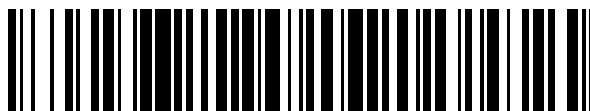


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 122**

51 Int. Cl.:  
**C08G 65/329** (2006.01)  
**C08L 71/02** (2006.01)  
**A61L 24/04** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09004765 .5**  
96 Fecha de presentación: **28.08.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2093245**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2009**

54 Título: **Dispositivo de polímero biocompatible**

30 Prioridad:  
**27.08.1999 US 151273**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**Wallace, Donald, G.;  
Chu, George, H. y  
Schroeder, Jacqueline, Anne**

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

ES 2 383 122 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

Dispositivo de polímero biocompatible.

Esta invención se refiere en general a composiciones de polímeros sintéticos que forman redes de polímeros interpenetrantes cuando se administran a tejidos. Dichas composiciones son particularmente adecuadas para usar en una variedad de aplicaciones médicas cuando la resistencia física del material administrado es importante. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención que se diseñan para usar para unir tejidos entre sí, son suficientemente fuertes para proporcionar un sustituto eficaz de otros medios quirúrgicos de unión, tales como suturas y grapas médicas.

El uso de composiciones de polímeros en la ingeniería de tejidos ahora está ampliamente reconocido, en particular la que consiste en polímeros sintéticos. A diferencia de muchas composiciones obtenidas de forma natural, las composiciones de polímeros sintéticos se pueden formular para presentar características físicas predeterminadas tales como resistencia de gel, así como características biológicas tales como la degradabilidad.

En una variedad de aplicaciones de ingeniería de tejidos, es conveniente usar composiciones que se puedan administrar como líquidos, pero que posteriormente forman hidrogeles en el sitio de administración. Dichas composiciones que forman hidrogeles in situ son más convenientes para usar, puesto que se pueden administrar como líquidos mediante una variedad de dispositivos diferentes, y son más adaptables para la administración en cualquier sitio, puesto que no están preformadas. Se han descrito muchos mecanismos diferentes que se pueden usar para promover la formación de hidrogel in situ. Por ejemplo, mezclas fotoactivables de prepolímeros de copoliéster soluble en agua y polietilenglicol, para crear barreras de hidrogeles, así como matrices de liberación del fármaco. En otro procedimiento, se han diseñado copolímeros de bloques de Pluronic o Poloxamer que son solubles en agua fría, pero forman hidrogeles insolubles que se adhieren a tejidos a la temperatura corporal (Leach, et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162:1317-1319 (1990)). También se han descrito cianoacrilatos polimerizables para usar como adhesivos de tejidos (Ellis, et al., *J. Otolaryngol.* 19:68-72 (1990)). En otro procedimiento más, se ha descrito que composiciones de polímeros sintéticos de dos partes, cuando se mezclan entre sí, forman enlaces covalentes uno con otro, así como con las superficies de tejidos expuestas (documento PCT WO 97/22371). En un procedimiento similar que implica una composición de dos partes, se ha descrito una mezcla de proteína y agente de reticulación bifuncional para usar como un adhesivo de tejidos (patente de EE.UU. nº 5.583.114).

En otras aplicaciones de ingeniería de tejidos, no es necesario o no se desea que las composiciones tengan una forma líquida cuando se administran. De hecho, en algunos casos puede ser ventajoso aplicar composiciones que son gelatinosas, tipo pasta, o incluso implantes sólidos preformados, puesto que estas formas tienden a permanecer en el sitio después de la administración, más fácilmente que las formulaciones líquidas.

Para muchas aplicaciones de ingeniería de tejidos, es importante que las composiciones sean capaces de formar una matriz después de la administración, que sea suficientemente fuerte para aguantar las fuerzas biológicas y físicas a las que estarán sometidas durante un periodo de tiempo suficientemente largo para cumplir su propósito pretendido. La resistencia es particularmente importante cuando las composiciones se usan como una sustitución parcial o total de suturas. Además, para aplicaciones en las que la adherencia a los tejidos es importante, es necesario que las formulaciones tengan una resistencia adhesiva adecuada. El cianoacrilato es un adhesivo altamente eficaz que forma una matriz fuerte, pero es demasiado tóxico para usarlo internamente y por lo tanto no está aprobado para dichos usos. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones que forman sellantes médicos con resistencia alta que no sean tóxicos.

La presente invención se refiere a un dispositivo de polímero biocompatible para usar en el tratamiento de tejidos, que comprende una esponja o lámina de colágeno impregnada con un polvo de polietilenglicol reactivo de dos partes, en el que dicho polvo reactivo comprende además un primer polietilenglicol que tiene múltiples grupos nucleófilos y un segundo polietilenglicol que tiene múltiples grupos electrófilos, en el que el polvo de polietilenglicol permanece sin reaccionar hasta que se pone en contacto con un tampón de pH alto.

Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones secundarias.

Un aspecto de la presente invención es la inclusión del potenciador de la resistencia a la tracción, que puede estar compuesto de una variedad de compuestos capaces de formar una estructura con las características adecuadas como se describe en otra parte en la presente memoria. Dichos compuestos incluyen, entre otros, Vicryl, lana de vidrio, plásticos y fibras.

Los grupos funcionales, X e Y, pueden ser cualquier pareja de restos reactivos que forman un enlace covalente, Z, en las condiciones adecuadas, tales como sulfhidrido, succinimidilo, acrilato y amino, que forman, sin orden particular, éter, éster o disulfuro.

Con el fin de potenciar o desalentar la biodegradación de la red de polímeros interpenetrantes, el núcleo de polímero sintético puede comprender además un extensor de cadena. Por ejemplo, restos de alfa-hidroxiácido, polilactona, poliortocarbonato y polifosfoéster, pueden servir para potenciar la biodegradabilidad. Además, el extensor de cadena puede ser un sustrato enzimático.

En otro aspecto de la presente invención, la composición comprende además componentes opcionales, tales como proteínas, antibióticos, factores de crecimiento y agentes hemostáticos.

En una realización preferida de la invención, el componente opcional está presente en forma de una nanofibra rígida, tal como la formada por el colágeno metilado.

5 En otro aspecto más de la invención, X e Y son cada uno 4 o mayor, para proporcionar una reticulación más eficaz.

En una realización, la composición de la presente invención comprende una pareja de poli(óxidos de alquileo) reactivos, una nanofibra rígida, tal como colágeno metilado, y un potenciador de la resistencia a la tracción.

Otros aspectos de la presente invención se describen en otra parte en la presente memoria.

10 La Figura 1 representa la estructura de polímeros lineales y ramificados con reticuladores biodegradables ("O") y grupos funcionales ("R") unidos a los mismos.

La Figura 2a representa la estructura de tetrakis(trimercaptopropionato) de pentaeritritol ("PESH-P").

La Figura 2b representa la estructura de tetraacrilato de pentaeritritol ("PETA").

La Figura 2c representa la estructura de T403, que se acopla con COH102 o acrilatos.

La Figura 3 representa la formación de enlace entre PESH-P y PETA.

15 La Figura 4a representa la estructura de poli(óxido de tetrametilen)-diamina, que se acopla con COH102 o acrilatos.

La Figura 4b representa la estructura de diacrilato de poli(óxido de propileno), que se acopla con grupos tiol o amino.

La Figura 4c representa la estructura de poli(óxido de propileno)-diamino, que se acopla con COH102 o acrilatos.

La Figura 5 representa los resultados del ejemplo 3.

La Figura 6 representa el aparato usado para los ensayos de fallo por cizallamiento del ejemplo 5.

20 Las Figuras 7 y 8 representan los esquemas sintéticos del ejemplo 6.

La figura 9 representa la estructura de COH102 (9a) y COH206 (9b).

La Figura 10 representa los tipos de dispositivos que son útiles para medir la resistencia a la tracción.

La Figura 11 representa la estructura del derivado de vinilsulfona del PEG de 4 brazos.

25 La Figura 12 representa la formación de una amida y un conjugado de PEG unido por éster carboxílico a partir de succinimidil-glutaril-PEG más amino-PEG.

La Figura 13 representa la formación de un conjugado de PEG unido por tioéster a partir de succinimidil-PEG y tiol-PEG.

La Figura 14 representa las estructuras de HEMA (metacrilato de hidroxietilo), MMA (metacrilato de metilo), succinato de mono-2-(acriloxi)etilo y metacrilato de 2-amino-etilo.

30 La Figura 15 representa un dispositivo que es útil para ensayar la resistencia a la rotura por presión de una membrana de colágeno.

La Figura 16 representa un dispositivo (un modelo de arteria carótida presurizada) que es útil para ensayar la resistencia a la rotura por presión de un defecto de abertura de arteria reparado.

La Figura 17 representa la formación de un enlace tioéter a partir de la reacción de tiol con acrilato.

35 La Figura 18 representa la estructura de TPETA (triacrilato de trimetilol-propano etoxilado)

La Figura 19 representa la estructura de TMPE-SH (trimetilol-(propano etoxilado)-tritiol).

La Figura 20 representa la estructura de TPT-SH (tris(3-mercaptopropionato) de trimetilol-propano).

La Figura 21 representa la estructura de dimetacrilato de glicerol.

40 La Figura 22 representa la estructura de poli(metacrilato de hidroxietilo)-co-metacrilato de aminoetilo-co-succinato de mono-2-(acriloxi)-etilo.

La presente invención se refiere a composiciones de polímeros sintéticos que de acuerdo con una realización,

- forman una red de polímeros interpenetrantes cuando se administran a un sitio del tejido. Poco tiempo (menos de 3 min) después de ser administrada, la composición forma una red que se desarrolla con una alta resistencia cohesiva (“tracción”), que contempla que la matriz tiene una resistencia a la tracción de al menos 10% y más preferiblemente 20% de la del cianoacrilato. En una realización preferida, dichas redes presentan una resistencia a la tracción mayor de 60 N/cm<sup>2</sup>. Las composiciones preferidas se diseñan para que queden ancladas en el sitio mediante medios mecánicos y/o químicos para sellar juntos los tejidos que se han separado como resultado de diferentes enfermedades o procedimientos quirúrgicos. Por consiguiente, se prefieren las composiciones que forman redes con resistencias adhesivas >50 mm de Hg (6,66 10<sup>3</sup> Pa) (es decir, la presión de rotura requerida para desprender el adhesivo y crear una fuga) para aplicaciones cuando se desea la adhesión fuerte de tejidos.
- 5
- 10 En otra realización, la presente invención se refiere a matrices preformadas en forma de láminas secadas que se pueden aplicar más rápidamente que un líquido pulverizado (para la cirugía abierta). El obtener resistencias a la rotura por presión muy altas en tiempos cortos (30 s) también puede permitir el uso de láminas activas en sitios que deben ser expuestos pronto después de la aplicación (30 s frente a 3 min).
- 15 En otra realización más, la presente invención comprende esponjas y láminas de colágeno activado como se describe con más detalle en los ejemplos 4 y 5 más adelante.

#### Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para describir mejor diferentes aspectos de las realizaciones preferidas de la presente invención.

- 20 El término “gel” se refiere al estado de la materia entre líquido y sólido. Como tal un “gel” tiene algunas de las propiedades de un líquido (es decir, la forma es resiliente y deformable) y algunas de las propiedades de un sólido (es decir, la forma es suficientemente discreta para mantener tres dimensiones en una superficie bidimensional). Por consiguiente, el “tiempo de gelificación”, denominado también en la presente memoria como “tiempo de gel”, se refiere al tiempo que una composición tarda en volverse no fluida bajo una tensión moderada. Esto se presenta en general como que se alcanza una resistencia de gel, expresada como el módulo elástico, G', mayor o igual que 10<sup>2</sup> dyn/cm<sup>2</sup> (10 Pa) en menos de 1 min.
- 25

La expresión “resistencia cohesiva” se refiere a la capacidad de las composiciones de la presente invención a permanecer intactas, es decir, no romperse, rasgarse o agrietarse, cuando se someten a tensiones físicas o condiciones ambientales. La resistencia cohesiva en la presente memoria se mide como función de la “resistencia a la tracción”.

- 30 La expresión “resistencia adhesiva” se refiere a la capacidad de las composiciones de la presente invención a poder permanecer unidas a los tejidos en el sitio de administración cuando se someten a tensiones físicas o condiciones ambientales.

- 35 El término “polímero” se refiere a una molécula que consiste en restos químicos individuales, que pueden ser iguales o diferentes, pero preferiblemente son iguales, que están unidos entre sí. Como se usa en la presente memoria, el término “polímero” se refiere a restos químicos individuales que están unidos extremo a extremo para formar una molécula lineal, así como restos químicos individuales unidos entre sí en forma de una estructura ramificada (p. ej., de “múltiples brazos” o “forma estrellada”).

El término “biocompatible” se refiere a la capacidad de las composiciones de la presente invención de ser aplicadas a tejidos sin provocar una inflamación ni fibrosis significativas u otras respuestas adversas de los tejidos.

- 40 La expresión “polímero sintético” se refiere a polímeros que no se encuentran de forma natural y que se producen mediante síntesis química o recombinante. Como tales, se excluyen específicamente proteínas naturales tales como colágeno y polisacáridos naturales tales como ácido hialurónico. Las proteínas tales como el colágeno sintético y los hidratos de carbono tales como el ácido hialurónico sintético, y sus derivados, están incluidos.

- 45 La expresión “polímeros sintéticos activados” se refiere a polímeros sintéticos que se han modificado químicamente para tener al menos un grupo funcional (p. ej., un grupo sulfhidrilo) que es capaz de reaccionar con una pareja de reacción correspondiente (p. ej., un grupo reactivo con sulfhidrilo) para formar un enlace covalente. La expresión “activado multifuncional” o “multifuncional” se refiere a polímeros sintéticos que tienen dos o más grupos funcionales (normalmente nucleófilos o electrófilos). Los tipos de polímeros sintéticos activados multifuncionales incluyen polímeros activados difuncionales, activados trifuncionales, activados tetrafuncionales y activados en forma estrellada (que tienen cuatro o más grupos funcionales).
- 50

- 55 La expresión “sellante médico” se refiere a composiciones que quedan ancladas en el sitio por medios mecánicos y/o químicos para sellar tejidos entre sí que se han separado como resultado de diferentes enfermedades o procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, los sellantes médicos se pueden usar para rellenar huecos en tejidos duros, para unir tejidos vasculares y otros tejidos blandos entre sí, para proporcionar una barrera médica para promover la hemostasia, y para evitar las adhesiones de tejidos evitando que una superficie tisular se ponga en contacto y se adhiera a otra superficie tisular.

La expresión "red de polímeros interpenetrantes" ("IPN") se pretende que describa la matriz que se forma a partir de un polímero o polímeros reactivos tales como PEG, o monómeros que polimerizan, que presenta un peso molecular infinito e incluye un correaccionante de un tipo diferente, tal como una fibra con alta resistencia a la tracción, que interpenetra en la red de polímero de PEG para formar dos redes continuas a lo largo de la red. Véase, Sperling, L.H. et al., "Morphology and Mechanical Behavior of Interpenetrating Polymer Networks", en *Polymer Networks*, A.J. Chompff and S. Newman, ed., Plenum Press, New York, New York (1971), páginas 435-449.

El término "carga" se usa para referirse a agentes de carga, compuestos orgánicos pequeños, polímeros, fibras, resinas y similares, que se añaden a composiciones químicas por una variedad de razones, siendo la más pertinente para la presente invención el potenciar la resistencia a la tracción.

#### 10 Componentes de las composiciones

Las composiciones de la presente invención son composiciones de dos partes, cada una de las cuales comprende un polímero sintético activado multifuncional diferente, de modo que los polímeros reaccionarán uno con otro en el sitio de la administración para formar una IPN. Como tales, se pueden administrar fácilmente por separado.

Dichas composiciones se pueden representar en general por la fórmula I como sigue:



El compuesto<sub>1</sub> tiene múltiples ( $m \geq 2$ ) grupos funcionales (X) que reaccionan con el compuesto<sub>2</sub>, que tiene múltiples ( $n \geq 2$ ) grupos funcionales (Y), de modo que cuando los grupos funcionales X e Y se ponen en contacto en condiciones adecuadas, se forma el enlace covalente Z. Por consiguiente, los grupos funcionales X e Y también se pueden denominar "parejas de reacción" una de otra y se pueden denominar en colectivo "par de reacción". Como se representa en la fórmula I sólo con propósitos de ilustración, sólo hay un enlace formado entre el compuesto<sub>1</sub> y el compuesto<sub>2</sub>. Sin embargo, cuando  $m+n \geq 5$ , y se usan relaciones adecuadas de los dos componentes como se describe en otra parte en la presente memoria, los dos compuestos forman múltiples uniones entre sí dando como resultado una matriz de polímeros tridimensional. Preferiblemente, ambos compuestos contienen 4 o más grupos funcionales, puesto que dicha multifuncionalidad produce una matriz de gel con una resistencia cohesiva general mayor. En una realización particularmente preferida, cada uno de los compuestos está activado tetrafuncionalmente.

En otra realización preferida, cada uno de los compuestos tiene 12 grupos funcionales. Dichos compuestos se forman haciendo reaccionar un primer polímero activado tetrafuncional con un segundo polímero activado tetrafuncional, en los que los grupos funcionales de cada uno de los dos compuestos son un par de reacción, y reaccionan entre sí para formar polímeros activados funcionales de "12 brazos". Un ejemplo de dicho compuesto de "12 brazos" es el dodecasulfhidril-PEG, de peso molecular 50.000, que se construye a partir de un PEG-éster de succinimida tetrafuncional central acoplado a 4 moléculas de sulfhidril-PEG tetrafuncional (exterior). Dichos polímeros tienen un tamaño en el intervalo de peso molecular de aproximadamente 10.000 a peso molecular mayor de 100.000 dependiendo del peso molecular de los materiales de partida polímeros activados tetrafuncionales.

Se pueden sintetizar fácilmente otros tipos de polímeros multifuncionales usando síntesis rutinaria. Sin embargo, se debe tener cuidado de producir productos de múltiples brazos con longitudes de brazos consistentes para evitar el impedimento estérico de los grupos funcionales. Por consiguiente, los polímeros activados que son adecuados para usar en la presente invención pueden tener una variedad de formas geométricas y configuraciones.

#### Núcleo del polímero

Como se ha descrito antes, cada uno de los compuestos tiene múltiples grupos funcionales, X e Y. El resto no reactivo del compuesto se considera que es el "núcleo". Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones, se prefiere que ambos compuestos tengan el mismo o diferente núcleo de polímero.

Un polímero hidrófilo sintético particularmente preferido para algunas aplicaciones es un polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 de peso molecular, más preferiblemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000 de peso molecular. Todavía más preferiblemente, cuando el núcleo de polímero es polietilenglicol, en general tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 7.500 a aproximadamente 20.000 de peso molecular. Lo más preferiblemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000.

Los poli(óxidos de alqueno) activados multifuncionales, tales como el polietilenglicol, están disponibles en el comercio, y también se preparan fácilmente usando métodos conocidos. Por ejemplo, véase el capítulo 22 de *Poly(ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, NY (1992); y *Shearwater Polymers, Inc. Catalog, Polyethylene Glycol Derivatives*, Huntsville, Alabama (1997-1998). Para usar como sellante de tejidos, la combinación de ejemplo de polímeros activados es la siguiente: PEG tetrafuncional, (éter de pentaeritritol y polipolietilenglicol)-glutarato de tetrasuccinimidilo (peso molecular 10.000); y PEG tetrafuncional, (éter de pentaeritritol y polipolietilenglicol)-tetrasulfhidrilo (peso molecular 10.000). En ambos casos, estos PEG de "4 brazos" se forman por etoxilación del pentaeritritol, en el que cada una de las cuatro cadenas tiene un peso molecular de aproximadamente 2.500, y después se derivatizan para introducir los grupos

funcionales en cada uno de los 4 brazos. También se prefieren los compuestos de tipo polietilenglicol análogos polimerizados a partir de diglicerol en lugar de pentaeritritol.

5 Se pueden usar otras moléculas ramificadas de forma radial, tales como glicerol o lactitol, para construir materiales que forman geles. Las estructuras deseadas pueden ser inmiscibles con el agua y de peso molecular bajo (de peso molecular de 350 a aproximadamente 12.000) de manera que permanecen líquidas. También están contempladas las estructuras que forman geles de mayor peso molecular. Se prefiere que dichas composiciones sean miscibles con el agua o dispersables en agua para ser compatibles con el uso de agua como medio líquido para el suministro.

#### Potenciador de la resistencia a la tracción

10 Con el fin de potenciar la resistencia de la matriz, en general es conveniente añadir un "potenciador de la resistencia a la tracción" a la composición. Dichos potenciadores de la resistencia a la tracción preferiblemente comprenden fibras con alta resistencia a la tracción de tamaño micrométrico, preferiblemente de 5 a 40 micrómetros de diámetro y de 20 a 5000 micrómetros de longitud, normalmente con temperaturas de transición vítrea muy por encima de 37°C.

15 Dichos potenciadores de la resistencia a la tracción para usar en la presente invención incluyen, entre otros, fibras de colágeno, fibras de poliglicólido y polilactida, así como otros potenciadores de la resistencia a la tracción orgánicos y potenciadores de la resistencia a la tracción inorgánicos. Un potenciador de la resistencia a la tracción particularmente útil es Vicryl (poliglicólido:polilactida, 90:10). El uso de potenciadores de la resistencia a la tracción, que son parte de la categoría más amplia de "cargas", es bien conocido. Por ejemplo, las "gomas de silicona" cuando se reticular con peróxidos, son débiles y de tipo queso, con resistencias a la tracción del orden de solo 34 N/cm<sup>2</sup>. Cuando se combinan de forma adecuada con cargas de refuerzo, la resistencia a la tracción de estas gommas puede aumentar tanto como 50 veces. Lichtenwalner, H.K. and Sprung, M.N., en Mark, H.F., Gaylord, N.G., and Bikales, N.M., Eds., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Vol. 12, p. 535, John Wiley, New York, 1970.

25 Los potenciadores de la resistencia a la tracción son aquellos que tienen resistencia a la tracción alta inherente y además pueden interaccionar por enlaces covalentes o no covalentes con la red de gel polimerizada. El potenciador de la resistencia a la tracción debe unirse al gel, sea de forma mecánica o covalente, con el fin de proporcionar soporte a la tracción. Las resistencias a la tracción de las suturas de poliglicólido reabsorbibles son de aproximadamente 89.000 N/cm<sup>2</sup>; la de las fibras de colágeno es 5000-10.000 N/cm<sup>2</sup> (Hayashi, T., en *Biomedical Applic. of Polym. Mater.*, Tsuruta, T. et al., Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993).

#### Grupos reactivos y enlaces de la matriz

30 En la presente invención, el enlace Z comprende un enlace covalente que se forma cuando los grupos funcionales, X e Y, se hacen reaccionar entre sí. Los grupos funcionales pueden ser sulfhidrilo, succinimidilo, acrilato, amino, etc. Por consiguiente, el enlace puede ser un éster, un éter, un disulfuro o similares. Otros grupos funcionales, su reactividad y los enlaces formados por estos son bien conocidos en la bibliografía científica. Por ejemplo, véase Bodanszky, M., *Principles of Peptide Synthesis*, 2nd ed., páginas 21 a 37, Springer-Verlog, Berlin (1993); y Lundbland, R.L., *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed., Chapter 6, CRC Press, Boca Raton, Florida (1991). Otros ejemplos de parejas de grupos funcionales incluyen, entre otros, sulfhidrilo/acrilato, sulfhidrilo/succinimidilo, amino/succinimidilo y amino/acrilato.

40 Además de los compuestos reactivos con sulfhidrilo que forman enlaces tioéster, se pueden usar otros compuestos diferentes que forman otros tipos de enlaces. Por ejemplo, los compuestos que contienen derivados de imidato de metilo forman enlaces de imidotioéster con grupos sulfhidrilo. Alternativamente, se pueden usar los grupos reactivos con sulfhidrilo que forman enlaces disulfuro con los grupos sulfhidrilo, tales como disulfuro de orto-piridilo, 3-nitro-2-piridinasulfenilo, ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico, 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico), derivados de metano-tiosulfato y disulfuros de 2,4-dinitrofenil-ceisteinilo. En dichos casos, se pueden usar agentes auxiliares, tales como peróxido de hidrógeno o éster de di-terc-butilo del ácido azodicarboxílico, para facilitar la formación del enlace disulfuro.

45 Otra clase más de grupos reactivos con sulfhidrilo forman enlaces tioéter con grupos sulfhidrilo. Dichos grupos incluyen, entre otros, yodoacetamida, N-etilmaleimida y otras maleimidias, incluyendo dextrano-maleimidias, monobromobimano y compuestos relacionados, vinilsulfonas, epóxidos, derivados de O-metil-isourea, etileniminas, aziridinas, y 4-(aminosulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol.

#### Extensores de cadena

50 Los grupos funcionales pueden estar unidos directamente al núcleo del compuesto, o pueden estar unidos indirectamente a través de un extensor de cadena. Dichos extensores de cadena son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 97/22371, que describe "grupos conectores" que serían adecuados para usar como extensores de cadena en las composiciones de la presente invención. Los extensores de cadena son útiles para evitar problemas de impedimento estérico que a veces se asocian con la formación de enlaces directos entre moléculas. Alternativamente, los extensores de cadena se pueden usar para unir varios compuestos activados multifuncionales juntos para hacer moléculas mayores. En una realización particularmente preferida, el extensor de

cadena también se puede usar para alterar las propiedades degradativas de las composiciones después de la administración y la formación del gel resultante. Por ejemplo, los extensores de cadena se pueden incorporar en uno o ambos polímeros activados multifuncionales para promover la hidrólisis, desalentar la hidrólisis, o proporcionar un sitio para la degradación enzimática. Los extensores de cadena también pueden activar o suprimir la actividad de los grupos sulfhidrilo y reactivos con sulfhidrilo. Por ejemplo, se espera que los grupos atractores de electrones a uno o dos carbonos del grupo sulfhidrilo disminuyan su eficacia en el acoplamiento, debido a una disminución de la nucleofilia. Se prevé que los carbonos de dobles enlaces y carbonos carbonílicos tengan este efecto. Se prevé que los grupos cercanos voluminosos para cualquiera de la pareja disminuyan las tasas de acoplamiento, debido al impedimento estérico. Los grupos atractores de electrones adyacentes al carbonilo reactivo del glutaril-N-succinimidilo, se prevé que hagan a este carbono carbonílico incluso más reactivo con la pareja de sulfhidrilo.

Los extensores de cadena pueden proporcionar sitios para la degradación, es decir, sitios hidrolizables. Los ejemplos de extensores de la cadena hidrolizables incluyen, entre otros, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico y ácido glicólico; polilactonas tales como caprolactona, valerolactona, gamma-butil-lactona y p-dioxanona; poliaminoácidos; polianhídridos tales como glutarato y succinato, poliortoésteres; poliortocarbonatos tales como carbonato de trimetileno; y polifosfoésteres. Los ejemplos de extensores de cadena no degradables incluyen, entre otros, succinimida, ácido propiónico y carboximetilato. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 99/07417. Los ejemplos de extensores de cadena degradables por enzimas incluyen Leu-Gly-Pro-Ala, que es degradado por colagenasa; y Gly-Pro-Lys, que es degradado por plasmina.

Se deben considerar otros principios generales cuando se diseñan composiciones de la presente invención como los siguientes: si se van a usar estructuras de mayor peso molecular, preferiblemente tienen enlaces biodegradables como se ha descrito antes, de modo que no se generan fragmentos mayores de 20.000 de peso molecular durante la reabsorción en el cuerpo. Además, para promover la miscibilidad y/o solubilidad en agua, puede ser deseable añadir suficiente carga eléctrica o hidrofilia. Dichos grupos hidrófilos se pueden introducir fácilmente usando síntesis química conocida, siempre que no den lugar a geles que se hinchen más de 3-5 veces o que tengan resistencia a la tracción baja. En particular, los segmentos de polialcoxi pueden debilitar la resistencia de gel.

#### Constituyentes opcionales de la composición

Además del o de los compuestos polímeros activados funcionales y el potenciador de la resistencia a la tracción, las composiciones de la presente invención también pueden contener otros compuestos, que se pueden incluir en uno o ambos componentes de las composiciones de dos componentes, o se pueden administrar por separado. En una realización, estos compuestos se pueden incorporar de forma covalente en la propia IPN mediante reticulación a uno o ambos compuestos activados funcionales después de mezclarlos juntos. En otra realización, como sería el caso si el compuesto no fuera reactivo con cualquiera de los compuestos activados funcionales, el compuesto se puede administrar de forma que quede física o iónicamente asociado con los compuestos que forman la matriz después de mezclar, y por lo tanto que formen parte de la propia matriz.

Los compuestos adicionales que se pueden añadir son glicosaminoglicanos y proteínas. Los glicosaminoglicanos incluyen, entre otros, ácido hialurónico, quitina, sulfato de condroitina A, B o C, sulfato de queratina, queratosulfato y heparina, y derivados de los mismos. En otra realización, las proteínas se pueden añadir para una variedad de propósitos. Por ejemplo, el colágeno puede mejorar la biocompatibilidad de la matriz, incluyendo la potencial colonización por las células, promoción de curación de heridas, etc. El colágeno y cualquier proteína que contenga grupo amino también contribuirían a la integridad estructural de la matriz quedando reticulada a la misma junto con los otros componentes de la matriz. En particular, si se usan los ésteres de PEG-succinimidilo, los enlaces amida formados con colágeno serán más estables a la degradación hidrolítica que los enlaces formados por reacción de ésteres de succinimidilo y sulfhidrilos.

Las proteínas adecuadas incluyen, entre otras, colágeno, fibronectina, gelatina y albúmina, así como fragmentos de péptidos de los mismos. Se prefiere en particular el colágeno, que puede estar en forma de colágeno afibrilar, microfibrilar o fibrilar. Los tipos de colágeno I y III aislados de placenta humana o dermis bovina, o preparados por métodos de ADN recombinantes, son adecuados. Véase, el documento PCT WO 90/05755 para una descripción de colágenos adecuados y derivados de colágeno. Debe entenderse que cuando se añade colágeno a la composición, es importante ajustar la concentración de los otros componentes de la composición para evitar la precipitación.

Los constituyentes adicionales que se pueden añadir a la composición incluyen antibióticos, factores de crecimientos, proteínas hemostáticas (tales como trombina, fibrina, fibrinógeno, los factores de la sangre, etc.), células, genes, ADN, etc.

#### Nanofibras rígidas opcionales

Los componentes opcionales de la composición mencionados antes se pueden añadir a las IPN de la presente invención, en una variedad de formas que son bien conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede añadir ADN en forma de ADN genómico, oligonucleótidos, polinucleótidos, dinucleótidos, etc. Igualmente, se pueden añadir constituyentes proteínicos como polipéptidos, proteínas nativas, proteínas sintéticas, fragmentos de proteínas, etc.

Una estructura particularmente preferida para añadir a las IPN de la presente invención, es una nanofibra. Muchos de los componentes opcionales mencionados antes, y en especial el colágeno metilado, se pueden formar fácilmente en dicha estructura. El término "nanofibra" pretende significar una fibra que normalmente tiene una longitud menor de un micrómetro. En algunos casos, estas fibras son tan pequeñas que el colágeno en esta forma se considera que es esencialmente "no fibrilar". En cualquier caso, cuando se incorpora a una IPN que consiste en un polímero flexible con una temperatura de transición vítrea relativamente baja (inferior a cero) tal como el PEG, una nanofibra rígida con una temperatura de transición vítrea relativamente alta (superior a 25°C) imparte resistencia adicional.

Aunque el colágeno es un buen ejemplo de una nanofibra rígida, porque está formado a partir de tres cadenas de polipéptidos en una triple hélice mantenidas juntas mediante enlaces de hidrógeno, otros polímeros también pueden ser adecuados. Por ejemplo, los derivados de otros biopolímeros que son de tipo varilla, tales como la tubulina y la queratina, se pueden fabricar en formas de nanofibras rígidas. Siempre que la estructura sea de polímero de tipo varilla de escala nanométrica, que sea compatible con el agua y preferiblemente que tenga grupos polares y más preferiblemente grupos amino en su superficie, la nanofibra rígida se puede hacer de una variedad de materiales diferentes. Véase, por ejemplo, Liu, G., et al., "Diblock Copolymer Nanofibers", *Macromolecules* 29: 5508-5510 (1996).

#### Formulación de la composición

Ambos componentes se suministran en el sitio en forma de polvos, para ser mezclados con tampón en el sitio de administración.

En una realización alternativa, ambos componentes se pueden mezclar juntos en un solo medio acuoso en el que no son reactivos, es decir, tal como en un tampón de pH bajo. Después, se pueden pulverizar sobre el sitio del tejido junto con un tampón de pH alto, después de lo cual reaccionarán rápidamente y formarán un gel.

La concentración de los compuestos reactivos en cada uno de los componentes de la composición depende necesariamente de una serie de factores. Por ejemplo, si los componentes de la composición son cada uno PEG de 4 brazos (es decir, composiciones de PEG-PEG), una concentración de 20-25% en peso en cada uno de los dos componentes antes de la mezcla, produce un gel después de la mezcla con un módulo elástico,  $G'$ , de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  dyn/cm<sup>2</sup> ( $10^4$ - $10^5$  Pa) que es adecuado para usar como un sellante quirúrgico. Usando colágeno metilado y succinimidil-PEG de 4 brazos, concentraciones de 2-4% y 0,2-0,4%, respectivamente, producen geles con resistencias cohesivas que son comparables a los geles de PEG-PEG al 10-15%. Usando albúmina como uno de los componentes, las concentraciones de 30% o mayores alcanzan una resistencia cohesiva similar. La concentración adecuada del compuesto, y otros ingredientes opcionales, en cada componente, y por lo tanto la concentración relativa de los componentes de la matriz en la matriz de gel final, se pueden optimizar fácilmente para lograr el tiempo de gelificación y la resistencia de gel deseados, usando experimentación rutinaria. Usando los PEG de 4 brazos descritos antes, el polímero sintético en general está presente en una concentración de 2 a 50% (p/v), y más preferiblemente 10-25%. Sin embargo, para algunas aplicaciones que requieren matrices con resistencia alta, en las que la fluidez de las composiciones no es crucial, es deseable usar PEG con concentraciones mayores, tales como de 50% a 70%, más preferiblemente 60%.

Los componentes líquidos de las composiciones de la presente invención se preparan cada uno por separado añadiendo el polímero sintético activado (en forma seca o como una disolución concentrada) a un medio líquido. Los medios líquidos adecuados incluyen disoluciones acuosas de tampones, tales como fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico, carbonato sódico/bicarbonato sódico, glutamato o acetato, en una concentración de 0,5 a 300 mM. En general, el PEG reactivo con sulfhidrido se prepara en agua o un tampón diluido, con un pH entre aproximadamente 5 y 6. Los tampones con pK entre aproximadamente 8 y 10,5 para preparar el componente de sulfhidrido-PEG son útiles para lograr un tiempo de gelificación rápido de las composiciones que contienen mezclas de sulfhidrido-PEG/SG-PEG. Estas incluyen carbonato, borato y AMPPO (ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxi-propano-sulfónico). A diferencia de esto, usando una combinación de maleimidil-PEG y sulfhidril-PEG, se prefiere un pH de aproximadamente 5 a 9 para el medio líquido usado para preparar el sulfhidril-PEG. Una composición particularmente preferida para las aplicaciones hemostáticas a sitios de tejidos que sangran activamente, comprende una mezcla de maleimidil- y succinimidil-PEG como el primer componente, y sulfhidril-PEG como el segundo componente. Dichas composiciones producen geles con biodegradabilidad potenciada y tiempos de gel superiores cuando se comparan con composiciones que tienen solo maleimidil-PEG o succinimidil-PEG.

El pH de la disolución acuosa de tampón que se usa para cada uno de los dos (o más) componentes de la composición debe ajustarse usando la optimización rutinaria para alcanzar un pH final que conduzca a la gelificación rápida, sin causar la gelificación instantánea, lo cual interfiere con el procedimiento de suministro. Por ejemplo, tanto el amino-PEG como el sulfhidril-PEG necesitan un pH básico para potenciar la nucleofilia. Los efectos del pH en el tiempo de gel se discuten a continuación en los ejemplos.

#### Resistencia de gel

Las composiciones de la presente invención se formulan para presentar una resistencia cohesiva superior. Esto



significa en general que presentan al menos 10% y preferiblemente 20% de la resistencia a la presión por rotura del cianoacrilato "Superglue".

Formulación de ejemplo hecha a partir de COH102/206/colágeno metilado más lana de vidrio o Vicryl

5 La adición de colágeno metilado a las formulaciones de PEG, tal como COH102/COH206 descrito más adelante en el ejemplo 2, endurece mucho el gel y permite que resista el hinchamiento en tampón salino o agua. Debido a que el gel no se hincha, continúa teniendo suficiente resistencia a la tracción inherente para permanecer unido a cargas fibrosas, tales como la lana de vidrio, hilos de Vicryl o hilos de seda de sutura.

10 La combinación de COH102/COH206 y colágeno metilado se puede considerar como "una red de polímeros interpenetrantes". Esto se debe a que los reactivos colágeno metilado y PEG existen como una disolución transparente homogénea antes de la gelificación a pH 4-5. La capacidad del PEG y el colágeno derivatizado a coexistir juntos en disolución era un descubrimiento muy inesperado. En el momento de la gelificación (iniciado por la elevación del pH), COH102 y COH206 reaccionan por sus respectivos grupos reactivos para formar enlaces tioéter. Este enlace da lugar a una red de peso molecular infinito, que es una característica de los geles de polímeros. COH102 y COH206 solos forman geles, pero dichos geles son comparativamente débiles. Cuando está presente el colágeno metilado, los grupos amino en el colágeno también pueden reaccionar con el COH102, formando enlaces amida y dando como resultado un gel triple de PEG y colágeno, que está covalentemente unido en una red.

20 La adición del colágeno metilado crea un gel que es suficientemente robusto para soportar las cargas fibrosas. Si el gel no es suficientemente fuerte para mantener la carga fibrosa, sale bajo cargas de tracción y no se logra una resistencia a la tracción alta. La tabla 12 muestra que cuando las moléculas poliméricas o en partículas se sustituyen por colágeno metilado, disminuye el rendimiento de la unión. Por lo tanto, siendo el colágeno metilado una molécula relativamente rígida, puede impartir una resistencia potenciada al hidrogel de PEG relativamente diluido. Los polímeros flexibles, tales como el ácido hialurónico, polilisina y quitosano, aunque tienen un peso molecular relativamente alto y crean disoluciones relativamente viscosas, aparentemente no tienen la misma rigidez y por lo tanto son menos capaces de absorber las tensiones de tracción y pasar estas tensiones a la carga fibrosa.

30 En términos de polímeros, el PEG es una cadena de polímero flexible que tiene una temperatura de transición vítrea baja (temperatura a la que el polímero es flexible, en lugar de gomoso y duro); el colágeno metilado tiene una temperatura de transición vítrea mayor (es decir, el colágeno metilado pierde su rigidez, se vuelve flexible, a aproximadamente 33-35°C, temperatura a la que "funde" para formar gelatina, una molécula de cadena flexible). Debido a que se forma una red de polímeros interpenetrantes (IPN) entre un polímero de temperatura de transición vítrea baja (PEG) y un polímero de temperatura de transición vítrea alta (colágeno metilado), el resultado es el refuerzo del primero por el último. Si se intenta reforzar el PEG con otro polímero flexible (tal como ácido hialurónico) que también tiene una temperatura de transición vítrea baja (es decir, es flexible a las temperaturas de interés), no se logra el refuerzo. (Véase, por ejemplo, Sperling, L.H., Huelck, V., and Thomas, D.A., "Morphology and mechanical behavior of interpenetrating polymer networks", en *Polymer Networks, Structural and Mechanical Properties*, eds. A.J. Chomppf, S. Newman, Plenum Press, NY, 1971, p. 435).

40 La resistencia de la unión potenciada de la formulación final aparentemente depende de varios factores: 1) los reactivos PEG COH102 y COH206 se unen covalentemente para formar un hidrogel; este gel también presenta una excelente unión con el tejido, aparentemente debido al éster de succinimidilo del COH102, que puede unirse a los grupos amino en el tejido (véase la tabla 14); 2) el colágeno metilado forma una red de polímeros interpenetrantes con la red de gel del PEG, reforzándola; y 3) pasa las cargas de tracción a las cargas fibrosas tales como las fibras de polilactida/glicólido o las fibras de vidrio. Por lo tanto, la adición de las cargas fibrosas es crítica para lograr el nivel final deseado de resistencia a la tracción del gel.

45 Se contempla que otros derivados de colágeno que permanecen solubles (moleculares, no fibrilares) a pH 4-7, también pueden impartir las mismas propiedades deseadas. Por ejemplo, otros ésteres de grupos carboxilo del colágeno, tales como colágeno etilado, propilado o bencilado, también pueden funcionar como colágeno metilado. El colágeno fibroso es menos deseado, debido a que forma dominios en forma de perlas, aglomerados, en el gel y no imparte la resistencia a la tracción potenciada. Tampoco son preferidos los derivados de colágeno que no son solubles a pH 4 o que pueden no contener grupos amino libres reactivos, tales como el colágeno succinilado, porque no proporcionan las propiedades deseadas. Los polímeros sintéticos que presentan rigidez son casi exclusivamente estructuras cristalinas insolubles en agua, que existirán como conglomerados de escala micrométrica y no forman la red interpenetrante íntima con el hidrogel de PEG que se necesita.

Uso y administración

55 Otra forma más de suministrar las composiciones de la presente invención es preparar los dos componentes reactivos (o el componente reactivo individual en el caso de componentes que contienen sulfhidrilo que están diseñados para formar enlaces disulfuro) en una forma de polvo inactiva. Dichas composiciones después se pueden activar tras la aplicación al sitio del tejido, o inmediatamente antes, aplicando un activador. En una realización, el activador es una disolución de tampón que tiene un pH que activará la composición una vez mezclado con la misma.

Véase el ejemplo 7 para una descripción de una composición de PEG que contiene sulfhidrilo que se mantiene a pH bajo hasta la administración, después se mezcla con un tampón de pH alto en el sitio de aplicación para iniciar la gelificación.

5 Otra forma más de suministrar las composiciones es preparar láminas preformadas, y aplicar las láminas como tales en el sitio de la administración (véanse los ejemplos).

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en una variedad de aplicaciones farmacéuticas diferentes. En general, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden adaptar para usar en cualquier aplicación de ingeniería de tejidos en las que se están usando actualmente matrices de geles sintéticos. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención son útiles como sellantes de tejidos en el aumento de tejidos, la reparación de tejidos, como agentes hemostáticos en la prevención de adherencias de tejidos, proporcionando modificaciones de superficie y en las aplicaciones de suministro de fármacos/células/genes. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente el protocolo de administración adecuado para usar con cualquier composición que tenga una resistencia de gel y tiempo de gelificación conocidos, basándose en los principios descritos en el presente documento y principios científicos bien conocidos. A continuación se da una descripción más detallada de varias aplicaciones específicas:

#### Sellantes y adhesivos de tejidos

En una aplicación preferida, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para estados médicos que requieren una capa de revestimiento o sellante para prevenir la pérdida de gases, líquidos o sólidos. El método implica aplicar ambos componentes al tejido u órgano dañado para sellar 1) tejidos vasculares y u otros tipos de tejidos u órganos, para detener o minimizar el flujo de sangre; 2) tejido torácico, para detener o minimizar la pérdida de aire; 3) tejido del tracto gastrointestinal o pancreático, para detener o minimizar la pérdida de contenido fecal o tisular; 4) vejiga o uréteres, para detener o minimizar la pérdida de orina; 5) dura, para detener o minimizar la pérdida de CSF; y 6) piel o tejido seroso, para detener la pérdida de líquido seroso.

Estas composiciones también se pueden usar para adherir tejidos entre sí tal como pequeños vasos, nervios o tejido dérmico. El material se puede usar 1) aplicándolo a la superficie de un tejido y después se puede presionar rápidamente un segundo tejido contra el primer tejido, o 2) poniendo los tejidos en estrecha yuxtaposición y después aplicando el material. Además, las composiciones se pueden usar para llenar espacios en tejidos blandos y duros que se han creado por enfermedad o cirugía.

#### Adherencias quirúrgicas

30 Una aplicación preferida es un método para reducir la formación de adherencias después de un procedimiento quirúrgico en un paciente. El método implica aplicar el material sobre el tejido dañado u órgano pulverizando ambos componentes juntos o aplicando los componentes previamente mezclados o un implante sólido preformado. Los componentes reaccionarán entre sí para formar una matriz fuerte en la superficie del tejido. Los procedimientos médicos incluyen indicaciones ginecológicas, abdominales, neuroquirúrgicas, cardíacas y ortopédicas.

#### Suministro del fármaco

Una aplicación preferida es un método de aplicación local de una sustancia biológicamente activa a pacientes. La sustancia activa se puede suministrar junto con los dos componentes de modo que el material se puede formar in situ, o puede ser parte de un implante preformado. La sustancia activa se puede liberar por procedimientos de difusión controlada o se puede unir covalentemente a los componentes, de modo que será liberada cuando se degrade el hidrogel resultante.

Las sustancias biológicamente activas pueden ser cualquiera de una variedad de materiales orgánicos e inorgánicos, incluyendo proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Los ejemplos específicos incluyen enzimas, antibióticos, agentes antineoplásicos, citoquinas, anestésicos locales, hormonas, agentes antiangiogénicos, anticuerpos, neurotransmisores, fármacos psicoactivos, fármacos que afectan a los órganos reproductivos y oligonucleótidos terapéuticos.

#### Modificación de los implantes

Una aplicación preferida es un método de aplicar revestimientos a implantes para afectar a las propiedades de la superficie de los implantes o para ayudar a adherir implantes a superficies de tejidos. Se puede aplicar un revestimiento de componentes a 1) injertos vasculares, prótesis endovasculares, para minimizar o detener la pérdida de sangre o líquido seroso de estos dispositivos; 2) catéteres o implantes mamarios, para reducir o detener la fibrosis excesiva; 3) parches o mallas artificiales, para minimizar la fibrosis excesiva y ayudar a adherir los implantes a las superficies de tejido.

#### Suministro de células o genes

Una aplicación preferida de las composiciones es encapsular y de esta forma suministrar células o genes, que

incluye material de fuentes naturales o ADN, ARN y sus respectivas formas de sentido contrario sintéticos, a un sitio deseado. Las células pueden incluir citoblastos mesenquimatosos, células epiteliales y células neuroectodérmicas. Las células pueden ser de origen alogénico o xenogénico.

## EJEMPLOS

### 5 Ejemplo 1 (Referencia)

#### Preparación de una composición sellante de tejidos basada en dos componentes de pentaeritritol

Se mezclan entre sí tetrakis(3-mercapto-propionato) de pentaeritritol, peso molecular 489 ("PESH-P", fig. 2a), 1,08 g, y tetraacrilato de pentaeritritol, peso molecular 352 ("PETA", fig. 2b), 1,0 g, en presencia de 5 a 10 µg de una polioxipropileno-triamina ("T403", Fig. 2c, Jeffamine, Texaco Chemical Co., Houston, Texas.) que sirve como base.

10 Todas las especies reactivas son líquidas. El PESH-P y PETA no son miscibles con el agua. Por consiguiente, el PETA se calienta a aproximadamente 40°C para formar un líquido antes de mezclarlo con el PESH-P y T403. En 1 a 5 min después de la mezcla, dependiendo del nivel de T403, empieza la gelificación. El enlace formado entre PESH-P y PETA se muestra en la figura 3. El gel se deja que cure durante varias horas, seguido de una hora de hidratación a 37°C. Después, la resistencia a la tracción del gel es 0,88 +/- 0,3 MPa. Cuando dichos geles se dejan  
15 en disolución salina fisiológica, pH 6,7, son estables durante más de 40 días, y solo se hinchan aproximadamente 20%. Los datos de resistencia a la rotura por presión muestran solo adhesión moderada a cuero triturado. Esto sería de esperar, puesto que no hay enlace químico del sulfhidrilo o acrilato con la proteína usando mezclas de PETA-P/PESH. En tres ensayos de resistencia a la rotura por presión, se observaron presiones de rotura de 20-40 mm de Hg (2,67.10<sup>3</sup> - 5,33.10<sup>3</sup> Pa).

### 20 Ejemplo 2

#### Resistencia a la tracción de diferentes composiciones

##### Materiales y métodos:

25 El (éter de pentaeritritol y polietilenglicol)-tetratiol, peso molecular 10.000 ("COH206"), tetrasuccinimidil-glutarato de éter de pentaeritritol y polietilenglicol, peso molecular 10.000 ("COH102"), y el (éter de pentaeritritol y polietilenglicol)-tetraamino, peso molecular 10.000 ("COH204"), se adquirieron en Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Alabama.) El cianoacrilato, "Superglue", se adquirió sin receta médica. La gelatina, 70-100 Bloom, se adquirió en Sigma (Saint Louis, Missouri.) El bis-succinimidil-succinato de sulfoetilenglicol ("S-EGS"), suberimidato de dimetilo ("DMS"), y glutarato de disuccinimidilo ("DSG") se adquirieron en Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois. El diacrilato de polietilenglicol ("PEG") ("PEG-di-acrilato") de peso molecular 200; dimetacrilato de PEG, de peso molecular 1.000  
30 ("PEG-di-metacrilato"); y el metacrilato de 2-hidroxietilo ("HEMA") se adquirieron en Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania. El diacrilato de polipropileno ("PPO"), de peso molecular 540 ("PPO-di-acrilato"); éter de bis-2-aminopropilo y PPO, de peso molecular 230 ("PPO-di-amino 230"); éter de bis-2-aminopropilo y PPO, de peso molecular 2.000 ("PPO-di-amino 2.000"); politetrahidrofuran-bis(3-aminopropilo) ("PTMO"), de peso molecular 350 ("PTMO 350"); PTMO, de peso molecular 1.100 ("PTMO 1.100"); PESH-P, de peso molecular 489; PETA, de peso  
35 molecular 352; y meta-bisulfito potásico se adquirieron en Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin. El persulfato amónico se adquirió en Biorad, Inc., Richmond California. El colágeno metilado se preparó a partir de colágeno de dermis bovina purificado, siguiendo un método modificado de la patente de EE.UU. n° 4.164.559 (véase el ejemplo 7). Las estructuras de PTMO (llamado también poli(óxido de tetrametilen)-di-amina), diacrilato de PPO y PPO-di-amino se muestran en las figuras 4a, 4b y 4c, respectivamente.

40 Los geles se prepararon como sigue:

a. COH102/COH206: se disolvieron 100 mg de COH102 en 400 µl de fosfato sódico 0,5 mM, pH 6,0. Se disolvieron 100 mg de COH206 en 400 µl de fosfato sódico 300 mM, pH 7,5. Las dos disoluciones se mezclaron en un vaso de precipitados y se vertieron en un molde de aproximadamente 8 x 0,5 x 0,5 cm. La gelificación se produjo en 2-3 min. La muestra se dejó a temperatura ambiente hasta secarse. La matriz seca se separó del molde, y se hidrató a 37°C  
45 durante 1 h antes del ensayo de la resistencia a la tracción.

b. COH102/COH204: La muestra se preparó como se ha descrito en a., excepto que el COH206 se sustituyó por el COH204.

c. PETA/PESH-P: La muestra se preparó como se describe en el ejemplo 1.

d. Geles de gelatina: se mezcló gelatina al 20% en tampón de fosfato sódico/carbonato sódico, pH 9,6, con diferentes compuestos como se indica más adelante y se ha descrito en a., suponiendo 10-20 moles de amino activo por mol de gelatina, y usando niveles estequiométricos del otro compuesto.

e. COH102/PPO-diamino 2.000/PEG-diacrilato: se disolvieron 615 mg de COH102 en 923 µl de etanol y se mezclaron con 246 µl de PPO-diamino 2.000 y 246 µl de PEG-diacrilato como se ha descrito en a.

f. PETA/PPO-diamino 230/PPO-diamino 2.000: se mezclan 500 µl de PETA, 630 µl de PPO-diamino 230 y 150 µl de PPO-diamino 2.000, como se ha descrito en a.

g. COH102/PTMO: El gel se preparó como se ha descrito en e, sustituyendo el PPO-diamino 2.000 por PTMO 1.100.

h. Cianoacrilato. El pegamento se extruyó en agua y endureció inmediatamente.

5 i. HEMA: Se disolvieron 1,3 ml de HEMA y 64 µl de PEG-diacrilato en 600 µl de tampón de fosfato sódico 150 mM, pH 7,4, y se mezclaron con 40 mg de persulfato amónico en 100 µl de agua. La mezcla se calentó a 60-80°C durante 4 h.

j. COH102/COH206/colágeno metilado: se disolvieron 25 mg de colágeno metilado, 100 mg de COH102 y 100 mg de COH206 en 1 ml de fosfato sódico 0,5 mM, pH 6,0.

10 Mediciones de resistencia a la tracción

15 Se fijaron los extremos de los geles secados, y después las regiones centrales de todas las muestras se rehidrataron durante aproximadamente 1 h en tampón salino fisiológico, pH 6,7 a 37°C antes del ensayo. Después, las matrices se alargaron hasta el punto de rotura en un aparato de ensayo Instron Modelo 4202 (Instron, Inc., Canton, Massachusetts) que se equipó con una celda de carga de 100 N. Se registró la carga máxima y se convirtió en el límite de rotura usando la sección transversal medida de la muestra en el punto de rotura. Los datos también se representaron gráficamente como la tensión frente a la tracción, usando  $\text{tracción} = \Delta L/L_0$ , donde  $\Delta L$  es la extensión y  $L_0$  es la longitud de la muestra original.

Tabla 1

Mediciones de la resistencia a la tracción

Material	Resistencia a la tracción (N/cm <sup>2</sup> )
HEMA	>393
Cianoacrilato	385
PETA/PESH-P	78 (n=10)
PETA/PTMO-diamino 350/1.100	26 (n=2)
PETA/PTMO-diamino 1.100	34
PETA/PPO-diamino 230/2.000	36 (n=2)
PESH-P/PPO-di-acrilato	20
COH102/COH206/colágeno metilado	37 (n=3)
COH102/PPO-diamino 2.000/PEG-diacrilato 200	10 (n=2)
COH102/PTMO-diamino	4 (n=2)
COH102/T403	5
COH206/PEG-diacrilato	8
COH/206/PEG-dimetacrilato/PEG-diacrilato	4
COH206/PEG-dimetacrilato	26
Gelatina/DMS	6
Gelatina/S-EGS	6 (n=2)
Gelatina/PETA	5
Gelatina/DSS/T403	3
COH102/COH206 20%	5 (n=4)
COH102/COH206 10%	10

20

Ejemplo 3

Adhesivos de alta resistencia basados en COH102 y COH206 y una comparación con adhesivos preparados a partir de PETA, PESH-P y GLYC-20HS

Resumen:

25 Se investigaron varios tipos de geles como potenciales formulaciones de sustitución de suturas. Los geles basados en derivados de pentaeritritol presentaban una resistencia cohesiva alta, pero adhesiva baja. Los geles basados en succinimidil-glicerol-PEG de 3 brazos presentaban baja resistencia cohesiva, pero buena resistencia adhesiva. Los geles basados en COH102/COH206 acuoso al 60% (p/v), a los que se añadieron diferentes materiales fibrosos, tales como colágeno fibroso insoluble, suturas de poliglicólido y lana de vidrio, presentaban resistencias cohesiva y  
30 adhesiva buenas.

Los adhesivos médicos de alta resistencia tienen interés como sustituciones de suturas en el cierre de incisiones quirúrgicas. En particular, se mostró que los geles formados a partir de PETA y PESH-P tenían resistencias a la tracción aproximadamente 10X mayores que los formados a partir de disoluciones al 20% (p/v) de COH102 y

COH206. Cuando los geles de PETA-PESH-P se complementaron con fibras o polímeros en partículas, se observaron geles con resistencias a la tracción incluso mayores.

5 Este experimento describe las propiedades adhesivas de geles de PETA-PESH-P y geles relacionados, así como las propiedades tanto adhesivas como de tracción de una formulación de COH102 y COH206 al 60% (p/v), a la que se han añadido colágeno y otros polímeros. También se describen propiedades de geles formadas a partir de glicerol-succinimida de 3 brazos (NOF Corp., Japón) y los reactivos anteriores.

#### Materiales y métodos:

10 PETA, PESH-P, y tetrakis(3-mercaptoacetato) de pentaeritritol (PESH-A), polietileno, tamaño de partículas de 180  $\mu$  de superficie activada, y polibutadieno, funcionalizado con epóxido, epoxi E.W. 260, se adquirieron en Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin. GLYC-20HS (succinimidil-succinato de éter de polioxietileno y glicerilo, peso molecular 2600), DEPA-10H (polioxietileno-bis-amina, peso molecular 1040) se obtuvieron en NOF Corporation, Japón. COH102 y COH206 eran de calidad reactivo de Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama. El polietileno-co-acrilato-succinimidato (PE-AC-S) se sintetizó a partir de polietileno-co-acrilato (peso molecular aproximadamente 400K con 5% de acrilato) adquirido en Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin. El colágeno insoluble 15 Kensey-Nash (Semed F) se adquirió en Kensey-Nash Corporation, Exton, Pennsylvania. Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, New Jersey, suministró un segundo tipo de colágeno insoluble. Las suturas de Prolene 7-0 fueron fabricadas por Ethicon Corporation. Se cortaron láminas de colágeno de fibra gruesa del mismo colágeno de dermis bovina de fibra gruesa que el usado para el ensayo de rotura por presión, como describen Prior, J.J., Wallace, D.G., Harner, A., and Powers, N., "A sprayable hemostat containing fibrillar collagen, bovine thrombin, and autologous plasma", *Ann. Thor. Surg.* 68, 479-485 (1999). Estas láminas de colágeno servían como un modelo de tejido para 20 posteriores estudios. El colágeno de fibra menor se preparó volviendo a precipitar el colágeno de dermis bovina digerido por pepsina fabricado por Collagen Aesthetics, Inc., Palo Alto, California. La lana de vidrio se adquirió en VWR Corporation. Las suturas de poliglicólido, no revestidas ("Dexon S") eran de Davis and Geck.

25 La formación de gel para las mediciones de la resistencia a la tracción se ha descrito antes en el ejemplo 1. Para los ensayos de rotura por presión, el aparato usado se describe en Wallace et al., véase antes. Se pulverizó o extendió mediante espátula aproximadamente 1 ml de la fórmula total sobre el sustrato de lámina de colágeno de fibra gruesa y se dejó reposar. Se aplicó presión de agua después de que la formulación alcanzara la textura de un sólido gomoso relativamente firme (que ya no era pegajoso), y se registró la presión para la rotura del sellado en mm de Hg.

30 Se prepararon geles de COH102 y COH206 al 60% como sigue: se disolvió COH102 al 60% (p/v) en tampón S (fosfato sódico 0,5 mM, pH 6,0) y se disolvió COH206 también al 60% en fosfato sódico 300 mM a pH 7,5 u 8,9; o en fosfato sódico 117 mM, carbonato sódico 183 mM, pH 9,6 ("tampón PC"). En algunos casos la relación anterior de fosfato y carbonato se alteró para dar pH 9,44 para un tiempo de sedimentación más rápido. El pH usado en cada caso se determinó por la velocidad de gelificación deseada. Se añadieron diferentes aditivos a dicha formulación 35 base; p. ej., se añadió colágeno Kensey-Nash y de menor tamaño de fibra, 28 mg/ml del gel final; se añadió lana de vidrio 25 mg/ml; y suturas de poliglicólido 40 mg/ml.

#### Resultados y discusión:

40 Los resultados se discuten a continuación y se muestran en las siguientes tablas 2, 3 y 4. Una resistencia a la tracción  $>60$  N/cm<sup>2</sup> se considera que es "fuerte". Una resistencia a la rotura por presión  $>50$  mm de Hg ( $6,63 \cdot 10^3$  Pa) se considera que es una "buena adhesión".

45 Los geles de PETA y PESH-P habían mostrado buenas resistencias a la tracción (ejemplo 1). Sin embargo, cuando se ensayó la adhesión a un tejido simulado hidratado (láminas de colágeno de fibra gruesa) en el ensayo de rotura por presión, presentaron una adhesión pobre ( $< 50$  mm de Hg ( $6,63 \cdot 10^3$  Pa) de presión de rotura). Como se muestra en la siguiente tabla 2, la formulación después se modificó para que contuviera GLYC-20HS soluble en agua y DEPA-10H, o la pareja COH102 y COH206 (que solos en medio acuoso dieron una buena adhesión a las láminas de colágeno). Estos materiales tenían una buena resistencia a la tracción (evaluación manual), pero de nuevo adhesión 50 pobre a las láminas de colágeno. El gel formado a partir de GLYC-20HS y DEPA-10H, también tenía adhesión pobre cuando no había agua presente en la fórmula. Se puede observar un resultado diferente cuando estos reactivos se disuelven en tampones acuosos, puesto que son solubles en agua.

50 Sin embargo, cuando GLYC-20HS era el componente mayoritario en masa, los geles eran débiles pero presentaban una buena adhesión en el ensayo de rotura por presión. Usando estas combinaciones particulares de componentes, parece que se podría alcanzar o una resistencia a la tracción alta o una unión adhesiva alta, pero no ambas.

Tabla 2

Resistencia a la tracción y resistencia a la rotura por presión de geles preparados con glicerol-succinimida de 3 brazos NOF

Material	Resistencia a la tracción (N/cm <sup>2</sup> )	Resistencia a la rotura por presión (mm de Hg)
PETA 500 mg PESH-P 540 µl T403 5 µl	>60	23 (3,06.10 <sup>3</sup> Pa)
GLYC-20HS 50 mg PETA 500 mg PESH-P 540 µl DEPA-10H 9 mg	>60	14,5 (1,93.10 <sup>3</sup> Pa)
PESH-A 216 µl PETA 240 mg GLYC-20HS 40 mg	>60	11 (1,47.10 <sup>3</sup> Pa)
PETA 400 mg COH102 100 mg PESH-P 440 µl COH206 100 mg DEPA-10H 8 mg	>60	15 (2.10 <sup>3</sup> Pa)
GLYC-20HS 640 mg DEPA-10H mg	-----	25 (3,33.10 <sup>3</sup> Pa)
GLYC-20HS 400 mg PESH-A 36 µl T403 10 µl	<30	>120 (16.10 <sup>3</sup> Pa)
GLYC-20HS 400 mg PETA 50 mg PESH-A 72 µl T403 20 µl	<30	166, 194 (22,1.10 <sup>3</sup> Pa, 259.10 <sup>4</sup> Pa)
GLYC-20HS 200 mg T403 19 µl PESH-P 18 µl	<30	55 (7,33.10 <sup>3</sup> Pa)

- 5 También se evaluó la capacidad del polietileno derivatizado con succinimidilo (PE-AC-S) a actuar como un potenciador eficaz de la resistencia a la tracción para los geles de PETA-PESH-P y para los geles de COH101/206 (tabla 3). Este material no aumentó la resistencia a la tracción de estos geles, quizás debido a que no era un filamento extendido, es decir su relación de dimensiones no era suficientemente alta.

Tabla 3

- 10 Polietileno-co-acrilato-succinimida ("PE-AC-S") como un potenciador de la resistencia a la tracción

Material	Resistencia a la tracción (N/cm <sup>2</sup> )
PETA 400 mg PESH-P 432 µl T403 8 µl PE-AC-S 20 mg	80 (igual que el control sin PE-AC-S)
COH102 COH206 (60%) +colágeno KN (28 mg/ml) +PE-AC-S (40 mg/ml)	38 (más débil que el control sin PE-AC-S)

- 15 La tabla 4 también resume los resultados con COH102 y COH206 más colágeno fibrilar Kensey-Nash, que presentaba una resistencia a la tracción potenciada frente a geles al 20% y 60% (p/v) de COH102/206 solo. Además, la formulación de COH102/COH206/colágeno tenía una buena unión adhesiva a las láminas de colágeno. Otros aditivos, tales como suturas de cuero triturado y Prolene 7-0 también potenciaban la resistencia de gel frente a los controles. Algunas cargas, tales como colágeno de fibra pequeña, polietileno y polibutadieno, no presentan propiedades potenciadoras de la resistencia a la tracción. Finalmente, algunas cargas o combinaciones de las mismas, tales como lana de vidrio y colágeno insoluble más suturas de poliglicólido, presentaban una potenciación significativa de la resistencia a la tracción, superando la observada con el cianoacrilato (385 N/cm<sup>2</sup>) (ejemplo 1). Se recogieron los datos de resistencia a la rotura por presión límite, pero confirmaron que todas las formulaciones de COH102/206 (60%) eran muy adhesivas a superficies de colágeno, y por lo tanto se esperaba que se adhirieran a los tejidos también.
- 20

5 Como se muestra en la tabla 4, se describe el hidrogel de P-HEMA en Santin, M., y col., "Synthesis and characterization of a new interpenetrated poly (2-hydroxyethylmethacrilato)-gelatin composite polymer", *Biomaterials* 17,1459-1467; y el gelatina-PEG-di-acrilato se describe en Nakayama, Y., and Matsuda, T., "Photocurable surgical tissue adhesive glues composed of photoreactive gelatin and poly(ethylene glycol) diacrilato", *J. Biomed. Biomat. Res. (Appl. Biomater.)* 48, 511-521 (1999).

Tabla 4  
Resistencia a la tracción y ensayos de resistencia a la rotura por presión

Material	Resistencia a la tracción (N/cm <sup>2</sup> )	Resistencia a la rotura por presión (mm de Hg)
COH102/206	2-12	100-200 (13,3-26,6.10 <sup>3</sup> Pa)
HIDROGEL pHEMA *	GEL al 20%	
GELATINA-PEG-DIACRILATO**	3	
PETA-PESH-P	5-16	151 ± 34 (20,1 ± 6,84.10 <sup>3</sup> Pa)
PETA- PESH-P+ colágeno KN	50-170	14, 23 (1,87.10 <sup>3</sup> Pa, 3,06.10 <sup>3</sup> Pa)
COH102/206 (60%) + colágeno KN	140-200	
COH102/206 (60%) + colágeno KN	123±39	268, 216 (3,81.10 <sup>4</sup> Pa, 28,8.10 <sup>3</sup> Pa)
COH102/206 (60%) + colágeno KN + suturas Prolene 7-0	(n=7) 180	
COH102/206 (60%) + cuero triturado	197,78	
COH102/206 (60%) sin carga	94	
COH102/206 (60%) + colágeno de fibra pequeña	27	
COH102/206 (60%) + suturas de Prolene 7-0 revestidas	27	
COH 102/206 (60%) + polietileno	58	
COH102/206 (60%) + polietileno + polibutadieno	14	
COH102/206 (60%) + lana de vidrio	58, 30	
COH102/206 (60%) + colágeno KN + suturas Dexon S	28,21	
COH102/206 (60%) + colágeno de Collagen Matrix + suturas Dexon S	745	156 (2,08 10 <sup>4</sup> Pa)
	161	
	531	
	718	376 (5,01.10 <sup>4</sup> Pa)

10 La figura 5 representa el ensayo de tracción de COH102/206 (60%) más colágeno de Collagen Matrix 28 mg/ml más suturas de poliglicólido no revestidas Dexon S (4-0) cortadas en trozos, 40 mg/ml. La resistencia a la tracción medida era mayor de 700 N/cm<sup>2</sup>, y la medición se interrumpió cuando la muestra empezó a deslizarse fuera del dispositivo de ensayo (pendiente descendiente).

Ejemplo 4

Materiales compuestos de lámina de colágeno que contienen PEG activo

15 Resumen

COH102 y COH206 se pueden disolver juntos en etanol sin reacción. La disolución en etanol se puede evaporar hasta sequedad, dejando un polvo de PEG reactivo. Cuando se pone en un tampón PC, pH 9,6, el polvo gelifica instantáneamente. Este descubrimiento se usó para desarrollar una lámina adhesiva. Esponjas de colágeno y láminas de colágeno de fibra gruesa recubiertas con esponjas se impregnaron con disoluciones en etanol de COH102 y COH206. Después de secar, dichas láminas de PEG reactivas se podían unir a una lámina de colágeno de fibra gruesa. Se observaron resistencias a la rotura por presión de aproximadamente 300 mm de Hg, 4.10<sup>4</sup> Pa, después de 10 min a pH 7.

25 También se prepararon láminas adhesivas que consistían en una lámina posterior de colágeno de fibra gruesa (preparada como se ha descrito en el ejemplo 3) a la que se unió una esponja de colágeno. La capa de esponja se impregnó con el polvo de PEG reactivo. Cuando dichas láminas se pusieron secas sobre una segunda lámina de colágeno de fibra gruesa humedecida con tampón a pH 9,6, se formó una unión fuerte en tan poco como 30 segundos. La unión de la lámina adhesiva a la segunda lámina de colágeno se midió por el ensayo de rotura por presión. Se observaron resistencias de rotura por presión de hasta 500 mm de Hg, 6,66.10<sup>4</sup> Pa.

Materiales y métodos

Las láminas de colágeno de fibra gruesa se prepararon como se describe en otra parte en la presente memoria. Se unieron esponjas de colágeno a la lámina de colágeno mediante extrusión de una suspensión de colágeno fibrilar reconstituido en la parte superior. La suspensión de colágeno reconstituido se preparó diluyendo colágeno Zyderm II caducado (proteína 65 mg/ml, Collagen Aesthetics, Inc., Palo Alto, California) con agua para lograr una dispersión de 20 mg/ml. Se cubrieron aproximadamente 7 cm<sup>2</sup> de lámina por ml de suspensión. Una vez extruida la suspensión de colágeno sobre las láminas de colágeno de fibra gruesa, el material compuesto se congeló y después se liofilizó. Después de liofilización, quedó una esponja de colágeno poroso adherente a la lámina de colágeno. A la esponja seca se añadió gota a gota una disolución en alcohol de COH102 y COH206. Esta última se preparó añadiendo 200 mg de COH102 y 200 mg de COH206, cada uno a 1,8 ml de etanol absoluto (secado sobre tamices moleculares). La disolución de ambos compuestos de PEG en etanol se logró mediante calentamiento suave y agitación (hasta aproximadamente 40°C). Después se mezclaron las dos disoluciones. Se usó 1 ml de disolución en etanol para cubrir aproximadamente 10 cm<sup>2</sup> de lámina. Las láminas de esponja-colágeno, humedecidas con la disolución de PEG en etanol después se secaron brevemente en una cámara de vacío. Cuando se había separado el volumen principal de disolvente, las láminas se transfirieron a un liofilizador durante varias horas para eliminar los residuos de disolvente. Las láminas secas se almacenaron a -20°C en atmósfera de argón seco.

Para ensayar la unión a una segunda lámina de colágeno de fibra gruesa, se llevó a cabo un ensayo de rotura por presión. La lámina de ensayo de colágeno se humedeció con tampón PC, pH 9,6 y se aseguró en la celda de la muestra. Se aplicó tampón adicional (de 0,1 a 0,2 ml) a la lámina. Después la lámina de esponja de PEG activo (preparada como antes; 1,2 x 1,2 cm) se puso con la esponja de cara hacia abajo sobre la lámina de colágeno de ensayo (tamaño por defecto: 2 mm). Las dos láminas se mantuvieron manualmente en el sitio durante 2-3 segundos para asegurar un buen contacto y la hidratación de la lámina de PEG activo. Después las dos láminas se dejaron incubar a temperatura ambiente hasta que se aplicó presión de agua desde abajo. Se registró la presión necesaria para la rotura del sellado.

Resultados

La tabla 5 muestra que se pueden lograr resistencias de la unión muy altas a pH 9,6, comparado con las láminas de control con ingredientes no activos. Se observan resistencias de la unión altas incluso en tiempos cortos. La estabilidad a largo plazo de la unión se examinó de forma cualitativa: se sacó un par de láminas unidas del aparato de ensayo de rotura por presión y se pusieron en 100 ml de agua a 33°C. La unión todavía estaba intacta y aparentemente fuerte, incluso 30 horas más tarde.

Tabla 5

Resistencias a la rotura por presión de láminas de PEG activo fijadas junto a láminas de colágeno de fibra gruesa

Material	Tiempo de incubación (min)	Resistencia a la rotura por presión (mm de Hg)
Lámina (control)	0,5	5 (6,66.10 <sup>2</sup> Pa)
Lámina + esponja (control)	0,5	17 (2,27.10 <sup>3</sup> Pa)
PEG activo + lámina + esponja	0,5	360, 391 (4,8.10 <sup>4</sup> Pa, 5,21 10 <sup>4</sup> Pa)
PEG activo + lámina + esponja	1,0	477, 531 (6,36.10 <sup>4</sup> Pa, 7,08.10 <sup>4</sup> Pa)
PEG activo + lámina + esponja	3,0	276, 231 (3,68.10 <sup>4</sup> Pa, 3,08.10 <sup>4</sup> Pa)

La tabla 6 muestra el efecto de reducir el pH del tampón de hidratación. La resistencia de la unión dependía del pH, y se observó una unión mucho más débil a pH 7,5. Sin embargo, las resistencias de la unión a pH menores mejoraba dejando más tiempo (3 a 10 min) para la formación de la unión, que puede ser aceptable para algunas aplicaciones.

El modo de fallo no siempre era evidente. En algunos casos, la lámina de ensayo se desprendió de la pinza de prueba sin dañar la unión. Estos resultados no se describieron. Si la lámina de ensayo permanecía bien sujeta, parecía que el fallo era entre la lámina activa y la lámina de ensayo. En algunos casos, la lámina activa se levantó y salió un chorro de agua del agujero. En otros casos, apareció agua en los márgenes de la celda de ensayo, pero el origen no estaba claro.



Tabla 6

Resistencias a la rotura por presión de láminas de PEG activas fijadas junto a láminas de colágeno de fibra gruesa

Material	pH*	Tiempo de incubación (min)	Resistencia a la rotura por presión (mm de Hg)
PEG activo + lámina + esponja	8,9	0,5	121 (1,61.10 <sup>4</sup> Pa)
	8,9	1,0	191 (2,55.10 <sup>4</sup> Pa)
	8,9	1,0	191 (2,55.10 <sup>4</sup> Pa)
	8,9	3,0	298 (3,97.10 <sup>4</sup> Pa)
	7,5	1,0	2 (2,67.10 <sup>2</sup> Pa)
	7,5	3,0	50 (6,66.10 <sup>3</sup> Pa)
	7,5	10,0	279 (3,72.10 <sup>4</sup> Pa)

\*El tampón de pH 8,9 era fosfato sódico 300 mM; el tampón de pH 7,5 era fosfato sódico 300 mM

### Ejemplo 5

#### 5 Estudios adicionales sobre las láminas adhesivas que contiene PEG activo:

##### Resumen

Se prepararon láminas adhesivas a partir de COH102/COH206, colágeno Zyderm, y colágeno Kensey-Nash (Semed F). Dichas láminas mostraron buenas resistencias a la rotura por presión cuando se unieron a láminas de colágeno de fibra gruesa.

10 Se desarrolló un ensayo de fallo de la unión por cizalladura. En este ensayo, la resistencia de la unión de láminas adhesivas de PEG activo era comparable al cianoacrilato (SUPERGLUE). Este experimento describe la preparación de láminas adhesivas de materiales biocompatibles, que incluyen colágeno Kensey-Nash de calidad implantable. También se describen en la presente memoria resultados comparativos de diferentes formulaciones en un ensayo de fallo por cizalladura.

#### 15 Materiales y métodos:

Se prepararon láminas activas a partir de láminas de colágeno de fibra gruesa, colágeno reconstituido y COH102 y COH206, como se describe en el ejemplo 4.

20 Las láminas activas de colágeno de Kensey-Nash se prepararon como sigue: se añadió colágeno (4 g) a 200 ml de agua desionizada ajustada a pH 2 con HCl. Se mantuvo la agitación con un impulsor suspendido durante 6 días. Las fibras se hincharon y dispersaron, creando una masa casi coherente. La suspensión se vertió en bandejas para pesar de poliestireno cuadradas de 9 cm de diámetro (aproximadamente 15 ml por bandeja para cubrir el fondo). La suspensión vertida se dejó en un incubador de 33 a 37°C para secar. Se formaron láminas sobre la superficie de las bandejas para pesar. En algunos casos dichas láminas se revistieron con colágeno Zyderm (suspensión en agua 20 mg/ml), se congelaron y liofilizaron. Dichas láminas secas, revestidas con una capa fina de tipo esponja de colágeno Zyderm después se activaron con una disolución en etanol de COH102 y COH206 (cada componente en una concentración de 10% en p/v). Estas se denominaron "láminas de KN ácidas". Un procedimiento alternativo usaba láminas Semed F (secadas a partir de una suspensión ácida), revestidas una vez con láminas de colágeno Zyderm, e incubadas durante 3 h en agua ajustada a pH 9-10. Se añadió hidróxido sódico adicional según fuera necesario para mantener la disolución más las láminas a pH 9-10. Las láminas se recuperaron de la disolución y se secaron durante la noche a 37°C. Después las láminas se volvieron a revestir con colágeno Zyderm 12 mg/ml, se congelaron, liofilizaron, y finalmente se impregnaron con PEG activo en etanol para dar las muestras activas secas, denominadas "láminas de KN básicas".

35 Se desarrolló un ensayo de fallo por cizalladura para las láminas activas usando los dispositivos representados en la figura 6. Se cortaron láminas de colágeno de fibra gruesa activadas con PEG o como se prepararon normalmente para el ensayo de rotura por presión, en tamaños de 1 x 3 cm (denominados "tiras"). Se fijaron sobre un extremo lengüetas de plástico o cinta adhesiva, cubriendo un área de 1 cm<sup>2</sup> de la tira. Las lengüetas de plástico se fijaron a la tira de cuero triturado con pegamento de cianoacrilato. Se perforó un agujero de aproximadamente 2 mm de diámetro en la lengüeta de plástico o en la cinta. Se pusieron sobre un área de 1 cm<sup>2</sup> de una lámina de colágeno, 300 µl de tampón PC, pH 9,6. Después se puso una lámina de PEG activo/colágeno sobre la tira de cuero triturado humedecida con tampón y se mantuvo con una presión ligera durante 30 s. De esta forma la superficie unida era 1 cm<sup>2</sup>. Después se pusieron ganchos a través de los agujeros en el extremo de cada tira, y las tiras unidas se suspendieron de un soporte adecuado. En el gancho inferior se añadieron arandelas metálicas (peso medio por arandela 1,63 g) para aumentar de forma creciente la fuerza de cizalladura en la superficie unida. Se registró el peso necesario para separar la superficie unida. Se estudiaron las variaciones en la naturaleza de las superficies unidas y las formulaciones de unión, incluyendo el uso de tiras de control que contenían esponja de colágeno en la superficie pero no PEG activo, y también la unión de tiras de cuero triturado con cianoacrilato.

Un conjunto de muestras implicaba la unión de una tira de cuero triturado no tratada a una tira de colágeno revestida

de esponja de colágeno (que no contiene PEG activo). Otro conjunto de muestras se llevó a cabo con las mismas parejas de tiras, pero esta vez se añadió una mezcla de COH102/COH206 a las tiras fijadas y se dejó gelificar. La mezcla de gelificación era la siguiente:

10 mg de COH102 más 40 µl de tampón de fosfato 0,5 mM pH 6,0

5 10 mg de COH206 más 40 µl de tampón de fosfato 300 mM pH 8,9

Dicha mezcla gelifica en aproximadamente 15 s, lo cual deja un tiempo amplio para añadir la mezcla de gel a una tira, presionar la segunda tira en la parte superior, y esperar 30 s para que se produzca la gelificación.

10 Para la unión de tiras con cianoacrilato, la tira de ensayo primero se humedeció con tampón PC (200 µl para un área de 1 cm<sup>2</sup>). Después se presionó una segunda tira revestida con cianoacrilato sobre la parte superior de la primera. Como con las láminas de PEG activo, solo se usó una presión moderada para mantener la fijación durante el tiempo de unión de 30 s.

Resultados:

15 Las láminas de KN ácidas y láminas de KN básicas se sometieron al ensayo de rotura por presión; se pusieron piezas de 1 cm<sup>2</sup> sobre la lámina de ensayo de cuero triturado ya humedecida con tampón PC. Las láminas de KN ácidas presentaban resistencias a la rotura por presión muy bajas (2 y 4 mm de Hg) (2,67.10<sup>2</sup> y 6,66.10<sup>2</sup> Pa). Las láminas de KN básicas dieron valores similares a los resultados previos con láminas de colágeno revestidas (324, 286, y 311 mm Hg) (4,32.10<sup>4</sup>, 3,81.10<sup>4</sup> y 4,14.10<sup>4</sup> Pa).

20 El método de fallo por cizalladura se usó para comparar la unión de láminas de colágeno en varias condiciones (Tabla 7). Para las láminas unidas por COH102/COH206, se observaron resistencias de la unión muy pobres. Las láminas de PEG activo presentaban resistencias de la unión similares a las observadas con cianoacrilato.

Tabla 7

Fallo por cizalladura de uniones para diferentes materiales en láminas

Material	Fuerza de rotura de la unión (g)
Lámina + esponja (control)	55,4, 53,8 (0,54 N, 0,53 N)
Lámina + COH102/COH206	14,7, 13,0 (0,14 N, 0,127 N)
Lámina + cianoacrilato	272 (2,67 N)
Lámina + PEG activo	>217, >466* (> 2,13 N, > 4,57 N*)

\*Resistencias de la unión límite no determinadas; en ambos casos la lámina de colágeno se rasgó, o falló la fijación de los ganchos, no la zona unida

Ejemplo 6

25 Métodos para la síntesis de bioadhesivos de alta resistencia

Este ejemplo describe la síntesis de un copolímero de polietilenglicol (PEG) y policaprolactona (PCL) que contiene grupos N-hidroxi-succinimidilo colgantes.

Esquema 1 (Figura 7):

30 Se elige PEG difuncional de peso molecular variable y se acopla a PCL por una polimerización de apertura de anillo controlada para añadir PCL de peso molecular fijo y elegido (Hedrick et al., *Macromolecules* 1998, 31, 8691-8705). Los grupos OH terminales en la PCL se convierten en glutaril-succinimidilo (Abuchowski et al., *Cancer Biochem.* 1984, 7,175-180). Se añade éster etílico de lisina para dar un polímero lineal con segmentos de PEG, PCL y lisina que se repiten. El segmento de lisina tiene un éster carboxílico colgante. El éster se hidroliza para dar un grupo carboxilo libre (Nathan et al. *Macromolecules* 1992, 25, 4476-4484). Después, el grupo carboxilo se convierte en glutaril-succinimidilo (Abuchowski).

Este esquema produjo una cadena lineal con grupos reactivos colgantes (NHS), con enlaces degradables (PCL), con grupos solubles en agua (PEG). La dureza del polímero se puede aumentar añadiendo elementos de PCL largos frente a elementos de PEG cortos; sin embargo, el PEG debe ser suficientemente largo para asegurar la solubilidad en agua, que se puede determinar empíricamente.

40 Esquema 2 (Figura 8):

Una cadena lineal similar con grupos reactivos colgantes, pero con segmentos de PMMA (poli(metacrilato de metilo)) que se repiten. El PEG difuncional de peso molecular variable pero seleccionado se activa con Br de 2-bromo-2-metilpropionilo y se aumenta hacia afuera un segmento de PMMA controlado en cada extremo. El extremo contiene

un grupo Br que se puede convertir por métodos químicos convencionales en un grupo OH y después derivatizar a glutaril-NHS, hacer reaccionar con éster etílico de lisina como en el esquema 1, y finalmente el éster etílico del carboxilo colgante se hidroliza en un carboxilato libre y se derivatiza a glutaril-NHS, otra vez para dar un copolímero análogo con diferentes propiedades físicas (p. ej., se sabe que el PMMA tienen alta resistencia a la tracción). Se puede proporcionar suficiente funcionalidad PEG para la solubilidad en agua. Puede ser necesario construir unidades de PEG-PCL-PMMA-Lys que se repiten, de modo que la PCL proporcione los enlaces biodegradables necesarios. La construcción de dichos segmentos ha sido descrita por Hedrick.

Otro procedimiento para reforzar polímeros lo describen Liu, et al., *Macromolecules*, 29:5508 (1996). Se puede sintetizar un bloque de PMMA que también contiene monómeros tales como metacrilato de 2-cinamoiletilo (CEM). La siguiente estructura es ilustrativa: Se sintetiza un polimetacrilato de dibloques que contiene un bloque soluble en agua, tal como metacrilato de hidroxietilo (HEMA) más algunos monómeros que contienen amino y carboxilo, tales como metacrilato de aminoetilo (AEM) y succinato de mono-2-(acriloxi)etilo (ARS), más un bloque insoluble en agua, tal como poli-MMA-co-CEM. Cuando este polímero está en agua o un medio polar, el bloque de MMA-CEM evitará el agua y se asociará en dominios separados. Como exponen Lie y col., se puede alterar la relación de bloques solubles en agua e insolubles en agua en el polímero para obtener estructuras de dominios diferentes. Los dominios asociados que evitan el agua pueden adoptar formas micelares (forma esférica), de tipo varilla, o de tipo placa, según se incluyan más y más de los bloques insolubles en agua en la cadena de polímero. Cuando se encuentran las condiciones correctas para generar los bloques de poli-MMA-CEM en forma de varilla, se reticulan estos bloques mediante luz de la longitud de onda e intensidad adecuadas. Entonces las varillas están fijadas, y el bloque de polímero soluble en agua, poli-HEMA-AEM-ARS, en este caso rodea la varilla. Se pueden obtener varillas de escala nanométrica que llevan grupos amino reactivos. Las dimensiones de dichas varillas se espera que sean de 1-30 nm de diámetro y de cientos a miles de nanómetros de longitud. Dichas varillas también deben funcionar para reforzar las redes de gel de polímero, como se cree que el colágeno metilado refuerza la red de PEG descrita en otra parte en esta solicitud.

Hedrick describe cómo hacer segmentos de PEG-PCL-PMMA de tamaño controlado, pero sin grupos reactivos y sin cadenas lineales con múltiples grupos reactivos colgantes. Nathan describe cómo acoplar PEG y lisina para dar un polímero que se repite con cadenas reactivas colgantes (pero no enlaces éster degradables, y sin adición de PCL y PMMA para la resistencia). Abuchowski da un método para hacer glutaril-succinimidil-PEG. El documento WO 99/17417, y las referencias citadas en el mismo, describen polímeros de PEG-polilactida-acrilato para polimerizar por luz y un procedimiento de radicales libres. Estos materiales no describen la adición de PMMA para la resistencia, ni mencionan grupos NHS u otros grupos colgantes para el enlace covalente (no dirigidos por radicales libres).

#### Ejemplo 7

COH102/206/colágeno metilado más cargas fibrosas, lana de vidrio o Vicryl.

#### Materiales:

##### a. Colágeno metilado

Se preparó colágeno metilado por una modificación del procedimiento de Miyata et al., patente de EE.UU. nº 4.164.559. Una dispersión (al 3% p/v) de colágeno bovino reconstituido pepsinado en fosfato sódico 0,02 M, NaCl 0,13 M, pH 7,2 (preparado por el método de McPherson et al., *Collagen Rel. Res.* 5, 119-135, 1985) se extruyó sobre una superficie de vidrio en una capa fina y se secó a temperatura ambiente. Se preparó HCl en metanol añadiendo 104 g de sulfato sódico anhidro y 10,7 ml de HCl conc. a 1300 ml de metanol anhidro y se dejó reposar herméticamente cerrado durante 2 días. El colágeno seco se cortó en tiras de 1 x 5 cm y se añadió al HCl en metanol (200 ml de HCl en metanol: 1 g de colágeno seco) en un recipiente cerrado y se agitó suavemente a 20°C durante 3 días. El HCl en metanol se decantó con cuidado y el colágeno se filtró en un embudo de vidrio sinterizado para separar las trazas de metanol. La eliminación completa del metanol se completó con vacío durante la noche. El colágeno metilado se volvió a solubilizar en agua destilada y el pH se ajustó de 4 a 6. Se calculó que la cantidad de agua alcanzaba una concentración final de proteína de aproximadamente 31 mg/ml. Las muestras de colágeno metilado solubilizado a menores concentraciones de proteína se volvieron a concentrar por liofilización breve para separar el agua. El colágeno metilado solubilizado era un material completamente transparente, que carecía de fibras u opalescencias, que tenía una consistencia de tipo gel viscosa. Las preparaciones que todavía contenían componentes turbios o insolubles (debido a la metilación incompleta del colágeno) producían formulaciones adhesivas pobres, produciendo geles que se hinchaban demasiado y presentaban poca resistencia de la unión.

##### b. Adhesivo sin carga

Para 0,5 ml de adhesivo, se mezclaron 50 mg de COH102 en polvo seco (tetra-glutaril-succinimidil-polietilenglicol de 4 brazos, 10K; Fig. 9a) y 50 mg de COH206 en polvo seco (tetra-tiol-polietilenglicol de 4 brazos, 10K; Fig. 9b) con 400 mg de colágeno metilado 31 mg de proteína/ml, pH 4. Ambos componentes de PEG se disolvieron en la disolución acuosa de colágeno, dando un fluido viscoso, transparente. La disolución se extendió sobre el sitio del tejido con una espátula; fluía muy poco bajo la fuerza de la gravedad. Para curar el adhesivo, se añadieron 20-50 µl de un tampón (fosfato sódico 134 mM, carbonato sódico 166 mM, pH 8,9; o tampón PC, pH 9,6) a la superficie. El

tampón no diluyó el gel, pero lo empapó lentamente. En 3-5 min, la superficie del gel había endurecido notablemente.

Para estudios de resistencia de la unión en condiciones hidratadas, el gel más el sustrato se dejaron curar durante 20 min en el banco de ensayo, y después se sumergieron en fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 130 mM, pH 6,7, a 37°C, durante 2 h o más. El ensayo de la resistencia de la unión se llevó a cabo en un aparato de tracción.

#### c. Adhesivo con carga

El Vicryl es un copolímero de ácido glicólico y ácido láctico (90:10) vendido como una malla implantable por Ethicon Corporation (Polyglactin 910; Sommerville, New Jersey).

Al colágeno metilado se añadieron 19 mg de hilos de Vicryl de 1-2 cm de longitud que se habían desenredado de malla Vicryl implantable. En algunos casos, también se usaron fibras de Vicryl tan cortas como de 0,3 cm. Los hilos y el gel viscoso se mezclaron y después se añadieron los componentes de PEG, como se ha descrito antes. La aplicación al sitio del tejido y el curado eran como antes. Otras cargas y sus respectivas cantidades añadidas a 0,5 ml de adhesivo eran: lana de vidrio, 9 mg; colágeno fibroso (colágeno Semed F, Kensey-Nash Corporation) 8 mg; Dexon S (suturas de poliglicólido-láctida, "4-0"), 10 trozos de 1 cm de longitud; fibras de elastina (ligamento nucal bovino, de 0,25 a 10 mm, Elastin Products Co., Inc, Owensville, MO), 40 mg; fibras de acero inoxidable (Bekaert Fibre Technologies, Marietta, GA), 14-28 mg (las fibras se lavaron con agua o HCl 1 N para separar un recubrimiento de poli(alcohol vinílico); micropartículas de polilactida/glicólido, preparadas a partir de polilactida/glicólido (65:35, peso molecular 40-75.000, Aldrich Chemical Co., micropartículas de diámetro 2 - 4 preparadas por el método de Zheng, J., and Hornsby, P.J., *Biotechnol. Progr.* 15, 763-767 (1999), 25 mg.

#### d. Adhesivo con colágeno metilado sustituido por otro agente

Se ensayaron diferentes moléculas de cadena larga, tales como ácido hialurónico (de cresta de gallo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), quitosano (Sigma), y polilisina (Sigma). Para el ácido hialurónico la fórmula era: COH102, 50 mg, COH206, 50 mg, Vicryl, 14 mg, y 400 µl de ácido hialurónico, al 2% (p/v) en agua, pH ajustado a 4; para el quitosano, la misma fórmula, con 400 µl de quitosano al 1% (p/v) en agua, pH 4-5. Para la polilisina, COH102, 40 mg, COH206, 30 mg, disueltos juntos en 50 µl de agua; hidrobromuro de polilisina, 330K, 40 mg disueltos en 60 µl de agua; las dos disoluciones se mezclaron juntas y se añadieron 7 mg de fibrillas de Vicryl. Además se ensayaron partículas de polilactida/glicólido, preparadas como antes, como una sustitución para el colágeno metilado; se suspendieron 16,5 mg de partículas en 300 µl de agua y se mezclaron con 50 mg de COH102, 50 mg de COH206 y 14 mg de Vicryl. Todos los geles se curaron cubriendo con una capa de tampón de pH 9,6, como se ha descrito antes.

#### e. Adhesivo sin carga y sin colágeno metilado.

Se disolvió COH102 en agua al 20% (p/v); se disolvió COH206 al 20% en tampón de pH 8,9. Las dos disoluciones se mezclaron rápidamente y se extruyeron en el sitio. La gelificación se produjo en 40 s.

#### Ensayos mecánicos:

Se aplicó la resistencia de la unión de las formulaciones adhesivas a tres tipos de tejidos o sustitutos de tejidos representados en la fig. 10. Se lavaron membranas de colágeno (fig. 10a; tripas para embutido; The SausageMaker, Inc., Buffalo, New York) con alcohol isopropílico y agua para separar las impurezas de lípidos y salinas, y se secaron. La unión de las membranas con una superposición de 1-3 mm y 1 cm de ancho se llevó a cabo extendiendo el adhesivo sobre la parte superior de las láminas. Se dejó curar el adhesivo 20 min en el banco de ensayo y después se sumergió durante 30 min a 2 h a 37°C antes de separarlo en un aparato de ensayo Instron modelo 4202 (Canton, Massachusetts), usando una celda de carga de 100 N. También se llevó a cabo la unión de arterias carótidas porcinas (10b, Pelfreeze, Rogers, Arkansas) en una geometría de extremo con extremo. Los segmentos de arteria carótida cortados se empalmaron (4-6 mm de diámetro) y se extendió adhesivo; no se aplicaron suturas de anclaje. La incubación y el ensayo eran los mismos descritos para las membranas de colágeno.

Para la unión de tiras de cuero de vaca (10c), se adquirieron trozos de piel de ternero sin pelo de Spear Products, Inc., Quakertown, Pennsylvania. Los trozos eran casi uniformes en grosor, 2-3 mm. Se cortaron tiras de 0,4 cm de ancho de los trozos de cuero, usando una cuchilla de afeitar de un solo filo. Las tiras cortadas se empalmaron un extremo con otro extremo y se unieron extendiendo 0,25 ml de adhesivo "CT003" o unas gotas de cianoacrilato. La incubación y el ensayo fueron los mismos descritos para las membranas de colágeno. La siguiente tabla 8 muestra que COH102/COH206/colágeno metilado, cuando se cargaba con lana de vidrio (fórmula c), era superior en la resistencia de la unión que las fórmulas a y b sin carga, cuando se ensayaron sobre las membranas de colágeno. De hecho, la resistencia de la unión era comparable a la obtenida con un adhesivo de cianoacrilato comercial (tabla 9). Un cianoacrilato de calidad médica (Dermabond) formó uniones incluso más fuertes con las membranas de colágeno (fuerza de  $5,2 \pm 1,9$  N para 7 determinaciones).

Tabla 8

Rendimiento de la unión con y sin colágeno metilado y una carga fibrosa

Fórmula	Resistencia de la unión (Fuerza N)	n
COH102/COH206	1,6 ± 1,1	3
COH102/COH206/colágeno metilado	1,7 ± 1,0	4
COH102/COH206/colágeno metilado/lana de vidrio	>2,8 ± 0,6*	6

\*La membrana de colágeno se rasgó, pero la unión sellante estaba todavía intacta

Tabla 9

5 Resistencia de la unión del cianoacrilato (Krazy Glue, Elmer's Products) en tres sustratos de tejido diferentes

Sustrato	Resistencia de la unión (Fuerza N)
Tiras de cuero de vaca	10,9, 16,2
Arteria carótida porcina	2,0, 3,8
Membrana de colágeno	3,0 ± 1,0 (n=5)

10 La tabla 10 a continuación presenta datos de la adición de una carga diferente, hilos de Vicryl, al COH102/COH206/colágeno metilado. Con sustratos tales como el cuero de vaca o la arteria carótida, el sustrato no se rasgó, y los valores de la resistencia de la unión eran representativos de la resistencia de la propia unión adhesiva. Típicamente estas uniones fallaban desde el punto de vista adhesivo, es decir, la resistencia a la tracción del propio gel adhesivo permanecía intacta y no era el factor limitante. Las resistencias de la unión observadas en disolución salina a 37°C, otra vez eran comparables con las vistas con cianoacrilato para unir el mismo conjunto de sustratos de tejidos (tabla 9).

Tabla 10

15 Resistencia de la unión de COH102/COH206/colágeno metilado con hilos de Vicryl como carga en tres sustratos de tejido diferentes

Tiempos de incubación (h)	Resistencia de la unión (Fuerza N)	Sustrato*
2	6,6, 5,6	Cuero de vaca
17	6,3, 5,5	Cuero de vaca
2	4,3, 2,2, 2,8, 5,1	Arteria carótida porcina
2	>5,9, 3,9	Membrana de colágeno

\*Tiras de cuero de vaca, 0,5 cm de ancho, arteria carótida porcina, 0,3-0,5 cm de diámetro, membrana de colágeno: tripa para embutido, 0,2 mm de grosor, 1 cm de ancho

Efecto de las diferentes cargas

20 La tabla 11 presenta los resultados de diferentes materiales de carga. El ensayo se llevó a cabo en tiras de cuero de vaca, sumergidas durante 2 h en disolución salina a 37°C. Parecía que los materiales filamentosos eran más eficaces que las partículas esféricas. La unión de la carga al gel es muy importante para mejorar la resistencia. Los filamentos de colágeno-polietilenglicol eran cerosos y no se adherían al gel; por lo tanto, a pesar de sus relaciones de dimensiones altas, no eran cargas eficaces.

Tabla 11

Efecto de diferentes cargas en la resistencia de la unión de COH102/COH206/colágeno metilado

Material	Resistencia de la unión (Fuerza N)
Vicryl	4,7, 7,4
Vicryl, lavado con etanol	7,2, 7,8
Vicryl, tratado con etanol, después lavado con peróxido de hidrógeno al 30%	8,3, 9,1
Suturas de seda quirúrgicas de 1-2 cm de largo, 30-50 µm de diámetro	2,5, 3,8
Suturas de seda quirúrgicas, desenredadas en hilos más finos, lavadas con cloroformo	5,0, 6,5
Colágeno fibroso (Semed F, Kensy-Nash) ajustado a pH 4; de 0,5 a 1 mm de longitud, - 50 µm de diámetro	1,3, 2,8
Partículas de gelatina, reticuladas con calor, ~100 µm de diámetro, poligonales	0,6, 0,8
Partículas de hidroxiapatito, de 0,5 a 1 mm de diámetro, poligonales	0,7
Filamento de conjugado colágeno-polietilenglicol ~50 µm de diámetro, 1 cm de longitud	0,8, 1,7
Fibras de acero inoxidable de 8 µm de diámetro, 4 mm de longitud	4,8, 6,9
Fibras de elastina de 0,25 a 10 mm de longitud	3,9, 4,0
Partículas de polilactida/glicólido de 2-4 µm de diámetro	1,1, 1,1

Efecto de la sustitución del colágeno metilado por otras moléculas poliméricas

- 5 La tabla 12 muestra que ninguno de los materiales ensayados daba resistencias de la unión comparables a la fórmula que contiene el colágeno metilado

Tabla 12

Sustitución del colágeno metilado por otras moléculas

Material	Resistencia de la unión (Fuerza N)
Ácido hialurónico	12, 1,3
Quitosano	2,1, 1,7
Pollisina	2,0
Partículas de polilactida/glicólido, 2-4 µm	0,6, 1,1

10 Efecto de la unión por reticulación

- La tabla 13 muestra que cuando el gel se formaba a partir de otros tipos de reacciones de reticulación, se afectaba a la adhesión y la resistencia de la unión, cuando se ensayaban en cuero de vaca después de incubación a 37°C. El material 1 se formó a partir de COH206 y peróxido de hidrógeno, que oxida grupos sulfhidrilo adyacentes en un enlace disulfuro. Se forma un gel rápidamente y el gel se puede complementar con colágeno metilado y Vicryl; sin embargo, después de varias horas en disolución salina, el gel se vuelve muy débil; las fibras de Vicryl se separan fácilmente. El material 2 usaba la reacción de los grupos sulfhidrilo de COH206 con el doble enlace de un derivado de vinilsulfona de PEG de 4 brazos (10K, Shearwater Polymers; Fig. 11). La presunta reacción, una adición de tipo Michael, formaba un enlace tioéter. Dichos geles tienen resistencia a la tracción adecuada pero adhesión pobre al cuero de vaca después de incubación en disolución salina. Los materiales 3 y 4 contenían COH204 (amino-PEG tetrafuncional, de 4 brazos, 10K, Shearwater Polymers); el grupo funcional amino supuestamente reaccionaba con el éster de succinimidilo del COH102 para formar un enlace amida (Fig. 12). Estos geles eran comparables en rendimiento a los formados a partir de COH102 y COH206. (Para la reacción adecuada en presencia de colágeno metilado, el COH204 debe valorarse a pH 2-4 durante la mezcla de los reactivos; al añadir el tampón de curado, su pH aumentaba, permitiendo la reacción del grupo amino). Parecía que la presencia del éster de succinimidilo era importante para lograr la mayor adhesión al sustrato tisular y para la buena resistencia a la tracción del gel. Se prevé que otros grupos que reaccionan con aminas, tales como aldehídos (aldehídos conjugados con PEG de múltiples brazos) también sean reactivos de formación de adhesivos eficaces.

Tabla 13

Resistencias de la unión de diferentes PEG funcionalizados cargados con hilos de Vicryl

Material	Tiempo de incubación (h)	Resistencia de la unión (Fuerza N)
COH206/colágeno metilado/Vicryl/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17	0,32, 0,20
COH206/vinil-2-sulfona-PEG de brazos/colágeno metilado/hilos de Vicryl	4	2,2, 1,5
COH102/206/204/colágeno metilado/hilos de Vicryl	2	6,4
COH102/204/colágeno metilado/hilos de Vicryl	4	3,6, 6,4
COH102/206/colágeno metilado/hilos de Vicryl	2	6,6, 5,6

Persistencia de la unión en condiciones hidratadas

- 5 La tabla 14 muestra que los adhesivos formados a partir de COH102, COH206 y también COH204 forman uniones usando cuero de vaca que persisten durante tiempos largos sumergidas en tampón salino a 37°C. Estas condiciones de hidratación rigurosas simulan el entorno in vivo. Se observó el debilitamiento de la unión después de más de 100 h de hidratación. Se creyó que el debilitamiento de la resistencia de la unión se debía a la hidrólisis de los enlaces éster carboxílico y tioéster de la red (Fig. 13). El COH102 es un éster de glutaril-succinimidilo; incluso después de
- 10 reacción con el carboxilo terminal del éster de succinimidilo, queda un enlace éster carboxílico del resto glutarilo a la cadena principal del PEG; este enlace, así como el enlace tioéster, podían hidrolizarse.

Tabla 14

Rendimiento de la unión con tiempos largos de hidratación

Material	Tiempo de incubación (h)	Resistencia de la unión (Fuerza N)
COH102/206/204/colágeno metilado/hilos de Vicryl	2	6,4
	66	2,6, 4,1
	70	3,0
	137	0,70, 2,6
	140	1,1, 0,4
COH102/204/colágeno metilado/hilos de Vicryl	4	3,6, 6,4
	64	7,0, 5,1
	136	3,8, 2,7
	234	2,7, 1,7
COH102/206/colágeno metilado/hilos de Vicryl	2	6,6, 5,6
	17	6,3, 5,5
	69	0,63, 0,90, 3,4, 5,4
	93	2,4, 5,4
	140	3,2, 2,9
	235	>2,4, 3,7

- 15 Fórmulas relacionadas con compuestos de peso molecular menor que llevan grupos éster de succinimidilo y amino o reactivos con tiol

La tabla 15 presenta las resistencias de la unión en tiras de cuero de vaca de derivados de PEG de peso molecular inferior como adhesivos, otra vez complementados con colágeno metilado y vicryl. GLYC-20HS es un succinimidil-succinato de un PEG de 3 brazos trifuncional construido a partir de un núcleo de glicerol, peso molecular 2600, NOF Corporation, Japan. COH201 es un PEG tetra-amino, de 4 brazos, peso molecular 2000, Shearwater Polymers. Los polímeros con carga de Vicryl parecían tener un efecto pequeño en la resistencia de la unión. Se usaron las siguientes proporciones: colágeno metilado, 500 µl (22 mg/ml en agua 2707-30B); GLYC-20HS, 48 mg; COH201, 60 µl de disolución al 60% en agua, valorado a pH 1-2 con HCl 6 M; hilos de Vicryl, 26 mg.

Tabla 15

- 25 Análogos de COH102 y COH206 de bajo peso molecular

Material	Tiempo de incubación (h)	Resistencia de la unión (Fuerza N)
GLYC-20HS/COH201/colágeno metilado	2	2,3, 0,64
GLYC-20HS/COH201//colágeno metilado/hilos de Vicryl	5	2,3, 3,3

Ensayos de rotura por presión de discos de colágeno y en defectos de aberturas en arterias carótidas

El rendimiento de los adhesivos destinados a usar en aplicaciones quirúrgicas con frecuencia se mide por su capacidad para sellar fugas de fluidos. Se usaron dos tipos de ensayos de fugas o presión de fluido:

a. Ensayo de rotura por presión en un disco de colágeno

5 Usando el dispositivo representado en la figura 15, se montó una manta de colágeno sobre una plataforma de latón y se fijó con una segunda arandela de latón enroscada a la primera. La plataforma de latón inferior se perforó y se conectó a una tubería llena de agua. El agua se dirigió mediante una bomba de jeringa a 5 ml/min. Una tubería colectora conducía a un manómetro. La manta de colágeno de ensayo también se perforó (agujero de 2 mm de diámetro). Se aplicó la preparación adhesiva (aproximadamente 0,5 ml) a la manta, cubriendo la perforación. El adhesivo se dejó curar 3 min (o más, si era necesario para realizar la cura hasta un caucho firme), después se aplicó presión de agua. Se registró la presión necesaria hasta la rotura del sellado. Para el cianoacrilato, se pegó un trozo pequeño (4 x 4 mm) de manta de colágeno a la manta perforada inferior.

b. Defecto de abertura en la arteria carótida

15 El modelo de arteria carótida presurizada se ilustra en la figura 16. Se conectó una arteria porcina (Pel Freeze Biologicals, Rogers, Arkansas) a una tubería de agua. El agua se dirigió mediante una bomba peristáltica. Al final de la tubería había un limitador de flujo puesto en la misma de modo que se podían forzar presiones de hasta 0,7 kg/cm<sup>2</sup> y más en la tubería aumentando la velocidad de la bomba. Primero se puso la arteria intacta en el sistema y se sometió a presión de agua, para asegurar que aguantaría las presiones deseadas sin fugas. Se preferían secciones de arteria que carecían de ramificaciones laterales; las ramificaciones con fugas a veces se sujetaban para parar las fugas. Se cortaron aberturas de aproximadamente 2 mm de largo transversalmente en la arteria en 4 sitios en una circunferencia (Fig. 16). La arteria cortada simulaba entonces una anastomosis a la que se habían aplicado suturas de anclaje. Después, los sitios cortados se pegaron todo alrededor en un intento de sellarlos. Se aplicó tampón (fosfato sódico 134 mM y carbonato sódico 166 mM, pH 8,9) al tejido de la arteria justo antes de aplicar el pegamento. La masa de pegamento se irrigó además con unas gotas de este tampón para curar el gel. Después de 8 min de tiempo de curado, el empalme pegado se sometió a presión de agua. La presión se aumentó en incrementos de 6,89.10<sup>3</sup> Pa, y se mantuvo en cada presión durante 1 min antes de aumentar a la siguiente. Una fuga se puntuó como positiva si goteaba más rápido que 1 gota cada 10 segundos.

25 La tabla 16 muestra las resistencias a la rotura por presión de COH102/206/colágeno metilado/Vicryl en agujeros de diferentes diámetros (en membranas de colágeno con 8 min de tiempo de curado; curado con tampón a pH 8,9; 0,5 ml de muestra extendidos sobre el agujero con espátula). Un agujero con un diámetro de 5 mm es el defecto mayor que se puede contemplar en una aplicación quirúrgica, puesto que se usarían suturas de anclaje para cerrar los defectos mayores, y el intervalo mayor entre estas suturas se calcula que es 5 mm. Incluso con dichos agujeros grandes, el adhesivo podía mantener las presiones cercanas o por encima de la máxima esperada en pacientes hipertensos, es decir 2,76.10<sup>4</sup> Pa. La tercera entrada de datos destaca la necesidad de tener un buen gel que cure en la interfase del gel y el disco de colágeno. La adición de tampón de curado a esta superficie antes de la aplicación mejora la unión a corto plazo.

Tabla 10

Resistencia de rotura por presión de COH102/206/colágeno metilado/Vicryl

Diámetro del orificio (mm)	Presión de rotura (Pa)*
2	> 2,07.10 <sup>4</sup> Pa, 5,1.10 <sup>4</sup> Pa, 3,17.10 <sup>4</sup> Pa
5	2,11.10 <sup>4</sup> Pa, 3,79.10 <sup>4</sup> Pa, 3,65.10 <sup>4</sup> Pa
5	6,89.10 <sup>3</sup> Pa <sup>†</sup>

\*0,68 N/cm<sup>2</sup> = 51 mm de Hg; 2,7 N/cm<sup>2</sup> = 204 mm de Hg  
<sup>†</sup>Membrana no tratada previamente con una gota de tampón a pH 8,9

40 La tabla 17 presenta los datos del cierre de los defectos de aberturas grandes en arterias carótidas (aberturas de 4 x 2 mm cortadas en la arteria de 4-6 mm de diámetro). La fórmula de COH102/206/colágeno metilado/Vicryl era comparable al cianoacrilato en el rendimiento. Debe indicarse que se observan peores resultados en arterias más finas que se estiran más con la presión.

Tabla 17

Ensayo de resistencia a la rotura por presión en la arteria carótida porcina

Material	Presión de rotura (Pa)	Tiempo de curado (min)
COH102/206/colágeno metilado/Vicryl	2,96.10 <sup>4</sup> ± 1,38.10 <sup>4</sup> Pa (n = 5)	8
	5,51.10 <sup>4</sup> ± 2,75.10 <sup>4</sup> Pa (n = 3)	30
Cianoacrilato (Elmer's Products)	1,86.10 <sup>4</sup> ± 2,48.10 <sup>4</sup> Pa (n = 6)	8
Cianoacrilato (Dermabond)	3,78.10 <sup>4</sup> ± 3,58.10 <sup>4</sup> Pa (n = 4)	8

45



## Ejemplo 8

Derivados de pentaeritrol y trimetilol-propano funcionalizados con tiol y acrilato, más cargas como Vicryl

Esta clase de adhesivos se preparó a partir de reactivos líquidos solos (no se añadió tampón acuoso). La reacción de acoplamiento implicada en la adición de grupos tiol al doble enlace de acrilato activado se muestra en la figura 17. La tabla 19 a continuación presenta los datos de la resistencia de la unión en la pareja reactiva de TPETA (tri-acrilato de tri-metilolpropano etoxilado, peso molecular 912, Aldrich Chemical Co.; Fig. 18) y TMPE-SH (tri-metilolpropano-tri-tiol etoxilado, peso molecular 1140 (Fig. 19), sintetizado a partir de trimetilol-propano etoxilado, peso molecular 1100, Aldrich Chemical Co.). Para llevar a cabo la reacción, era necesaria una base para convertir el tiol en un anión tiolato. Se usó T403, un tri-amino-(óxido de propileno) de 3 brazos, peso molecular 970 (Texaco Chemical Co., Fig. 2c.). El gel formado era suficientemente fuerte y solo se había añadido Vicryl como carga. No se añadió colágeno metilado. (No era probable que el colágeno metilado, disuelto en agua, hubiera permanecido en disolución con el TPETA y TMPE líquidos solos). La formulación era la siguiente:

Tabla 18  
TPETA/TMPE-SH/T403/Vicryl

Cantidades	mmoles de grupos reactivos
TPETA 160 mg	0,53
TMPE-SH 200 mg	0,53
T-403 10 µl	0,03
Hilos de Vicryl, 1-2 cm de longitud, 15 mg	

Se mezclaron entre sí el TMPE-SH y T403, seguido de la adición de hilos de vicryl, y finalmente se añadió el TPETA y se mezcló con los otros componentes. La mezcla se extendió sobre los sustratos de ensayo húmedos con una espátula, como se ha descrito antes. La mezcla se volvió pegajosa en aproximadamente 3 min, y era un gel firme en 5 min. Después, la mezcla de ensayo se sumergió en disolución salina como se ha descrito antes, después de 20 min. El tiempo de gel se podía controlar totalmente con la cantidad de T403 añadida.

La tabla 19 muestra que se logró la unión a los tres sustratos de tejidos, pero la resistencia de la unión era menor que para las formulaciones de COH102/206. El fallo de la unión era siempre adhesivo, estos geles presentaban una resistencia a la tracción alta pero no se adherían bien al tejido. Sin embargo, en algunas aplicaciones clínicas, no es necesaria una adherencia fuerte a los tejidos. Esta característica era particularmente evidente en la membrana de colágeno. La reacción de acoplamiento química aparentemente no proporciona un mecanismo adecuado para la unión covalente al tejido, como es el caso con COH102, en el que el éster de succinimidilo en principio puede reaccionar con grupos amino en el tejido. Los grupos sulfhidrilo libres en las proteínas del tejido podrían reaccionar con el grupo acrilato del TPETA, pero dichos grupos son relativamente raros en las proteínas.

Tabla 19

Resistencia de la unión de TPETA/TMPE-SH/Vicryl/T403 en tres sustratos de tejidos.

Tiempos de incubación (h)	Resistencia de la unión (Fuerza N)	Sustrato*
2	3,3, 6,0	Cuero de vaca*
18	3,7, 2,9	Cuero de vaca
2	1,7, 2,0	Arteria carótida porcina
2	0,7, 0,5	Membrana de colágeno

\*Tiras de cuero de vaca, 0,5 cm de ancho, arteria carótida porcina, 0,3-0,5 cm de diámetro, membrana de colágeno: tripa para embutido, 0,2 mm de grosor, 1 cm de ancho

La tabla 20 muestra las formulaciones de TPETA/TMPESH, aunque presentan una unión solo modesta a las tiras de cuero de vaca durante la inmersión prolongada en disolución salina fisiológica a 37°C, no obstante presentan uniones persistentes después de inmersión en disolución salina. Se cree que esto se debe a la estabilidad relativa del enlace tioéter, con respecto a los enlaces presentes en los geles de COH102/206. Las relaciones molares usadas de los materiales eran 0,59:0,52:0,031, 15 mg para TPETA:TMPE-SH:T403:Vicryl, mg/0,39 ml.

Tabla 20

Rendimiento de TPETA/TMPE-SH/T403/Vicryl como un adhesivo

Tiempo de incubación (h)	Resistencia de la unión (fuerza N)
2	3,3, 6,0
18	3,7, 2,9
66	2,8, 3,3
260	2,5, 3,1

Ejemplo 95 Resistencia a la tracción de materiales adhesivos hidratados

Las formulaciones adhesivas descritas aquí normalmente fallan desde el punto de vista adhesivo, su resistencia cohesiva parece que no es el factor limitante. Los siguientes datos comparan las resistencias a la tracción del propio adhesivo con otros adhesivos e hidrogeles.

Medición de las resistencias a la tracción después de 2 h de inmersión en disolución salina a 37°C

- 10 Se formó el adhesivo en una forma aproximadamente cilíndrica y se dejó curar en una bandeja para pesar de poliestireno durante aproximadamente 20 min a temperatura ambiente. Después la muestra se sumergió en agua durante 2-2 ½ h a 37°C. Se sacó la muestra del agua, se secó con papel secante, y se fijó una cinta en cada uno de los extremos con pegamento de cianoacrilato. Después la muestra se montó en un dispositivo de ensayo de tracción Instron, agarrada por los dos extremos por la cinta, y se alargó hasta fallar. Se anotó la resistencia a la tracción
- 15 límite en N/cm<sup>2</sup>, respecto a la sección transversal de la muestra en el punto de rotura. En algunos casos se calculó la curva de tensión-deformación, usando  $\Delta L/L_0$  como la deformación, en la que  $\Delta L = L - L_0$ , L es la longitud de la muestra en el tiempo t y L<sub>0</sub> es la longitud original de la muestra. Para preparar una muestra de control que consistiera solo en cianoacrilato, se aplicó cianoacrilato a rayas sobre hígado de vaca. Después de aproximadamente 20 min, el cianoacrilato había curado en una tira. Se separó del hígado (que es un tejido extremadamente frágil), y se
- 20 eliminaron las partículas de hígado residuales. Así se obtuvo una tira de polímero de cianoacrilato curado de forma relativamente uniforme.

- Los datos mostrados en la tabla 21 muestran que los adhesivos que contenían un potenciador de la resistencia a la tracción presentaban mayor resistencia a la tracción que los hidrogeles sin dicho potenciador. La clase de adhesivos de acrilato-tiol (tales como TPT-SH: tris(3-mercaptopropionato) de trimetilol-propano, Fig. 20) que contenían Vicryl
- 25 tenían resistencias a la tracción mayores que el cianoacrilato solo. Las formulaciones sin un potenciador de la resistencia a la tracción tenían resistencias a la tracción de aproximadamente 8 a 20 N/cm<sup>2</sup>. COH102/206 (20%) es un hidrogel sencillo, tiene una resistencia a la tracción mucho menor que la correspondiente formulación que contiene colágeno metilado y Vicryl. Las mediciones se tomaron después de 2 h de inmersión en disolución salina a 37°C.

30

Tabla 21

Resistencia a la tracción de adhesivos seleccionados

Material	Resistencia a la tracción (N/cm <sup>2</sup> )
COH102/206/colágeno metilado/Vicryl	84 ± 21 (n = 5)
TPETA/TPT-SH/GdMA/T403/Vicryl <sup>1</sup>	310 ± 160 (n = 2)
Cianoacrilato (pegamento Krazy, Elmer's Products)	200 ± 7 (n = 2)
COH102/206 (20%)	7 ± 5 (n = 3)
Gelatin-PEG-di-acrilato <sup>2</sup>	5 - 16
pHEMA <sup>3</sup>	3

<sup>1</sup>TPT-SH: tris(3-mercaptopropionato) de trimetilol-propano (Fig. 20), peso molecular 400: Aldrich; GdMA: dimetacrilato de glicerol, Aldrich (Fig. 21)

<sup>2</sup>Nakayama, Y., and Matsuda, T., "Photocurable surgical tissue adhesive glues composed of photoreactive gelatin and poly(ethylene glycol) diacrylate", *J. Biomed. Biomat. Res. (Appl. Biomater.)* 48, 511-521 (1999).

<sup>3</sup>pHEMA: poli(hidroximetacrilato); Santin, M., Huang, S.J., Iannace, S., Ambrosio, L., Nicolais, L., and Peluso, G., "Synthesis and characterization of a new interpenetrated poly (2-hydroxy ethylmethacrylate)-gelatin composite polymer", *Biomaterials* 17, 1459-1467.

Ejemplo 10Copolímeros lineales con grupos reactivos colgantes

- 35 El objetivo de este experimento era encontrar un medio para sintetizar polímeros de cadena lineal con grupos

reactivos colgantes como se muestra en la figura 1. Otro objetivo era poder insertar en la cadena de polímero lineal no solo grupos reactivos colgantes, si no también subunidades monómeras o bloques de polímeros que podrían impartir dureza a los geles formados a partir de los polímeros. Como tal, este experimento es una extensión del ejemplo 6 anterior.

5 Todos los polímeros preparados eran de la familia de poli-acrilato/metacrilato. Siguiendo un procedimiento resumido en Sun, Y-M, et al., "Composite poly(2-hydroxyethyl methacrilato) membranes as rate-controlling barriers for transdermal applications", *Biomaterials* 18, 527-533,1997, se prepararon los polímeros lineales. Los monómeros incluidos en la polimerización eran HEMA (metacrilato de hidroxietilo), MMA (metacrilato de metilo), ARS (succinato de mono-2-(acriloxi)etilo), y AEM (metacrilato de 2-amino-etilo) (Figura 14).

10 La polimerización para formar Poli-HEMA con cadenas laterales de carboxilo y amino se llevó a cabo durante 4 h a 75°C con los siguientes ingredientes: HEMA, 1260 µl; ARS, 240 µl; AEM, 348 mg; azobis-isobutironitrilo, 54 mg; y etanol seco, 34 ml. La precipitación se llevó a cabo con éter de petróleo seco.

15 La polimerización se inició con el azobis-isobutironitrilo en etanol seco, con agitación enérgica. Se disolvió primero AEM, que es poco soluble en etanol (50% en p/v), la disolución se ajustó a pH 2-4 con HCl, y se añadió a la disolución de los otros constituyentes en etanol. Se hizo un barrido con nitrógeno en la reacción entera y se llevó a una botella con tapón de rosca en un baño de agua. Se separaron los inhibidores de radicales libres de HEMA y MMA pasando estos reactivos a través de una columna de óxido de aluminio 90 (Activa neutra, actividad 1, nº de malla 70-230, EM Science, Gibbstown, New Jersey) justo antes de la adición a la mezcla de reacción. Después de 4 h a 70-80°C, la disolución se enfrió, se filtró para separar el AEM insoluble y otras partículas, y el polímero se precipitó por adición de 10 ml de éter de petróleo. El polímero coaguló en la superficie del vaso de precipitados, y se decantó la disolución de etanol gastada. El polímero se secó a vacío durante varios días.

20 La tabla 22 muestra que aparentemente se obtuvieron los polímeros, y para las dos primeras muestras en la tabla, se formaron rápidamente geles con COH102, sugiriendo la presencia de restos de AEM en la cadena de polímero. En el caso de preparaciones de polímeros anteriores, la cantidad relativa de grupos funcionales amino y carboxilo en el polímero se calculó a partir de la curva de valoración. Estaban presentes aproximadamente 1 subunidad de AEM y 2 subunidades de ARS por cada 20 unidades de HEMA a lo largo de la cadena. Véase la figura 23.

25 Ninguno de los geles de polímeros que se formaron era más duro que los hidrogeles formados de COH102 y COH206 solo. Los copolímeros con alto contenido en MMA eran de tipo yeso y se desmoronaban fácilmente. El MMA se eligió originalmente porque el propio pMMA es un polímero duro insoluble en agua. Por consiguiente, estas clases de cadenas de polímeros con grupos reactivos colgantes aparentemente no son adecuadas para usar en la presente invención. La modificación adicional de la relación de estos monómeros de acrilato/metacrilato, o la introducción de otros monómeros de la familia del acrilato, puede producir un polímero con las propiedades deseadas, y dichos estudios de optimización se pueden llevar a cabo fácilmente usando las enseñanzas de la presente memoria.

35 Tabla 22

Propiedades de polímeros de poli-acrilato/metacrilato sintetizados

Relación HEMA:MMA	Gelificación (+ o -) <sup>1</sup>	Soluble (S o N)	Peso molecular (Daltons) <sup>2</sup>
100:0	+	S	880
80:20	+	N	1300
50:50	-	N	4500

1. Se mezclaron disoluciones o dispersiones aproximadamente al 50% (p/v) del polímero en tampón a pH 9,6 (descrito antes) con una disolución al 50% (p/v) de COH102 en agua. La formación de un gel en segundos a horas se puntuó como "+".

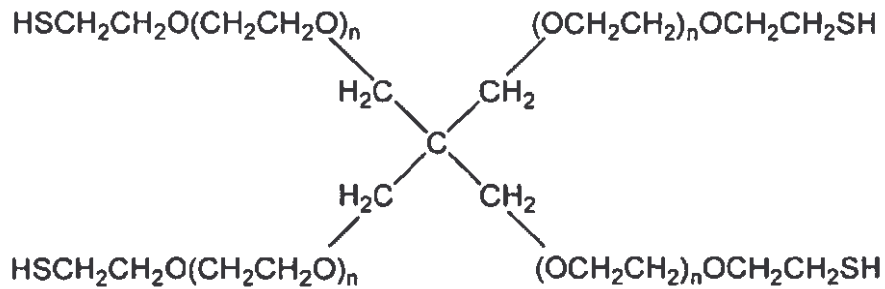
2. Peso molecular relativo a los patrones de pMMA, HPLC en gel de PL en tándem, columnas de tamices moleculares, en disolvente dimetilformamida con caudal 1,0 ml/min.

REIVINDICACIONES

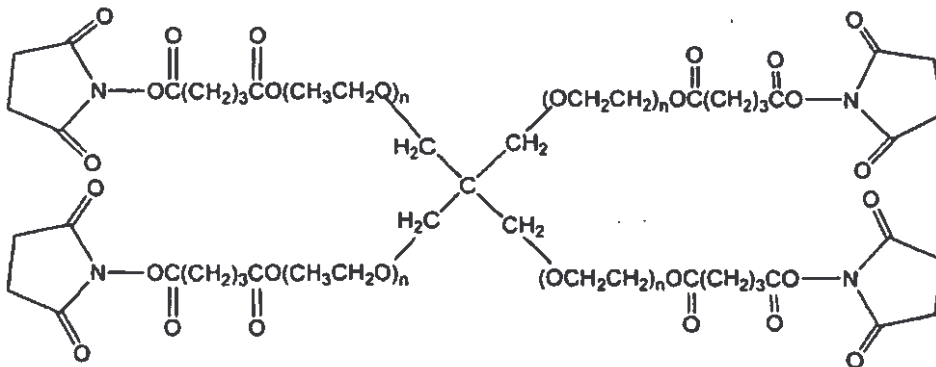
1.- Un dispositivo de polímero biocompatible para usar en el tratamiento de tejidos, que comprende una esponja o lámina de colágeno impregnada con un polvo de polietilenglicol reactivo de dos partes, en el que dicho polvo reactivo además comprende un primer polietilenglicol que tiene múltiples grupos nucleófilos y un segundo polietilenglicol que tiene múltiples grupos electrófilos, en el que el polvo de polietilenglicol permanece sin reaccionar hasta que se pone en contacto con un tampón de pH alto.

2.- Un dispositivo de polímero biocompatible de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer polietilenglicol tiene 4 o más grupos nucleófilos y el segundo polietilenglicol tiene 4 o más grupos electrófilos.

3.- Un dispositivo de polímero biocompatible de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho primer polietilenglicol es un tiol-polietilenglicol tetrafuncional (PM 10.000) de la siguiente fórmula



y dicho segundo polietilenglicol es un glutaril-succinimidil-polietilenglicol tetrafuncional (PM 10.000) de la siguiente fórmula



4.- Un dispositivo de polímero biocompatible de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un potenciador de la resistencia a la tracción de un material seleccionado del grupo que consiste en fibras de poliglicólido, fibras de polilactida, lana de vidrio, plásticos.

5.- Un dispositivo de polímero biocompatible de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en glicosaminoglicanos y proteínas.

6.- Un dispositivo de polímero biocompatible de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el compuesto adicional es una proteína seleccionada del grupo que consiste en colágeno, fibronectina, gelatina, albúmina, o fragmentos peptídicos de los mismos.

7.- Un dispositivo de polímero biocompatible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como un sellante de tejidos en el aumento de tejidos, en la reparación de tejidos, como un agente hemostático para usar para prevenir las adherencias de tejidos o para el suministro de fármacos, células o genes.

FIG. 1

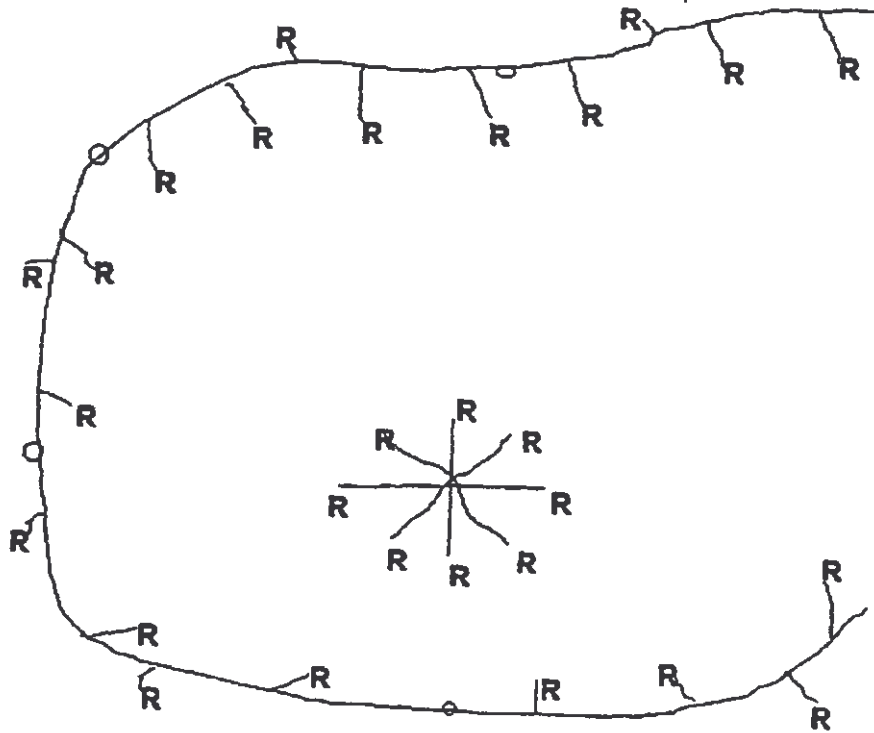


FIG. 2

Fig. 2a: PESH-P  
Tetrakis(Tri-mercaptopropionato) de pentaeritritol

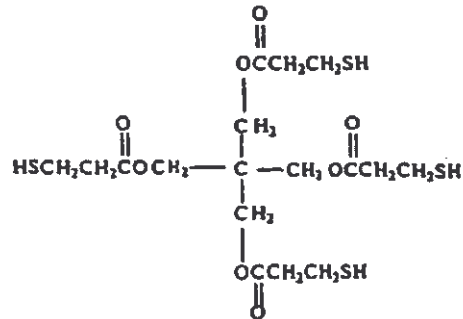


Fig. 2b: PETA  
Tetraacrilato de pentaeritritol

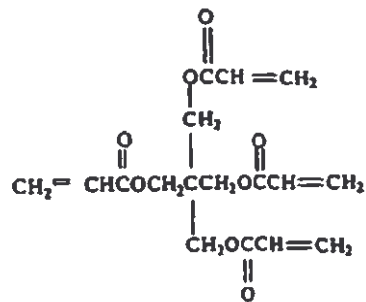


Fig. 2c  
Polioxiopropilen-triamina

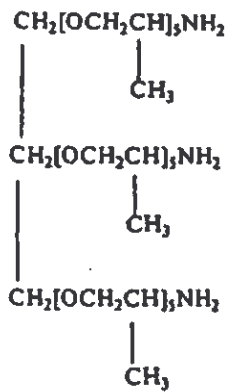


FIG. 3  
Estructura del enlace formado entre PESH-P y PETA

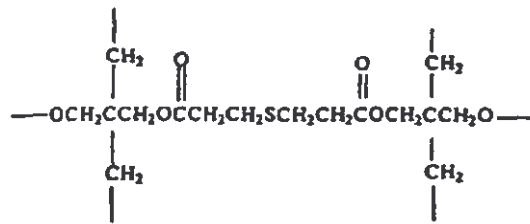


FIG. 4

Fig. 4a

Poli(óxido de tetrametilen)-diamina

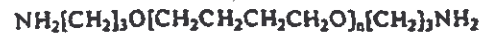


Fig. 4b

Diacrilato de poli(óxido de propileno)

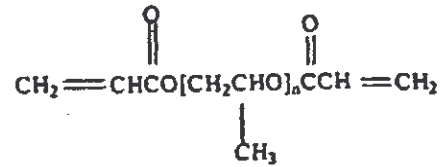


Fig. 4c

Poli(óxido de propilen)-diamina

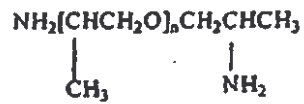




FIG. 5

COH102/COH206 (60%)  
+Colágeno  
+Dexon S

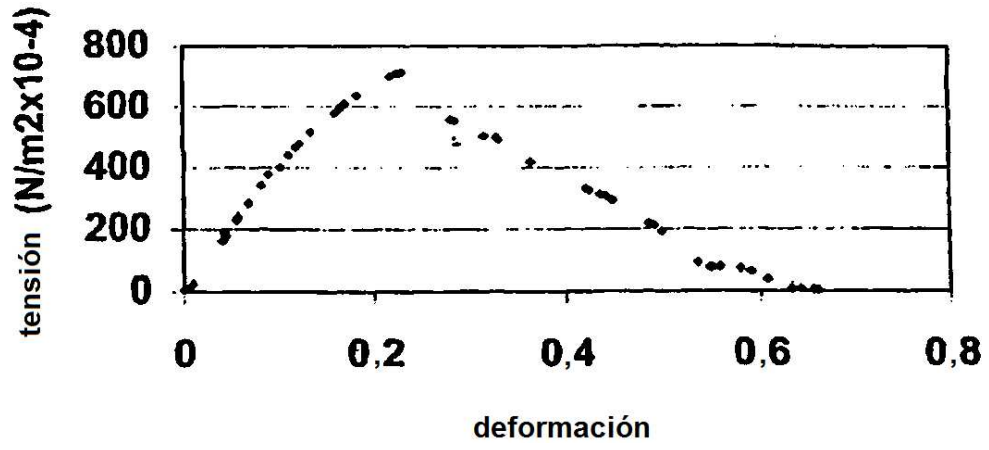


FIG. 6

Dibujo esquemático de la configuración de la tira para los ensayos de fallo por cizalladura

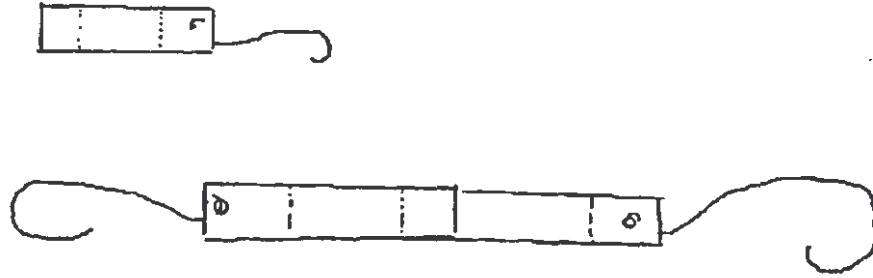


FIG. 7  
Esquema 1

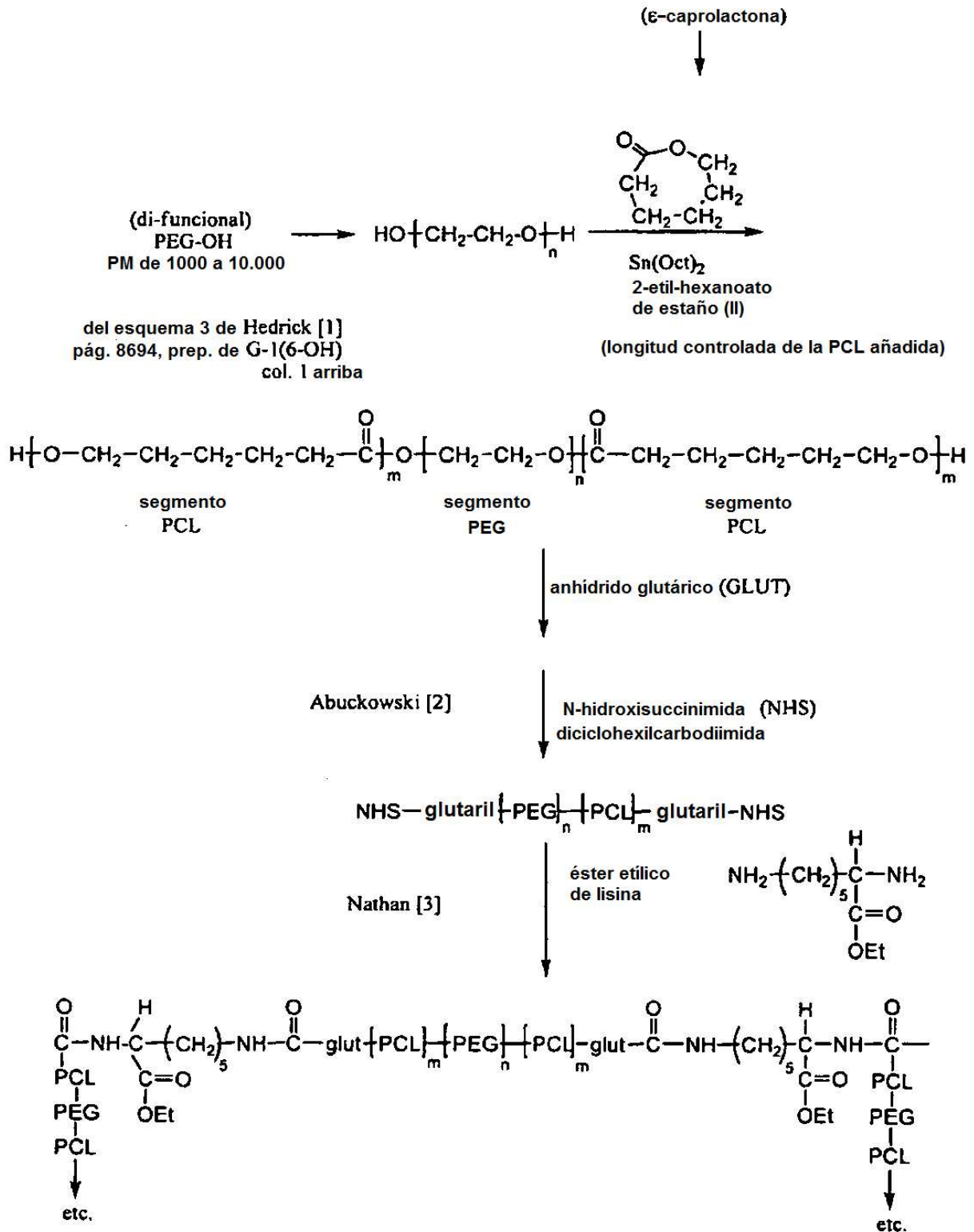
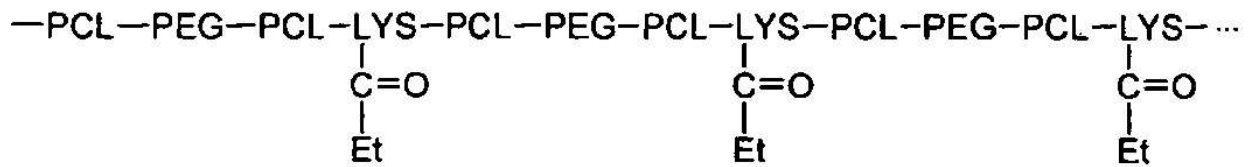


FIG. 7  
Esquema 1, continuación

cadena de polímero que se repite



[3]

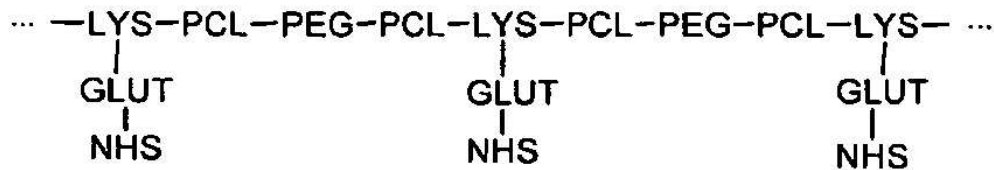


hidrólisis

[2]



derivatización de nuevo  
con anhídrido glutárico  
y NHS



cadena que se repite con elementos degradables (PCL)  
con grupos colgantes reactivos (NHS), con  
segmentos solubles en agua (PEG)

FIG. 8  
Esquema 2

PEG-OH difuncional

[1]  
pág. 8698  
col. 2  
líneas 16-27  
también  
pág. 8694  
col. 1, abajo

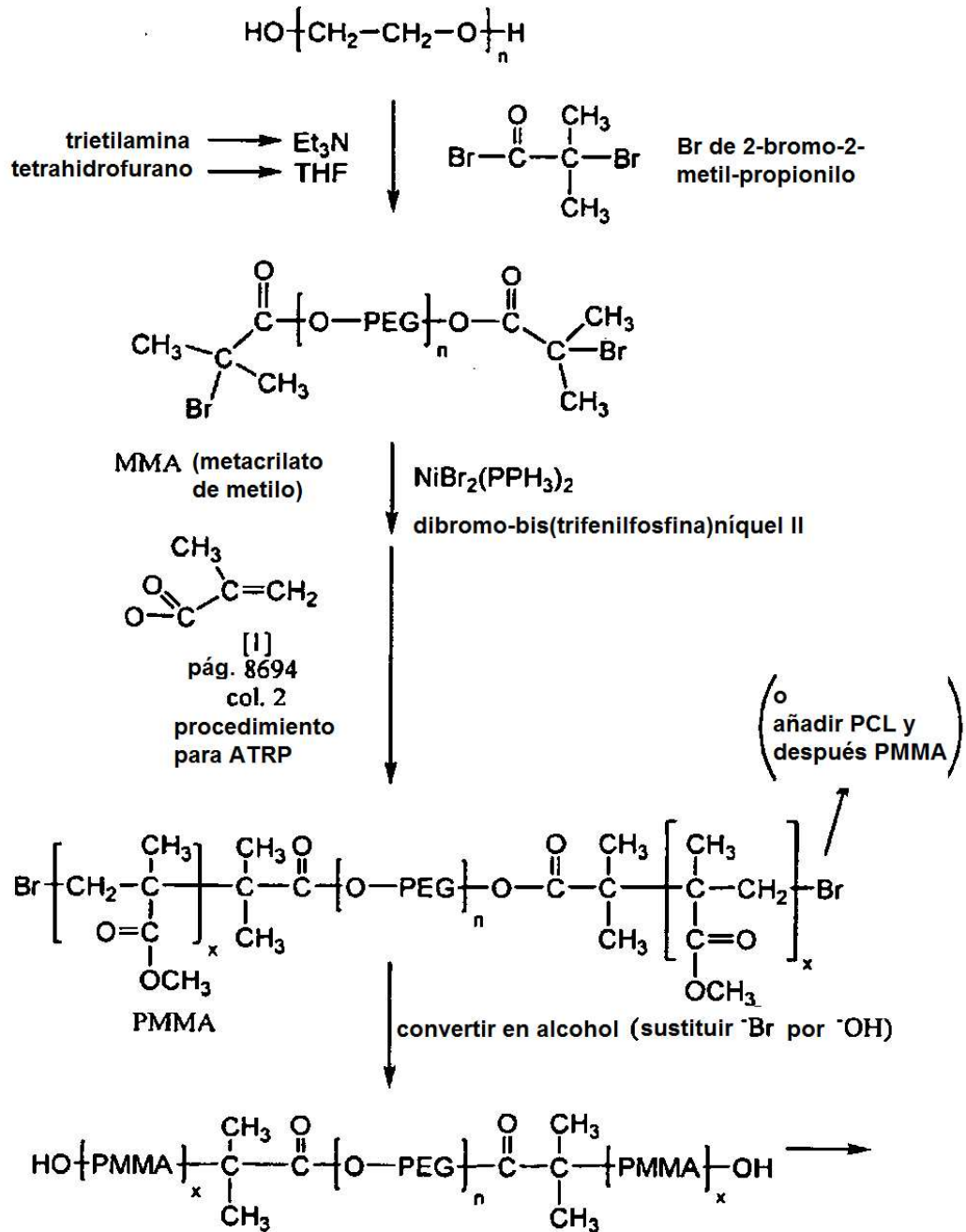


FIG. 8  
Esquema 2, continuación

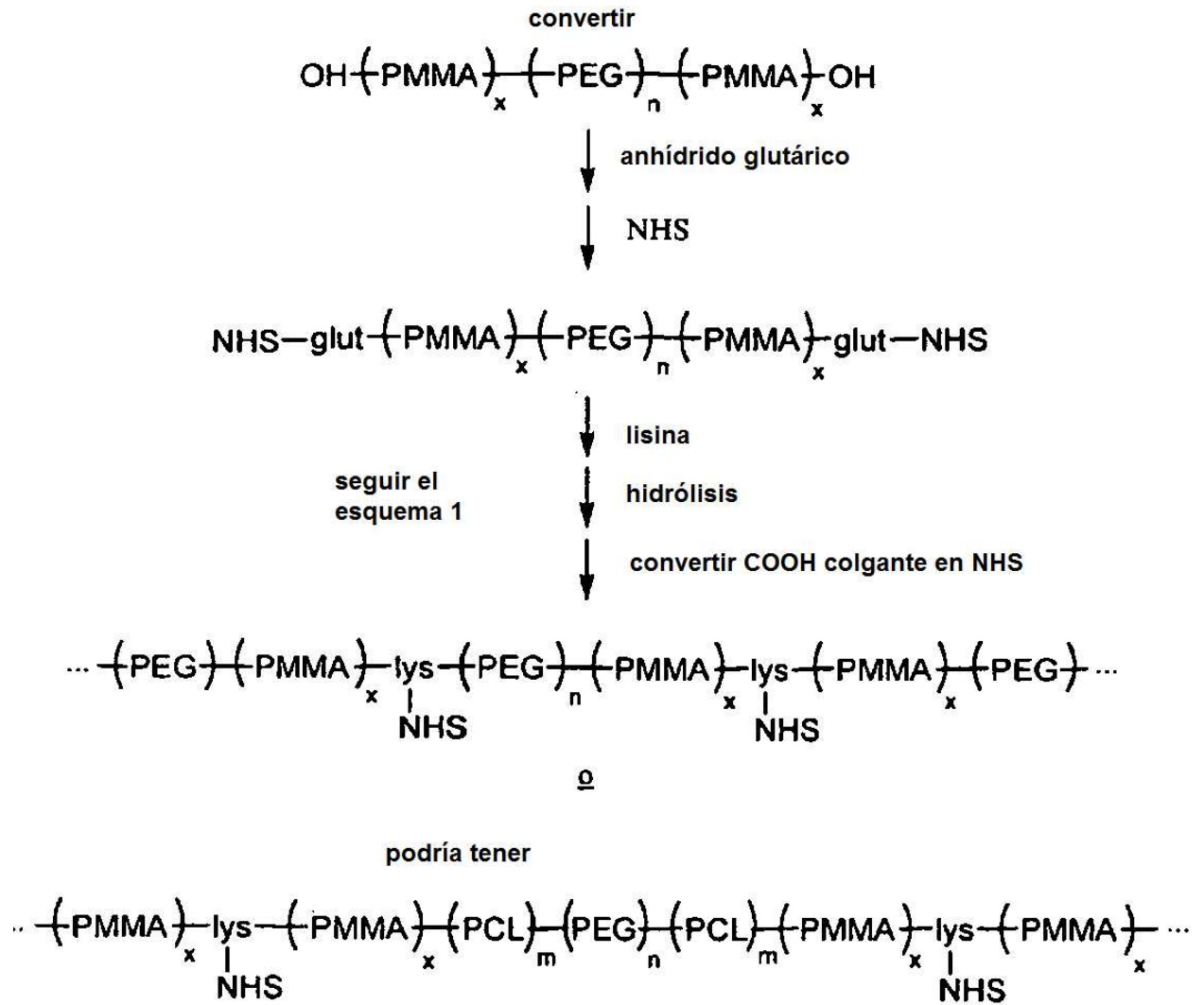
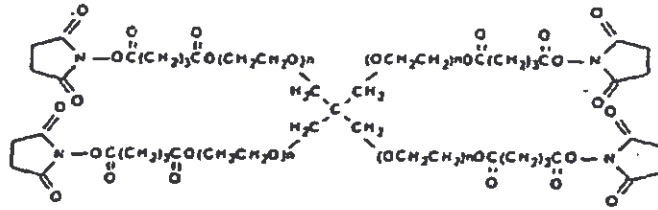


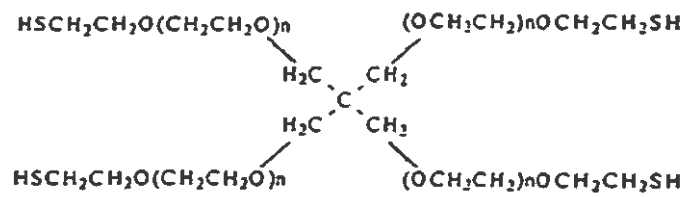
FIG. 9

Fig. 9a



COH102: GLUTARIL-SUCCINIMIDIL-POLIETILENGLICOL TETRAFUNCIONAL

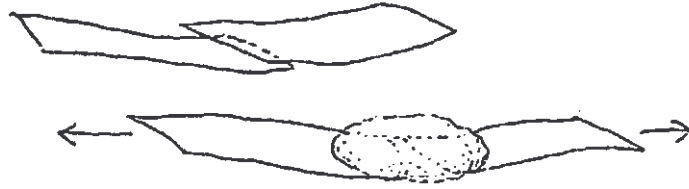
Fig. 9b



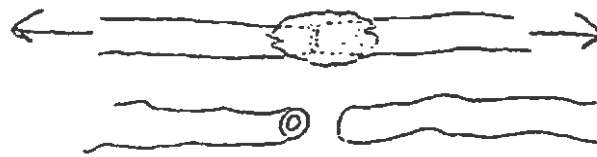
COH206: TIOL-POLIETILENGLICOL TETRAFUNCIONAL

**FIG. 10**

**Fig. 10a**  
MEMBRANAS DE COLÁGENO



**Fig. 10B**  
ARTERIA CARÓTIDA PORCINA



**Fig. 10C**  
TIRA DE CUERO DE VACA





FIG. 11

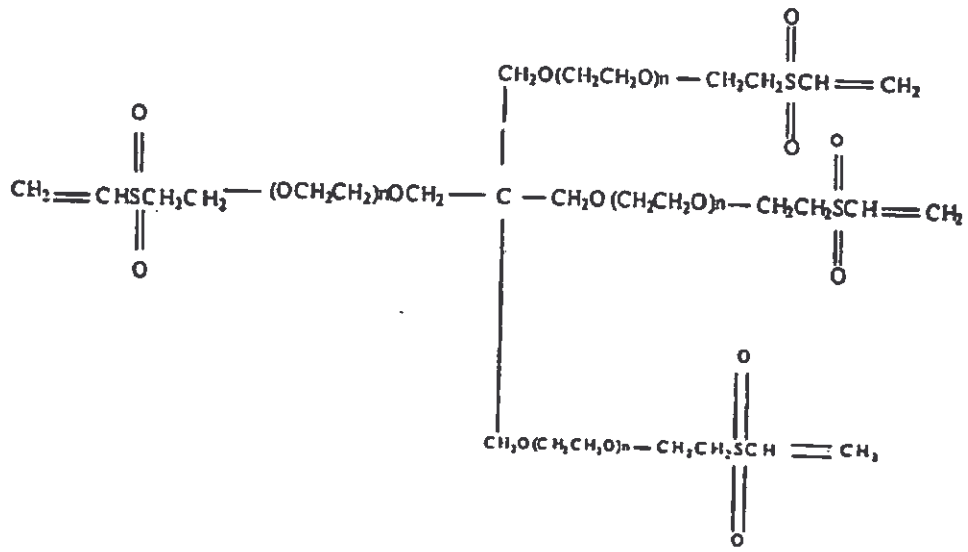


FIG. 12

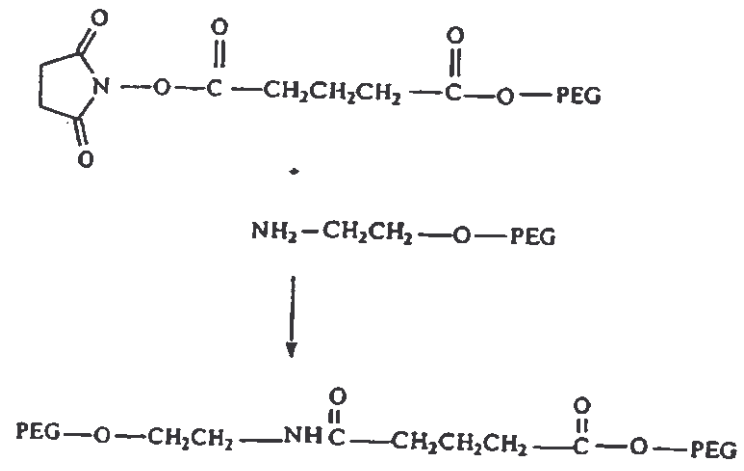


FIG. 13

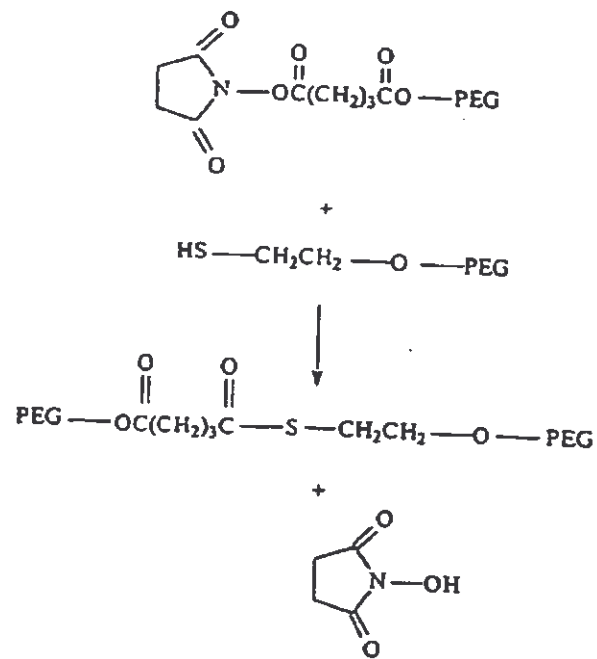
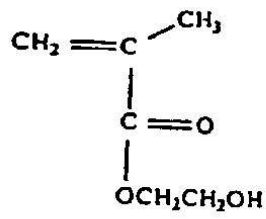
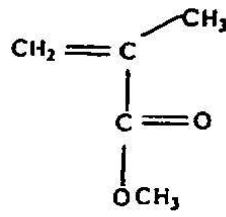


FIG. 14

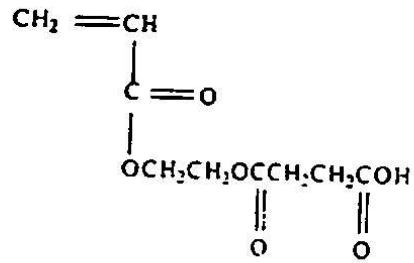


HEMA  
metacrilato de  
hidroxietilo

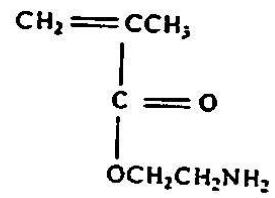
+



MMA  
metacrilato  
de metilo



succinato de mono-2-(acriloxi)etilo



metacrilato de  
2-amino-etilo

FIG. 15

dispositivo de ensayo de rotura por presión

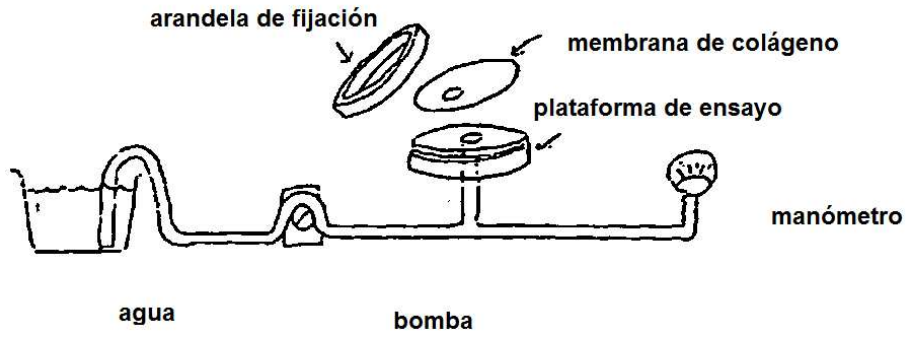


FIG. 16

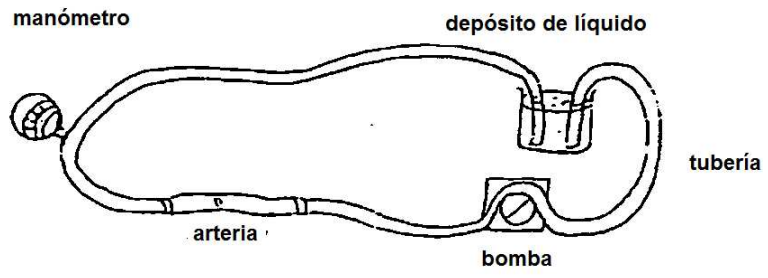


FIG. 17

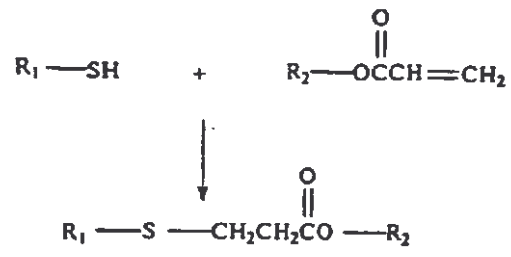


FIG. 18

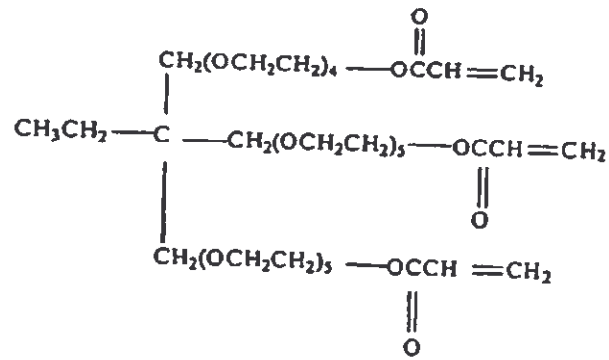




FIG. 19

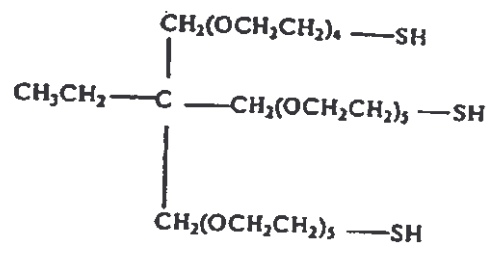


FIG. 20

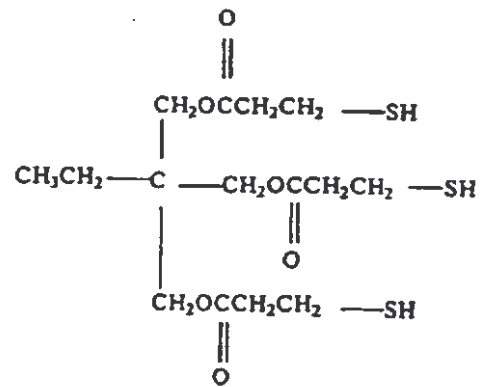


FIG. 21

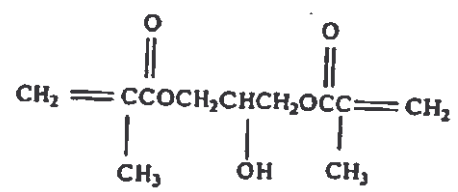


FIG. 22

