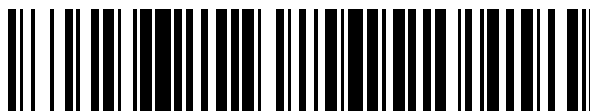


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 200**

51 Int. Cl.:

A61L 24/04 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 31/06 (2006.01)

A61L 31/08 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

C08L 81/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09010135 .3**

96 Fecha de presentación: **18.12.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **2111876**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

54 Título: **COMPOSICIONES DE POLÍMEROS RETICULADOS Y MÉTODOS PARA SU USO.**

30 Prioridad:
18.12.1995 US 573799

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:
**ANGIODEVICE INTERNATIONAL GMBH
BUNDESPLATZ 1
6304 ZUG, CH**

72 Inventor/es:
Rhee, Woonza, M.

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 200 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

Composiciones de polímeros reticulados y métodos para su uso

5 Esta invención se refiere, en general, a composiciones de polímeros reticulados que comprenden un primer polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleófilos reticulados utilizando un segundo polímero sintético que contiene múltiples grupos electrófilos, y a métodos para utilizar dichas composiciones como bioadhesivos, para el aumento de tejidos, en la prevención de adhesiones quirúrgicas, y para revestir superficies de implantes sintéticos, como matrices de administración de fármacos, y para aplicaciones oftalmológicas.

10 La patente de EEUU nº 5.162.430, otorgada el 10 de noviembre de 1992, de Rhee et al., y de propiedad de los cesionarios de la presente invención, describe conjugados de colágeno-polímero sintético preparados uniendo covalentemente el colágeno a polímeros hidrófilos sintéticos, tales como diversos derivados de polietilenglicol.

La patente de EEUU de propiedad de los solicitantes nº 5.324.775, otorgada el 28 de junio de 1994, de Rhee et al., describe diversos polímeros de inserto naturales y biocompatibles (tales como polisacáridos) unidos covalentemente a polímeros de polietilenglicol hidrófilos sintéticos no inmunogénicos.

15 La patente de EEUU de propiedad de los solicitantes nº 5.328.955, otorgada el 12 de julio de 1994, de Rhee et al., describe diversas formas activadas de polietilenglicol y diversos enlaces que pueden utilizarse para producir conjugados de colágeno-polímero sintético que tienen una gama de propiedades físicas y químicas.

20 La solicitud de EEUU, en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes nº de serie 08/403.358, presentada el 14 de marzo de 1995, describe una composición de biomaterial reticulado que se prepara utilizando un agente reticulante hidrófobo, o una mezcla de agentes reticulantes hidrófilos e hidrófobos. Los agentes reticulantes hidrófobos preferidos incluyen cualquier polímero hidrófobo que contenga, o que puede derivatizarse químicamente para que contenga, dos o más grupos succinimidilo.

25 La solicitud de EEUU, en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes nº de serie 08/403.360, presentada el 14 de marzo de 1995, describe una composición útil para la prevención de adhesiones quirúrgicas que comprende un material de sustrato y un agente de unión antiadhesión, en la que el material de sustrato comprende preferiblemente colágeno, y el agente de unión comprende preferiblemente al menos un grupo funcional reactivo con el tejido y al menos un grupo funcional reactivo con el sustrato.

30 La solicitud de EEUU de propiedad de los solicitantes nº de serie 08/476.825, presentada el 7 de junio de 1995, de Rhee et al., describe composiciones bioadhesivas que comprende colágeno reticulado utilizando un polímero hidrófilo sintético multifuncionalmente activado, así como métodos para utilizar dichas composiciones para realizar una adhesión entre una primera superficie y una segunda superficie, en las que al menos una de la primera y la segunda superficie es preferiblemente la superficie de un tejido nativo.

35 La publicación de patente japonesa nº 07090241 describe una composición utilizada para la adhesión temporal de un material de lente a un soporte, para montar el material sobre un dispositivo mecanizado, que comprende una mezcla de polietilenglicol, que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 1000-5000, y poli-N-vinilpirrolidona, que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 30.000-200.000.

40 West y Hubbell, Biomaterials (1995), 16:1153-1156, describen la prevención de adhesiones postoperatorias utilizando un hidrogel de polietilenglicol-co-diacrilato del ácido láctico fotopolimerizado y un hidrogel de polietilenglicol-co-polipropilenglicol físicamente reticulado, Poloxamer 407®. El documento EP-A-0747066 describe composiciones con base de colágeno útiles para la unión de tejidos, o para la unión de tejidos a materiales de implante sintéticos.

El documento US 4.175.073 describe derivados reactivos de polímeros que contienen grupos HS- y su uso como agentes tiolantes, o como vehículos para enzimas u otras proteínas.

45 Los inventores ofrecen en la presente una descripción detallada de realizaciones preferidas de la presente invención, que incluyen composiciones de polímeros reticulados que comprenden polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleófilos reticulados utilizando polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos electrófilos, y métodos para utilizar estas composiciones para realizar la adhesión entre una primera superficie y una segunda superficie (en los que al menos una de la primera y la segunda superficie es preferiblemente la superficie de un tejido nativo), o para realizar el aumento de un tejido, o para evitar la adhesión quirúrgica, o para revestir superficies de implantes sintéticos, o para administrar fármacos u otros agentes activos, o para aplicaciones oftálmicas.

50 La presente invención describe una composición que comprende un primer polímero sintético que tiene m grupos nucleófilos, y un segundo polímero sintético que tiene n grupos electrófilos, en la que dichos grupos nucleófilos y dichos grupos electrófilos son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes entre el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético que da como resultado la formación de una matriz tridimensional, en la que m y n son cada uno mayor o igual a tres, en la que los grupos nucleófilos son grupos tiol, en la que los grupos electrófilos son grupos succinimidilo, y en la que el esqueleto de cada polímero sintético es un polietilenglicol.

55

La presente invención proporciona también dicha composición para su uso para prevenir la formación de adhesiones tras una cirugía o lesión.

La presente invención también proporciona dicha composición para su uso como un biosellante.

5 En un uso médico general para prevenir la formación de adhesiones tras una cirugía, un primer polímero sintético que contiene dos o más grupos nucleófilos se mezcla con un segundo polímero sintético que contiene dos o más grupos electrófilos para proporcionar una mezcla de reacción; la mezcla de reacción se aplica al tejido que comprende, rodea o es adyacente a un sitio quirúrgico antes de que se produzca una reticulación sustancial entre los grupos nucleófilos y los grupos electrófilos; se deja que la mezcla de reacción siga reticulándose *in situ* hasta que se logra el equilibrio de reticulación; y el sitio quirúrgico se cierra mediante metodologías convencionales.

10 Una característica de la invención es que las composiciones de polímeros reticulados son ópticamente transparentes.

Además, las composiciones de la invención están formadas por componentes biocompatibles y no inmunogénicos que no dejan productos de reacción tóxicos, potencialmente inflamatorios o inmunogénicos en el tejido del sitio de administración.

15 Otra característica de la invención es que las composiciones de polímeros reticulados tiene una alta resistencia a la compresión y una alta capacidad de hinchamiento, es decir, una composición que se ha secado se hinchará hasta tres veces (o más) de su tamaño seco tras una rehidratación, y es más "elástica". Puesto que estos polímeros son, en general, muy hidrófilos, pueden inyectarse con más facilidad, es decir, la composición reticulada se mantiene como una "masa cohesiva" cuando se inyecta a través de una aguja de calibre fino (calibre 27-30).

20 Otra característica de la invención es que los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético pueden unirse covalentemente a grupos amino primarios sobre los restos lisina de las moléculas de colágeno en el tejido del sitio de administración, de hecho "anclan biológicamente" la composición al tejido receptor.

25 Una característica de la invención es que los componentes de las composiciones no son inmunogénicos y no requieren un "ensayo dérmico" antes de comenzar el tratamiento, como sí necesitan las composiciones de colágeno xenogeneicas disponibles en la actualidad, tales como las fabricadas a partir de pieles bovinas.

Otra característica de la invención es que, a diferencia del colágeno, las composiciones de la invención no están sometidas a una ruptura enzimática por metaloproteinasas de matriz, tales como colagenasa, y por tanto no se degradan con facilidad *in vivo* y, por tanto, se espera que tengan mayor persistencia a largo plazo *in vivo* que las composiciones de colágeno de la técnica anterior.

30 Otra característica es que, cuando los grupos sobre cada uno de los polímeros utilizados reaccionan para formar un enlace amida, la fabricación de las composiciones de la presente invención puede controlarse en gran medida, dando como resultado unos productos con una calidad más constante.

35 La figura 1 (referencia) muestra la fuerza de compresión frente al desplazamiento para discos (dimensiones aproximadas: 5 mm de espesor x 5 mm de diámetro) de composiciones de polímeros reticulados que comprenden tetra-amino-PEG (10.000 PM) reticulado utilizando SE-PEG tetrafuncionalmente activado (10.000 PM), medido utilizando el equipo de ensayo universal Instron, modelo 4202, a una velocidad de compresión de 2 mm por minuto.

40 La figura 2 (referencia) muestra la fuerza de compresión frente al desplazamiento para discos (dimensiones aproximadas: 5 mm de espesor x 5 mm de diámetro) de composiciones de polímeros reticulados que comprenden tetra-amino-PEG (10.000 PM) reticulado utilizando SC-PEG trifuncionalmente activado (5.000 PM), medido utilizando el equipo de ensayo universal Instron, modelo 4202, a una velocidad de compresión de 2 mm por minuto.

La figura 3 (referencia) muestra la estructura química de dos polietilenglicoles disponibles en el mercado que contienen múltiples grupos amino primarios.

Las figuras 4 a 13 (referencia) muestran la formación de diversas composiciones de polímeros sintéticos reticulados a partir de polímeros hidrófilos.

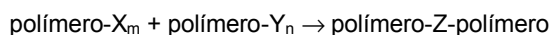
45 Las figuras 14 a 18 (referencia) muestran la formación de diversas composiciones de polímeros sintéticos reticulados a partir de polímeros hidrófobos.

50 Según la presente invención, las composiciones de polímeros reticulados se preparan haciendo reaccionar un primer polímero sintético que contiene dos o más grupo nucleófilos con un segundo polímero sintético que contiene dos o más grupos electrófilos capaces de unirse covalentemente con los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético.

Los componentes de la presente invención no son inmunogénicos y, por tanto, no requieren un "ensayo dérmico" antes de comenzar el tratamiento, como sí requiere el colágeno xenogeneico. Además, a diferencia del colágeno, las composiciones de la invención no están sometidas a una ruptura enzimática por las metaloproteinasas de matriz

(por ejemplo, colagenasa) y, por tanto, se espera que tengan mayor persistencia a largo plazo *in vivo* que las composiciones de colágeno disponibles en la actualidad.

- 5 El concepto detrás de la presente invención es que un polímero sintético que contenga múltiples grupos nucleófilos (representado a continuación como "X") reaccionará con un polímero sintético que contenga múltiples grupos electrófilos (representado a continuación como "Y"), dando como resultado una red de polímeros covalentemente unidos, como sigue:



X = -SH,

Y = -CO₂N(COCH₂)₂, -N(COCH)₂, y

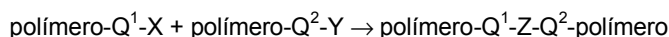
- 10 Z = un grupo funcional que surge de la unión de un grupo nucleófilo (X) y un grupo electrófilo (Y).

El esqueleto de cada polímero es óxido de etileno. Los ejemplos de óxidos de alquileno difuncionales pueden representarse como:



en los que X e Y son como se definió anteriormente, y el término "polímero" representa -(CH₂CH₂O)_n-.

- 15 El grupo funcional X o Y requerido habitualmente se acopla al esqueleto del polímero mediante un grupo conector (representado a continuación como "Q"), siendo muchos conocidos o posibles. Existen muchas formas de preparar los diversos polímeros funcionalizados, algunas de las cuales se listan a continuación:



en los que Q =

-O-(CH₂)_n-

-S-(CH₂)_n-

-NH-(CH₂)_n-

-O₂C-NH-(CH₂)_n-

-O₂C-(CH₂)_n-

-O₂C-CR¹H-

-O-R²-CO-NH

Estructura completa =

polímero-O-(CH₂)_n-X (o Y)

polímero-S-(CH₂)_n-X (o Y)

polímero-NH-(CH₂)_n-X (o Y)

polímero-O₂C-NH-(CH₂)_n-X (o Y)

polímero-O₂C-(CH₂)_n-X (o Y)

polímero-O₂C-CRH-X (o Y)

polímero-O-R-CO-NH-X (o Y)

en los que n = 1-10 en cada caso;

- 20 R¹ = H, CH₃, C₂H₅, etc.;

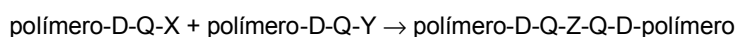
R² = CH₂, CO-NH-CH₂ CH₂;

Q¹ y Q² pueden ser iguales o diferentes.

Por ejemplo, cuando Q² = OCH₂CH₂ (no existe Q¹ en este caso), Y = -CO₂N(COCH₂)₂; y X = -SH, las reacciones y los grupos Z resultantes serían los siguientes:

- 25 $\text{polímero-SH} + \text{polímero-OCH}_2\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{-N(COCH}_2)_2 \rightarrow \text{polímero-S-OCH}_2\text{CH}_2\text{CO-polímero (tioéster)}$

Un grupo adicional, representado a continuación como "D", puede insertarse entre el polímero y el grupo conector para aumentar la degradación de la composición de polímeros reticulados *in vivo*, por ejemplo, para su uso en aplicaciones de administración de fármacos.



- 30 Algunos grupos "D" biodegradables útiles incluyen lactida, glicólido, ε-caprolactona, poli(α-hidroxiácido), poliaminoácidos, polianhídridos, y diversos di- o tripéptidos.

Polímeros sintéticos

Para preparar las composiciones de la presente invención primero es necesario proporcionar un primer polímero sintético que contenga un grupo tiol, y un segundo polímero sintético que contenga grupos electrófilos capaces de unirse covalentemente con los grupos nucleófilos sobre el segundo polímero sintético.

- 5 Tal como se emplea en la presente, la expresión “polímero sintético” se refiere a polímeros que no son naturales y que se producen mediante síntesis química. Los tipos de polímeros sintéticos multifuncionalmente activados incluyen polímeros tetrafuncionalmente activados, y polímeros ramificados en forma de estrella.

Los polímeros sintéticos multifuncionalmente activados para su uso en la presente invención deben contener al menos tres grupos funcionales para formar una red reticulada tridimensional con polímeros sintéticos que contengan múltiples grupos nucleófilos (es decir, “polímeros multinucleófilos”). En otras palabras, deben estar al menos trifuncional o tetrafuncionalmente activados.

10

Tanto el primer como el segundo polímero sintético contienen al menos tres grupos funcionales.

Polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleófilos

Los polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleófilos también se denominan genéricamente en la presente “polímeros multinucleófilos”. Para su uso en la presente invención, los polímeros multinucleófilos deben contener al menos tres grupos nucleófilos.

15

El polietilenglicol puede modificarse químicamente para que contenga múltiples grupos tiol según los métodos indicados, por ejemplo, en el capítulo 22 de Poly(ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, NY (1992).

20 Los polietilenglicoles que han sido modificados para que contengan grupos tiol se denominan en la presente “multitiol-PEG”. Tal como se emplea en la presente, “polietilenglicol(es)” incluye polietilenglicol(es) modificado(s) y/o derivatizado(s).

Polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos electrófilos

Los polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos electrófilos también se denominan en la presente “polímeros multielectrófilos”. Para su uso en la presente invención, los polímeros sintéticos multifuncionalmente activados deben contener al menos tres grupos electrófilos para formar una red reticulada tridimensional con polímeros multinucleófilos.

25

Los polímeros multielectrófilos para su uso en las composiciones de la invención son polímeros que contienen grupos succinimidilo capaces de formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre otras moléculas.

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión “que contiene dos o más grupos succinimidilo” pretende incluir los polímeros que están disponibles en el mercado que contienen dos o más grupos succinimidilo, así como los que puedan derivatizarse químicamente para que contengan dos o más grupos succinimidilo. Tal como se emplea en la presente, la expresión “grupo succinimidilo” pretende incluir grupos sulfosuccinimidilo y otras variaciones del grupo succinimidilo “genérico”. La presencia del resto sulfito de sodio sobre el grupo sulfosuccinimidilo sirve para aumentar la solubilidad del polímero.

35

Polímeros hidrófilos

Se emplean diversos polietilenglicoles en las composiciones de la presente invención. Tal como se emplea en la presente, el término “PEG” se refiere a polímeros que tienen la estructura repetida $(OCH_2CH_2)_n$.

40 En las figuras 4 a 13 se muestran estructuras de algunas formas específicas tetrafuncionalmente activadas de PEG, así como los productos de reacción generalizados obtenidos haciendo reaccionar los PEG tetrafuncionalmente activados con multiamino-PEG. Tal como se muestra en las figuras, el grupo succinimidilo es una estructura de anillo de 5 miembros representada como $-N(COCH_2)_2$. En las figuras 4 a 13, el símbolo Δ indica un enlace abierto.

La figura 4 muestra la reacción de glutarato de succinimidilo-PEG tetrafuncionalmente activado, denominado en la presente SG-PEG, con multiamino-PEG, y el producto de la reacción obtenido.

45 Otra forma activada de PEG se denomina propionato de succinimidilo-PEG (SE-PEG). La fórmula estructural del SE-PEG tetrafuncionalmente activado y el producto de la reacción obtenido haciéndolo reaccionar con multiamino-PEG se muestran en la figura 5. En una fórmula estructural general para el compuesto, el subíndice 3 se reemplaza por “m”. En la realización mostrada en la figura 4, $m = 3$ porque existen tres grupos CH_2 repetidos a cada lado del PEG.

50 La estructura de la figura 5 da como resultado un conjugado que incluye un enlace “éter” que es menos propenso a la hidrólisis. Esto lo diferencia del conjugado que se muestra en la figura 4, en el que se proporciona un enlace éster. El enlace éster se somete a hidrólisis bajo condiciones fisiológicas.

Otra forma funcionalmente activada del polietilenglicol, en la que $m = 2$, se muestra en la figura 6, así como el conjugado formado haciendo reaccionar el PEG tetrafuncionalmente activado con un multiamino-PEG.

5 Se proporciona otro PEG funcionalmente activado similar a los compuestos de las figuras 5 y 6, en el que $m = 1$. La fórmula estructural del PEG tetrafuncionalmente activado y el conjugado resultante formado haciendo reaccionar el PEG activado con multiamino-PEG se muestran en la figura 7. Se hace notar que este conjugado incluye un enlace éter y un enlace peptídico. Estos enlaces son estables bajo condiciones fisiológicas.

10 Otra forma funcionalmente activada de PEG se denomina succinimidilsuccinamida-PEG (SSA-PEG). La fórmula estructural para la forma tetrafuncionalmente activada de este compuesto y el producto de la reacción obtenido haciéndolo reaccionar multiamino-PEG se muestran en la figura 8. En la estructura que aparece en la figura 8, $m = 2$; sin embargo, los compuestos relacionados, en los que $m = 1$ o $m = 3-10$, también pueden utilizarse en las composiciones de la invención.

La estructura en la figura 8 da como resultado un conjugado que incluye un enlace "amida" que, al igual que el enlace éter previamente descrito, es menos propenso a la hidrólisis y, por tanto, es más estable que un enlace éter.

15 Se proporciona otra forma activada de PEG, en la que $m = 0$. Este compuesto se denomina carbonato de succinimidilo-PEG (SC-PEG). La fórmula estructural del SC-PEG tetrafuncionalmente activado y el conjugado formado haciéndolo reaccionar con multiamino-PEG se muestran en la figura 9.

20 Tal como se analizó anteriormente, los derivados de polietilenglicol activados preferidos para su uso en la invención contienen grupos succinimidilo como grupo reactivo. Sin embargo, pueden unirse diferentes grupos activantes a los sitios a lo largo de la longitud de la molécula de PEG. Por ejemplo, el PEG puede derivatizarse para formar propionaldehído-PEG (A-PEG) funcionalmente activado, cuya forma tetrafuncionalmente activada se muestra en la figura 10, así como el conjugado formado por la reacción de A-PEG con multiamino-PEG. El enlace mostrado en la figura 10 se denomina enlace $-(CH_2)_m-NH-$, en el que $m = 1-10$.

25 Otra forma de polietilenglicol activado es el glicidil éter-PEG (E-PEG) funcionalmente activado, cuyo compuesto tetrafuncionalmente activado se muestra en la figura 11, así como el conjugado formado haciéndolo reaccionar con multiamino-PEG.

Otro derivado activado del polietilenglicol es isocianato-PEG (I-PEG) funcionalmente activado, que se muestra en la figura 12, junto con el conjugado formado haciéndolo reaccionar con multiamino-PEG.

Otro derivado activado del polietilenglicol es vinilsulfona-PEG (V-PEG) funcionalmente activado, que se muestra en la figura 13, abajo, junto con el conjugado formado haciéndolo reaccionar con multiamino-PEG.

30 Los polietilenglicoles multifuncionalmente activados preferidos para su uso en las composiciones de la presente invención son los polietilenglicoles que contienen grupos succinimidilo, tales como SO-PEG y SE-PEO (mostrados en las figuras 4-7), preferiblemente en la forma trifuncional o tetrafuncionalmente activada.

Muchas de las formas activadas de polietilenglicol descritas anteriormente están disponibles en el mercado en Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama, y Union Carbide, South Charleston, West Virginia.

35 Derivatización de polímeros para que contengan grupos funcionales

40 Ciertos polímeros, tales como poliácidos, pueden derivatizarse para que contengan grupos succinimidilo. Los poliácidos para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, ácido tricarbóxico con base de trimetilolpropano, ácido tetracarboxílico con base de di(trimetilolpropano), ácido heptandioico, ácido octandioico (ácido subérico), y ácido hexadecandioico (ácido tápsico). Muchos de estos poliácidos están disponibles en el mercado en DuPont Chemical Company.

Según un método general, los poliácidos puede derivatizarse químicamente para que contengan dos o más grupos succinimidilo mediante una reacción con una cantidad molar apropiada de N-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

45 Los polialcoholes, tales como trimetilolpropano y di(trimetilolpropano), pueden convertirse en la forma de ácido carboxílico utilizando diversos métodos, y después pueden derivatizarse aún más mediante una reacción con NHS en presencia de DCC para producir polímeros trifuncional y tetrafuncionalmente activados, respectivamente, según se describe en la solicitud de EEUU en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes n° de serie 08/403.358.

Preparación de composiciones de polímeros reticulados

50 En un método general para preparar las composiciones de polímeros reticulados de la invención, un primer polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleófilos se mezcla con un segundo polímero sintético que contiene múltiples grupos electrófilos. La formación de una red reticulada tridimensional se produce como resultado de la

reacción entre los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético y los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético.

En lo sucesivo, la expresión "primer polímero sintético" se empleará para hacer referencia a un polímero sintético que contiene grupos nucleófilos, y la expresión "segundo polímero sintético" se empleará para hacer referencia a un polímero sintético que contiene grupos electrófilos. Las concentraciones del primer polímero sintético y del segundo polímero sintético utilizados para preparar las composiciones de la presente invención variarán dependiendo de una serie de factores, incluyendo los tipos y los pesos moleculares de los polímeros sintéticos concretos utilizados y de la aplicación de uso final deseada.

En general, los inventores han descubierto que, cuando se utiliza multiamino-PEG (referencia) como primer polímero sintético, se emplea preferiblemente a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20% en peso de la composición final, mientras que el segundo polímero sintético se utiliza a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20% en peso de la composición final. Por ejemplo, una composición final que tenga un peso total de 1 gramo (1000 miligramos) contendrá entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 miligramos de multiamino-PEG, y entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 miligramos del segundo polímero sintético.

El uso de concentraciones mayores del primer y segundo polímero sintético dará como resultado la formación de una red reticulada más tupida, produciendo un gel más robusto y rígido. Así, las composiciones previstas para su uso en el aumento de tejidos emplearán, en general, concentraciones del primer y segundo polímero sintético que se encuentran más cerca del extremo más alto del intervalo de concentración preferido. Las composiciones previstas para su uso como bioadhesivos o para la prevención de la adhesión no necesitan ser tan firmes y, por tanto, pueden contener concentraciones menores de polímero.

Debido a que los polímeros que contienen múltiples grupos electrófilos también reaccionan con el agua, el segundo polímero sintético en general se conserva y se utiliza en una forma seca y estéril, para evitar la pérdida de la capacidad reticulante debido a la hidrólisis que se produce generalmente tras la exposición de dichos grupos electrófilos a un medio acuoso. Los procesos para preparar polímeros hidrófilos sintéticos que contengan múltiples grupos electrófilos en forma seca y estéril se indican en la solicitud de EEUU en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes nº de serie 08/497.573, presentada el 30 de junio de 1995. Por ejemplo, el polímero sintético seco puede moldearse por compresión para formar una membrana o lámina fina, que entonces puede esterilizarse utilizando irradiación con rayos gamma, o preferiblemente con rayos ϵ . La membrana o lámina seca resultante puede cortarse en el tamaño adecuado o triturarse para formar partículas de tamaño más pequeño.

Los polímeros que contienen múltiples grupos nucleófilos en general no son reactivos frente al agua y, por tanto, pueden conservarse en una disolución acuosa.

Las composiciones de polímeros reticulados también pueden prepararse para que contengan diversos agentes formadores de imágenes, tales como sulfato de yodo o bario, o flúor, para ayudar a la visualización de las composiciones después de la administración, mediante rayos X, o ^{19}F -MRI, respectivamente.

Administración de las composiciones de polímeros sintéticos reticulados

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse antes, durante o después de la reticulación del primer y segundo polímero sintético. Ciertos usos, que se analizan con más detalle a continuación, tales como el aumento de tejido, pueden requerir que las composiciones se reticulen antes de la administración, mientras que otras aplicaciones, tales como la adhesión de tejidos, requieren que las composiciones se administren antes de que la reticulación haya alcanzado el "equilibrio". El punto en el que la reticulación ha alcanzado el equilibrio se define en la presente como el punto en el que la composición ya no resulte pegajosa al tacto.

Para administrar la composición antes de la reticulación, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético pueden estar contenidos en diferentes tambores de una jeringa de dos compartimentos. En este caso, los dos polímeros sintéticos no se mezclan realmente hasta el momento en que los dos polímeros se extrusionan desde la punta de la aguja de la jeringa hacia el tejido del paciente. Esto permite que la mayor parte de la reacción de reticulación se realice *in situ*, evitando el problema del bloqueo de la aguja que se produce habitualmente si los dos polímeros sintéticos se mezclan demasiado pronto y la reticulación entre los dos componentes ya está demasiado avanzada antes de su distribución desde la aguja de la jeringa. El uso de una jeringa de dos compartimentos, tal como se describió anteriormente, permite el uso de agujas de un diámetro más pequeño, lo cual resulta ventajoso cuando se realiza el aumento de tejido blando en tejido facial delicado, tal como el que rodea los ojos.

Como alternativa, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético pueden mezclarse según los métodos descritos anteriormente antes de su administración al sitio del tejido, y después inyectarse inmediatamente en el sitio del tejido deseado (preferiblemente, en aproximadamente 60 segundos) tras el mezclado.

En otra realización de la invención, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético se mezclan, después se extrusionan y se dejan reticular para formar una lámina u otra forma sólida. El sólido reticulado entonces se deshidrata para eliminar sustancialmente toda el agua no unida. El sólido secado resultante puede pulverizarse o

5 triturarse para formar partículas, después se suspende en un vehículo fluido no acuoso que incluye, sin limitación, ácido hialurónico, sulfato de dextrano, dextrano, colágeno no reticulado succinilado, colágeno no reticulado metilado, glucógeno, glicerol, dextrosa, maltosa, triglicéridos de ácidos grasos (tales como aceite de maíz, aceite de soja, y aceite de sésamo), y fosfolípido de yema de huevo. La suspensión de las partículas puede inyectarse a través de una aguja de calibre pequeño hacia un sitio de tejido. Cuando están en el interior del tejido, las partículas de polímeros reticulados se rehidratan y se hinchan hasta cinco veces su tamaño.

Uso de polímeros sintéticos reticulados como bioadhesivos

10 Los inventores han descubierto que las composiciones preferidas de la invención tienden a tener una pegajosidad muy alta, lo cual hace que sean particularmente adecuados para su uso como bioadhesivos, por ejemplo, para su uso en cirugía. Tal como se emplean en la presente, el término y las expresiones “bioadhesivo”, “adhesivo biológico” y “adhesivo quirúrgico” se usan de modo intercambiable para hacer referencia a composiciones biocompatibles capaces de realizar una unión temporal o permanente entre las superficies de dos tejidos nativos, o entre la superficie de un tejido nativo y la superficie de un tejido no nativo o la superficie de un implante sintético.

15 En un método general para realizar la unión de una primera superficie a una segunda superficie, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético se aplican a una primera superficie, después la primera superficie se pone en contacto con una segunda superficie para realizar la adhesión entre la primera superficie y la segunda superficie. Preferiblemente, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético en primer lugar se mezclan para iniciar la reticulación, y después se administran a una primera superficie antes de que se haya producido una reticulación sustancial entre los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético y los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético. La primera superficie entonces se pone en contacto con la segunda superficie, preferiblemente de modo inmediato, para realizar la adhesión entre las dos superficies. Al menos una de la primera y la segunda superficie es preferiblemente la superficie de un tejido nativo.

25 Por ejemplo, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético se proporcionan, en general, en jeringas separadas, cuyos contenidos se mezclan utilizando técnicas de mezclado de jeringa a jeringa, justo antes de la administración a la primera superficie. El primer polímero sintético y el segundo polímero sintético preferiblemente se mezclan durante un mínimo de 20 pases (preferiblemente de 20 a 100, más preferiblemente de 30 a 60) para asegurar un mezclado adecuado. Puesto que la reticulación entre los correspondientes grupos reactivos sobre los dos polímeros sintéticos en general se inicia durante el proceso de mezclado, es importante administrar la mezcla de reacción a la primera superficie cuanto antes después del mezclado.

30 La mezcla de reacción puede extrusionarse sobre la primera superficie desde el orificio de una jeringa u otro dispositivo de extrusión apropiado. Tras la aplicación, la mezcla de reacción extrusionada puede extenderse sobre la primera superficie utilizando una espátula, si es necesario. Como alternativa, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético pueden mezclarse en un recipiente o placa de mezclado apropiados, y después aplicarse sobre la primera superficie utilizando una espátula.

35 En otro método para preparar la mezcla de reacción, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético están contenidos en cámaras separadas de una botella o lata de pulverización con una boquilla, u otro dispositivo de pulverización adecuado. En este escenario, el primer y el segundo polímero no se mezclan realmente hasta que son expulsados juntos desde la boquilla del dispositivo de pulverización. Tras la aplicación de la mezcla de reacción a una superficie que contiene colágeno, la primera superficie se pone en contacto con una segunda superficie. Si las dos superficies se ponen en contacto antes de que se haya producido una reticulación sustancial entre el polímero sintético y el agente reticulante, los grupos reactivos sobre el agente reticulante también se unirán covalentemente con los grupos amino primarios sobre los restos lisina de las moléculas de colágeno presentes en cualquiera o en ambas superficies, proporcionando una mayor adhesión.

45 Las dos superficies pueden mantenerse juntas de forma manual, o utilizando otro medio apropiado, a medida que la reacción de reticulación se desarrolla hasta su conclusión. Generalmente, la reticulación concluye en 5 a 60 minutos después del mezclado del primer y segundo polímero sintético. Sin embargo, el tiempo requerido para que se produzca la reticulación completa depende de una serie de factores, incluyendo el tipo y los pesos moleculares de los dos polímeros sintéticos y, más en concreto, de las concentraciones de los dos polímeros sintéticos (es decir, unas concentraciones mayores producen unos tiempos de reticulación más rápidos).

50 Al menos una de la primera y la segunda superficie es preferiblemente la superficie de un tejido nativo. Tal como se emplea en la presente, la expresión “tejido nativo” se refiere a tejidos biológicos que son nativos del cuerpo del paciente concreto que se está tratando. Tal como se emplea en la presente, la expresión “tejido nativo” pretende incluir tejidos biológicos que se han elevado o retirado de una parte del cuerpo de un paciente para implantarse en otra parte del cuerpo del mismo paciente (tales como autoinjertos de hueso, autoinjertos de fragmentos de piel, etc.).
55 Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden utilizarse para adherir un trozo de piel de una parte del cuerpo del paciente a otra parte del cuerpo, como en el caso de una víctima de quemaduras.

La otra superficie puede ser la superficie de un tejido nativo, la superficie de un tejido no nativo, o la superficie de un implante sintético. Tal como se emplea en la presente, la expresión “tejido no nativo” se refiere a tejidos biológicos

que se han retirado del cuerpo de un paciente donante (que puede ser de la misma especie o de una especie diferente del paciente receptor) para su implantación en el cuerpo de un paciente receptor (por ejemplo, trasplantes de tejidos y órganos). Por ejemplo, las composiciones de polímeros reticulados de la presente invención pueden utilizarse para adherir la córnea de un donante al ojo de un paciente receptor.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión “implante sintético” se refiere a cualquier material biocompatible destinado a implantarse en el cuerpo de un paciente que no esté incluido en las anteriores definiciones de tejido nativo y tejido no nativo. Los implantes sintéticos incluyen, por ejemplo, vasos sanguíneos artificiales, válvulas cardíacas, órganos artificiales, prótesis óseas, lenticulas implantables, injertos vasculares, implantes de estenosis, y combinaciones de implante de estenosis/injerto, etc.

10 Uso de las composiciones de polímeros sintéticos reticulados para el aumento de tejido

Las composiciones de polímeros reticulados de la invención también pueden utilizarse para el aumento de tejido blando o duro dentro del cuerpo de un sujeto mamífero. Así, pueden ser mejores que los productos de materiales con base de colágeno comercializados en la actualidad para el aumento de tejido blando, porque son menos inmunogénicos y más persistentes. Los ejemplos de aplicaciones de aumento de tejido blando incluyen aumento de esfínteres (por ejemplo, urinario, anal, esofágico) y el tratamiento de la rinitis y de cicatrices. Los ejemplos de aplicaciones de aumento de tejido duro incluyen la reparación y/o la sustitución de hueso y/o tejido cartilaginoso.

Las composiciones de la invención son particularmente adecuadas para su uso como material de sustitución para el fluido sinovial en articulaciones osteoartíticas, en el que las composiciones de polímeros reticulados actúan para reducir el dolor de las articulaciones y para mejorar la función de la articulación restableciendo una red de hidrogel blando en la articulación. Las composiciones de polímeros reticulados también pueden utilizarse como material de sustitución para el núcleo pulposo de un disco intervertebral dañado. Así, en primer lugar se retira el núcleo pulposo del disco dañado, y después se inyecta la composición de polímeros reticulados o se introduce de otra manera en el centro del disco. La composición puede reticularse antes de su introducción en el disco, o dejar que se reticule *in situ*.

En un método general para realizar el aumento de tejido dentro del cuerpo de un sujeto mamífero, el primer y segundo polímero sintético se inyectan de modo simultáneo en un sitio de tejido que necesite un aumento a través de una aguja de calibre pequeño (por ejemplo, calibre 25-32). Una vez que se encuentra en el interior del cuerpo del paciente, los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético y los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético reaccionan entre sí para formar una red de polímeros reticulados *in situ*. Los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético también pueden reaccionar con grupos amino primarios sobre los restos lisina de las moléculas de colágeno dentro del propio tejido del paciente, proporcionando un “anclaje biológico” de las composiciones al tejido del receptor.

Uso de las composiciones de polímeros sintéticos reticulados para evitar adhesiones

Otro uso de las composiciones de polímeros reticulados de la invención es para revestir tejidos para evitar la formación de adhesiones tras una cirugía o una lesión en tejidos u órganos internos. En un método general para revestir tejidos para evitar la formación de adhesiones tras una cirugía, el primer y el segundo polímero sintético se mezclan, después se aplica una capa fina de la mezcla de reacción a los tejidos que comprenden, rodean y/o son adyacentes al sitio quirúrgico antes de que se haya producido una reticulación sustancial entre los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético y los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético. La aplicación de la mezcla de reacción al sitio del tejido puede ser mediante extrusión, aplicación con pincel, pulverización (tal como se describió anteriormente), o mediante cualquier otro medio conveniente.

Tras la aplicación de la mezcla de reacción al sitio quirúrgico se deja que continúe la reticulación *in situ* antes de cerrar la incisión quirúrgica. Cuando la reticulación ha alcanzado el equilibrio, los tejidos que se ponen en contacto con los tejidos revestidos no se pegarán a los tejidos revestidos. En este momento, el sitio quirúrgico puede cerrarse utilizando medios convencionales (suturas, etc.).

En general, las composiciones que logren una reticulación completa en un periodo de tiempo relativamente corto (es decir, 5-15 minutos tras el mezclado del primer polímero sintético y el segundo polímero sintético) se prefieren para su uso en la prevención de las adhesiones quirúrgicas, de forma que el sitio quirúrgico pueda cerrarse relativamente pronto después de finalizar el procedimiento quirúrgico.

50 Uso de polímeros sintéticos reticulados para revestir implantes

Otro uso de las composiciones de polímeros reticulados de la invención es como material de revestimiento para implantes sintéticos. En un método general para revestir una superficie de un implante sintético, el primer y el segundo polímero sintético se mezclan, y después se aplica una capa fina de la mezcla de reacción sobre la superficie del implante antes de que se haya producido una reticulación sustancial entre los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético y los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético. Para minimizar la reacción celular y fibrosa con el implante revestido, la mezcla de reacción se prepara preferiblemente para que tenga una carga neta neutra. La aplicación de la mezcla de reacción a la superficie del implante puede ser mediante extrusión,

aplicación con pincel, pulverización (tal como se describió anteriormente), o mediante cualquier otro medio conveniente. Tras la aplicación de la mezcla de reacción a la superficie del implante se deja que la reticulación continúe hasta que se logra la reticulación completa.

5 Aunque este método puede utilizarse para revestir la superficie de cualquier tipo de implante sintético, resulta particularmente útil en implantes en los que una trombogenicidad reducida es una consideración importante, tales como vasos sanguíneos artificiales y válvulas cardíacas, injertos vasculares, implantes de estenosis vasculares, y combinaciones de implante de estenosis/injerto. El método también puede utilizarse para revestir membranas quirúrgicas implantables (por ejemplo, monofilamentos de polipropileno) o mallas (por ejemplo, para su uso en la reparación de hernias). Los implantes de mama también pueden revestirse utilizando el anterior método para
10 minimizar la contractura capsular.

Las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse para revestir lenticulas, que están fabricadas con polímeros naturales o sintéticos.

Otros usos para los polímeros sintéticos reticulados

15 Tal como se analiza en la solicitud en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes n° de serie 08/574.050, presentada el 18 de diciembre de 1995, las composiciones de polímeros reticulados de la invención pueden utilizarse para bloquear o rellenar diversos lúmenes y huecos en el cuerpo de un sujeto mamífero. Las composiciones también pueden utilizarse como biosellantes para sellar fisuras o grietas dentro de un tejido o una estructura (tal como un vaso), o las uniones entre tejidos o estructuras adyacentes, para evitar el escape de la sangre o de otros fluidos biológicos.

20 Las composiciones de polímeros reticulados también pueden utilizarse como un dispositivo de rellenado de grandes espacios para el desplazamiento de órganos en la cavidad del cuerpo durante procedimientos quirúrgicos o de radiación, por ejemplo, para proteger los intestinos durante un tratamiento programado de radiación a la pelvis.

25 Las composiciones de polímeros reticulados de la invención también puede revestirse sobre la superficie interior de un lumen fisiológico, tal como un vaso sanguíneo o una trompa de Falopio, actuando con ello como sellante para evitar la reestenosis del lumen tras un tratamiento médico tal como, por ejemplo, una cateterización de balón para retirar depósitos de placas arteriales de la superficie interior de un vaso sanguíneo, o la eliminación de tejido cicatrizal o de tejido endometrial del interior de una trompa de Falopio. Una capa fina de la mezcla de reacción se aplica preferiblemente a la superficie interior del vaso (por ejemplo, mediante un catéter) inmediatamente después de mezclar el primer y el segundo polímero sintético. Debido a que las composiciones de la invención no se degradan con facilidad *in vivo*, se minimiza el potencial para la reestenosis debido a la degradación del revestimiento. El uso de composiciones de polímeros reticulados que tienen una carga neta neutra minimiza el potencial para la reestenosis.

Ejemplos

35 Se ha intentado asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, pesos moleculares, etc.) pero deben tomarse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o una presión cercana a ésta.

Ejemplo 1 (referencia)

Preparación de composiciones de multiamino-PEG reticuladas

40 Se mezclaron 0,15 gramos de diamino-PEG (3400 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 250 μ l de agua con 0,1 g de SC-PEG trifuncionalmente activado (5000 PM, también obtenido en Shearwater Polymers) utilizando un mezclador de jeringa a jeringa. La mezcla de reacción se extrusiona sobre una placa Petri y se forma un gel blando a temperatura ambiente.

45 Se mezclaron 0,15 gramos de diamino-PEG en 250 μ l de agua con 0,1 g de SE-PEG tetrafuncionalmente activado (también obtenido en Shearwater Polymers) utilizando un mezclador de jeringa a jeringa. La mezcla de reacción se extrusiona sobre una placa Petri y se forma un gel blando a temperatura ambiente.

Ejemplo 2 (referencia)

Preparación de composiciones de multiamino-PEG reticuladas

Se prepararon las siguientes disoluciones madre de diversos diamino-PEG:

50 - Se disolvieron 10 gramos de Jeffamine ED-2001 (obtenido en Texaco Chemical Company, Houston, TX) en 9 ml de agua.

- Se disolvieron 10 gramos de Jeffamine ED-4000 (también obtenido en Texaco Chemical Company) en 9 ml de agua.

- Se disolvieron 0,1 gramos de diamino-PEG (3400 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 300 µl de agua.

- 5 Cada una de las tres disoluciones de diamino-PEG preparadas anteriormente se mezclaron con disoluciones acuosas de SC-PEG trifuncionalmente activado (TSC-PEG, 5000 PM, también obtenido en Shearwater Polymers) como se indica en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Preparación de composiciones de polímeros reticulados

Diamino-PEG	TSC-PEG + disolvente acuoso
50 ul	0 mg + 50 µl de agua
50 ul	10 mg + 50 µl de PBS
50 ul	10 mg + 100 µl de PBS
250 ul	50 mg + 500 µl de PBS

- 10 Las disoluciones de diamino-PEG y TSC-PEG se mezclaron utilizando un mezclado de jeringa a jeringa. Cada uno de los materiales se extrusionó desde la jeringa y se dejó endurecer durante 1 hora a 37 °C. Cada uno de los materiales formó un gel. En general, los geles fueron más blandos cuanto mayor era el contenido en agua; los geles que contenían la cantidad más pequeña de disolvente acuoso (agua o PBS) fueron más firmes.

Ejemplo 3 (referencia)

Caracterización de las composiciones de multiamino-PEG reticuladas

- 15 Se mezclaron 50 miligramos de tetra-amino-PEG (10.000 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 0,5 ml de PBS, utilizando un mezclado de jeringa a jeringa, con 50 mg de SE-PEG tetrafuncionalmente activado ("tetra SE-PEG", 10.000 PM, también obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 0,5 ml de PBS o SC-PEG trifuncionalmente activado ("tri SC-PEG", 5000 PM, también obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 0,5 ml de PBS.

- 20 Las jeringas que contenían cada una de las dos mezclas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 16 horas. Ambas composiciones formaron geles elásticos. Los geles se empujaron hacia el exterior de las jeringas y se cortaron en discos de 5-6 mm de espesor con un diámetro de 5 mm, para su uso en los ensayos de compresión y capacidad de hinchamiento, según se describe a continuación.

- 25 Se midió la fuerza de compresión frente al desplazamiento para los dos geles con el equipo de ensayo universal Instron, modelo 4202, a una velocidad de compresión de 2 mm por minuto, utilizando los discos de los dos geles preparados como se describió anteriormente. La fuerza de compresión (en Newtons) frente al desplazamiento del gel (en milímetros) se muestra en las figuras 1 y 2 para los geles preparados utilizando tetra SE-PEG y tri SC-PEG, respectivamente.

- 30 Bajo una fuerza de compresión tan alta como 30-35 Newtons, los geles no se rompieron sino que permanecieron elásticos.

Los discos de cada uno de los dos geles, preparados como se describió anteriormente, se pesaron y se midieron sus dimensiones (diámetro y longitud). Los discos entonces se sumergieron en PBS y se incubaron a 37 °C. Después de 3 días de incubación, los discos se retiraron del PBS, se pesaron y se midieron. Los resultados del ensayo de capacidad de hinchamiento se muestran en la tabla 2 siguiente.

- 35 Tabla 2. Ensayo de capacidad de hinchamiento de composiciones de multiamino-PEG reticuladas

Agente reticulante	Peso del gel (en gramos)		Dimensiones (en mm) (diámetro/espesor)	
	Antes del hinchamiento	Después del hinchamiento	Antes del hinchamiento	Después del hinchamiento
Tetra SE-PEG	0,116	0,310	5,0/5,0	7,1/8,1
Tri SC-PEG	0,131	0,287	5,0/6,0	6,4/8,5

Tal como se muestra arriba, los geles se hincharon en dos a tres veces su peso, así como se hincharon una media de aproximadamente 50% en diámetro y espesor.

Ejemplo 4 (referencia)*Preparación de composiciones de polilisina reticuladas*

5 Se mezclaron 10 miligramos de bromhidrato de poli-L-lisina (8.000 PM, obtenido en Peninsula Laboratories, Belmont, CA) en 0,1 ml de tampón fosfato (0,2 M, pH = 6,6) con 10 mg de SE-PEG tetrafuncionalmente activado (10.000 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 0,1 ml de PBS. La composición forma un gel blando casi inmediatamente.

Ejemplo 5 (referencia)*Preparación y ensayo mecánico de las composiciones de multiamino-PEG reticuladas*

10 Se prepararon geles que comprenden tetra-amino-PEG (10.000 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) y 1,4% (en peso) de SE-PEG tetrafuncionalmente activado ("tetra SE-PEG", 10.000 PM, también obtenido en Shearwater Polymers) mezclando el tetra-amino-PEG (a una concentración de 25 mg/ml en agua) con el tetra SE-PEG (en PBS) en una placa Petri. Las mezclas de tetra-amino-PEG/SE-PEG resultantes se incubaron durante 16 horas a 37 °C.

15 La mezcla que contenía SE-PEG al 1% no formó un gel debido a la baja concentración de SE-PEG. La mezcla que contenía SE-PEG al 2% formó un gel en algún momento del periodo de incubación de 16 horas. Las mezclas que contenían SE-PEG al 3% y al 4% formaron geles en aproximadamente 4-6 minutos del mezclado. El gel que contenía SE-PEG al 2% pudo extrusionarse con facilidad a través de una aguja de calibre 30; el gel que contenía SE-PEG al 3% pudo extrusionarse a través de una aguja de calibre 27.

20 Se evaluó el efecto de una elevada temperatura sobre la formación del gel. Se prepararon geles que comprendían tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG al 2,5% (en peso) y se incubaron a una temperatura de 37 °C y 40-50 °C. Se descubrió que una elevada temperatura tenía un marcado efecto sobre el tiempo de gelificación: la mezcla de tetra-amino-PEG/SE-PEG incubada a 37 °C formó un gel en aproximadamente 20-25 minutos, mientras que las mezclas incubadas a 40-50 °C formaron geles en aproximadamente 5 minutos. Ambos geles pudieron extrusionarse a través de una aguja de calibre 27.

25 Se evaluó el efecto del pH sobre la formación del gel. Se prepararon geles que comprendían tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG al 2,5% (en peso) según se indica en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Efecto del pH sobre la formación del gel de permutaciones de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG

pH de tetra-amino-PEG	pH de tetra SE-PEG	pH de la mezcla resultante	Tiempo de gelificación	Temperatura de gelificación
10	4,1	6,9	10-15 minutos	45 °C
10	7,0	7,2	<5 minutos	45 °C

30 Se evaluó la extrudibilidad a través de una aguja de calibre 27 para geles que comprendían tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG al 1-3% (en peso). Los geles estaban contenidos en jeringas de 1 cc. Se midió la fuerza requerida para empujar el émbolo de la jeringa a una velocidad de 5 centímetros por minuto utilizando un equipo de ensayo universal Instron, modelo 4202. Los resultados del ensayo de extrusión se presentan en la siguiente tabla 4.

Tabla 4. Extrusión de geles de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG a través de una aguja de calibre 27

Concentración de SE-PEG (en peso)	Fuerza de extrusión (N)
1,5-2%	10-11
2-2,5%	52
2,5-3%	88

Unas fuerzas de extrusión de 100 N o menores se consideran aceptables para la inyección manual sin la ayuda de un dispositivo de asistencia para la jeringa.

35 Se midió la resistencia a la tracción (es decir, elasticidad) de geles de 3 mm de espesor que comprendían tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG al 2,5%, 5% y 10% (en peso) utilizando un equipo de ensayo universal Instron, modelo 4202. Geles de longitudes iniciales variadas se estiraron a una velocidad de 10 milímetros por minuto. La longitud de cada gel, la tensión en la rotura (cambio en la longitud como porcentaje de la longitud inicial), y la fuerza en la rotura se indican en la siguiente tabla 5.

Tabla 5. Resistencia a la tracción de geles de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG

Concentración de SE-PEG (% en peso)	Longitud inicial (cm)	Tensión en la rotura	Fuerza en la rotura (N)
10	1,4	139%	0,4
10	1,9	99%	0,5
10	2,5	78%	0,5
5	1,3	111%	0,2
5	1,3	99%	0,2
5	1,6	94%	0,2
2,5	1,0	237%	<0,1
2,5	1,5	187%	<0,1
2,5	1,7	129%	<0,1

Los geles que contenían tetra SE-PEG al 5% y 10% aproximadamente doblaban su longitud antes de romperse. Los geles que contenían SE-PEG al 2,5% aproximadamente triplicaban su longitud antes de romperse, pero eran considerablemente más débiles (es decir, menor fuerza en la rotura) que los geles más reticulados.

5 Ejemplo 6 (referencia)

Efecto del pH sobre la formación del gel de formulaciones de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG

Se prepararon geles que comprendían diversas concentraciones de tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG a pH 6, 7 y 8 en placas Petri. Tras el mezclado del tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG, las placas se inclinaron repetidas veces; se consideró que el tiempo de gelificación era el punto en el que la formulación cesó de fluir. El efecto del pH sobre el tiempo de gelificación de las diversas formulaciones de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG a temperatura ambiente se muestra en la siguiente tabla 6.

Tabla 6. Efecto del pH sobre la formación del gel de formulaciones de PEG/tetra SE-PEG

Conc. de tetra-amino-PEG (mg/ml)	Conc. de tetra SE-PEG (mg/ml)	pH	Tiempo de gelificación
20	20	6	>90,0 min
20	20	7	20,0 min
20	20	8	1,4 min
50	50	6	24,0 min
50	50	7	3,5 min
50	50	8	10,0 seg
100	100	6	9,0 min
100	100	7	47,0 seg
100	100	8	10,0 seg
200	200	6	2,0 min
200	200	7	9,0 seg
200	200	8	5,0 seg

El tiempo requerido para la formación del gel disminuyó a medida que aumentaba el pH y que aumentaban las concentraciones de tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG.

15 Ejemplo 7 (referencia)

Cultivo de células en una matriz de multiamino-PEG reticulada

Se disolvieron 30 miligramos de tetra-amino-PEG (10.000 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 0,6 ml de PBS, y después se esterilizó mediante filtración. Se disolvieron 30 miligramos de SE-PEG

tetrafuncionalmente activado ("tetra SE-PEG", 10.000 PM, también obtenido en Shearwater Polymers) en 0,6 ml de PBS, y después se esterilizó mediante filtración.

5 Las disoluciones de tetra-amino-PEG y tetra SE-PEG se mezclaron con un sedimento que contenía células de fibroblastos de piel humana ("HSF") (CRL n° 1885, transferencia 4, obtenidas de American Tissue Type Culture Collection, Rockville, MD). Se dispensaron 250 microlitros de la disolución resultante de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG (PEG-PEG) que contenía células a cada uno de dos pocillos de una placa de cultivo de 48 pocillos y se dejaron gelificar durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1 mililitro de medio de Eagle modificado de Dulbecco (suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina, penicilina-estreptomicina, y aminoácidos no esenciales) a cada uno de los dos pocillos. La concentración de células era de aproximadamente 3 x 10⁵ células por mililitro de disolución de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG, o 7,5 x 10⁵ células por pocillo.

10 Para preparar un control, un sedimento de células HSF se suspendió en 1,2 ml de medio completo. Se dispensaron 250 microlitros de la mezcla control en cada uno de tres pocillos sobre la misma placa de 48 pocillos que se utilizó anteriormente. Se estimó que cada pocillo contenía aproximadamente 7,5 x 10⁵ células. Cada pocillo recibió medio fresco cada día alterno.

15 Al principio, los geles de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG que contenían células eran transparentes, y se observó que había una gran densidad de población de células y que éstas tenían una morfología esferoidea, lo cual indica que había poca adhesión entre las células y el gel de PEG/PEG (las células normalmente adoptarían una morfología aplanada con forma de huso cuando se adhieren a un sustrato, tal como el plástico tratado de las placas de cultivo de tejidos). Después de 3 días de incubación a 37 °C, se observó que el medio en los pocillos que contenían los geles de PEG/PEG tenía un color más claro (el medio de Eagle modificado de Dulbecco normalmente tiene color rojo), lo cual indica un cambio en el pH del medio. Esto indica que las células estaban vivas y se estaban alimentando. A los 7 días de incubación a 37 °C, las células aún se mantenían con una morfología esferoidea (lo cual indica que no estaban adheridas al gel) y el medio tenían un color aún más claro, lo cual indica que las células todavía eran viables y continuaban alimentándose.

20 En el día 7, los contenidos de cada pocillo se colocaron en una disolución de formaldehído al 10% para la evaluación histológica. Según la evaluación histológica, se estimó que 75% de las células en los pocillos que contenían los geles de PEG/PEG parecían vivas, pero no parecía que se estuviesen reproduciendo.

25 Los resultados del experimento indican que las células HSF son viables en los geles de tetra-amino-PEG/tetra SE-PEG reticulados, pero no parece que se adhieran al gel y no parecen que se reproduzcan mientras están atrapadas en la matriz del gel. Tal como se describió anteriormente, la adherencia o no adherencia de las células a un material de sustrato puede influir en la morfología de las células. En ciertos tipos de células, la morfología celular, a su vez, puede influir en ciertas funciones celulares. Por tanto, la no adherencia de las células a la matriz del gel de PEG-PEG puede ser una ventaja para suministrar tipos celulares concretos cuya función se ve influida por la morfología celular. Por ejemplo, la capacidad de las células de cartílago para producir materiales de la matriz extracelular se ve influida por la morfología celular: cuando las células están en una configuración aplanada, con forma de huso, las células están en modo reproductor; cuando las células están en la configuración esferoidea se detiene la reproducción, y las células comienzan a producir componentes de la matriz extracelular.

30 Debido a que los geles de PEG-PEG no se degradan con facilidad *in vivo*, los geles pueden ser particularmente útiles para aplicaciones de suministro de células en las que resulta deseable que las células permanezcan atrapadas dentro de la matriz durante periodos largos de tiempo.

40

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición que comprende un primer polímero sintético que tiene m grupos nucleófilos, y un segundo polímero sintético que tiene n grupos electrófilos, en la que dichos grupos nucleófilos y dichos grupos electrófilos son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes entre el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético que da como resultado la formación de una matriz tridimensional, en la que m y n son cada uno mayor o igual a tres, en la que los grupos nucleófilos son grupos tiol, en la que los grupos electrófilos son grupos succinimidilo, y en la que el esqueleto de cada polímero sintético es un polietilenglicol.
- 5
- 2.- Una composición según la reivindicación 1 para su uso en la prevención de la formación de adhesiones tras una cirugía o lesión.
- 10
- 3.- Una composición según la reivindicación 1 para su uso como un biosellante.

Compresión de un disco de 5 mm (diámetro de 5 mm) a 2 mm/min

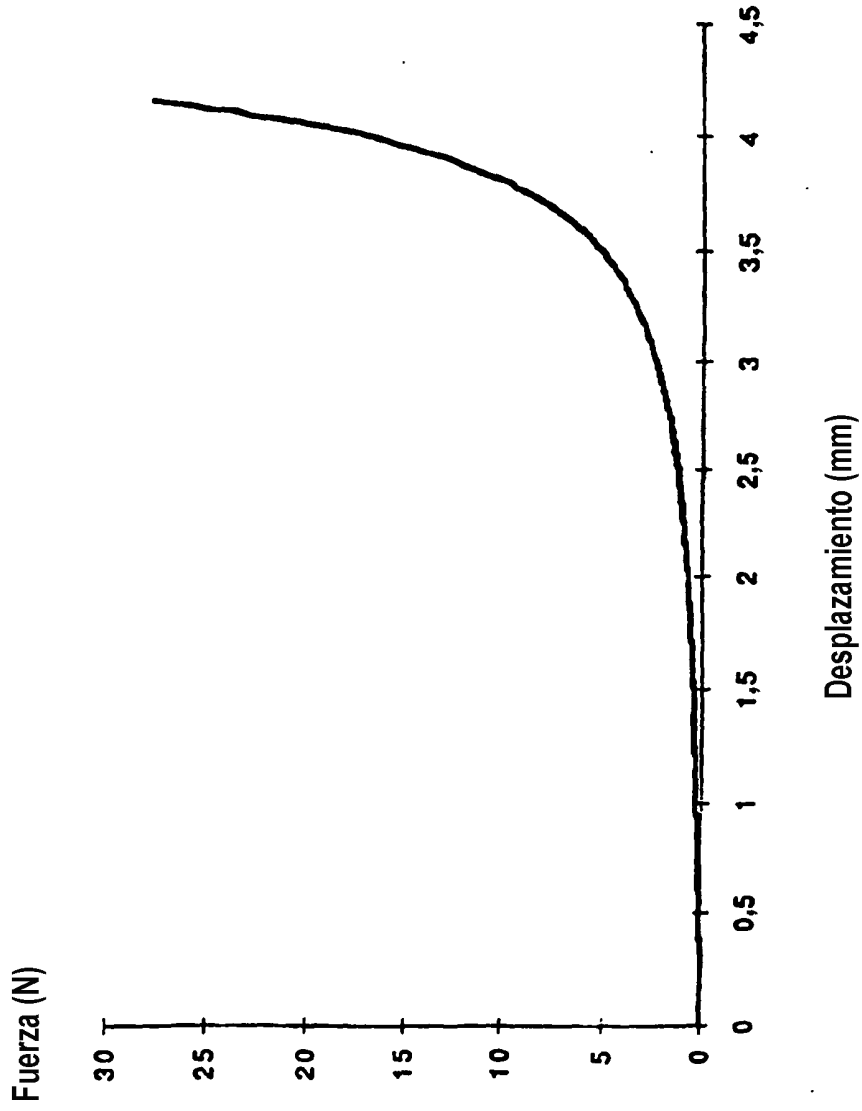


Fig. 1

Compresión de un disco de 5 mm (diámetro de 5 mm) a 2 mm/min

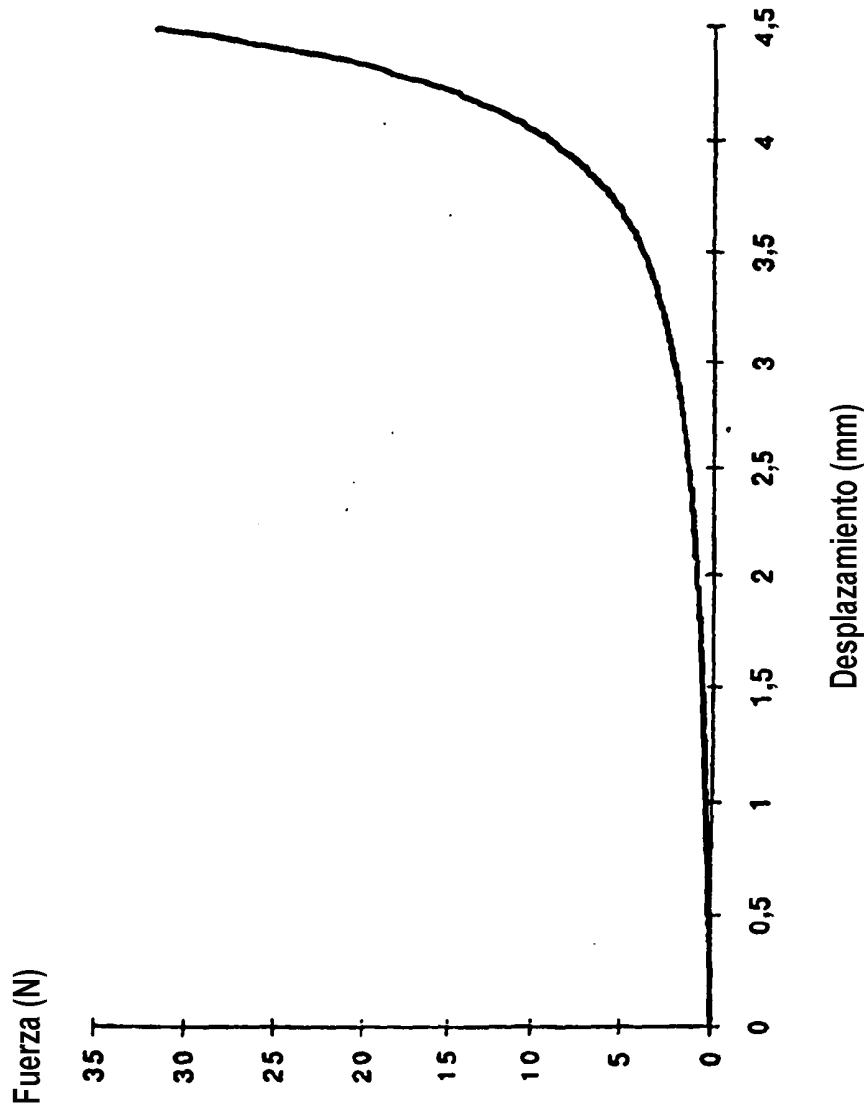


Fig. 2

Diamina

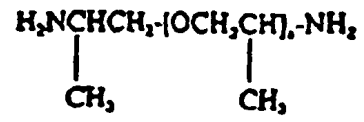


Fig. 3a

Triamina

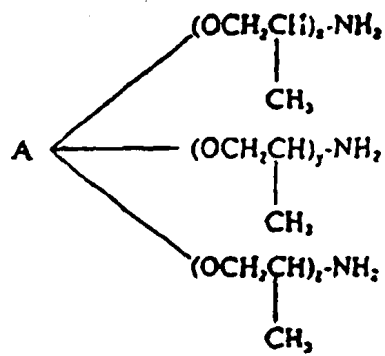
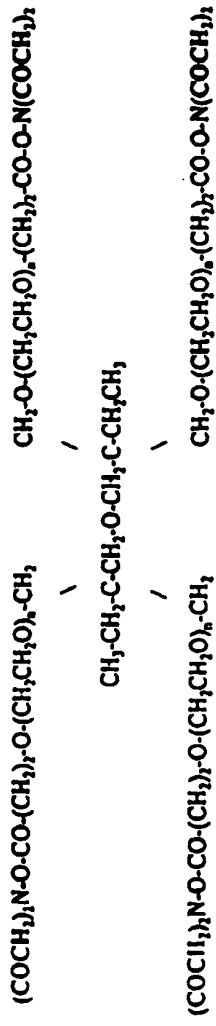


Fig 3b

SE-PEG, m = 2: Butilato de succinimidilo-PEG tetrafuncionalmente activado (enlace éter)



+ multiamino-PEG

↓

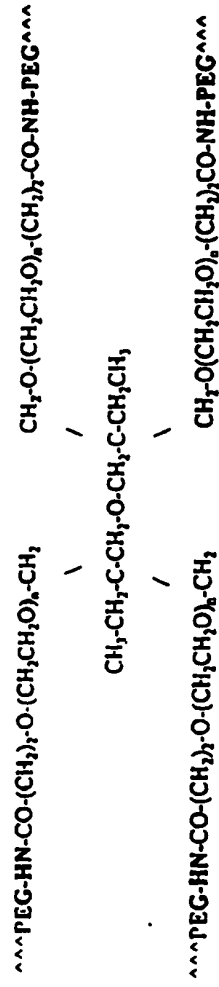
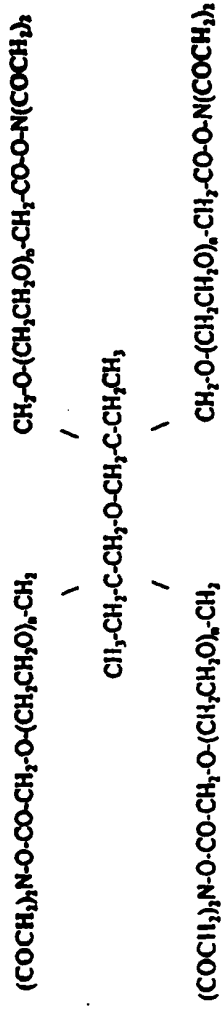


Fig. 6

SE-PEG, m = 1: Acetato de succinimidilo-PEG tetrafuncionalmente activado (enlace éter)



+ multiamino-PEG

↓

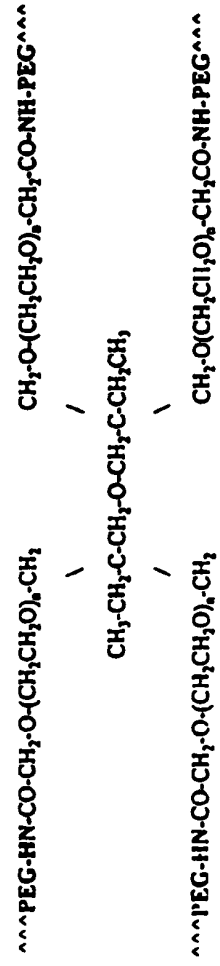


Fig. 7

A-PEG: Propionaldehído-PEG tetrafuncionalmente activado

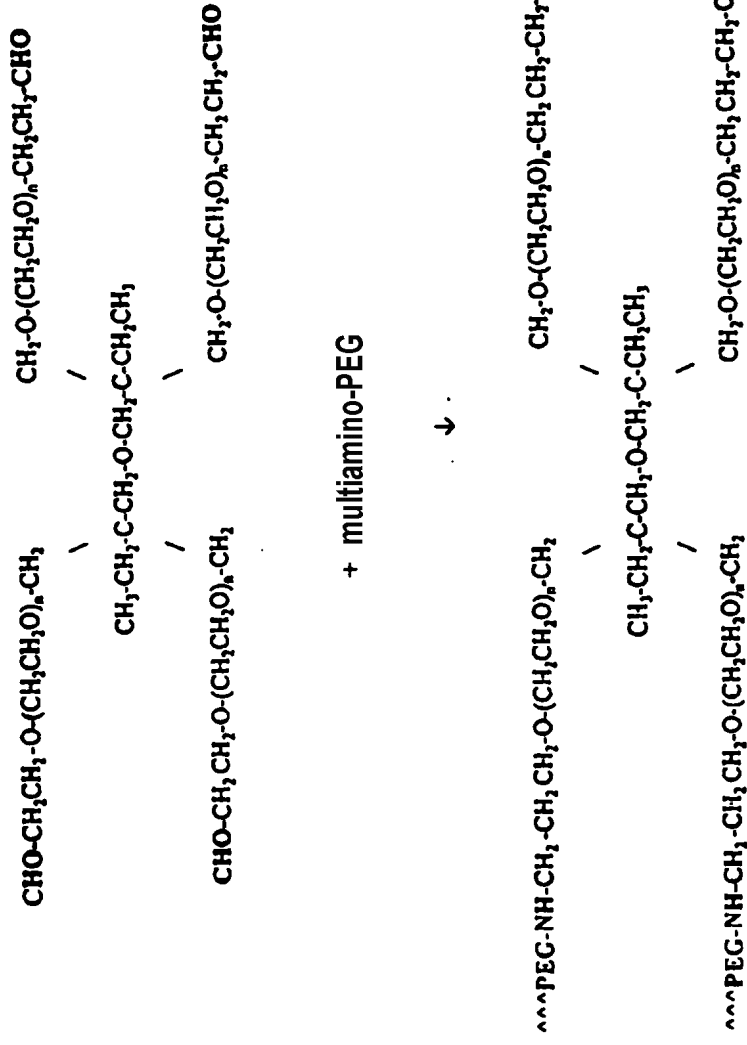


Fig. 10

I-PEG: Isocianato-PEG tetrafuncionalmente activado

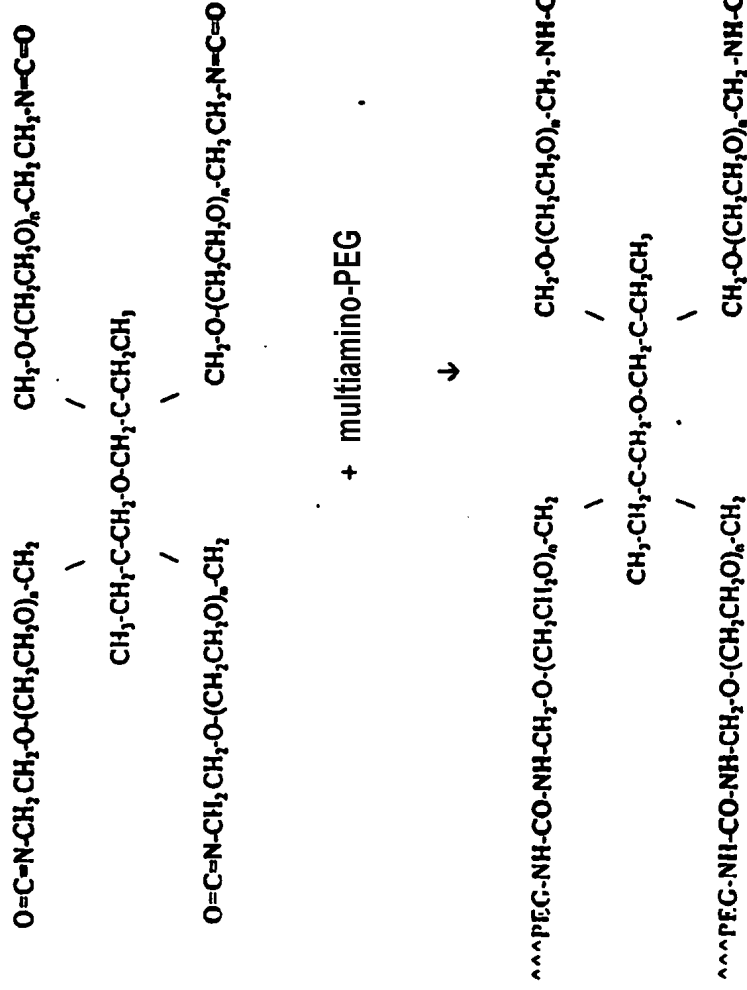


Fig. 12

V-PEG: Vinilsulfona-PEG tetrafuncionalmente activado

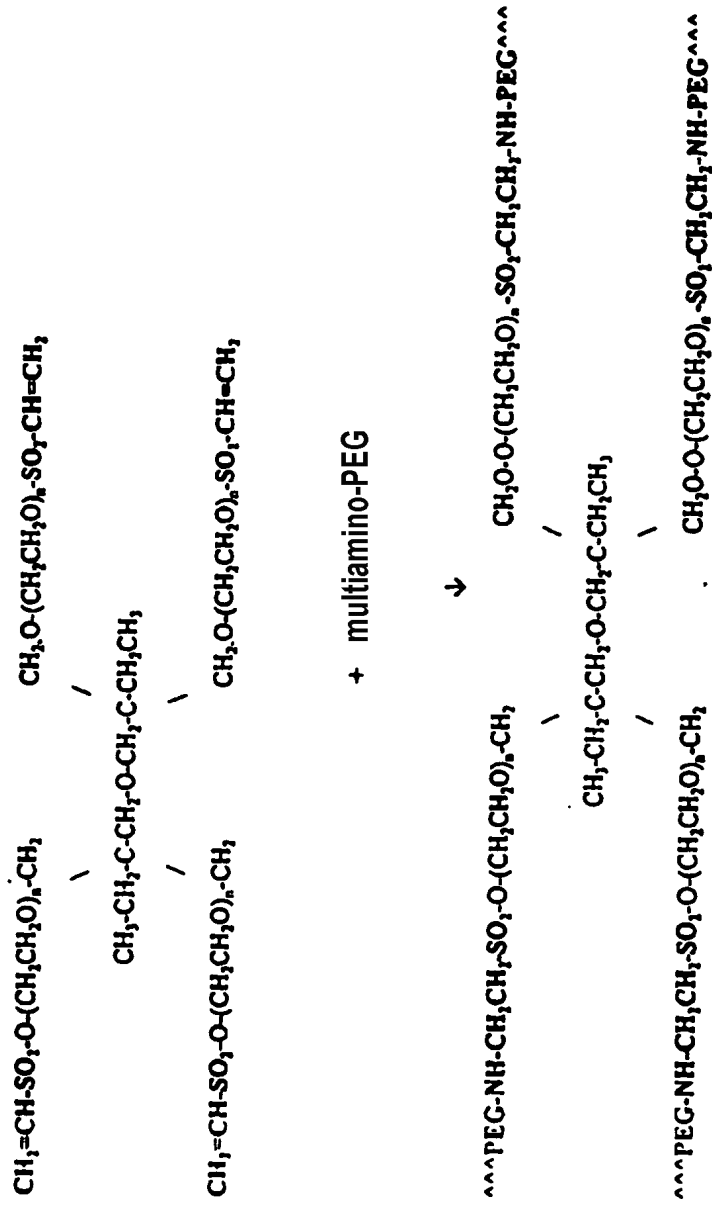
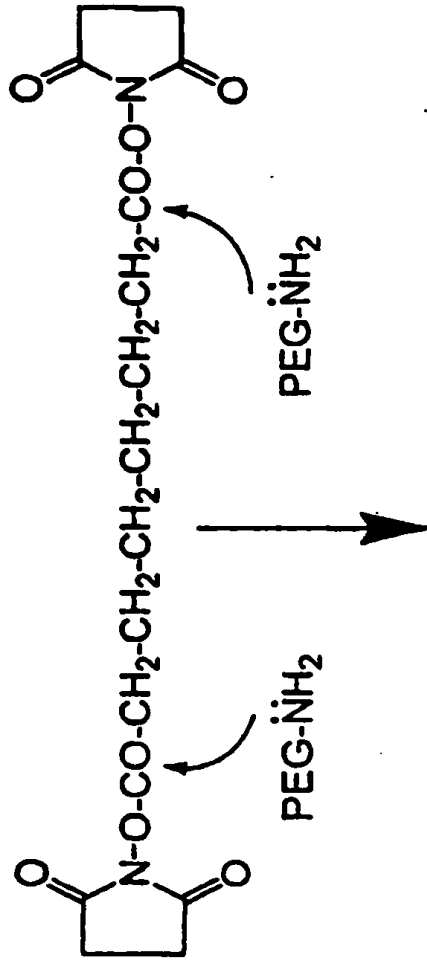


Fig. 13

Suberato de disuccinimidilo (DSS)



PEG-HN-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-PEG

Fig. 14

Ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP)

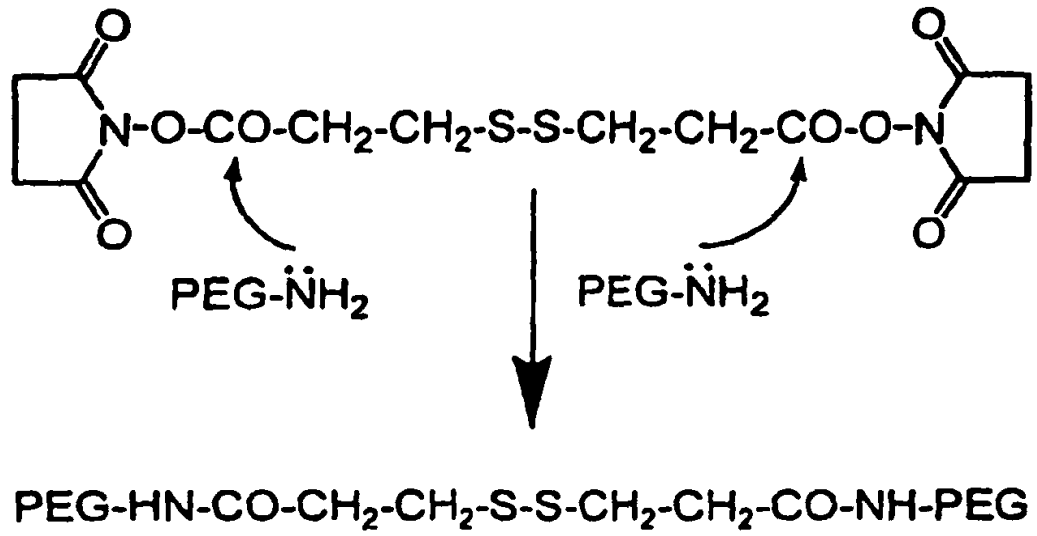


Fig. 15

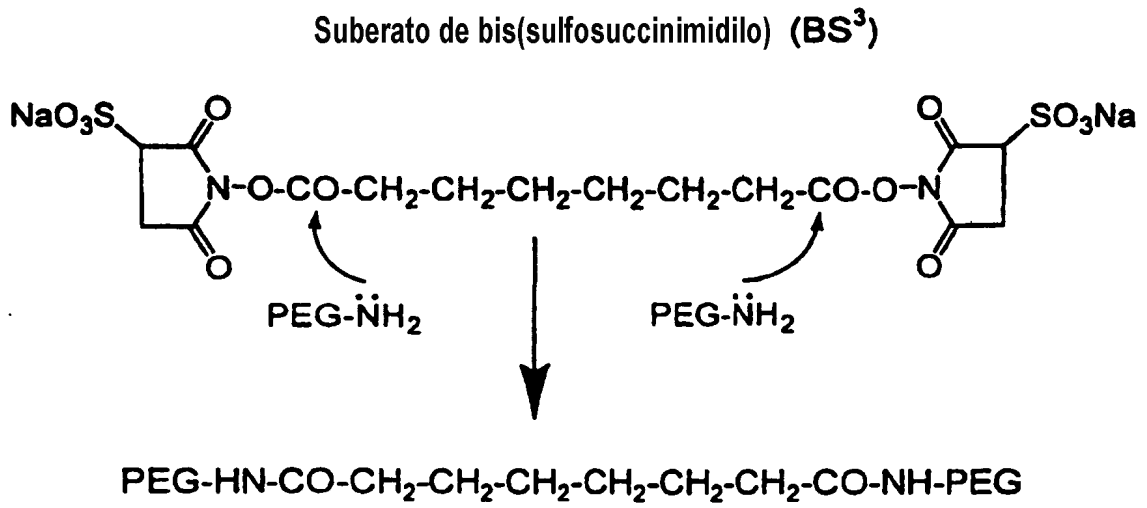


Fig. 16

Bis(2-succinimidooxycarboniloxi)etil sulfona (BSOCOES)

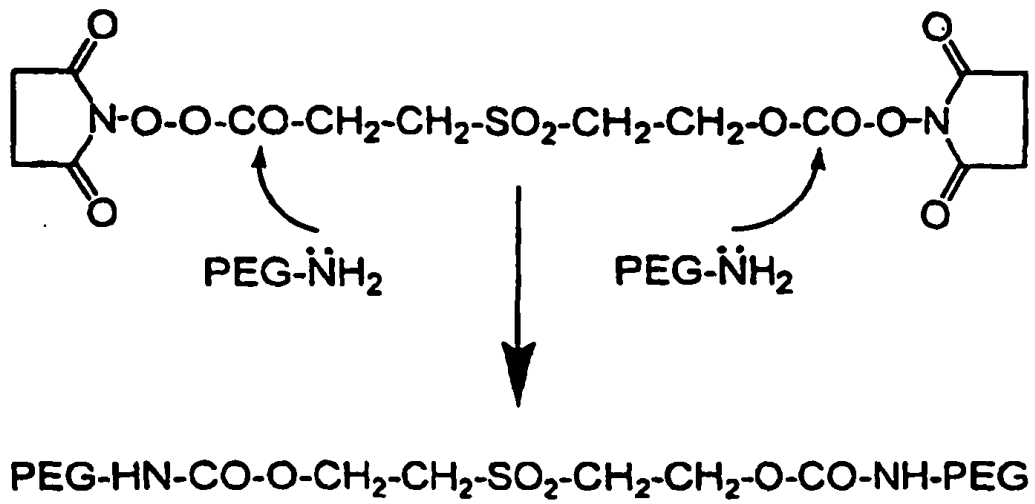


Fig. 17

3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP)

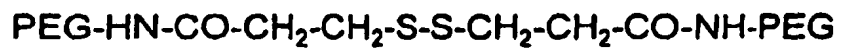
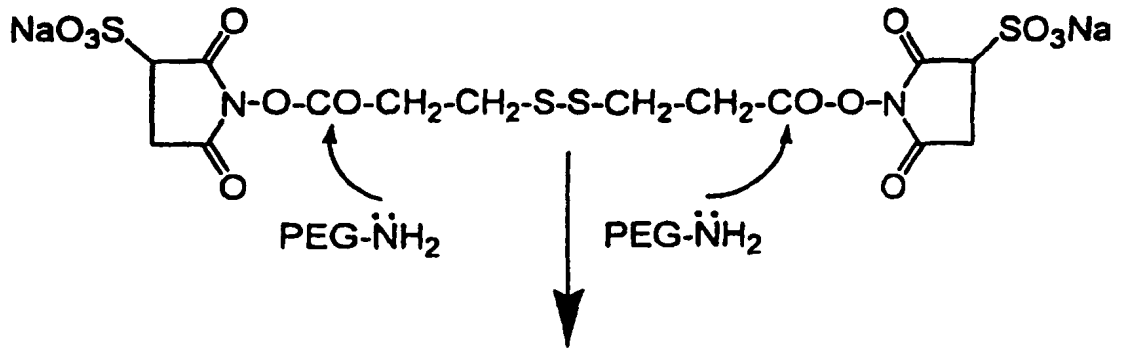


Fig. 18