placas endógenas y un sitio de diámetro luminal expandido tras angioplastia, comprendiendo dicho procedimiento

infundir una cantidad eficaz de dicho compuesto 4-amino-1,8-naftalimida en la arteria en el sitio del diámetro luminal expandido; y

10 activar el compuesto 4-amino-1,8-naftalimida con una cantidad suficiente de un agente activador para reticular las proteínas de la pared arterial y las placas endógenas y estabilizar la pared de la arteria.

15 teniendo el compuesto 4-amino-1,8-naftalimida la estructura D-B, en la que D es una molécula de compuesto 4-amino-1,8-naftalimida y B es quitosana.

20 2. Un compuesto que tiene la estructura D-B-F, en la que D es una molécula de compuesto 4-amino-1,8-naftalimida, B es quitosana y F es una molécula funcional de un agente farmacológico, un material para cuidados de la piel, un protector solar o un cosmético.

25 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 para usar en un procedimiento de administración local de un agente farmacológico en un área tisular objetivo, obteniéndose dicho compuesto mediante fijación del agente farmacológico a dicha molécula 4-amino-1,8-naftalimida para dar una especie preparada que tiene un resto de agente farmacológico, un enlace de fijación y un resto naftalimida, comprendiendo dicho procedimiento:

Infundir la especie preparada en el área tisular objetivo, para dar una especie administrada; y

30 activar la especie administrada con una cantidad suficiente de un agente activador para desplazar el resto naftalimida y unir el enlace de fijación al área tisular.

35 4. Un compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la escisión endógena libera el resto de agente farmacológico para interacción celular.

40 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 para usar en un procedimiento para reducir la incidencia de reestenosis y estabilizar la pared de una arteria que tiene proteínas en la pared arterial, placas endógenas, y un sitio de diámetro luminal expandido tras angioplastia, obteniéndose dicho compuesto mediante fijación de un agente anti-reestenosis al compuesto 4-amino-1,8-naftalimida para dar una especie preparada que tiene un resto anti-reestenosis, un enlace de fijación y un resto naftalimida, comprendiendo dicho procedimiento:

45 Infundir la especie preparada en la arteria en el sitio del diámetro luminal expandido, para dar una especie administrada; y activar la especie administrada con una cantidad suficiente de un agente activador para reticular las proteínas de la pared arterial y las placas endógenas, estabilizar la pared de la arteria, desplazar el resto naftalimida y unir el enlace de fijación al área tisular.

50 6. Un compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la escisión endógena del enlace de fijación liberará el resto de agente anti-reestenosis para interacción celular.

55 7. Un compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente anti-reestenosis es heparina, taxol o sirolimus.

60

65

70

Fig. 1

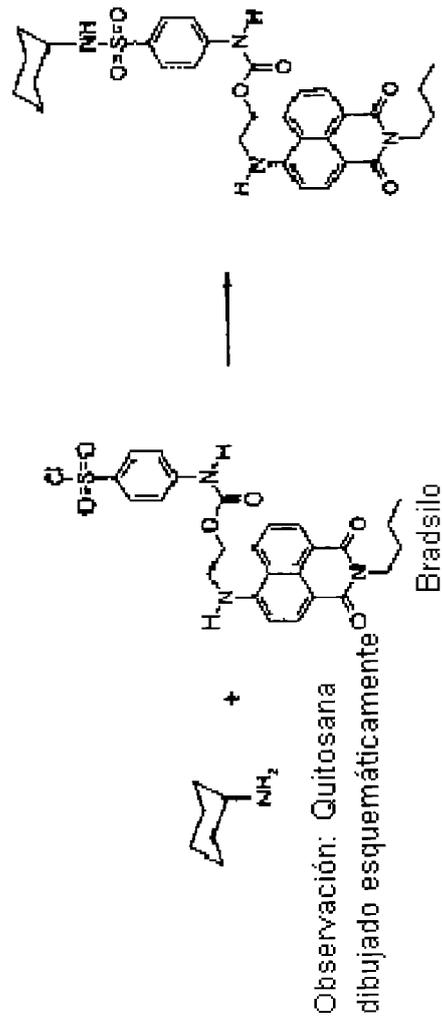


Fig. 2

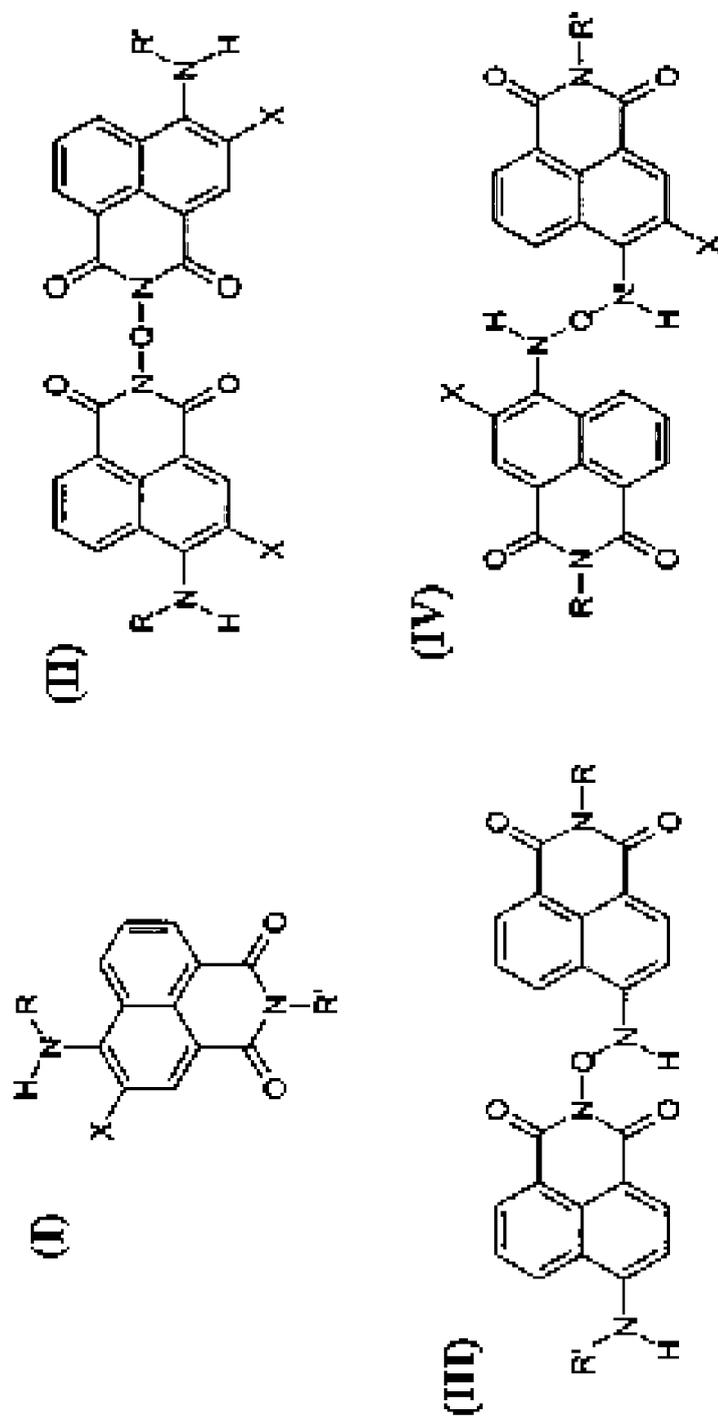


Fig. 3

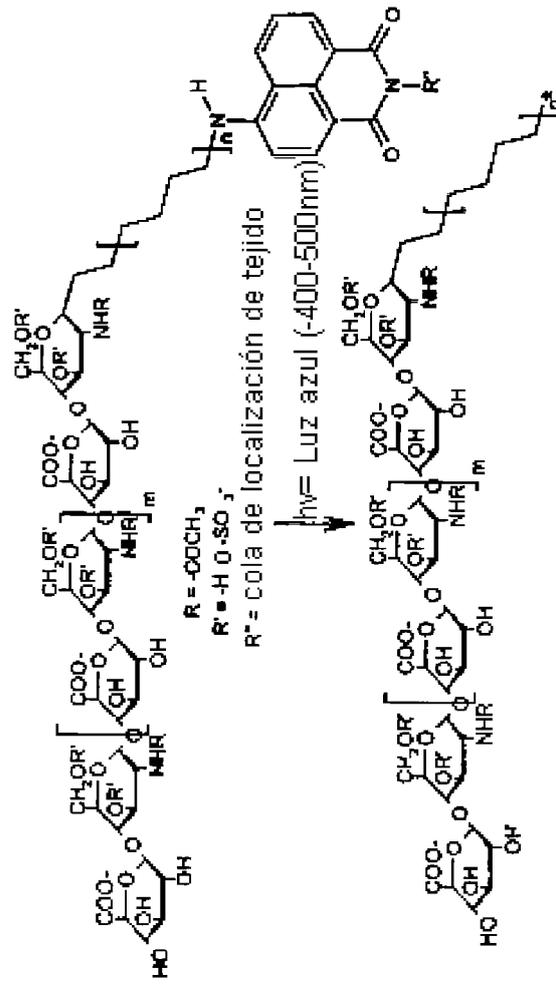
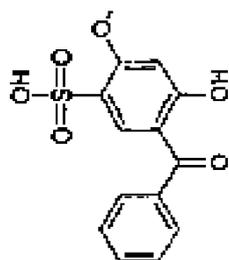
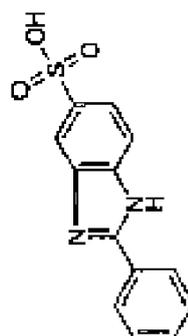


Fig. 4



Sulfisobenzonazole



Ácido fenilbencimidazol sulfónico

Fig. 5

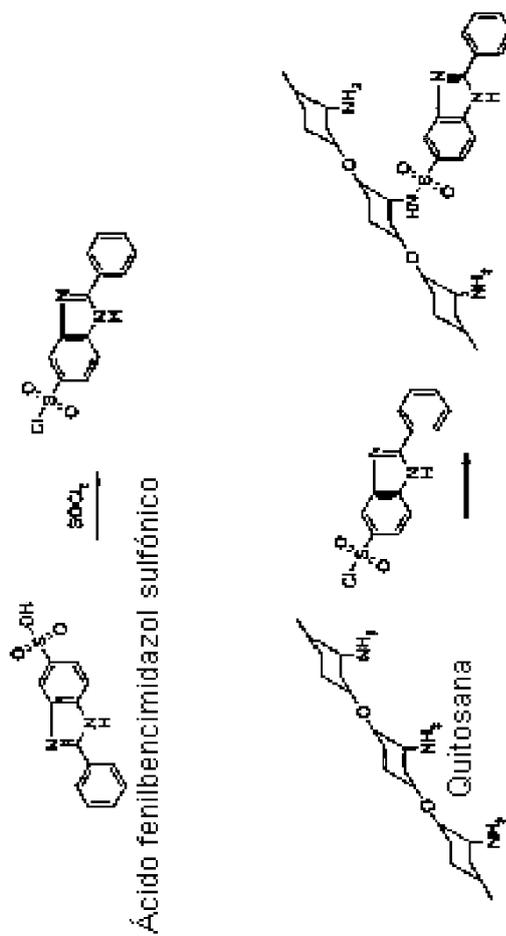


Fig. 6

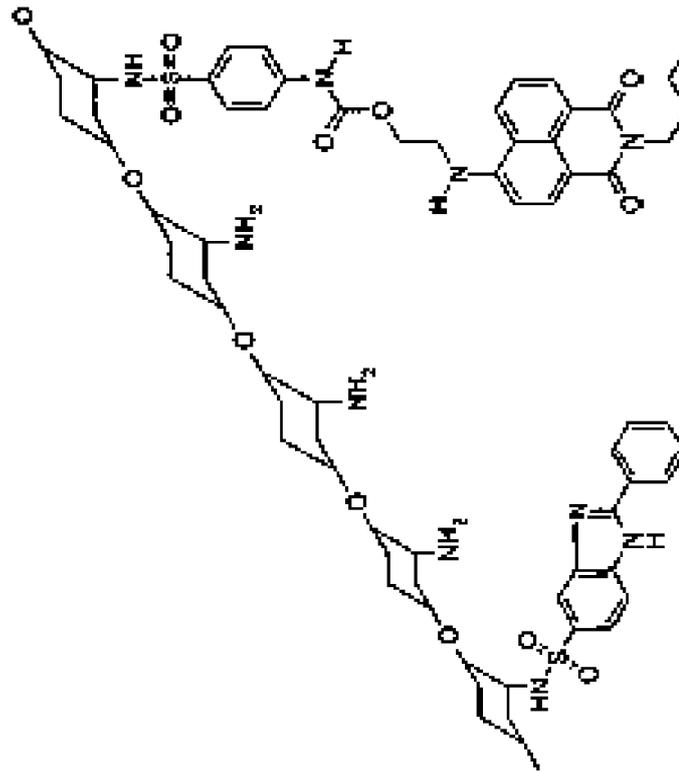


Fig. 7

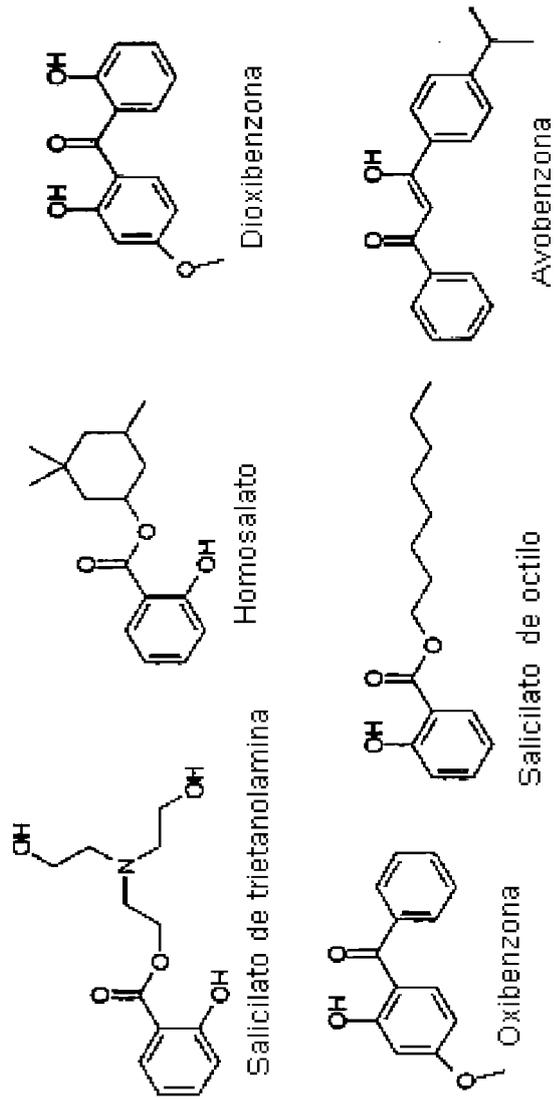


Fig. 8

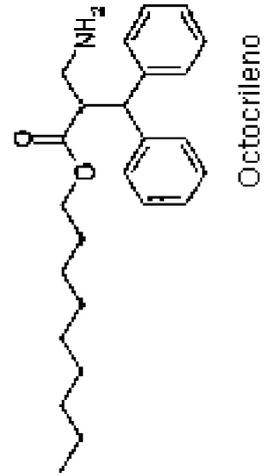
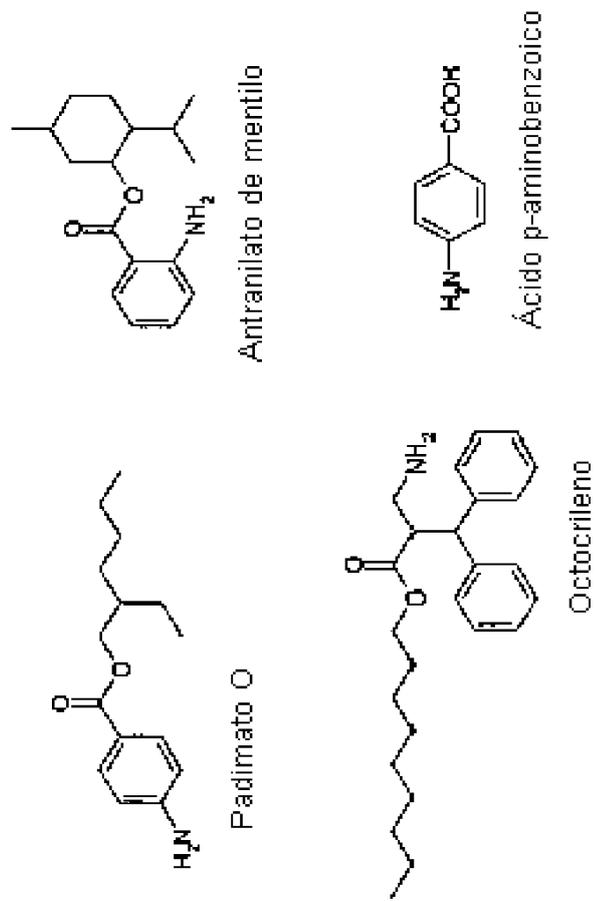


Fig. 9

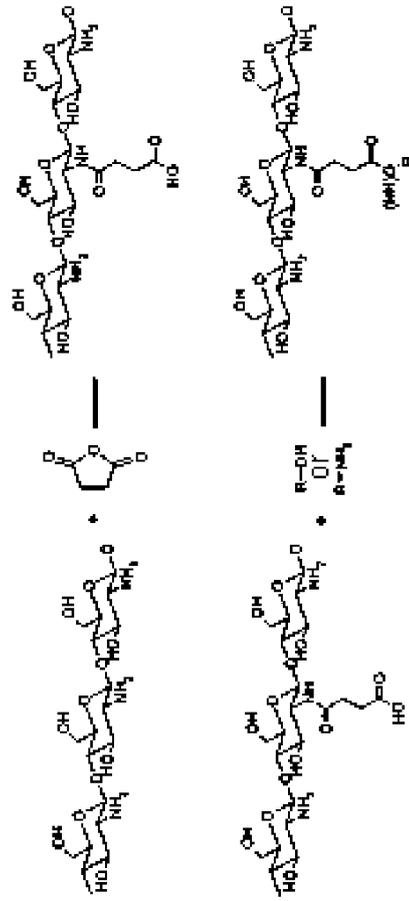


Fig. 10

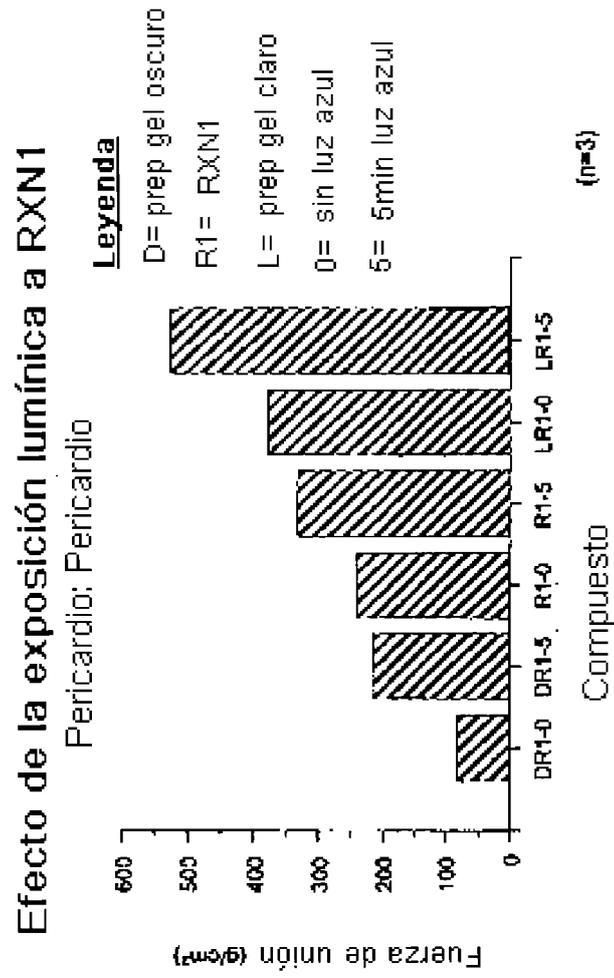


Fig. 11

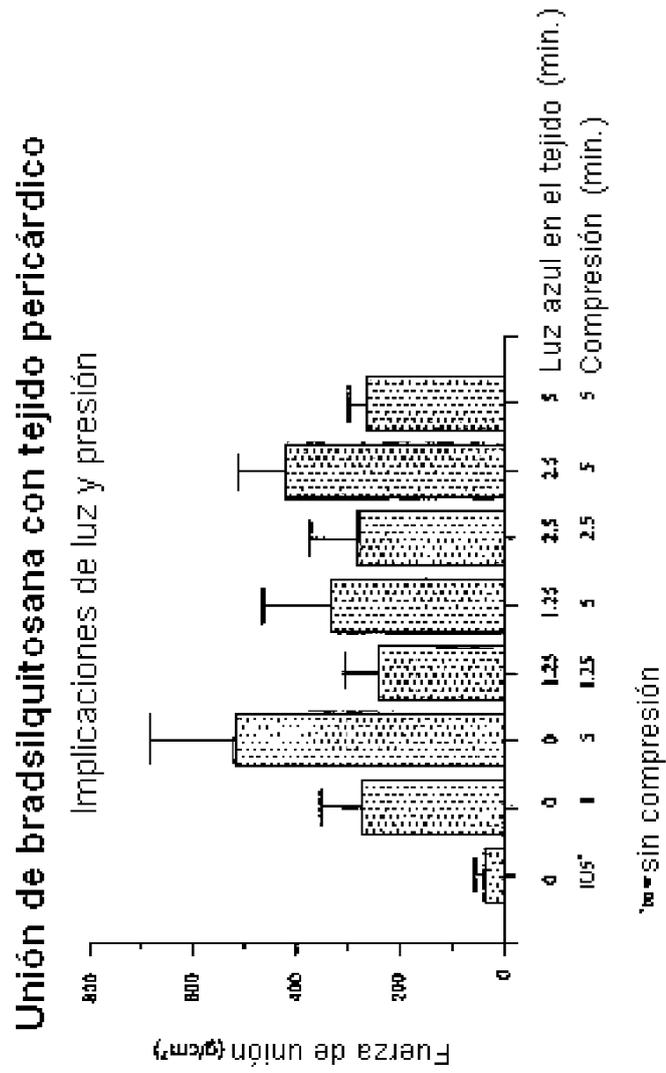


Fig. 12 Adventicia arterial de conejo: Substrato de parche usando bradsilquitosana

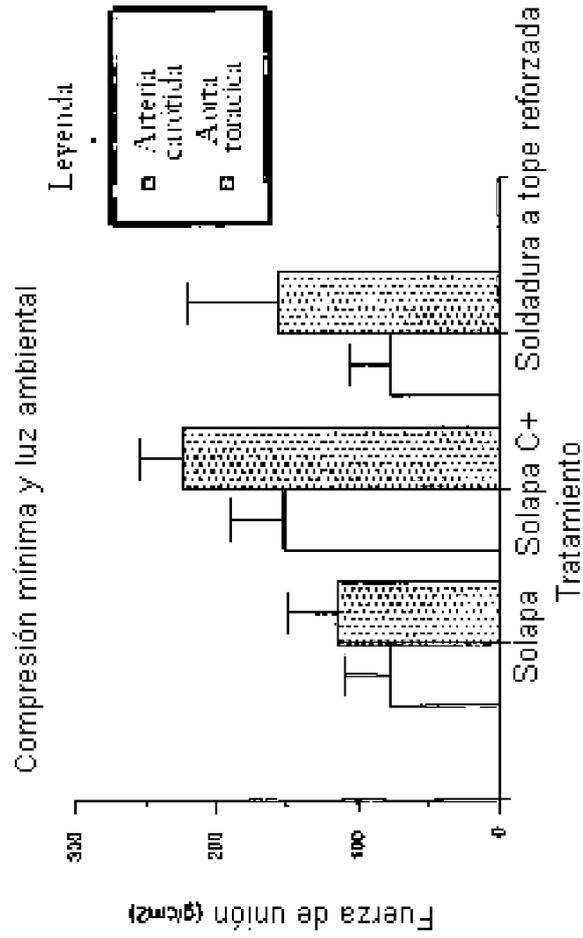


Fig. 13

Citotoxicidad de células en cultivo
Ensayo MTT- célula vascular de músculo esquelético liso

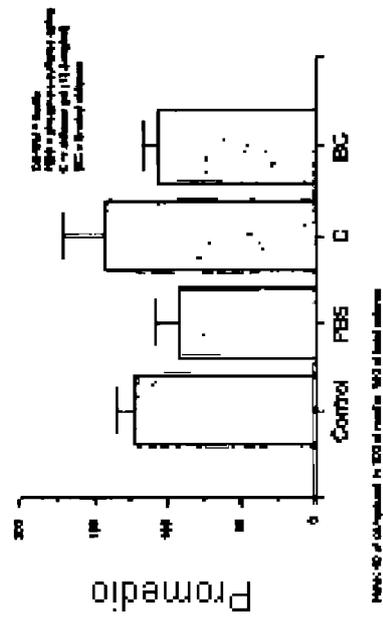
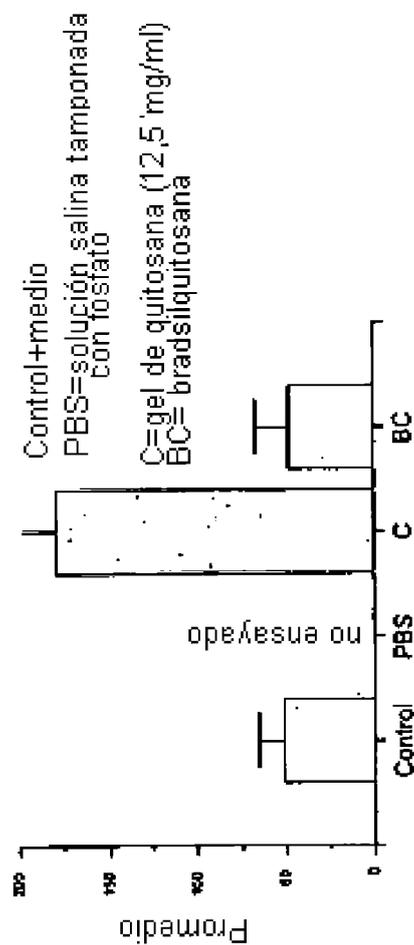


Fig. 14

Citotoxicidad en cultivo de células

Ensayo MTT- células endoteliales de la vena umbilical humana



Nota: 40 ul de compuesto en 100 ul de medio; 50 ul de volumen total

Fig. 15

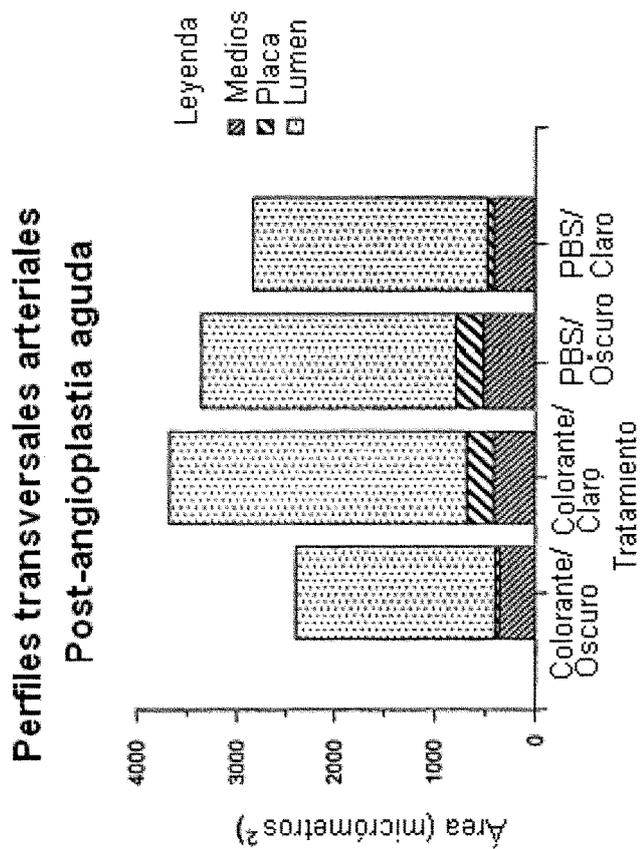


Fig. 16

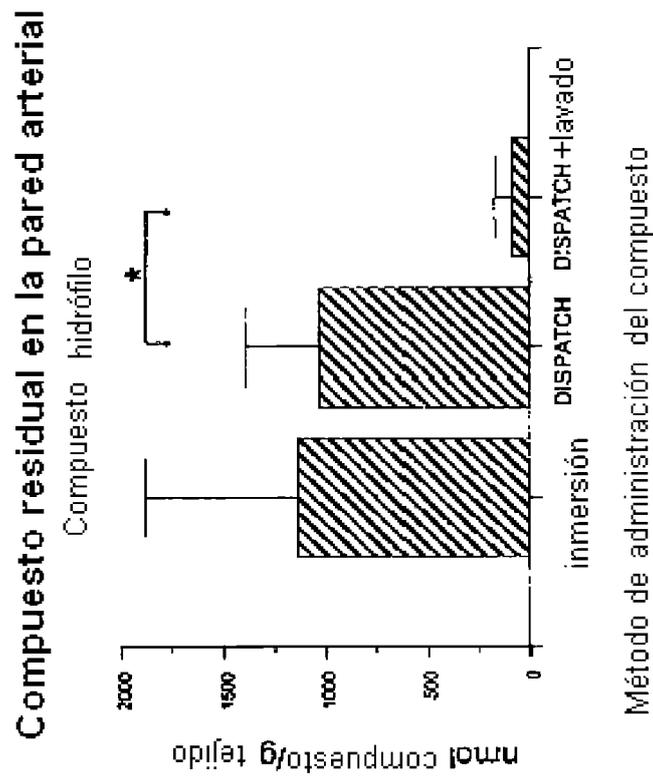


Fig. 17

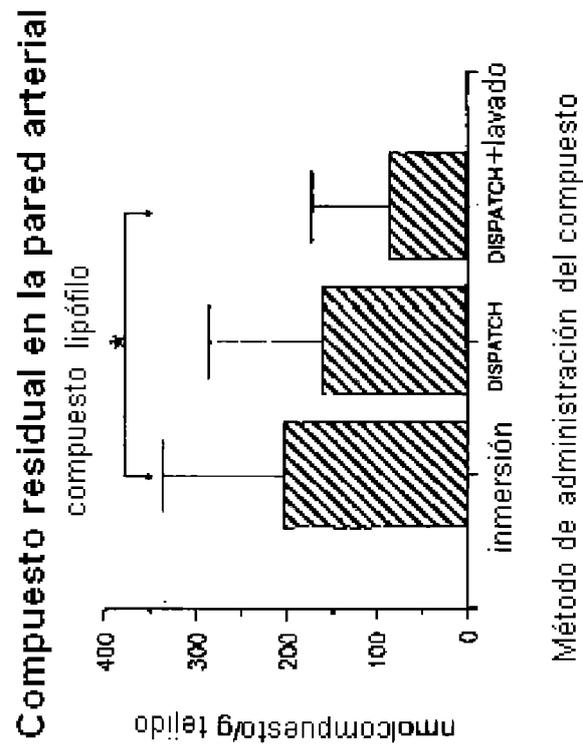
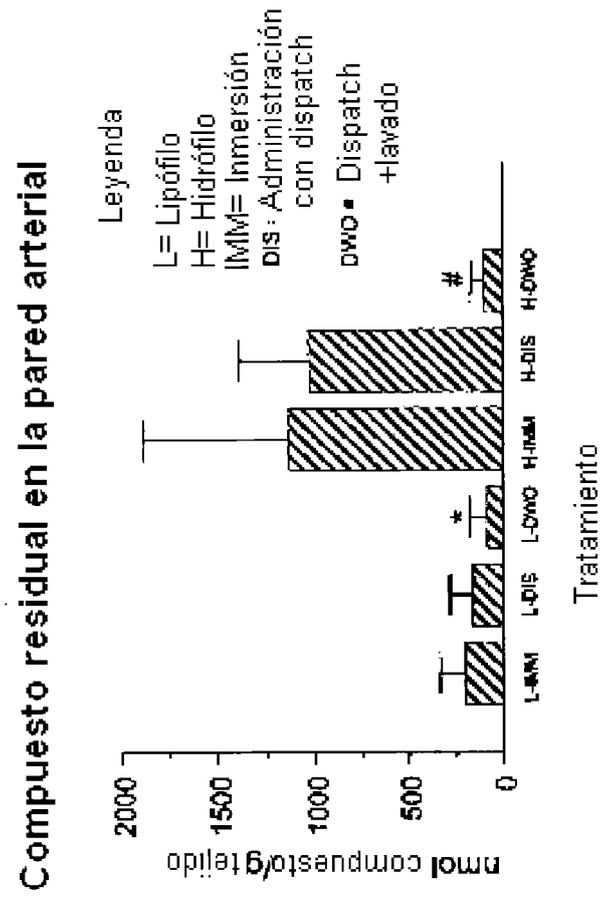


Fig. 18



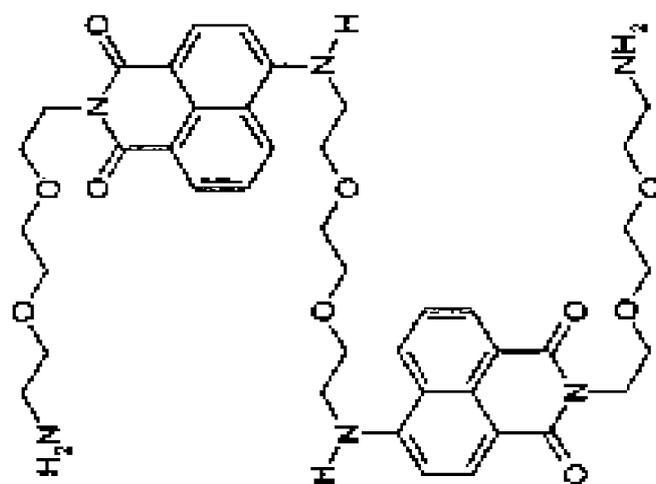


Fig. 19

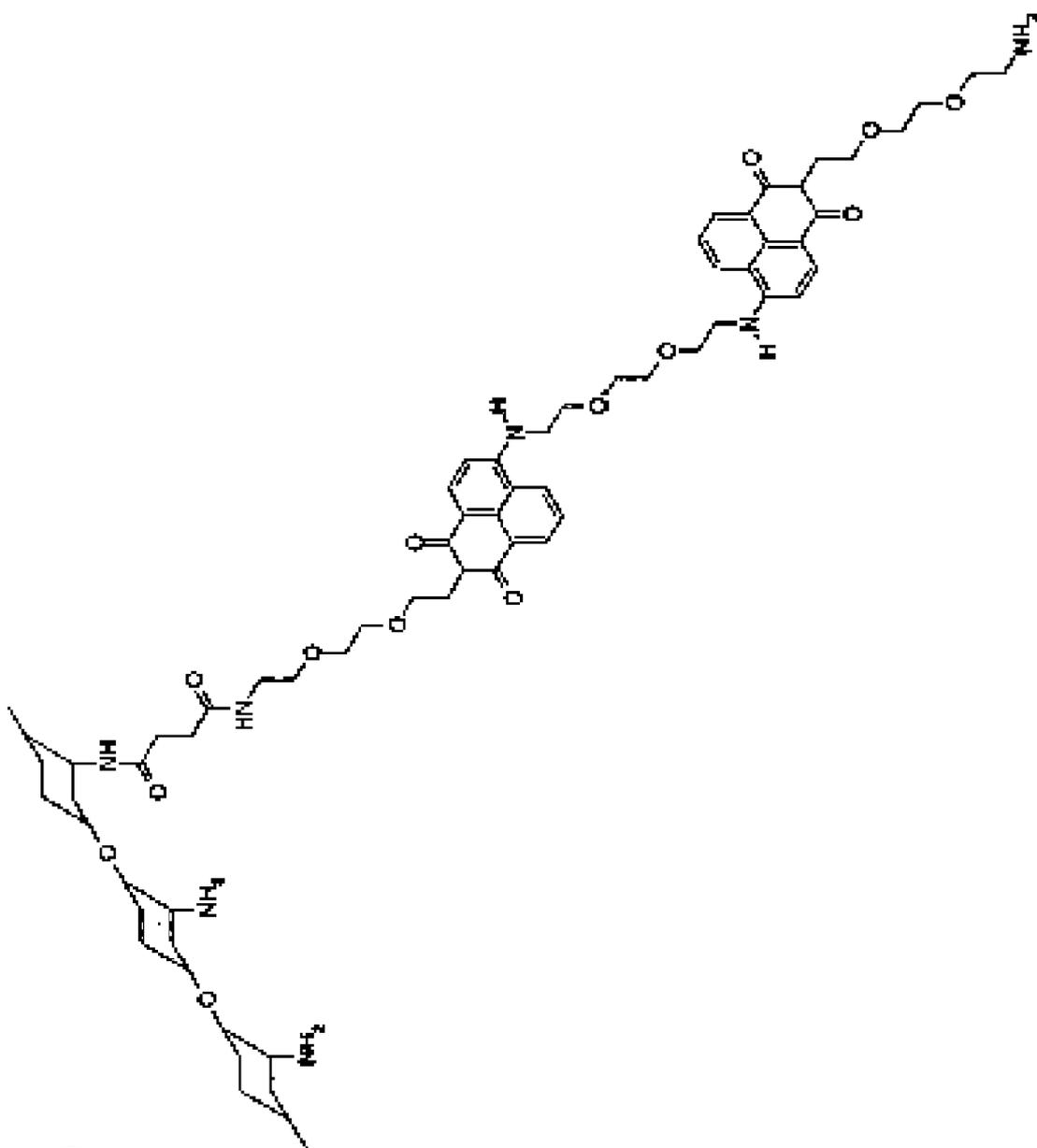


Fig. 20

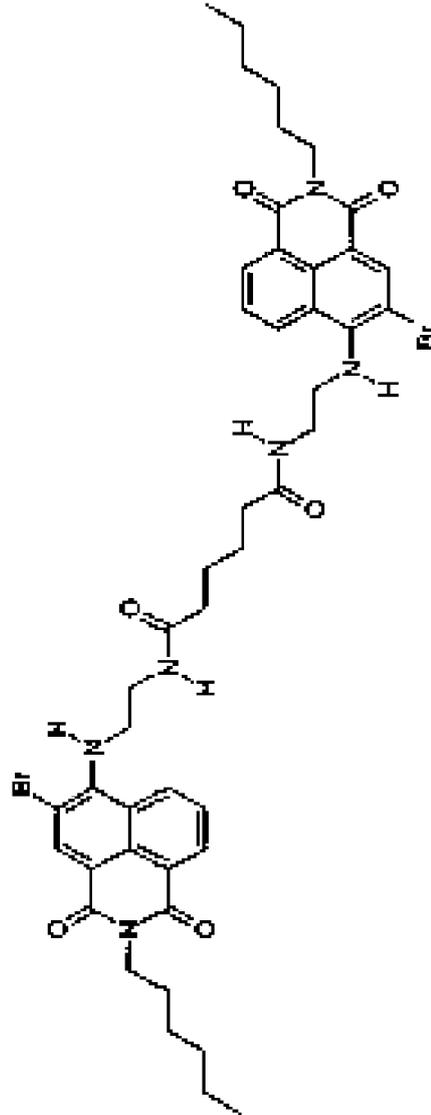
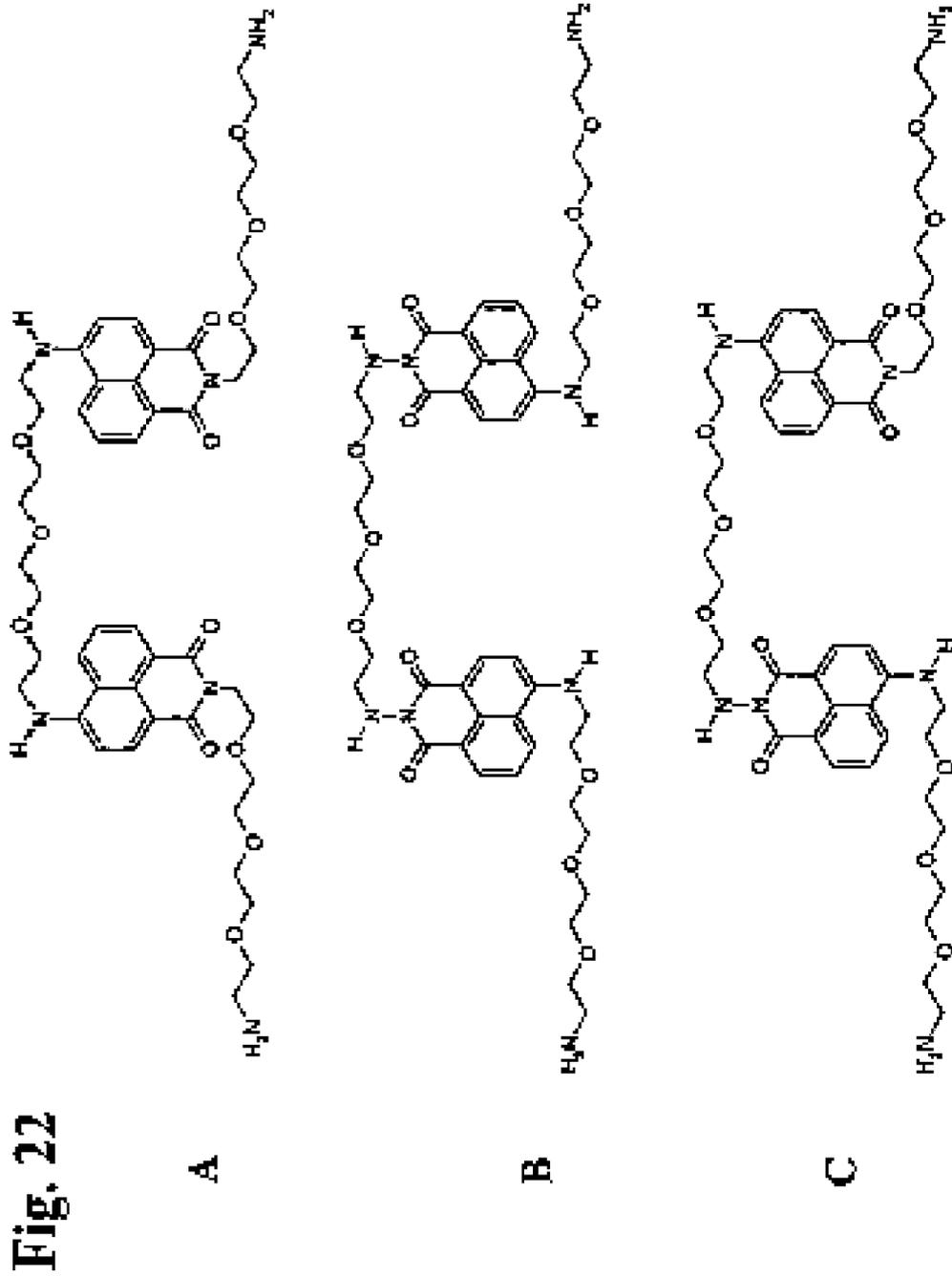


Fig. 21



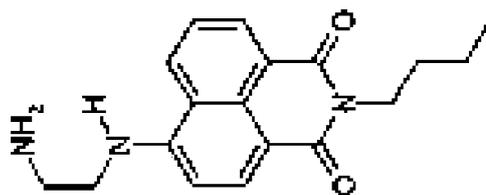


Fig. 23

Fig. 24

