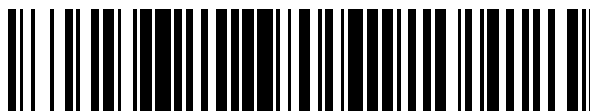


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 258**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01) **C07H 21/04** (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/565 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61K 31/7042 (2006.01)

A61K 31/724 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01941913 .4**

96 Fecha de presentación: **04.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1292709**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54 Título: **Relaciones de adición conjugadas para la entrega controlada de compuestos farmacéuticamente activos**

30 Prioridad:
02.06.2000 US 586937

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.08.2012

73 Titular/es:
**EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZÜRICH
ETH-ZENTRUM HG E 49
8092 ZÜRICH, CH y
UNIVERSITÄT ZÜRICH**

72 Inventor/es:
**HUBBEL, Jeffrey, A.;
ELBERT, Donald y
SCHOENMAKERS, Ronald**

74 Agente/Representante:
Martín Santos, Victoria Sofia

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).

ES 2 386 258 T3

DESCRIPCIÓN

Reacciones de adición conjugadas para la entrega controlada de compuestos farmacéuticamente activos

Antecedentes de la Invención

La presente invención se refiere a la liberación de compuestos farmacéuticamente activos a partir de biomateriales, incluyendo materiales a granel y materiales coloidales. Se usan reacciones de adición nucleófila para la conjugación de los compuestos farmacéuticamente activos a los polímeros para lograr las tasas de liberación preferentes que presentan las composiciones de la invención.

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

El uso de materiales para la liberación de compuestos farmacéuticamente activos ha sido estudiado por diversos grupos. Pitt y Schindler categorizaron los diversos tipos de esquemas de entrega controlada de fármacos (Pitt y colaboradores, Controlled Drug Delivery, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 53-80, 1983). Ellos definieron dos tipos de sistemas en los cuales el fármaco estaba unido covalentemente a un material. Los sistemas en los cuales el fármaco estaba unido de manera colgante al polímero fueron llamados sistemas tipo IV, y los sistemas en los cuales el fármaco estaba incorporado en la columna del polímero fueron llamados sistemas tipo V. Esta definición de polímeros tipo V fue expandida adicionalmente por Baker (Controlled Release of Biologically Active Agents, p. 84-13, John Wiley and Sons, New York, 1987), quienes incluyeron sistemas en los cuales un grupo polimerizable por radicales libres era añadido a un fármaco, con la subsecuente polimerización por radicales libres del fármaco solo o con otros co-monómeros para formar un material (por ejemplo, ver Duncan y colaboradores, Adv. In Polym. Sci. 57:51-101, 1984). Los sistemas tipo Ivb son diferentes de los sistemas tipo V en que se utiliza una molécula enlazada para conectar un fármaco a un grupo activo en un polímero.

WO 00/44808 divulga biomateriales poliméricos formados por reacciones nucleópticas por adición a grupos conjugados insaturados. La divulgación de la WO 00/44808 se discutirá más adelante.

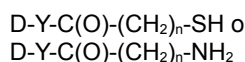
Aunque se ha hecho mucho progreso en el campo de los biomateriales poliméricos, se deben hacer desarrollos adicionales, con el propósito de que esos biomateriales se usen de manera óptima en el cuerpo. Para la liberación de un compuesto terapéutico a partir de un biomaterial durante un marco temporal clínicamente relevante, la vida media de la liberación del compuesto terapéutico del biomaterial debe ser del orden de semanas o meses, mas que del orden de horas o años, como ha sido el caso cuando se colocan los biomateriales bajo condiciones fisiológicas. De hecho, la utilidad clínica de la entrega de compuestos farmacéuticamente activos a partir de biomateriales ha sido limitada debido a la falta de control de la tasa de liberación de compuestos farmacéuticamente activos del biomaterial y la gran dificultad y los bajos rendimientos asociados con la conjugación de estos compuestos al polímero.

Sumario de la Invención

El objeto de la presente invención es un biomaterial tal y como se reivindica en la reivindicación 1, el uso del biomaterial en un método como se reivindica en la reivindicación 23, un compuesto farmacéutico activo como se reivindica en la reivindicación 24, y un componente precursor apropiado para el uso en la formación de un biomaterial como se reivindica en la reivindicación 27. En las reivindicaciones dependientes se reivindican realizaciones de la patente.

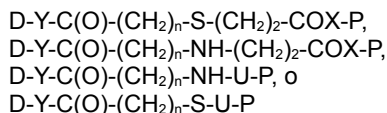
La siguiente invención incluye compuestos que son útiles en el acoplamiento de un compuesto farmacéuticamente activo a un polímero, usando una reacción de adición conjugada. También se describe la polimerización o reticulación de los polímeros para formar un biomaterial, usando en algunas formas de realización reacciones de adición conjugada. Además de lo anterior, la polimerización o reticulación pueden ser logradas mediante otros mecanismos, tales como polimerización de radicales libres. Un polímero acoplado a un compuesto farmacéuticamente activo puede también ser reticulado con otro polímero para formar un copolímero, tal como un biomaterial polimérico lineal, biomaterial coloidal, o un biomaterial en gel. Los compuestos, componentes precursores, y biomateriales de la invención pueden ser usados en el tratamiento o prevención de una enfermedad, un desorden, o una infección.

En un primer aspecto, la invención provee un compuesto que tiene la fórmula:



donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; n es 1, 2 ó 3; Y es O, NH o N.

En un segundo aspecto, se describe un compuesto de la fórmula:



5

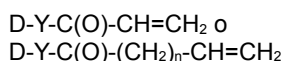
donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; n es 1, 2 ó 3; X es N u O; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo uno o mas grupos insaturados conjugados; Y es O, NH o N; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida con la ramificación farmacéuticamente activa o la

10

ramificación de enlace es de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. De manera deseable, la vida media es de entre un día y nueve meses, con mayor preferencia entre dos días y seis meses, y con la mayor preferencia entre cuatro días y tres semanas.

En un tercer aspecto, se describe un compuesto que tiene la fórmula:

15

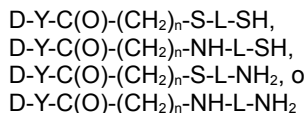


donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace, Y es O, NH o N. También se contempla que el compuesto pueda tener una ramificación hidrocarburo en lugar de uno o mas hidrógenos en el grupo alqueno (-CH=CH₂). En diversas formas de realización, n es 1.

20

En un cuarto aspecto, la invención incluye un compuesto que tiene la fórmula:

25

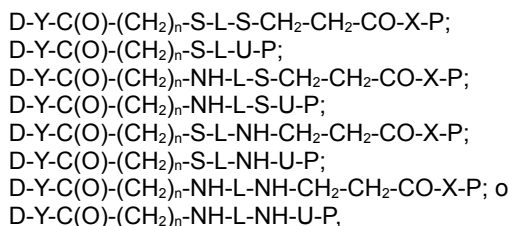


donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; y L es un grupo lineal o ramificado. En la presente invención, n es 1, 2 ó 3.

30

En un quinto aspecto, se describe un compuesto que tiene la fórmula:

35



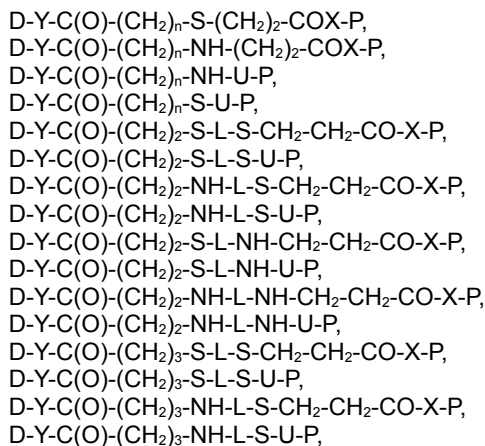
40

donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; L es un grupo (grupo enlazador) lineal o ramificado; X es O o N; Y es O, NH o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua que tiene uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida con la ramificación farmacéuticamente activa o la ramificación de enlace es de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. En la presente invención, n es 1, 2 ó 3.

45

Un sexto aspecto de se describe un biomaterial formado de la reticulación de dos o mas componentes precursores que tienen la fórmula:

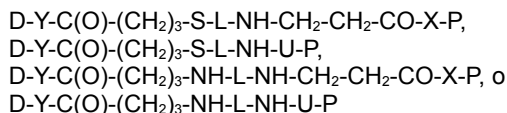
50



55

60

65



5

donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; L es un grupo (grupo enlazador) lineal o ramificado; X es O o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida con la

10

ramificación farmacéuticamente activa o la ramificación de enlace es de entre un día y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. En una forma de realización deseable, la reticulación ocurre mediante polimerización por radicales libres o adición conjugada, posiblemente en presencia de un acelerador. En otra forma de realización deseable, la reticulación forma un material coloidal, micro-esfera o nano-esfera. La reticulación puede también ocurrir en presencia de moléculas biológicas sensibles o en o cerca de un sitio en el

15

cuerpo de un mamífero, tal como un ser humano. De manera deseable, un compuesto farmacéuticamente activo es liberado y entregado al sitio. En la presente invención, n es 1, 2 ó 3.

20

Una forma de realización deseable de los aspectos primero a sexto de la invención, o descritos aquí respectivamente, la ramificación farmacéuticamente activa es derivada de una del grupo que consiste en moléculas orgánicas sintéticas, moléculas orgánicas que ocurren naturalmente, moléculas de ácido nucleico,

25

proteínas o péptidos bio-sintéticos, péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, y péptidos o proteínas que ocurren naturalmente modificados. Las moléculas orgánicas preferentes incluyen paclitaxel, doxorubicina, 5-fluorodesoxiuridina, estradiol, 2-metoxiestradiol, y sus derivados.

30

En formas de realización preferentes de los aspectos segundo, cuarto, quinto y sexto, el polímero soluble en agua o hinchable en agua es seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli (vinílico), alcohol poli(etilen-co-vinílico), ácido poli (acrílico), poli(etilen-co-alcohol vinílico), poli(vinil pirrolidona), poli(hidroxipropil metacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli(dimetil acrilamida), poli(ácido acrílico), poli(etiloxazolina), copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de propileno), o copolímeros solubles en agua o hinchables en agua conteniendo estos polímeros, y sus derivados teniendo grupos insaturados conjugados. Los grupos insaturados pueden ser idénticos o diferentes. En diversas formas de realización, uno o mas de los grupos insaturados pueden no estar acoplados a una ramificación farmacéuticamente activa. De manera deseable, los grupos insaturados no son activados como para sufrir reacciones de sustitución nucleófila. Grupos insaturados preferidos incluyen acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, acrilonitrilos, quinonas, y sus derivados. En otra forma de realización deseable, la hidrólisis del compuesto da como resultado la liberación de un compuesto farmacéuticamente activo que tiene la fórmula D-OH, D-NH₂, o D-NH.

35

En una forma de realización deseable de los aspectos cuarto al sexto, el enlace, i.e. grupo de enlace L, incluye uno o mas aminoácidos. De manera deseable, el enlazador comprende un sitio de adhesión, un sitio de enlace de factor de crecimiento, o sitio de enlace de proteasa. Los enlazadores preferentes también incluyen enlazadores degradables enzimáticamente.

40

Si el enlazador, i.e. grupo de enlace L, de los aspectos cuarto a sexto es hidrófilo, puede incrementar la solubilidad en agua de la ramificación farmacéuticamente activa y/o incrementar la tasa de liberación del compuesto farmacéuticamente activo derivado. Si el enlazador es hidrófobo, puede reducir la solubilidad en agua de la ramificación farmacéuticamente activa y/o reducir la tasa de liberación de un compuesto farmacéuticamente activo derivado de D. En otras formas de realización preferentes, el enlazador incluye un grupo nucleófilo que incrementa la tasa de liberación de un compuesto farmacéuticamente activo teniendo la fórmula D-OH- D-NH₂, o D-NH, mediante reacción con el enlace éster o amida en D. Enlazadores preferentes también incluyen fracciones hidrocarburo que contienen entre uno y cuatro átomos de carbono, inclusive.

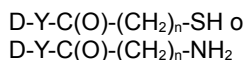
45

Si el enlazador de los aspectos cuarto a sexto es hidrófilo, puede también incrementar la solubilidad en agua de la ramificación de enlace y/o incrementar la tasa de liberación de un compuesto derivado de la ramificación de enlace. Si el enlazador es hidrófobo, puede reducir la solubilidad en agua de la ramificación de enlace y/o reducir la tasa de liberación de un compuesto derivado de la ramificación de enlace. En otras formas de realización preferentes, el enlazador incluye un grupo nucleófilo que incrementa la tasa de liberación de un compuesto que tiene la fórmula D-OH- D-NH₂, o D-NH, mediante reacción con el enlace éster o amida en D. Enlazadores preferentes también incluyen fracciones hidrocarburo que contienen entre uno y cuatro átomos de carbono, inclusive.

55

En un séptimo aspecto, se describe un método para hacer un componente precursor de un biomaterial. El método incluye (a) unir un compuesto farmacéuticamente activo o un compuesto de enlace a una molécula enlazadora para producir un compuesto que tiene la fórmula:

60

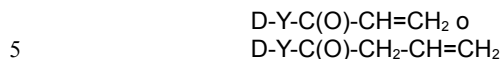


donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; y n es 1, 2 ó 3; y (b) acoplar el producto formado en el paso (a) a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada.

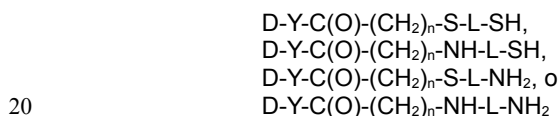
65

Un método para hacer un componente precursor de un biomaterial también se describe en un octavo aspecto.

Este método incluye (a) unir un compuesto farmacéuticamente activo o compuesto de enlace a una molécula enlazadora para producir un compuesto teniendo la fórmula:



donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace, y Y es O, NH o N; y (b) acoplar el producto formado en el paso (a) a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada. De preferencia, el paso (a) es llevado a cabo condensando un ácido acrílico con un alcohol o amina en un compuesto farmacéuticamente activo o en una ramificación de enlace para formar un enlace éster o amida y producir un compuesto farmacéuticamente activo modificado o un compuesto de enlace modificado. El noveno aspecto describe un método para hacer un componente precursor de un biomaterial que incluye (a) unir un compuesto farmacéuticamente activo o un compuesto de enlace a un enlazador para producir un compuesto que tiene la fórmula:



donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; y L es un enlazador lineal o ramificado, y (b) acoplar el producto formado en el paso (a) a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada. De preferencia, el paso (a) es llevado a cabo condensando un ácido acrílico con un alcohol o amina en un compuesto farmacéuticamente activo o en un compuesto de enlace para formar un enlace éster o amida, haciendo reaccionar el producto con un compuesto que tiene una amina o tiol protegidos y una amina o tiol libres, y removiendo el grupo protector tiol o amina. En diversas formas de realización, n es 1, 2 ó 3.

En un décimo aspecto se describe un método para hacer un componente precursor de un biomaterial que incluye (a) condensar un enlazador que consiste en uno de los siguientes: un ácido mercaptopropiónico protegido con tiol, un ácido mercaptoacético protegido con tiol, un ácido aminopropiónico protegido con amina, o una glicina protegida con amina; con un alcohol o amina en un compuesto farmacéuticamente activo o en un compuesto de enlace para formar un enlace éster o amida y producir un compuesto farmacéuticamente activo modificado o un compuesto de enlace modificado; (b) remover el grupo protector tiol o amina; y (c) acoplar el producto formado en el paso (b) a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada.

En un décimo primer aspecto se describe un método para hacer un componente precursor de un biomaterial. Este método incluye (a) condensar un ácido acrílico con un alcohol o amina en un compuesto farmacéuticamente activo o un compuesto de enlace para formar un enlace éster o amida y producir un compuesto farmacéuticamente activo modificado o un compuesto de enlace modificado; (b) hacer reaccionar el compuesto farmacéuticamente activo modificado o el compuesto de enlace modificado con un enlazador que contiene un tiol o una amina libres y un tiol o una amina protegidos mediante adición conjugada; (c) remover el grupo protector tiol o amina; y (d) acoplar el producto formado en el paso (c) a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados por una reacción de adición conjugada.

En un décimo segundo aspecto se describe un método para hacer un componente precursor de un biomaterial. Este método incluye (a) incorporar una amino o un tiol nucleófilos en un compuesto farmacéuticamente activo o un compuesto de enlace y (b) acoplar el producto formado en el paso (a) a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada. De preferencia, el compuesto farmacéuticamente activo es ADN, ARN, un péptido o una proteína. En una forma de realización deseable, el ADN o ARN tiene una base que se modifica para contener un tiol.

En formas de realización preferentes de los aspectos séptimo a décimo segundo, el compuesto farmacéuticamente activo es seleccionado del grupo que consiste en moléculas orgánicas sintetizadas, moléculas orgánicas que ocurren naturalmente, moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos bio-sintéticos, proteínas o péptidos que ocurren naturalmente, y péptidos o proteínas que ocurren naturalmente modificados. Moléculas orgánicas preferentes incluyen paclitaxel, doxorubicina, camptotecina, 5-fluorodesoxiuridina, estradiol, 2-metoxiestradiol, y sus derivados. En una forma de realización deseable, la secuencia de aminoácidos del péptido o proteína bio-sintéticos tiene una cisteína en vez de otro aminoácido encontrado en la ubicación correspondiente en un péptido o proteína que ocurre naturalmente. La unión del compuesto farmacéuticamente activo o la ramificación de enlace a un enlazador o ácido acrílico en el paso (a) puede llevarse a cabo en presencia de un agente de condensación. En otras formas de realización preferentes de estos aspectos, el polímero soluble en agua o hinchable en agua es seleccionado del grupo que consiste en poli(etilén glicol), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(vinil pirrolidona), poli (hidroxipropil metacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli (dimetil acrilamida), poli(ácido acrílico), poli(etiloxazolina), copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de

propileno), o copolímeros solubles en agua o hinchables en agua conteniendo estos polímeros, y sus derivados teniendo grupos insaturados conjugados. En otra forma de realización, los grupos insaturados conjugados son idénticos. Grupos insaturados conjugados preferentes incluyen acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, acrilonitrilos, y quinonas. En formas de realización preferentes de estos aspectos, uno o mas de los grupos insaturados no están acoplados a la ramificación farmacéuticamente activa. En otras formas de realización preferentes de estos aspectos, uno o mas de los grupos insaturados no están acoplados a la ramificación de enlace. En todavía otras formas de realización preferentes de estos aspectos, uno o mas de los grupos insaturados no están acoplados a la ramificación de enlace o a la ramificación farmacéuticamente activa. De manera deseable, los grupos insaturados no son activados de modo de sufrir reacciones de sustitución nucleófila. Los métodos pueden incluir un paso de purificación que es llevado a cabo antes del último paso. De manera deseable, el compuesto farmacéuticamente activo es liberado del componente precursor como el compuesto farmacéuticamente activo no modificado, original. En una forma de realización deseable, el número de grupos insaturados conjugados en el polímero es mayor que el número de grupos amina o tiol en el enlazador.

La molécula enlazadora de los aspectos séptimo a décimo segundo aquí descritos, puede tener las mismas formas de realización listadas para el enlazador de los aspectos cuarto a sexto.

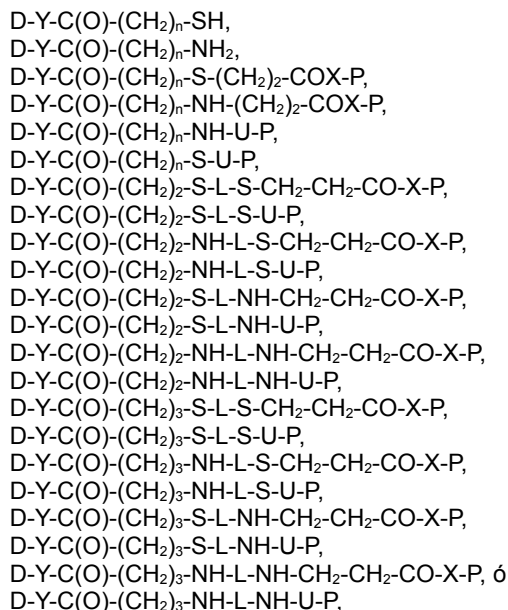
En un décimo tercer aspecto se describe un método de hacer un biomaterial. Este método incluye (a) unir un compuesto farmacéuticamente activo o compuesto de enlace a una molécula enlazadora o incorporar una amina o un tiol nucleófilos en un compuesto farmacéuticamente activo o compuesto de enlace, (b) remover cualesquiera grupos protectores tiol o amina en el enlazador, (c) acoplar un tiol, una amina, o grupo alqueno en el enlazador o incorporado en el compuesto farmacéuticamente activo o compuesto de enlace a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada para formar un componente precursor, y (d) reticular los grupos insaturados conjugados no acoplados en uno o mas de los componentes precursores. En una forma de realización deseable, un polímero que tiene uno o mas grupos insaturados conjugados y que no se acopla a una ramificación farmacéuticamente activa es incorporado en el biomaterial llevando a cabo la reticulación en presencia de este polímero. En otra forma de realización deseable, un polímero que tiene uno o mas grupos insaturados conjugados y que no está acoplado a una ramificación de enlace es incorporado en el biomaterial llevando a cabo la reticulación en presencia de este polímero. En todavía otra forma de realización deseable, un polímero que tiene uno o mas grupos insaturados conjugados y que no está acoplado a ya sea una ramificación de enlace o un compuesto farmacéuticamente activo es incorporado en el biomaterial llevando a cabo la reticulación en presencia de este polímero. En otra forma de realización deseable, la reticulación es llevada a cabo en presencia de un compuesto objetivo teniendo dos o mas grupos nucleófilos, y el compuesto objetivo es con ello incorporado en el biomaterial. Compuestos objetivos preferentes incluyen un péptido con una secuencia de aminoácidos que es 80%, de preferencia 90%, o con mayor preferencia 100% idéntica a la secuencia GCNNRGDNNCG (SEQ ID NO: 73). Otros compuestos objetivo preferentes incluyen aquéllos que tienen una secuencia de aminoácidos o ramificación que provee objetivación a células, tejidos, órganos, sistemas de órganos, o sitios dentro de un mamífero. En una forma de realización deseable, el paso de reticulación y/o la formación de los componentes precursores del biomaterial ocurre dentro del cuerpo de un mamífero, tal como un ser humano. En otra forma de realización deseable, la reticulación ocurre mediante polimerización por radicales libres o reacciones de adición conjugada en o cerca de un sitio dentro del cuerpo de un mamífero. De manera deseable, la reticulación ocurre mediante una reacción auto-selectiva entre un tiol o una amina y un grupo insaturado conjugado. En otra forma de realización deseable, la reticulación forma un hidrogel, un material coloidal, una micro-esfera, o nano-esfera, que puede entregarse a un mamífero, tal como un ser humano. En todavía otra forma de realización deseable, el compuesto farmacéuticamente activo o un derivado del mismo es liberado del biomaterial y entregado a un sitio dentro del cuerpo. De preferencia, la vida media del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa o en la ramificación de enlace es de entre una hora y un año en el sitio dentro del cuerpo. De manera deseable, la vida media es de entre una hora y un año a un pH de 7.4 y 37°C en una solución acuosa. Los grupos insaturados conjugados de este aspecto pueden tener las mismas formas de realización listadas para los grupos insaturados conjugados de cualesquiera de los aspectos previos.

En un décimo cuarto aspecto se describe un biomaterial que tiene una ramificación farmacéuticamente activa. El biomaterial incluye un enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa, y este enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. De manera deseable, la vida media del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa para este biomaterial, el biomaterial del sexto aspecto de la invención, y los biomateriales formados usando los métodos descritos, es de entre un día y nueve meses, con mayor preferencia entre dos días y seis meses, y con la mayor preferencia entre cuatro días y tres semanas. En un aspecto relacionado, se describe un biomaterial que tiene una ramificación de enlace. El biomaterial incluye un enlace éster o amida en la ramificación de enlace, y este enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. De manera deseable, la vida media del enlace éster o amida en la ramificación de enlace para este biomaterial es de entre un día y nueve meses, con mayor preferencia entre dos días y seis meses, y con la mayor preferencia entre cuatro días y tres semanas. En otras formas de realización, la ramificación de enlace es heparina, una ramificación que se liga a heparina, una ramificación de enlace de ión de metal, una ramificación carbohidrato, una ramificación de enlace de carbohidrato, o una ramificación que se liga a grupos hidrófobos. Ejemplos de fracciones de enlace de ión de metal incluyen fracciones de enlace de Cu^{+2} , fracciones

de enlace de Co^{+2} , y fracciones de enlace de Zn^{+2} . Fracciones de enlace de carbohidratos preferentes con ácidos fenilborónicos. En otra forma de realización, el ácido fenilborónico es enlazado al biomaterial mediante una amina secundaria en el anillo de fenilo del ácido fenilborónico. Un ejemplo de una ramificación que se liga a grupos hidrófobos es una ciclodextrina. En formas de realización preferentes, una ramificación o un compuesto farmacéuticamente activo es ligado a la ramificación de enlace en el biomaterial. Ejemplos de fracciones farmacéuticamente activas o compuestos que pueden ser ligados directa o indirectamente a la ramificación de enlace incluyen moléculas orgánicas sintéticas, moléculas orgánicas que ocurren naturalmente, moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos bio-sintéticos, péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, y péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, modificados. Ejemplos de tales moléculas orgánicas incluyen paclitaxel, doxorubicina, camptotecina, 5-fluorodesoxiuridina, estradiol, 2-metoxiestradiol, y sus derivados.

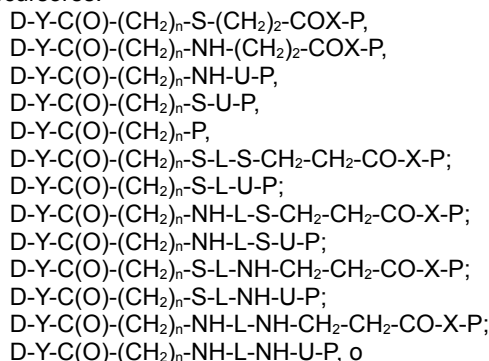
En formas de realización preferentes de los aspectos décimo tercero y décimo cuarto, la ramificación farmacéuticamente activa tiene cualquiera de las formas de realización preferentes de la ramificación farmacéuticamente activa de los aspectos previos.

En un décimo quinto aspecto, la invención se usa junto en un método para tratar o prevenir una enfermedad, un desorden, o una infección, administrando a un mamífero, tal como un ser humano, un compuesto que tiene la fórmula:



donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; L es un enlazador lineal o ramificado; X es O o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa o la ramificación de enlace es de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. En diversas formas de realización, n es 1, 2 ó 3.

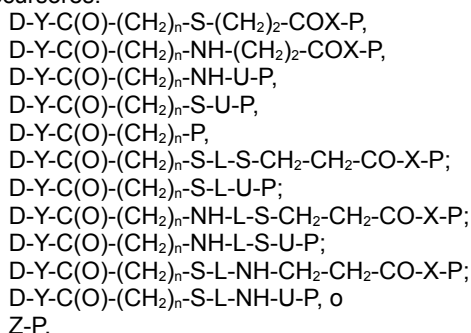
En un décimo sexto aspecto, se describe un método de tratar o prevenir una enfermedad, un desorden, o una infección en un mamífero. Este método incluye administrar al mamífero un biomaterial que tiene una ramificación farmacéuticamente activa. La ramificación farmacéuticamente activa puede estar ligada directamente al biomaterial mediante un enlace amida o éster o ligada indirectamente al material mediante una interacción covalente o no covalente con una ramificación de enlace que está ligada al biomaterial mediante un enlace éster o amida. Este biomaterial es formado a partir de la reticulación de uno o mas de los siguientes componentes precursores:



Z-P,

donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; L es un enlazador lineal o ramificado; X es O o N; Z es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace en la cual se ha incorporado una amina o un tiol nucleófilos; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa o en la ramificación de enlace es de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. En diversas formas de realización, n es 1, 2 ó 3.

En un décimo sexto aspecto, la invención es para uso en un método de tratar o prevenir una enfermedad, un desorden, o una infección en un mamífero. Este método incluye administrar al mamífero un biomaterial que tiene una ramificación farmacéuticamente activa. La ramificación farmacéuticamente activa puede estar ligada directamente al biomaterial mediante un enlace amida o éster o ligada indirectamente al biomaterial mediante una interacción covalente o no covalente con una ramificación de enlace que se liga al biomaterial mediante un enlace amida o éster. Este biomaterial es formado a partir de la reticulación de uno o mas de los siguientes componentes precursores:



donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; L es un enlazador lineal o ramificado; X es O o N; Z es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace en la cual se ha incorporado una amina o un tiol nucleófilos; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa o en la ramificación de enlace es de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. N es 1, 2 ó 3.

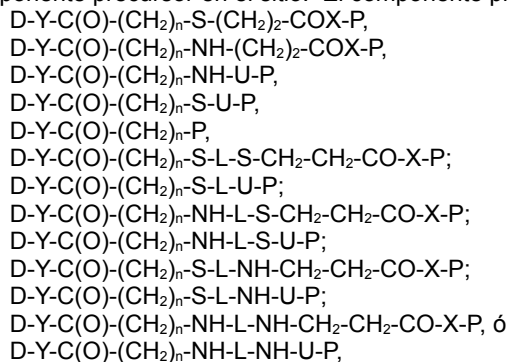
En un décimo séptimo aspecto, se describe un método de tratar o prevenir una enfermedad, un desorden, o una infección en un mamífero. Este método incluye (a) unir un compuesto farmacéuticamente activo o un compuesto de enlace a una molécula enlazadora, (b) remover cualesquiera grupos tiol o amina protectores en el enlazador, (c) acoplar un grupo tiol, amina o alqueno en el enlazador a un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados mediante una reacción de adición conjugada, y (d) reticular los grupos insaturados no acoplados en el polímero en un sitio dentro de un mamífero. En una forma de realización de este aspecto, también se llevan a cabo uno o mas de los pasos (a) a (c) en un sitio dentro de un mamífero.

En un décimo octavo aspecto, se describe un método de tratar o prevenir una enfermedad, un desorden, o una infección en un mamífero administrando al mamífero un biomaterial que tiene una ramificación farmacéuticamente activa. El biomaterial puede incluir un enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa. Este enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. De manera alternativa, el biomaterial puede incluir un enlace éster o amida en la ramificación de enlace, que interactúa de manera covalente o no covalente con un compuesto o una ramificación farmacéuticamente activos. Este enlace éster o amida en la ramificación de enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C.

En un décimo noveno aspecto, se describe un método para entregar un compuesto farmacéuticamente activo a una célula, un tejido, un órgano, un sistema de órganos, o el cuerpo de un mamífero. Este método incluye poner en contacto la célula, el tejido, el órgano, el sistema de órganos o el cuerpo con un biomaterial que tiene un enlace éster o amida en una ramificación farmacéuticamente activa. El enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C, y el corte del enlace da como resultado la liberación de un compuesto farmacéuticamente activo teniendo la ramificación farmacéuticamente activa. Un aspecto relacionado incluye un método que implica poner en contacto la célula, el tejido, el órgano, el sistema de órganos o el cuerpo con un biomaterial que tiene un enlace éster o amida en una ramificación de enlace, que interactúa de manera covalente o no covalente con un compuesto o una ramificación farmacéuticamente activos. El enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C, y el corte del enlace da como resultado la liberación de la ramificación de enlace. La liberación de la ramificación de enlace también da como resultado la liberación del compuesto o la ramificación farmacéuticamente activos que está asociado con la ramificación de enlace del biomaterial.

En un vigésimo aspecto, se describe un método para entregar un compuesto farmacéuticamente activo a una célula, un tejido, un órgano, un sistema de órganos, o el cuerpo de un mamífero. Este método incluye administrar al mamífero un biomaterial que tiene una ramificación farmacéuticamente activa. El biomaterial es

formado de la reticulación de un componente precursor en presencia de un compuesto de objetivación teniendo dos o mas grupos nucleófilos. El componente precursor incluye una ramificación farmacéuticamente activa acoplada a un polímero teniendo dos o mas grupos insaturados conjugados, y el compuesto de objetivación provee objetivar una célula, un tejido, un órgano, un sistema de órganos, o sitio dentro del mamífero. Un compuesto farmacéuticamente activo que tiene la ramificación farmacéuticamente activa es liberado del biomaterial en o cerca de la célula, el tejido, el órgano, el sistema de órganos, o el cuerpo del mamífero. En una forma de realización deseable de este aspecto, el biomaterial tiene un enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa, y el enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. En un aspecto relacionado, se describe un método que incluye administrar al mamífero un biomaterial que tiene una ramificación de enlace. El biomaterial es formado a partir de la reticulación de un componente precursor en presencia de un compuesto de objetivación teniendo dos o mas grupos nucleófilos. El componente precursor incluye una ramificación de enlace acoplada a un polímero que tiene dos o mas grupos insaturados conjugados, y el compuesto de objetivación que provee objetivación a una célula, un tejido, un órgano, un sistema de órganos, o sitio dentro del mamífero. La ramificación de enlace liga de manera covalente o no covalente un compuesto o una ramificación farmacéuticamente activos. La ramificación de enlace y el compuesto o la ramificación farmacéuticamente activos asociado con la ramificación de enlace son liberados del biomaterial en o cerca de la célula, el tejido, el órgano, el sistema de órganos, o el cuerpo del mamífero. En una forma de realización deseable de este aspecto, el biomaterial tiene un enlace éster o amida en la ramificación de enlace, y el enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. En un vigésimo primer aspecto, la invención provee un método de prevenir adhesiones, trombosis, o restenosis, en un mamífero. Este método incluye poner en contacto un sitio en el mamífero con un componente precursor y reticular el componente precursor en el sitio. El componente precursor tiene la fórmula:



donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; Y es O, NH o N; L es un enlazador lineal o ramificado; X es O o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua teniendo uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero. La vida media del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa o en la ramificación de enlace es de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. N es 1, 2 ó 3.

En un vigésimo segundo aspecto, la invención provee un método de prevenir adhesiones, trombosis o restenosis en un mamífero. Este método incluye poner en contacto un sitio dentro del mamífero con un biomaterial que tiene un enlace éster o amida en una ramificación farmacéuticamente activa. El enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C, y el corte del enlace da como resultado la liberación de un compuesto farmacéuticamente activo teniendo la ramificación farmacéuticamente activa. En un aspecto relacionado, la invención provee un método que incluye poner en contacto un sitio dentro del mamífero con un biomaterial que tiene un enlace éster o amida en una ramificación de enlace. El enlace tiene una vida media de entre una hora y un año en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C, y el corte del enlace da como resultado la liberación de la ramificación de enlace (o un compuesto derivado de la ramificación de enlace). La ramificación de enlace puede ligar de manera covalente o no covalente un compuesto o una ramificación farmacéuticamente activos. De esta manera, la liberación de la ramificación de enlace del biomaterial también da como resultado la liberación del compuesto o la ramificación farmacéuticamente activos.

En una forma de realización deseable de los aspectos décimo quinto a vigésimo segundo, el compuesto, el componente precursor o el biomaterial es administrado por vía oral, intravenosa, intramuscular, sub-cutánea, parental, o cualquiera otra ruta suficiente para proveer una dosis adecuada para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, un desorden, o una infección. En otra forma de realización deseable de estos aspectos, el enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa o en la ramificación de enlace tiene una vida media de entre un día y nueve meses en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. Con mayor preferencia, la vida media es de entre dos días y seis meses, y con la mayor preferencia es de entre cuatro días y tres semanas en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C. Una enfermedad que puede ser tratada o prevenida usando los métodos de estos aspectos es cáncer. De preferencia, el mamífero es un ser humano. El enlazador de estos aspectos puede tener las mismas formas de realización listadas para el enlazador de los aspectos

cuarto a sexto. La ramificación farmacéuticamente activa o los grupos insaturados conjugados de estos aspectos pueden tener formas de realización preferentes correspondientes listadas para cualquiera de los aspectos previos.

Los nuevos aspectos antes mencionados de la invención y en los siguientes aspectos que se describan, pueden incluir reacciones de adición conjugada auto-selectivas entre un nucleófilo fuerte y un grupo insaturado conjugado para reticulación de los componentes precursores para formar un biomaterial, como se describió en la solicitud de patente US 09/ 496,231. Los métodos que allí se describen son adecuados para enlaces cruzados de los componentes precursores de la invención a la forma de biomateriales de la invención. Por ejemplo, los novedosos componentes precursores de la presente invención, que tienen una ramificación farmacéuticamente activa o ramificación de enlace ligada covalentemente, pueden ser reticulados en presencia de un polímero que tiene dos o mas grupos nucleófilos para formar un copolímero en métodos que incluyen reacciones de adición conjugada auto-selectivas. En adición, los métodos de la presente invención pueden utilizar una reacción de adición conjugada auto-selectiva para el acoplamiento de un grupo tiol o amina, enlazado a o incorporado en un compuesto farmacéuticamente activo o una ramificación de enlace, a un grupo insaturado conjugado en un polímero para la producción de compuestos novedosos.

Se describen ahora los biomateriales poliméricos que se han desarrollado previamente (solicitud de patente US 09/ 496,231; presentada el 1 de febrero de 2000), que son únicos en su uso de reacciones de adición entre un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada para polimerizar o reticular dos o mas componentes en una manera que puede lograrse en presencia de materiales biológicamente sensibles. U.S.S.N. 09/496,912 B1 ha sido concedida como US 7,744,912 B1, y corresponde a WO 00/44808 A1. Las aplicaciones del proceso incluyen la formación de biomateriales en presencia de fármacos, incluyendo proteínas y ADN, formación de biomateriales en presencia de células y agregados celulares, y también formación de biomateriales *in vivo* ya sea dentro del cuerpo o o sobre la superficie del cuerpo. Es posible formar estos biomateriales en presencia de materiales biológicamente sensibles debido a la elevada auto-selectividad de las reacciones de adición entre nucleófilos fuertes e insaturaciones conjugadas, que se emplean. El nucleófilo fuerte de interés particular en el método descrito en la presente es el tiol.

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

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

De conformidad con lo anterior, en un vigésimo tercer aspecto se describe un método para hacer un biomaterial, que envuelve combinar dos o más componentes precursores del biomaterial bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, en donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre un nucleófilo fuerte y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila, tal y como se describe en WO 00/44808. La funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y el biomaterial no comprende albúmina no procesada. En adición, el enlace o grupo conjugado insaturado no es una maleimida ni una vinil sulfona.

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

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

En todavía otras modalidades del vigésimo tercer aspecto, el método también comprende combinar los

componentes precursores con una molécula que comprenda un sitio de adhesión, un sitio de enlace de factores de crecimiento, o un sitio de enlace de heparina, un sitio de enlace de ión de metal, o sitio de enlace de carbohidratos (v.gr., un grupo ácido borónico) y también comprende ya sea un nucleófilo fuerte o un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado. De preferencia el nucleófilo fuerte es un tiol, o el enlace conjugado insaturado o el grupo conjugado insaturado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio.

En todavía otras modalidades del vigésimo tercer aspecto, el biomaterial es un hidrogel. El biomaterial también puede ser degradable. El biomaterial se puede hacer en la presencia de moléculas biológicas sensibles, o en la presencia de células o tejidos. El biomaterial también se puede hacer adentro o sobre el cuerpo de un animal.

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

En un vigésimo cuarto aspecto, se describe un biomaterial formado mediante la combinación de dos o más componentes precursores de un biomaterial, bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre un nucleófilo fuerte y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila tal y como se describe en WO 00/44808 A1. La funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y el biomaterial no comprende albúmina no procesada, y el enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado no es una maleimida ni una vinil sulfona.

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

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

En todavía otras modalidades del vigésimo cuarto aspecto, el método también comprende combinar los componentes precursores con una molécula que comprenda un sitio de adhesión, un sitio de enlace de factores de crecimiento, un sitio de enlace de heparina, un sitio de enlace de ión de metal, o sitio de enlace de carbohidratos (v.gr., un grupo ácido borónico) y también comprende ya sea un nucleófilo fuerte o un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado. De preferencia el nucleófilo fuerte es un tiol, o el enlace conjugado insaturado o el grupo conjugado insaturado es un acrilato, una acrilamida, una quinona, o un vinilpiridinio.

En todavía otras modalidades del vigésimo cuarto aspecto, el biomaterial es un hidrogel. El biomaterial también puede ser degradable. El biomaterial se puede hacer en la presencia de moléculas biológicas sensibles, o en la presencia de células o tejidos. El biomaterial también se puede hacer dentro o sobre el cuerpo de un animal.

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

En un vigésimo quinto aspecto, se describe un método para aplicar una sustancia terapéutica a una célula, tejido, órgano, sistema orgánico, o cuerpo de un animal, el método envolviendo poner en contacto a la célula, tejido, órgano, sistema orgánico o cuerpo con el biomaterial del vigésimo cuarto aspecto de la invención, donde el biomaterial contiene una sustancia terapéutica, por medio de la cual se aplica la sustancia terapéutica a la célula, tejido, órgano, sistema orgánico, o cuerpo de un animal.

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

En un vigésimo sexto aspecto, se describe un método para regenerar un tejido, que envuelve introducir un andamio a un sitio, bajo condiciones que permitan el crecimiento interno de las células. El andamio puede comprender el biomaterial del vigésimo cuarto aspecto.

En las modalidades del vigésimo sexto aspecto, el andamio se ha sembrado previamente con células. El tejido

se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de hueso, piel, nervio, vaso sanguíneo, y cartílago.

En un vigésimo séptimo aspecto, se describe un método para evitar adhesiones, trombosis, o restenosis, que implica poner en contacto un sitio con los componentes precursores del biomaterial del vigésimo cuarto aspecto de la invención; y polimerizar los componentes en el sitio.

5 En un vigésimo octavo aspecto, se describe un método para sellar un flujo de fluido o gas, el método comprendiendo los pasos de poner en contacto un sitio dentro del cuerpo de un animal, con los componentes precursores del biomaterial del vigésimo cuarto aspecto de la invención, que pueden comprender además un componente que incluya cuando menos un enlace conjugado insaturado o grupo conjugado insaturado, y cuando menos un grupo reactivo amina; y polimerizar los componentes en el sitio.

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

En un vigésimo noveno aspecto, la invención se describe un método para encapsular una célula o tejido, que implica combinar los componentes precursores de un biomaterial con una célula o tejido; y polimerizar los componentes, donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-seleccionada entre un nucleófilo fuerte y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, y donde el biomaterial polimerizado encapsula a la célula o el tejido.

En un trigésimo aspecto, la invención se describe un método para hacer un biomaterial, que implica combinar dos o más componentes precursores del biomaterial, bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, donde la polimerización ocurre a través de la reacción auto-selectiva entre una amina y un enlace conjugado insaturado, o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila, donde la funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y donde el biomaterial no comprende albúmina no procesada, y el enlace o grupo conjugado insaturado no es una maleimida ni una vinil sulfona.

En un trigésimo primer aspecto, se describe un biomaterial formado mediante la combinación de dos o más componentes precursores del biomaterial, bajo condiciones que permitan la polimerización de los dos componentes, donde la polimerización ocurre mediante la reacción auto-selectiva entre una amina y un enlace conjugado insaturado o un grupo conjugado insaturado, mediante adición nucleófila, donde la funcionalidad de cada componente es de cuando menos dos, y donde el biomaterial no comprende albúmina no procesada, y el enlace o grupo insaturado no es una maleimida ni una vinil sulfona.

En formas de realización de diversos aspectos de la invención o descritos aquí respectivamente, el polímero es un octa-acrilato de PEG, tetra-acrilato de PEG, triacrilato de PEG, diacrilato de PEG, o monoacrilato de PEG. En otros aspectos, el polímero es octa-acrilamida de PEG, tetra-acrilamida de PEG, triacrilamida de PEG, o monoacrilamida de PEG. En todavía otros aspectos, el polímero contiene sitios acrilato mixtos y sitios acrilamida mixtos. En todavía otras formas descritos de realización, n es 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

En diversas otras formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores descritos aquí, el biomaterial contiene una ramificación de enlace enlazada covalente o no covalentemente, tal como un anti-cuerpo, una proteína, un ácido nucleico, o una ramificación orgánica que liga un compuesto farmacéuticamente activo. En todavía otras formas de realización, el biomaterial contiene una ciclodextrina que liga un compuesto farmacéuticamente activo hidrófobo. En otras formas de realización, la ramificación de enlace es heparina, una ramificación de enlace de heparina, una ramificación de enlace de ión de metal, una ramificación de

40 carbohidrato, una ramificación de enlace de carbohidratos, o una ramificación que liga grupos hidrófobos. Ejemplos de las fracciones de enlace de ión de metal incluyen fracciones de enlace Cu^{+2} , fracciones de enlace Co^{+2} , y fracciones de enlace Zn^{+2} . Fracciones de enlace de carbohidratos preferentes son ácidos fenilborónicos.

En otra forma de realización, el ácido fenilborónico es enlazado al biomaterial mediante una amina secundaria en el anillo de fenilo del ácido fenilborónico. En formas de realización preferentes, una ramificación o un

45 compuesto farmacéuticamente activos está ligado directa o indirectamente a la ramificación de enlace en el biomaterial. Ejemplos de fracciones o compuestos farmacéuticamente activos que pueden estar ligados directa o indirectamente a la ramificación de enlace incluyen moléculas orgánicas sintéticas, moléculas orgánicas que ocurren naturalmente, moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos bio-sintéticos, péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, y péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, modificados. Ejemplos de tales

50 moléculas orgánicas incluyen paclitaxel, doxorubicina, camptotecina, 5-fluorodesoxiuridina, estradiol, 2-metoxiestradiol, y sus derivados. En otras formas de realización, un sitio de enlace de metal es incorporado en un compuesto farmacéuticamente activo tal como una proteína para promover la interacción del compuesto farmacéuticamente activo con un metal ligado por una ramificación de enlace en un biomaterial. Por ejemplo, uno o mas residuos histidina pueden ser añadidos a una proteína farmacéuticamente activa para incrementar su afinidad por los metales y de esta manera incrementar su afinidad por un biomaterial.

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores, una ramificación farmacéuticamente activa puede ser ligada directamente al biomaterial mediante un enlace éster o amida o ligada indirectamente al biomaterial mediante una interacción covalente o no covalente con una ramificación de enlace que está ligada al biomaterial mediante un enlace éster o amida. Una ramificación o un compuesto

60 farmacéuticamente activos pueden ligar directamente la ramificación de enlace o pueden ligar indirectamente la ramificación de enlace interactuando con una molécula (tal como un ión de metal o heparina) que se liga directamente a la ramificación de enlace.

En otras formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores aquí descritos, el biomaterial encapsula un compuesto farmacéuticamente activo. El compuesto farmacéuticamente activo puede ser atrapado en el biomaterial por la formación del biomaterial en presencia de un compuesto farmacéuticamente activo. En

65 materiales reticulados, la red polimérica forma una barrera física a la difusión de fármacos macro-moleculares

tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, ARN y ADN. El tamaño de la red puede ser ajustado por el diseño de los componentes de la red. Por ejemplo, materiales reticulados formados con concentraciones de masa de triacrilato de PEG pueden formar redes mas permeables que las formadas con una igual concentración de masa del octa-acrilato de PEG bajo condiciones equivalentes. De esta manera, la permeabilidad de un fármaco macro-molecular puede ser modulada mediante el diseño de la red de biomaterial para obtener liberación controlada del fármaco.

En la presente invención, se utilizan las siguientes definiciones. Las definiciones son las mismas que las utilizadas en WO 00/44808.

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

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

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

Cuando se desea el grado más elevado de auto-selectividad en los métodos útiles de la invención, el nucleófilo selecto es un tiol. Cuando no se requiere el nivel más elevado de selectividad estos métodos, se puede usar una amina como el nucleófilo fuerte. Se pueden alterar las condiciones que se utilizan para completar la reacción auto-selectiva, para incrementar el grado de auto-selectividad, como se proporciona en la presente. Por ejemplo, si se usa una amina como el nucleófilo fuerte en la formación de un biomaterial, mediante la selección de una amina con un pK bajo, y la solución precursora final que se va a polimerizar se formula de tal manera que el pH está cerca del pK, se favorece la reacción de la insaturación con la amina que se proporciona, y de esta manera se consigue la auto-selectividad.

Con "nucleófilo fuerte" se quiere decir una molécula que es capaz de donar un par de electrones a un electrófilo en una reacción de formación de enlace polar. De preferencia el nucleófilo fuerte es más nucleófilo que el H₂O al pH fisiológico. Los ejemplos de nucleófilos fuertes son tioles y aminas.

El nucleófilo fuerte preferido para usarse en la presente invención es un tiol, puesto que éste exhibe alta auto-selectividad. En las proteínas que se encuentran afuera de las células están presentes muy pocos tioles estéricamente accesibles. Las aminas también pueden ser útiles y auto-selectivas, especialmente cuando la reacción de formación de biomaterial se conduce en la presencia de moléculas biológicas sensibles que no llevan aminas, por ejemplo, muchos fármacos.

Con "enlace conjugado insaturado" se quiere decir la alternación de enlaces múltiples de carbono-carbono, carbono- heteroátomo, o heteroátomo-heteroátomo con enlaces individuales, o la enlace de un grupo funcional a una macromolécula, tal como un polímero sintético o una proteína. Esos enlaces pueden experimentar las reacciones por adición.

Con "grupo conjugado insaturado" se quiere decir una molécula o una región de una molécula, que contiene una alternación de enlaces múltiples de carbono-carbono, carbono-heteroátomo, o heteroátomo-heteroátomo con enlaces individuales, que tienen un enlace múltiple que puede experimentar las reacciones por adición. Los ejemplos de grupos conjugados insaturados incluyen, pero no están limitados a acrilamidas, quinonas, y vinilpiridinios, por ejemplo, 2- o 4-vinilpiridinio.

Con "péptido sustancialmente puro", "polipéptido sustancialmente puro", o "proteína sustancialmente pura", se quiere decir un polipéptido que se ha separado de los componentes que naturalmente acompañan a éste. Como se usan en la presente, los términos péptido, polipéptido, y proteína se usan de manera intercambiable. Típicamente, el polipéptido es sustancialmente puro cuando éste está cuando menos el 60 por ciento, en peso, libre de las proteínas y las moléculas orgánicas naturalmente ocurientes con las cuales éste está naturalmente asociado. De preferencia, el polipéptido es cuando menos 75 por ciento, de más preferencia cuando menos 90 por ciento, y de mayor preferencia cuando menos 99 por ciento, en peso, puro. Se puede obtener un polipéptido de interés sustancialmente puro, por ejemplo, mediante la extracción de una fuente natural (por ejemplo, una célula, agregado celular, o tejido), mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifique el polipéptido deseado, o mediante la síntesis química de la proteína. Se pueden hacer ensayos sobre la pureza mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía de columna, electroforesis de gel de poliácridamida, electroforesis de gel de agarosa, densidad óptica, o análisis HPLC.

Una proteína está sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados cuando ésta se separa de esos contaminantes que la acompañan en su estado natural. De esta manera, una proteína que se sintetiza o produce químicamente en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina ésta naturalmente, estará sustancialmente libre de sus componentes naturalmente asociados. De conformidad con lo anterior, los polipéptidos sustancialmente puros incluyen aquéllos derivados a partir de organismos eucarióticos, pero sintetizados en *E. coli* u otros procariotes.

Con "ácido nucleico purificado" se quiere decir una molécula de ácido nucleico que esté libre de los genes que,

en el genoma naturalmente ocuriente del organismo a partir del cual se derivó el ácido nucleico de la invención, flanquean el gen. El término incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora dentro de un vector; dentro de un plásmido o virus autónomamente duplicador; o dentro del ADN genómico de un procaríote o eucaríote; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un genómico o un fragmento de ADNc producido mediante PCR o digestión de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. Este también incluye ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica la secuencia de polipéptidos adicional.

Con "funcionalizar" se quiere decir modificar de una manera que de cómo resultado la unión de un grupo o ramificación funcional. Por ejemplo, una molécula se puede funcionalizar mediante la introducción de una molécula que haga a la molécula un nucleófilo fuerte o una insaturación conjugada. De preferencia una molécula, por ejemplo PEG, se funcionaliza para convertirse en un tiol, amina, acrilato, o quinona.

Las proteínas en particular también se pueden funcionalizar de manera efectiva mediante la reducción parcial o completa de enlaces bisulfuro, para crear tioles libres. Con "funcionalidad@" se quiere decir el número de sitios reactivos en una molécula. Como se usa en la presente, la funcionalidad de un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada será cada una de cuando menos dos. La mezcla de dos componentes, por ejemplo, un nucleófilo fuerte y una insaturación conjugada, con funcionalidades de dos cada uno, dará como resultado un biomaterial polimérico lineal, y la mezcla de dos componentes con funcionalidades de cuando menos dos cada uno, uno de los componentes teniendo una funcionalidad de más de dos, dará como resultado un biomaterial reticulado.

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

Con "sitio de enlace de factores de crecimiento" se quiere decir una secuencia de péptidos a la cual se liga un factor de crecimiento, o una(s) molécula(s) que enlaza(n) un factor de crecimiento. Por ejemplo, el sitio de enlace de factores de crecimiento puede incluir un sitio de enlace de heparina. El sitio fijará la heparina, que a su vez fijará los factores de crecimiento de enlace a la heparina, por ejemplo, bFGF, VEGF, BMP, o TGFβ.

Con "sitio de enlace de proteasa" se quiere decir una secuencia de péptidos que es un sustrato para una enzima.

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

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

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

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

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

Aunado a las definiciones antes mencionadas, se utilizan las específicamente las siguientes en la presente invención.

Con "ramificación farmacéuticamente activa" se quiere decir una especie que difiere de un compuesto terapéuticamente activo en que no contiene un grupo reactivo, tal como un grupo alcohol o amina, que está presente en el compuesto. La ramificación farmacéuticamente activa puede ser denotada por D, y el compuesto terapéuticamente activo es designado D-OH, D-NH₂, o D-NH.

En adición a denotar una ramificación farmacéuticamente activa ligada a un biomaterial mediante un enlace éster o amida, el símbolo "D" puede ser usado para denotar una ramificación de enlace enlazada a un biomaterial mediante un enlace éster o amida. Por "ramificación de enlace" se quiere decir un compuesto que liga directa o indirectamente una ramificación o un compuesto farmacéuticamente activos. Por ejemplo, la ramificación de enlace puede ligar directamente una ramificación o un compuesto farmacéuticamente activos

- por enlace a una molécula tal como un ión de metal o heparina que entonces liga la ramificación o el compuesto farmacéuticamente activos. La ramificación o el compuesto farmacéuticamente activos que está asociado con la ramificación de enlace no requiere contener un grupo -OH, -NH₂, o -NH debido a que la ramificación o el compuesto farmacéuticamente activos está acoplado al biomaterial mediante su interacción con la ramificación de enlace. En este caso, un grupo -OH, -NH₂, o -NH en la ramificación o el compuesto farmacéuticamente activos no tiene que participar en un enlace éster o amida en el biomaterial. Por Acompuesto de enlace@ se quiere decir un compuesto que incluye una ramificación de enlace.
- Con "polímero soluble en agua" se quiere decir un compuesto formado a partir de la reticulación de dos o mas monómeros, con lo cual el compuesto es capaz de ser disuelto en agua.
- Con "polímero hinchable en agua" se quiere decir un compuesto formado a partir de la reticulación de dos o mas monómeros, con lo cual el compuesto no se disuelve en agua. La interacción entre el agua y el polímero ocasiona que el polímero incremente su volumen.
- Con "copolímero" se quiere decir un polímero que es formado a partir de dos o mas monómeros, donde al menos dos de los monómeros tendrán una fórmula o estructura química diferente.
- Con "enlazador" se quiere decir un compuesto o una ramificación dentro de un compuesto que es capaz de acoplar una ramificación farmacéuticamente activa a un polímero mediante una serie de enlaces covalentes. El enlazador puede ya sea ligar un átomo que está presente en la ramificación farmacéuticamente activa o puede ligar un átomo que está acoplado a la ramificación farmacéuticamente activa mediante una serie de enlaces covalentes, i.e. el par de enlaces D y P. Otro átomo en el enlazador puede reaccionar con un grupo insaturado conjugado que está unido a un polímero. El enlazador puede incluir el grupo enlazador L.
- Con "tasa de liberación" se quiere decir la tasa de producción debida a la hidrólisis de un enlace en un biomaterial o un componente de un biomaterial. Si el enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa, denotada D, es hidrolizado, el compuesto farmacéuticamente activo original que fue usado en la formación del compuesto o biomaterial es liberado. Si otro enlace, tal como un enlace dentro del enlazador o un enlace éster en el polímero, es hidrolizado, se libera una versión modificada del compuesto farmacéuticamente activo original. El compuesto modificado puede ser representado como D-O₂C-Z, D-NH-C(O)-Z, o D-N-C(O)-Z, donde Z comprende la porción del componente o biomaterial entre el enlace hidrolizado y el grupo D-O₂C, D-NH-C(O), o D-N-C(O).
- Con "compuesto farmacéuticamente activo derivado de D" se quiere decir un compuesto terapéuticamente activo que comprende la ramificación farmacéuticamente activa D. El compuesto puede ser el mismo que el compuesto farmacéuticamente activo original; denotado D-OH, D-NH₂, o D-NH, usado en la formación del componente o biomaterial. De manera alternativa, el compuesto puede ser representado como D-O₂C-Z, D-NH-C(O)-Z o D-N-C(O)-Z, como se describió antes; en este caso, el compuesto tiene el grupo -O₂C-Z en vez del grupo hidroxilo o el grupo NH-C(O)-Z o N-C(O)-Z en vez del grupo amina (NH₂ o NH) que fue modificado durante la formación del componente o biomaterial. Con Acompuesto farmacéuticamente activo o su derivado@ se quiere decir un compuesto terapéuticamente activo, denotado D-OH, D-NH₂, o D-NH, o un derivado de este compuesto en el cual el grupo alcohol o amina es modificado tal que el derivado sea representado por D-O₂C-Z, D-NH-C(O)-Z o D-N-C(O)-Z, como se señaló antes.
- Con "acoplado a" se quiere decir reaccionado con o unido a, posiblemente mediante una serie de enlaces covalentes. Por ejemplo, "una ramificación farmacéuticamente activa acoplada a un polímero" se quiere decir una ramificación que está presente en la misma molécula que el polímero y que está enlazada a otro grupo, tal como un enlazador, que está unido al polímero. Una ramificación farmacéuticamente activa es considerada estar acoplada a solamente un grupo insaturado conjugado en un polímero. De esta manera, si una ramificación farmacéuticamente activa o un grupo unido a la ramificación farmacéuticamente activa es reaccionado con un grupo insaturado conjugado en un polímero, entonces la ramificación se dice estar acoplada a ese grupo insaturado conjugado. El o los grupos insaturados conjugados remanentes unidos al polímero que no fueron reaccionados con el compuesto que tiene la ramificación farmacéuticamente activa son referidos como "no acoplados a la ramificación farmacéuticamente activa".
- Con "derivado" de una molécula orgánica se quiere decir un compuesto que tiene una porción de la molécula orgánica y que tiene la misma actividad terapéutica que la molécula orgánica. El derivado puede tener uno o mas grupos funcionales que no están presentes en la molécula orgánica farmacéuticamente activa. De manera adicional, el derivado puede no tener uno o mas grupos funcionales que están presentes en la molécula orgánica farmacéuticamente activa.
- Con "ramificación farmacéuticamente activa derivada de" se quiere decir una ramificación en un compuesto farmacéuticamente activo que puede unirse a otro compuesto. Por ejemplo, un grupo reactivo -tal como un alcohol, una amina primaria o una amina secundaria- en un compuesto farmacéuticamente activo puede reaccionar con un compuesto que tiene un ácido carboxílico, formando un producto que incluye la ramificación farmacéuticamente activa. En este caso, la ramificación no contiene un hidrógeno que está presente en el compuesto farmacéuticamente activo, y el producto contiene un enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa.
- Con "reacción de sustitución nucleófila" se quiere decir una reacción entre un nucleófilo y un electrófilo en la cual un enlace covalente es formado entre el nucleófilo y el electrófilo y un enlace es roto entre el electrófilo y un grupo que sale. De esta manera, un grupo que sale que había estado ligado al electrófilo es reemplazado por el nucleófilo.
- Con "polimerización por radicales libres" se quiere decir la reticulación de monómeros que es iniciada por un radical. El radical reacciona con un monómero, produciendo un radical que puede reaccionar con otro

monómero.

Con "reacción de adición conjugada" se quiere decir una reacción entre un nucleófilo y un grupo insaturado conjugado o enlace insaturado conjugado. Por ejemplo, un nucleófilo puede reaccionar con un aldehído o cetona α,β insaturado, dando como resultado la formación de un enlace covalente entre el nucleófilo y el carbono β y un enlace entre un átomo de hidrógeno y el carbono α . En esta reacción, un enlace entre los carbonos α y β es también convertido de un enlace doble a uno sencillo. Ejemplos adicionales son listados en la sección de la descripción detallada.

Por "en o cerca de un sitio dentro del cuerpo" quiere decir ubicado cerca de un sitio dentro del cuerpo, tal que el compuesto farmacéuticamente activo liberado esté localizado en el área deseada.

Con "material coloidal" se quiere decir un copolímero de dimensiones mayores de 5 nm y menor de 1 μm .

Con "micro-esfera" se quiere decir un biomaterial que tiene una forma esférica con un diámetro entre 1 y 1,000 μm .

Con "nano-esfera" se quiere decir un biomaterial que tiene una forma esférica con un diámetro de entre 1 y 1,000 nm.

Con "base que es modificada para contener un tiol" se quiere decir una base que tiene un tiol o un grupo que tiene azufre. Por ejemplo, un derivado de 6-cloropurina puede ser reaccionado con H_2S para formar una adenosina que tiene un azufre en vez de un grupo amina.

Con "péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, modificados" se quiere decir péptidos o proteínas que ocurren naturalmente que han sido reaccionados con un grupo que tiene un tiol o una amina tal que el producto sea capaz de reaccionar con un grupo insaturado conjugado o enlace mediante una reacción de adición conjugada.

Con "paso de purificación" se quiere decir un paso que incrementa la pureza de un producto. El producto puede ser separado de algunos de los demás componentes de una mezcla tales como materiales iniciales, aceleradores, productos secundarios, y solventes. Los productos pueden ser purificados con base en sus características -tales como tamaño, forma, carga, hidrofobicidad, solubilidad, o punto de ebullición- usando técnicas estándar.

Con "agente de condensación" se quiere decir un compuesto que acelera la reacción entre un alcohol o amina y un ácido carboxílico. El agente de condensación reacciona con el ácido carboxílico tal que el grupo hidroxilo del ácido carboxílico sea convertido en un grupo que sale mejor para la reacción de sustitución nucleófila entre este ácido carboxílico activado y el alcohol o amina. Los agentes de condensación son bien conocidos en la materia de la síntesis orgánica.

Con "tratar o prevenir una enfermedad, un desorden, o una infección" se quiere decir administrar a un mamífero un biomaterial, que tiene una ramificación farmacéuticamente activa ligada de manera covalente. También se describe la aplicación de un componente precursor de un biomaterial, o un compuesto que tiene una unión covalente de una fracción farmacéuticamente activa. En una forma de realización deseable aquí descrita, los componentes precursores administrados reticulan dentro del cuerpo para formar un biomaterial. Un compuesto terapéuticamente activo es liberado del biomaterial debido a la hidrólisis de un enlace entre la ramificación farmacéuticamente activa y el polímero, tal como el enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa. Este compuesto es capaz de reducir o retrasar la aparición de síntomas o remover o prevenir la causa de una enfermedad, un desorden o una infección.

No se pretende que la administración esté limitada a un modo particular de administración, dosis, o frecuencia de dosificación; el presente modo contempla todos los modos de administración, incluyendo ruta oral, intravenosa, intramuscular, sub-cutánea, parenteral o cualquier otra ruta suficiente para proveer una dosis adecuada para impedir o tratar una enfermedad, un desorden o una infección. Uno o mas de los biomateriales, los componentes precursores, o los compuestos, puede administrarse a un mamífero en una sola dosis o dosis múltiples, posiblemente en presencia de compuestos estabilizadores farmacéuticos. Cuando se administran dosis múltiples, las dosis pueden ser separadas entre sí, por ejemplo una semana a un mes. Deberá entenderse que para cualquier sujeto particular, deben ajustarse con el tiempo los regímenes de dosificación específicos, de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Breve Descripción de los Dibujos

Las figuras 1 a 15 se describen en WO 00/44808 y se reproducen en la presente con propósito ilustrativo.

La figura 1 es una gráfica del efecto del cambio de residuos aminoácidos adyacentes a la cisteína sobre la velocidad de la adición de conjugado en los acrilatos (acrilato de PEG). La figura 2 es una representación esquemática de una reacción por adición de conjugado, que se usa como un modelo para estudiar la cinética de la adición de un tiol (en cisteína) al acrilato en el diacrilato de PEG.

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

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

La figura 5 es una gráfica que muestra el efecto que tiene la influencia estérica de los grupos cerca del sitio de la insaturación conjugada sobre la reacción entre un tiol (en la cisteína) y un acrilato, crotonato, o dimetilacrilato de un PEG funcionalizado de conformidad con lo anterior.

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

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

5 mioglobina de los hidrogeles sensibles a la plasmina.

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

10 sometieron a cargas compresivas.

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

15 9.0. Los geles mostraron que la rigidez del gel se manipuló por el contenido del triacrilato hidrófobo.

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

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

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

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

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

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

Las figuras 16 a 25 ilustran la presente invención.

La figura 16 es una representación esquemática de la ruta de síntesis para la modificación de paclitaxel (Ejemplo 19) o la cadena lateral de paclitaxel (Ejemplo 16) con un enlazador que contiene tiol. Este enlazador es entonces acoplado a una insaturación enlazada mediante PEG mediante una reacción de adición conjugada, y los grupos insaturados conjugados enlazados mediante PEG remanentes son reticulados para formar un biomaterial. La figura 17 es una representación esquemática de la ruta de síntesis para la modificación de paclitaxel (Ejemplo 20) o la cadena lateral de paclitaxel (Ejemplo 17) con un acrilato. Este acrilato es entonces acoplado a una insaturación enlazada mediante PEG mediante un enlazador que contiene un tiol o una amina, y los grupos insaturados conjugados enlazados mediante PEG remanentes son reticulados para formar un biomaterial.

La figura 18 es una representación esquemática de la ruta de síntesis para la formación de un componente precursor de biomaterial que contiene la cadena lateral de paclitaxel. Este componente precursor es representado por la fórmula: D-OC(O)(CH₂)₃-S-(CH₂)₂C(O)NH-P, en la cual D es una ramificación farmacéuticamente activa (v.gr., el éster metilo de la cadena lateral de paclitaxel) y P es un polímero (v.gr., PEG) (Ejemplo 26).

La figura 19A es una gráfica que ilustra la cinética para la liberación de la cadena lateral de paclitaxel de una solución de un conjugado enlazado mediante PEG en PBS, pH 7.4 a 37°C (Ejemplo 27). El Aenlazador C3" denota el conjugado enlazado mediante PEG teniendo la fórmula D-OC(O)(CH₂)₂-S-(CH₂)₂C(O)NH-P, en la cual D es el éster metilo de la cadena lateral de paclitaxel y P es PEG (Ejemplo 16). Este conjugado contiene tres

átomos de carbono entre la cadena lateral de paclitaxel y el átomo de azufre en el enlazador. El Aenlazador C4" denota el conjugado enlazado mediante PEG teniendo la fórmula

$D-OC(O)(CH_2)_3-S-(CH_2)_2C(O)NH-P$, en la cual D es el éster metilo de la cadena lateral de paclitaxel y P es PEG

(Ejemplo 26). Este conjugado contiene cuatro átomos de carbono entre la cadena lateral de paclitaxel y el átomo de azufre en el enlazador. La figura 19B es una gráfica que ilustra la cinética para la liberación de la

cadena lateral de paclitaxel de un hidrogel foto-polimerizado que fue de los conjugados enlazados mediante PEG listados en la figura 19A. La cinética de liberación fue medida en PBS, pH 7.4 a 37°C.

La figura 20 es una representación esquemática de la ruta de síntesis para la formación de un ligando de enlace de ión de metal de ácido iminodiacético para incorporación en biomateriales (Ejemplo 28).

La figura 21 es una representación esquemática de la ruta de síntesis para la formación de un ligando de ácido fenilborónico para incorporación en biomateriales (Ejemplo 28).

Las figuras 22A y 22B son gráficas que ilustran la hinchazón de geles de PEG reticulados en agua amortiguada. Dentro de las primeras pocas horas después de la reticulación, los geles se hincharon de manera considerable, pero alcanzaron un volumen de equilibrio dentro de las 24 horas. La relación de hinchazón Q describe el volumen del gel relativo a su volumen bajo las condiciones de reticulación (figura 22A). La figura 22B muestra la ramificación de volumen calculado de PEG en el gel durante el primer día de hinchazón. Los geles fueron hechos a partir de PEG-ditiol y uno de los siguientes: octa-acrilato de PEG, 40% (▲); tetra-acrilato de PEG, 40% (■); tetra-acrilato de PEG, 30% (□); o triacrilato de PEG, 40% (○). Los porcentajes se refieren al porcentaje de PEG en el precursor del gel durante la reticulación. Los datos son valores promedio con base en tres geles.

La figura 24 es una gráfica que ilustra la cinética de la liberación de proteínas de los hidrogeles de PEG. Partículas sólidas de proteína fueron incorporadas en hidrogeles de PEG por mezcla de las partículas de proteína con multi-acrilato de PEG y PEG-ditiol. La liberación de proteína fue monitoreada midiendo la absorbencia a 280 nm de la solución de lavado sobre el gel, que fue reemplazada diariamente. La liberación acumulada es mostrada para (■) geles hechos de tetra-acrilato de PEG (peso molecular de 14,800; hecho a una concentración de 40% de PEG) y (▲) geles hechos de octa-acrilato de PEG (peso molecular de 20,000; hecho a una concentración de 40% de PEG). Las barras de error muestran las desviaciones estándar (n = 3).

Las figuras 25A y 25B son imágenes de geles SDS-PAGE ilustrando la auto-selectividad de la reacción de reticulación. En la figura 25A, los carriles 1 y 6 contienen marcadores de peso molecular; el carril 2 contiene albúmina y amortiguador corriente con DTT; y el carril 3 contiene albúmina incubada con diacrilato de PEG (20 moles PEG/mol de albúmina) por una hora a 37°C y luego disuelta en amortiguador corriente con DTT. El carril 5 contiene albúmina que fue disuelta en urea 8M y reducida con TCEP. La albúmina reducida fue incubada con diacrilato de PEG (350 moles PEG/mol de albúmina) por una hora a 37°C y luego disuelta en amortiguador corriente con DTT. El carril 10 contiene albúmina disuelta en amortiguador corriente sin DTT.

En la figura 25B, el carril 1 contiene marcadores de peso molecular, y el carril 2 contiene albúmina disuelta en amortiguador corriente con DTT. El carril 3 contiene albúmina que había sido liberada de un hidrogel hecho de tetra-acrilato de PEG y PEG-ditiol y luego disuelta en amortiguador corriente con DTT. El carril 4 contiene albúmina incubada con ácido acrílico (20,000 moles ácido acrílico/mol de albúmina) por 15 minutos a 37°C y luego disuelta en amortiguador corriente con DTT. El carril 5 contiene albúmina disuelta en amortiguador corriente sin DTT. El carril 6 contiene albúmina incubada con ácido acrílico (20,000 moles ácido acrílico/mol albúmina) por 15 minutos a 37°C y luego disuelta en amortiguador corriente sin DTT. El carril 7 contiene albúmina incubada con PEG-ditiol (20 moles PEG/mol albúmina) por una hora a 37°C y luego incubada con ácido acrílico (10,000 moles ácido acrílico/mol albúmina) por 15 minutos a 37°C. La albúmina fue entonces disuelta en amortiguador corriente sin DTT. El carril 8 contiene albúmina incubada con PEG-ditiol por una hora a 37°C y luego disuelta en amortiguador corriente sin DTT. El carril 9 contiene albúmina incubada con urea 8M y PEG-ditiol (20 moles PEG/mol albúmina) por una hora a 37°C y luego incubada con ácido acrílico (10,000 moles ácido acrílico/mol albúmina) por 15 minutos a 37°C. La albúmina fue entonces disuelta en amortiguador corriente sin DTT. El carril 10 contiene albúmina incubada con urea 8M y PEG-ditiol (20 moles PEG/mol albúmina) por una hora a 37°C y luego disuelta en amortiguador corriente sin DTT.

Descripción Detallada

I. Síntesis o Aplicación *In vivo* de los biomateriales

El sistema de reacción química que se usó para la formación del biomaterial

Se ha desarrollado un esquema de reacción química mediante el cual polimerizar o reticular (las palabras se usan como sinónimos en la presente) dos o más componentes precursores de un biomaterial *in situ*, o en la presencia de materiales biológicos sensibles, de una manera muy auto-selectiva. Este esquema de reacción química se describe en WO 00/44808 y se usa análogamente en la presente invención. Comúnmente se mezclan juntos dos componentes precursores. Estos dos componentes precursores son auto-selectivos en sus velocidades de reacción (es decir, un primer componente precursor reacciona mucho más rápido con un segundo componente precursor que con otros componentes en el material biológico sensible, y el segundo componente precursor reacciona mucho más rápido con el primer componente precursor que con otros componentes en el material biológico sensible). Cuando ambos componentes precursores tienen una funcionalidad de cuando menos dos, y cuando uno de ellos tiene una funcionalidad mayor que dos, el sistema

reaccionará auto-selectivamente para formar un biomaterial reticulado. La palabra Afuncionalidad@ se usa en la presente en el sentido que se usa en la ciencia de polímeros (es decir, el número de sitios reactivos). De esta manera, la mezcla de dos componentes con funcionalidades de dos cada uno dará como resultado un biomaterial polimérico lineal, y la mezcla de dos componentes con funcionalidades de cuando menos dos cada uno, uno de los componentes teniendo una funcionalidad de más de dos, dará como resultado un biomaterial reticulado. Pueden ser útiles ambos tipos de biomateriales.

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

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

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

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

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

El polietilenglicol (PEG) proporciona un bloque de construcción muy conveniente. Uno puede comprar o sintetizar fácilmente los PEGs lineales (queriendo decir con dos extremos) o ramificados (queriendo decir más de dos extremos), y después funcionalizar los grupos extremos de PEG para introducir ya sea un nucleófilo fuerte, tal como un tiol, o una estructura conjugada, tal como un acrilato o una quinona. Cuando estos componentes ya sea se mezclan uno con el otro, o se mezclan con un componente correspondiente, se formará un material de hidrogel. Uno puede hacer reaccionar un componente PEG con un componente no PEG, controlando el peso molecular o la hidrofiliidad de cualquier componente, para manipular las características mecánicas, la permeabilidad, y el contenido de agua del biomaterial resultante. Estos materiales generalmente son útiles en implantes médicos, como se describe con mayor detalle posteriormente.

En la formación de biomateriales, especialmente biomateriales que se desea que se degraden *in vivo*, los péptidos proporcionan un bloque de construcción muy conveniente. Este es directo para sintetizar péptidos que contienen dos o más residuos de cisteína, y este componente puede servir entonces fácilmente como el componente precursor nucleófilo de un biomaterial, especialmente un biomaterial de hidrogel. Por ejemplo, un

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

Sitios de Proteasa

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

Sitios de Adhesión

Uno puede incorporar sitios de péptido para la adhesión de células, a saber péptidos que se fijan a receptores promotores de adhesión en las superficies de las células adentro de los biomateriales de la presente invención. El principio se describe en WO 00/44808. Este se dirige para incorporar una diversidad de esos péptidos promotores de adhesión, tal como la secuencia RGD de la fibronectina, o la secuencia YIGSR de la laminina. Como anteriormente, esto se puede hacer, por ejemplo, simplemente por medio de mezclar un péptido que contenga cisteína con diacrilato o triacrilato de PEG, diacrilamida o triacrilamida de PEG, o diquinona o triquinona de PEG, unos pocos minutos antes de mezclar con el resto del componente precursor que contiene tiol. Durante este primer paso, el péptido promotor de adhesión llegará a estar incorporado dentro de un extremo del PEG funcionalizado de manera múltiple con una insaturación conjugada; cuando se añade el multitiol restante al sistema se formará una red reticulada. De esta manera, por ejemplo, cuando se mezcla un péptido de adhesión que contiene una cisteína con un triacrilato de PEG (en, por ejemplo, 0.1 mol de péptido por mol de grupo extremo de acrilato), y después se añade un péptido de sustrato de proteasa que contiene dos residuos de cisteína, para formar la red tridimensional (en, por ejemplo, equimolar menor de 0.1 mol de péptido por mol de grupo extremo de acrilato), el material resultante será altamente bio-mimético: la combinación de sitios de adhesión incorporados y sitios de proteasa permite que una célula establezca tracción en el material a medida que degrada una trayectoria para su migración, exactamente como lo haría de manera natural la célula en la matriz extra-celular *in vivo*. En este caso, el sitio de adhesión está incorporado suspendido dentro del material. Uno también puede incorporar el sitio de adhesión directamente en la estructura base del material. Esto se puede hacer en más de una manera. Una manera sería incluir dos o más tioles (por ejemplo, cisteína) en el péptido o proteína de adhesión. Uno puede sintetizar activamente el péptido de adhesión (por ejemplo, usando química de fase de solución) directamente sobre un polímero, tal como PEG, e incluir cuando menos un tiol (por ejemplo, cisteína) o insaturación conjugada por extremo de cadena.

Sitios de enlace de factores de crecimiento

Uno puede incrementar adicionalmente la naturaleza biométrica de los biomateriales de la presente invención, especialmente cuando éstos se forman a partir de componentes solubles en agua, con el propósito de ser

hidrogeles, mediante la incorporación de dominios de enlace de factores de crecimiento. El principio se describe en WO 00/44808. Por ejemplo, se pueden emplear péptidos de enlace de heparina para fijar la heparina, que a su vez se puede emplear para fijar factores de crecimiento de enlace a la heparina, tales como bFGF, VEGF, BMP o TGF β . En sí, si el factor de crecimiento de enlace a la heparina, la heparina, y el péptido de enlace a la heparina activado se mezclaran con el PEG activado (de manera similar a la que se describió en la sección precedente), el gel resultante liberaría lentamente el factor de crecimiento, reteniendo la mayoría de éste hasta que una célula invasora liberara el factor de crecimiento por la degradación del gel. Esta es una de las funciones naturales de la matriz extra-celular *in vivo*, para servir como un depósito para factores de crecimiento que llegan a liberarse en la lesión por la actividad celular local. Otra manera relacionada para secuestrar los factores de crecimiento de enlace a la heparina sería más directamente a través del uso de mímicos de heparina covalentemente incorporados, por ejemplo, péptidos con cadenas laterales negativamente cargadas, que directamente fijar los factores de crecimiento. Por otra parte, puesto que el material mismo en una red, éste se puede usar para liberar un factor de crecimiento que esté simplemente incorporado físicamente, y se libera lentamente mediante degradación o difusión, o una combinación de los mismos. Se debe entender que debido a que la química de la gelación es auto-selectiva, el factor de crecimiento mismo y los otros péptidos bio-activos no se modifican químicamente con el propósito de destruir su actividad biológica. Este aspecto importante de la auto-selectividad hace obvia la necesidad, por ejemplo, de encapsular el factor de crecimiento en partículas de polímero (para protegerlo mediante lo mismo de la química de la gelación, si la química de la gelación fuera a reaccionar con grupos laterales que esté presentes libres en el factor de crecimiento, tal como las aminas ϵ presentes en las cadenas laterales de la lisina en la proteína).

Entrega de Fármacos desde Hidrogeles Formados Mediante Reacciones por Adición Conjugada (como se describen en WO 00/44808)

Los hidrogeles son particularmente útiles para la aplicación de productos terapéuticos de proteínas. Los hidrogeles son bio-compatibles, y proporcionan un ambiente suave para las proteínas, con el propósito de minimizar la desnaturalización de las proteínas. Las reacciones por adición de conjugados con tioles se utilizan para la producción de geles en la presencia de proteínas, debido a la auto-selectividad de estas reacciones, en comparación con las reacciones por sustitución nucleófila, las reacciones de radicales libres, o las reacciones que envuelven aminas para reactividad. De esta manera, las proteínas se atrapan físicamente adentro de los geles. Adicionalmente, se pueden incorporar segmentos degradables adentro de los polímeros que forman el hidrogel, y por medio de la degradación de los segmentos adentro del gel, las proteínas se liberarán a medida que el gel se degrade. Una modalidad particularmente útil de la invención ocurre en el caso cuando la reacción por adición de conjugados misma lleva a una estructura que es particularmente propensa a la hidrólisis. En la mayoría de los casos, los fármacos de proteínas o productos terapéuticos de peso molecular elevado, tales como oligonucleótidos o genes anti-sentido, se liberan desde los materiales hidrófobos degradables, tales como el ácido poliláctico. Sin embargo, se describen aquí más materiales hidrófilos, tales como polietilenglicol reticulado funcionalizado con tioles, con insaturaciones conjugadas, o ambos. Existen otros ejemplos, incluyendo polietilenglicol foto-reticulado (Pathak y colaboradores, Journal of the American Chemical Society 114:8311-8312, 1992) y polietilenglicol reticulado mediante reacciones por sustitución nucleófila (Zhao y colaboradores, Polymer Preprints 38:526-527, 1997; WO 99/2270; WO 99/34833, y WO 99/14259). La reticulación por medio de químicas por adición de conjugados con tioles exhibe excelente auto-selectividad, en el sentido de que la reacción entre el grupo conjugado y otros grupos, tales como aminas, en proteínas, será bastante lenta. Cuando la proteína que se va a incorporar contiene un tiol libre, éste se hará reaccionar con el sistema del biomaterial, a menos que éste se proteja o haga reaccionar de otra manera. Una ventaja adicional para el uso de biomateriales formados mediante la adición de conjugados con tioles, para encapsular y liberar proteínas surge debido a la química de los grupos generados mediante la reticulación por adición de conjugados. Si el grupo conjugado es un acrilato, entonces en el sistema está presente un éster relativamente inestable. Si el acrilato se sometiera a la reticulación de radicales libres, se ha encontrado que esos geles se degradan solamente muy lentamente a un pH de 7.4 y a 37°C, con un gel que se degrada durante el período de aproximadamente un año. Sin embargo, si el grupo acrilato se hace reaccionar con un tiol, el éster del grupo acrilato se hidroliza con una vida media de aproximadamente 3 semanas, produciendo geles que se degradan durante aproximadamente 3 semanas (como se describe posteriormente). Mientras que en el caso de la reticulación de radicales libres, se deben incluir grupos especiales entre el polietilenglicol y el acrilato, para promover la degradación del gel (tal como oligómeros de ácido poliláctico; Pathak, *supra*), no se requieren grupos especiales entre el acrilato y el polietilenglicol en el caso de la reticulación por adición de conjugados. Uno puede emplear enlazadores más estables entre la insaturación conjugada y el polímero, y entonces incorporar un dominio que sea degradable por hidrólisis, tal como un oligómero de ácido glicólico, ácido láctico, caprolactona ϵ , o carbonato de trimetileno, entre el polímero y la insaturación conjugada, para obtener la degradación del biomaterial mediante la degradación de estos dominios.

Aplicaciones Bio-Médicas para los Hidrogeles (como se describen en WO 00/44808)

Los hidrogeles son materiales poliméricos que se hinchan altamente con agua. Para muchas aplicaciones, los hidrogeles son especialmente útiles. Los hidrogeles son de interés para miríadas de aplicaciones bio-médicas. Estas incluyen, pero no están limitadas a aplicaciones de barreras (preventivos de adhesión, selladores),

dispositivos de aplicación de fármacos, diseño de tejidos y andamios para curación de heridas, materiales para encapsulación y trasplante celular, materiales para el aumento quirúrgico de tejidos, y materiales para selladores y adhesivos. A continuación se da una lista de aplicaciones incompleta pero ilustrativa para los hidrogeles en bio-medicina:

- 5 1. Son preferentes los hidrogeles para la prevención de adhesiones, para minimizar las adhesiones no deseadas postoperatorias u otras adhesiones post-traumáticas. Esas adhesiones pueden ser proteináceas o celulares, o ambas. Por ejemplo, las adhesiones abdominopélvicas postoperatorias pueden llevar a dolor crónico, obstrucción del intestino, e infertilidad. Como un segundo ejemplo, la adhesión no deseada entre las

10 plaquetas de la sangre y la superficie de la pared del vaso sanguíneo después de la angioplastia de globo en el sistema vascular puede llevar a trombosis yestenosis. Los materiales curados *in situ* sobre un sitio quirúrgico puede ser útil para evitar las adhesiones postoperatorias, especialmente cuando estos materiales se degradan durante un período de muchos días a semanas. Los materiales curados *in situ* sobre una arteria lesionada puede ser útil para evitar la trombosis sobre el sitio del trauma vascular asociado con la intervención de

15 catéteres, el despliegue de un stent, o cirugía.
 2. Los hidrogeles como pegamentos o selladores son preferentes para sellar fugas en tejidos que aíslan (fase de gas o líquido) cavidades que contengan fluidos. Algunos ejemplos son los vasos sanguíneos, la piel, el pulmón, la barrera dura, y el intestino. Los materiales pueden ser útiles internamente, por ejemplo, para sellar

20 fugas de aire en el pulmón, y externamente, por ejemplo, para cerrar incisiones en la piel.
 3. Los hidrogeles también pueden ser útiles como dispositivos de aplicación de fármacos localizada. Un fármaco puede ser cualquier molécula biológicamente activa, por ejemplo, un producto natural, fármaco sintético, proteína (tal como factores de crecimiento o enzimas), o material genético. Las propiedades

25 funcionales ese fármaco deben ser conservadas por su portador. El fármaco se puede liberar mediante mecanismos difusivos, o mediante la degradación del portador del gel, a través de una diversidad de mecanismos (tal como hidrólisis o degradación enzimática), o mediante otros mecanismos de detección (por ejemplo, hinchazón inducida por el pH). Dado que muchos fármacos contienen grupos reactivos, es importante que el material que sirve como el portador no reaccione con el material de una manera indeseable; en sí, la alta

30 auto-selectividad de las reacciones entre las insaturaciones conjugadas y los tioles es muy útil en la encapsulación de fármacos. El Ejemplo 29 (ejemplo de referencia) ilustra que proteínas (v.gr., albúmina de suero bovino) pueden ser encapsuladas durante la formación de hidrogeles sin ser modificadas covalentemente por atrapamiento. Adicionalmente, de acuerdo con la invención, las proteínas pueden ser liberadas de los hidrogeles en forma no modificada.

35 La tasa de liberación puede ser optimizada para una aplicación clínica particular. Por ejemplo, enlazadores hidrolizables o sitios de corte de proteasa pueden ser incorporados en los hidrogeles para incrementar la tasa de liberación. Adicionalmente, la tasa de liberación puede ser alterada variando el peso molecular de los polímeros, la concentración de los polímeros, o la funcionalidad de los polímeros usados para formación de hidrogeles.

40 4. Los hidrogeles como andamios son preferentes para el diseño de tejidos y aplicaciones de curación de heridas: regeneración de nervios, angiogénesis, y reparación y regeneración de piel, huesos y cartílagos. Esos andamios se pueden introducir al cuerpo sembrados previamente con células, o pueden depender de la infiltración celular desde afuera del material en los tejidos cerca del biomaterial implantado. Esos andamios

45 pueden contener (a través de enlaces covalentes o no covalentes) moléculas interactivas con células como péptidos de adhesión y factores de crecimiento.
 5. Los hidrogeles también tienen aplicaciones bio-médicas como dispositivos de trasplante celular. Esos dispositivos sirven para aislar células (por ejemplo, aloinjerto o xenoinjerto) del sistema de defensa de un anfitrión (inmuno-protección), mientras permite el transporte selectivo de moléculas tales como oxígeno, dióxido de carbono, glucosa, hormonas, e insulina y otros factores de crecimiento, habilitando así a las células para

50 retener sus funciones normales, y para proporcionar beneficios deseados, tales como la liberación de una proteína terapéutica que se pueda difundir a través de la membrana de hidrogel de inmuno-protección al receptor.
 6. Los hidrogeles pueden responder a su ambiente. Estos se pueden diseñar para incrementar la formación de la red, y de esta manera la unión, entre el gel y el tejido porque cuando se inyectan inicialmente los componentes se originan en agua y son solubles en agua. Después de la transición los estímulos activos (por

55 ejemplo, la temperatura o el pH) uno o ambos precursores se vuelven insolubles en agua, dando un contenido de agua promedio más bajo, y dando como resultado una rigidez incrementada y propiedades mecánicas mejoradas del gel resultante.
- En algunos de estos ejemplos citados anteriormente, es deseable formar hidrogeles terapéuticos en su destino final en el cuerpo. Por lo tanto son de interés los materiales implantables que se pueden inyectar en la fase

60 líquida a un sitio objetivo, en donde éstos se puedan transformar entonces en materiales sólidos. La forma de ese implante puede corresponder con la topografía del tejido, y un implante relativamente grande se puede

aplicar a través de métodos mínimamente invasivos. Frecuentemente, se puede conseguir una buena adhesión al sustrato del tejido subyacente, por ejemplo, por medio de la penetración íntima de los precursores líquidos dentro de la textura en la superficie del tejido, o por medio de la interpenetración de fase para formar una red de polímeros inter-penetrante entre la red de polímeros del biomaterial y los materiales extra-celulares del tejido natural, que también son una red de polímeros. Uno también puede diseñar materiales adicionales para jugar un papel como agente de acoplamiento para mejorar la adhesión. Por ejemplo, uno puede diseñar un agente de acoplamiento hetero-bifuncional con un éster activado (tal como un derivado de éster activado de N-succinimidilo) o un grupo epóxido en un extremo, y una estructura conjugada que reaccione lentamente con las aminas en el otro extremo. Ese agente reaccionaría con las proteínas en la superficie del tejido cuando se aplique a la superficie del tejido, y entonces inmovilizaría los grupos conjugados para incorporación química dentro de la red del biomaterial, durante la polimerización o reticulación. Este paso de tratamiento previo introduciría mediante lo mismo, sobre la superficie del tejido, grupos químicos que pueden participar en la reticulación auto-selectiva entre los dos componentes de la solución precursora final.

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

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

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

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

II. Química de la Reticulación

La química de reticulación aplicable en la presnete invención se divulga en WO 00/44808 y se describe a

continuación.

Como se usa en la presente, el símbolo **P¹** se emplea para indicar la parte de una molécula que se encuentra entre dos sitios reactivos (sentido telequérico) o que se injerta con sitios reactivos (sentido injertado). Con los polímeros telequéricos, **P¹** se encontrará entre dos nucleófilos fuertes, tal como dos tioles, o entre dos insaturaciones conjugadas (por ejemplo, en el caso de un diacrilato de PEG o un ditiol de PEG, **P¹** es una cadena PEG). En el caso de una triquinona o un tritol de PEG, **P¹** es un PEG ramificado de tres brazos. En el caso de un bloque copolimérico de acrilato-(oligómero de ácido láctico)-PEG -(oligómero de ácido láctico)-acrilato o quinona-(oligómero de ácido láctico)-PEG-(oligómero de ácido láctico)-quinona, **P¹** es el copolímero de bloque de (oligómero de ácido láctico)-PEG-(oligómero de ácido láctico). En el caso de un copolímero de injerto (por ejemplo, polilisina-injerto-(acrilato de PEG) o polilisina-injerto-(quinona de PEG), o polilisina- injerto-(tiol de PEG)), en el que la geometría del polímero es como una botella-cepillo con las puntas de las cerdas conteniendo ya sea las insaturaciones conjugadas o el nucleófilo fuerte, **P¹** es polilisina-injerto-(PEG). **P¹** también puede presentar los grupos reactivos en las cadenas laterales: todo polímero que lleve alcoholes o aminas en las cadenas laterales se acrilata fácilmente, por ejemplo, con el propósito de presentar múltiples grupos conjugados insaturados para la reacción por adición de conjugados. Los polímeros que contienen ácidos carboxílicos se pueden derivar para exponer, por ejemplo, grupos de quininas. **P¹** no necesita ser polimérico en el sentido usual de la palabra. Por ejemplo, en el caso del diacrilato o diquinona de etilenglicol, **P¹** es la unidad de etileno. En el caso de un péptido, por ejemplo, YCXXXXXXCY (SEQ ID NO: 1) o CXXXXXXC (SEQ ID NO: 2), en donde C es la cisteína del aminoácido y X e Y son otros aminoácidos, de tal manera que XXXXXX (SEQ ID NO:3), pueda ser una secuencia que funcione como un sustrato para una proteasa tal como collagenasa, **P¹** es XXXXXX. La longitud de XXXXXX o el número de X (por ejemplo, X_n) puede ser cualquier longitud o número (n=0). En el caso del ditiol de 1,2-etileno, **P¹** es el etileno. De esta manera **P¹** es la parte molecular del componente precursor que está interpuesto entre los dos o más grupos reactivos en el componente precursor. Frecuentemente esto es conveniente cuando éste es polimérico u oligomérico, pero en ningún caso es necesario; las moléculas pequeñas también son de interés y uso. Los ejemplos de pequeñas moléculas que se pueden usar incluyen, pero no están limitadas a azúcares reducidos o compuestos análogos tales como manitol, eritritol, pentaeritrol, trimetilolpropano, y glicerol, que pueden estar total o parcialmente acrilatados, o pueden reaccionar con ácido beta-mercaptopropiónico para dar tioles. Los ácidos di- o multicarboxílicos, tales como EDTA, ácido cítrico, ácido succínico, y ácido sebásico, se pueden convertir a quinonas.

Definición de la reacción tipo Michael

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

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

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

Estructuras conjugadas insaturadas

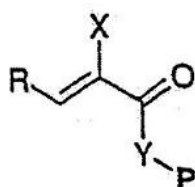
Es posible realizar las reacciones por adición tipo Michael en una amplia variedad de compuestos conjugados insaturados. En las estructuras que se muestran posteriormente, una estructura oligomérica o polimérica se

indica como **P¹**. En la presente también se describen diferentes posibilidades para la identidad específica de **P¹**. **P¹** se puede acoplar a grupos conjugados insaturados reactivos, en estructuras tales como aquellas numeradas del 1 al 20, de esta forma se obtiene el polímero P soluble o disolvente en agua.

En los dibujos se pretende que **P¹** termine con un grupo CH₂, CH o C.

- 5 Los enlaces dobles reactivos se pueden conjugar a uno o más grupos carbonilo en una cetona lineal, estructura de éster o amida (1,2), o a dos en un sistema de anillo, como en un derivado maleico o paraquinoide (3,4,5,6,7,8,9,10). En el último caso el anillo se puede fusionar para dar una naftoquinona (6,7,10) o una 4,7-bencimidazolidiona (8) (Pathak, *supra*), y los grupos carbonilo se pueden convertir a una oxima (9,10). El enlace doble se puede conjugar a un enlace doble de heteroátomo - heteroátomo, tal como una sulfona (11), un sulfóxido (12), un sulfonato o una sulfonamida (13), un fosfonato o fosfonamida (14). Finalmente, el enlace
- 10 doble se puede conjugar a un sistema aromático deficiente en electrones, tal como un ion de 4-vinilpiridinio (15). Se pueden usar enlaces triples en conjugación con enlaces múltiples basados en carbonilo o heteroátomo (16,17,18,19,20).
- 15 Se debe resaltar que las estructuras 1-20 constituyen ejemplos para el polímero P, los cuales pueden, en otro orden, reaccionar con el enlazador de la presente invención en una reacción de adición conjugada a la forma de los componente del precursor de la presente invención, y de otra forma reticular por una reacción de adición conjugada o un mecanismo de reacción radical a la forma de un biomaterial de la presente invención.

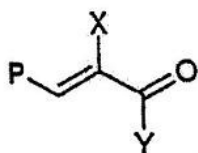
Estructuras Químicas:



1

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

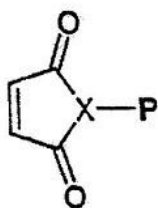
W = cadena alifática lineal C1-C5



2

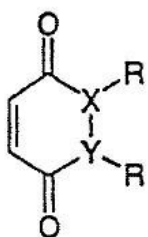
X = CN, COOW Y = OW, Ph

W = cadena alifática lineal C1-C5



3

X = N, CH

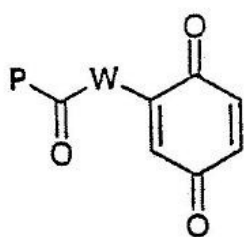


4

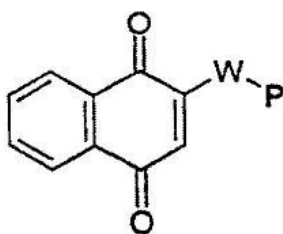
A $X = CH$ $Y = CH$ $R = H, W-P$ ($W = NH, O, \text{nada}$)

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

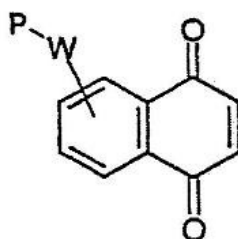
C $X - Y = C=C$ $R = W-P$ ($W = NH, O, \text{nada}$)



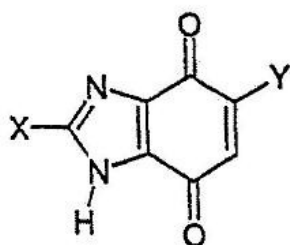
5



6

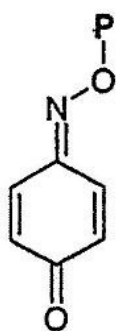


7

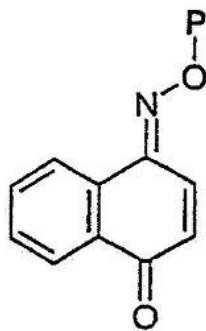


8

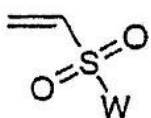
$X, Y = H, P$
 P, P
 P, H
 $P, \text{cadena alifática}$



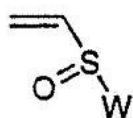
9



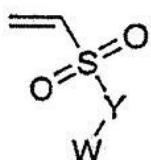
10



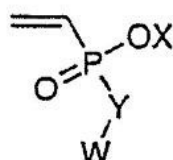
11



12

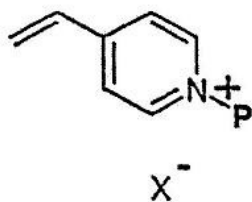


13



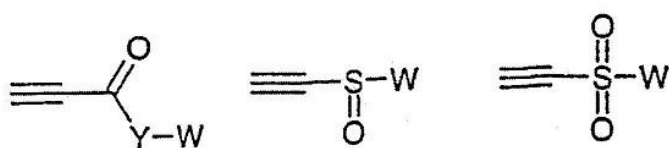
14

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



15

X = halógeno, sulfonato



16

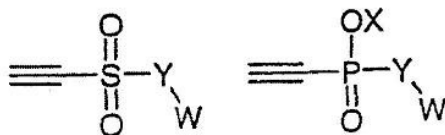
17

18

Y = O, NH

X = ión de metal alcalino
a alcalino térreo, P

W = P, 1,4-Ph-



19

20

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

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

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

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

P¹ se puede colocar en posiciones en donde éste no reduzca la reactividad del grupo insaturado, esto es, en la parte opuesta del anillo (3,5), en otro anillo (7,8) o enlazado a O a través de una mono-oxima de para-quinona (9,10). **P¹** también se puede enlazar al enlace doble reactivo (6,8), si se va a disminuir la velocidad de adición nucleófila.

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

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

La formación de agregados ordenados (liposomas, micelas) o la separación de fase simple en ambiente de agua, incrementa la concentración local de grupos insaturados, y en consecuencia la velocidad de la reacción. En este caso, lo último depende también del coeficiente de separación de los nucleófilos, que se incrementa para las moléculas con carácter lipófilo mejorado.

Nucleófilos

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

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

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

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

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

Los grupos nucleófilos pueden estar contenidos en moléculas con gran flexibilidad en su estructura global. Por ejemplo, se puede presentar un nucleófilo difuncional en la forma de Nuc-P¹-Nuc, en donde P¹ se usa en el sentido descrito en la presente, y Nuc se refiere al nucleófilo. De la misma manera, un polímero ramificado P¹ se puede derivar con un número de nucleófilos para crear P¹-(Nuc)_i, donde i=2 sería útil. Nuc no se necesita desplegar en los términos de cadena de P¹, por ejemplo, se puede contemplar una estructura de repetición: (P¹-Nuc)_i, en donde i=2 sería útil. Claramente, no todos de los P¹ o de Nuc en esa estructura no necesitan ser idénticos. Solamente es necesario que un precursor nucleófilo contenga más que o igual a dos de esos grupos Nuc.

De la misma manera, se pueden formar estructuras similares de P¹ y los grupos conjugados insaturados descritos en detalle anteriormente. Únicamente es necesario que un precursor conjugado insaturado contenga más que igual a dos de esos grupos conjugados insaturados.

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

En la práctica, es conveniente y útil que uno o más de los componentes precursores sea polimérico en el sentido usual de la palabra. En estos casos, P¹ pueden ser polímeros hidrófilos sintéticos, líquidos poliméricos hidrófobos sintéticos, polímeros hidrofóbicos sintéticos que sean solubles en solventes de toxicidad aceptable o influencia biológica para la aplicación contemplada, proteínas o péptidos bio-sintéticos, proteínas naturalmente ocurrientes o proteínas procesadas naturalmente ocurrientes, o polisacáridos.

65 Polímeros Hidrófilos

En las modalidades preferidas, el polímero sintético **P¹** puede ser poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), alcohol poli(etilen-co-vinílico), ácido poli(acrílico), ácido poli(etilen-co-acrílico), poli(etil-oxazolina), poli(vinilpirrolidona), poli(etilen-co-vinil-pirrolidona), ácido poli(maleico), ácido poli(etilen-co-maleico), poli(acrilamida), o copolímeros de bloque de óxido de poli(etileno)-óxido de co-poli(propileno). Esta no es una lista

5 detallada puesto que también se pueden usar otros polímeros hidrófilos. **P¹** también pueden ser copolímeros, copolímeros de bloque, copolímeros de injerto, o copolímeros aleatorios. Los bloques, que se polimerizan en los extremos de los polímeros hidrófilos, pueden estar compuestos de, por ejemplo, ácido láctico, ácido glicólico, épsilon - caprolactona, oligómeros de ácido lacti-co-glicólico, carbonato de trimetileno, anhídridos, y aminoácidos, por ejemplo, para conferir degradabilidad por medios hidrolíticos o

10 enzimáticos. Esta lista no es detallada; también se pueden usar otros oligómeros para los copolímeros de bloque.

Los copolímeros aleatorios se pueden basar en alcohol vinílico, tal como alcohol poli(N-vinilpirrolidon-co-vinílico) o alcohol poli(etilen-co-vinílico), con diferentes composiciones, se pueden derivar con grupos conjugados insaturados, tales como acrilatos, benzoquinonas, naftoquinonas y otros. Los copolímeros de alcohol vinílico se pueden funcionalizar con grupos (CH₂)_nCOOH, mediante la reacción con ácidos ω-bromo-carboxílicos. Los polímeros resultantes o copolímeros de ácido acrílico o metacrílico se pueden usar para la

15 unión de los grupos quinona. La composición de co-monómeros y el grado de funcionalización no tienen influencia dramática en las velocidades de reacción, a menos que éstos determinen la solubilidad o la transición de fase. Por otra parte, éstos determinan las propiedades mecánicas finales.

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

Proteínas y proteínas bio-sintéticas

25 **P** puede ser una proteína. La proteína puede ser una proteína naturalmente ocurrente o recombinante. En términos generales, las proteínas recombinantes son material de aminoácidos de cualquier longitud, generado a través de tecnología de ADN recombinante. Los ejemplos de los componentes que éstos pueden tener incluyen secuencias de péptidos que codifican los sitios de degradación para las proteasas, secuencias de péptidos para

30 También puede ser **P¹** cualquier proteína naturalmente ocurrente. Más específicamente, una proteína naturalmente ocurrente está compuesta de muchos **P¹**s que están separados por nucleófilos. Por ejemplo, albúmina de suero, una proteína de 584 aminoácidos, contiene 5.7 por ciento de cisteína, 9.9 por ciento de lisina, y 3.1 por ciento de tirosina. Las secuencias de aminoácidos que ocurren entre, por ejemplo, cisteína, tirosina y lisina, conforman distintos **P¹**s. Aunque la albúmina en su estado natural puede ser menos que útil

35 para los propósitos de reticulación mediante reacciones por adición de conjugados entre insaturaciones conjugadas y tioles en la proteína, la albúmina se puede procesar rápidamente mediante reducción, con el propósito de formar un poli(aminoácido) con algunos o todos sus residuos de cisteína libres, o ésta se puede derivar químicamente para introducir múltiples grupos tiol.

40 Péptidos

En algunos casos, **P¹** puede ser un péptido o un polipéptido, en donde el nucleófilo es la cisteína de aminoácido, que da como resultado los péptidos de estructuras similares a H₂N-CXXXXXXCXXXXXXC-COOH (SEQ ID NO: 4) o H₂N-CXXXXXXC-COOH (SEQ ID NO: 5), en donde es la representación de una letra de la

45 cisteína, y X representa cualquier aminoácido excepto cisteína, en una modalidad, o Acetil-NH-YXXXXXXYXXXXXXY-COOH (SEQ ID NO: 6), en donde Y es la representación de una letra de la tirosina, y X representa cualquier aminoácido excepto cisteína o tirosina, en otra modalidad. La longitud de XXXXX (SEQ ID NO: 7) o el número de X (por ejemplo, X_n) puede ser de cualquier longitud o número (n=0). Es particularmente útil cuando las secuencias en los dominios que se muestran como XXXXX anteriormente, son sustratos para las

50 enzimas que están envueltas en la migración de células (por ejemplo, como sustratos para enzimas tales como colagenasa, plasmina, o elastasa), aunque no se deben limitar los dominios a éstos. En los ejemplos se describe una de esas secuencias particularmente útil, como un sustrato para la enzima plasmina. Se puede aprender una diversidad de esos péptidos por un estudio de la literatura de estas enzimas. Por ejemplo, ese estudio muestra sitios de sustrato para la importante plasmina de proteasa (Tabla 1; SEQ ID NOS: 8-24):

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

Sitios de Arginilo							
P3	P2	P1	P1=	P2=	P3=	Cadena y sitio Fg	Referencia
G	P	R+	V*	V*	E-	α 19	3
N	N	R+	D-	N	T	α 104	2.4

Y	N	R+	V*	S	E-	α_{110}	2
Q	M*	R+	M*	E-	L*	α_{239}	1
G	F*	R+	H+	R+	H+	α_{491}	5
G	Y	R+	A*	R+	P	β_{42}	2.3

Sitios de Lisilo							
Y	Q	K+	N	N	K+	α_{78}	3
L*	I*	K+	M*	K+	P	α_{206}	1.2
N	F*	K+	S	Q	L*	α_{219}	1
E-	W	K+	A*	L*	T	α_{230}	1
S	Y	K+	M*	A*	D	α_{583}	5
T	Q	K+	K+	V*	E-	β_{53}	3
R+	Q	K+	Q	V*	K+	β_{130}	2
Q	V*	K+	D-	N	E-	β_{133}	4
L*	I*	K+	A*	I*	Q	γ_{62}	4
T	L*	K+	S	R+	K+	γ_{85}	2.3
S	R+	K+	M*	L*	E-	γ_{88}	2

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

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

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

Dado que la plasmina es una enzima importante en la migración de células y remodelación de tejidos/coágulos, estos sustratos o partes de estos sustratos representan secuencias útiles adentro de los sitios indicados anteriormente como XXXXX en P¹.

De la misma manera, la collagenasa es una enzima importante en la migración de células y la remodelación de tejidos. Un estudio de la literatura sobre la collagenasa indica también una diversidad de sitios de sustrato, que representan identidades útiles para XXXXX en P¹ (Tabla 2; SEQ ID NOS: 25-31):

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

P3	P2	P1	P1=	P2=	P3=	Tipo y sitio de Colágeno	Ref.
P	Q	G	I*	A*	G	Becerro y pollo $\alpha 1$ (I): cartílago humano $\alpha 1$ (II)	6

P	Q	G	L*	L*	G	Becerro α 2 (I)	6
P	Q	G	I*	L*	G	Pollo α 2 (I)	6
P	Q	G	L*	A*	G	Pollo α 2 (I): piel humana α 1 (III)	6
P	L*	G	I*	A*	G	Hígado humano α 1 (III)	6
P	L*	G	L*	W	A*	Humano	7
P	L*	G	L*	A*	G	Humano	8

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

5

El uso de los sitios de degradación de enzimas adentro de P^1 , ya sea en el componente precursor de nucleófilo (más fácilmente, puesto que se puede usar la cisteína en la secuencia para proporcionar un tiol como un nucleófilo), o como el componente precursor conjugado insaturado, es que la velocidad de resorción o remodelación del biomaterial puede estar ligada a la velocidad y el progreso de la curación, por ejemplo, como se indica por la infiltración celular.

10

Es particularmente poderoso notar que la velocidad de la resorción del biomaterial se puede modular por medio de ajustes a la secuencia de oligopéptidos, con el propósito de alterar el K_m y el k_{cat} del sitio de sustrato. Por ejemplo, un estudio de la literatura sobre la enzimología de los sitios de sustrato de la colagenasa muestra que es posible ajustar la velocidad de degradación de los sustratos por medio del diseño de la secuencia de los sustratos (Tabla 3: SEQ ID NOS: 32-38):

15

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

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

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

Aceleradores

25

Se hace referencia a los nucleófilos que reaccionan de manera deficiente como teniendo una vida media de pseudo primer orden de más de aproximadamente 15 minutos (con el grupo conjugado insaturado presente en exceso; las reacciones más lentas pueden ser útiles en algunas circunstancias médicas), a un pH generalmente definido como un pH de más de 5 y menos de 9, y a una temperatura mayor que 25°C y menor que 40°C. Se hace referencia a los iniciadores de radicales como moléculas orgánicas o solubles en agua que experimentan la escisión espontánea homolítica, térmica o foto-químicamente iniciada, de los enlaces de carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo, para producir radicales basados en carbono o heteroátomo. Se debe entender que el uso de esos iniciadores de radicales como aceleradores, aunque no se prefiere, es superior a la polimerización, en el sentido de que la concentración de radicales libres que se emplea puede ser mucho más baja. La velocidad de adición de nucleófilos que reaccionan deficientemente a los grupos conjugados insaturados se puede mejorar mediante la presencia de sustancias aceleradoras; estas pueden ser iniciadores

30

de radicales, foto-sensibilizadores; (solos o en combinación con iniciadores de radicales; Pathak, *supra*), ácidos Lewis de bajo peso molecular (Pathak, *supra*), catalizadores de estado sólido caracterizados por la acidez Lewis, o por la presencia de iones de amonio cuaternario, tales como una resina de Amberlyst (Pathak, *supra*), o receptores de enlace de hidrógeno, basados en urea N,N-disustituida o estructuras peptídicas (Pathak, *supra*). En el último caso, el mecanismo de aceleración se basa en la estabilización mediante el enlace de hidrógeno del estado de transición parecido a enolato, después del ataque del nucleófilo en la olefina conjugada; con este propósito se pueden usar anti-cuerpos hechos a la medida (Pathak, *supra*).

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

III. Formación de la red de polímeros

La formación de la red de polímeros aplicable en la presente invención se divulga en WO 00/44808 y se describe a continuación.

Funcionalidad

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

Los monómeros descritos son de dos clases, que cuando se hacen reaccionar juntas forman un biomaterial lineal o reticulado. Se requiere que ambas clases de monómeros se mezclen juntas para que ocurra la reticulación (inmediatamente a continuación se describen diferentes planteamientos para mezclado). Una clase de monómero contiene 2 o más grupos conjugados insaturados (por lo tanto, una funcionalidad de 2 o más), de preferencia conjugados. La otra clase de monómero contiene 2 o más nucleófilos (por lo tanto, una funcionalidad de 2 o más), de preferencia nucleófilos que son nucleófilos más fuertes que otros presentes como otros componentes del sistema, por ejemplo, tioles cuando se comparan con aminas que pueden estar presentes como componentes deseablemente no reactivos del sistema.

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

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

Cuando se está incorporando un fármaco en el laboratorio o en una línea de fabricación, entonces existe gran flexibilidad en la selección de este solvente orgánico, puesto que cuando menos se removerá la mayoría de éste antes de que se proporcione el implante al sujeto. Cuando se está formando un material en la piel, entonces también existe mucha de la flexibilidad, debido a la baja toxicidad a la piel de muchos solventes orgánicos, incluyendo NMP, acetona, etanol, isopropanol, y acetato de etilo. Cuando se está formando un material en el cuerpo, entonces la lista de solventes aceptables es considerablemente más pequeña, y está dominada por las preocupaciones de toxicidad. En esos casos, la NMP es un solvente orgánico particularmente

favorable. La toxicidad del sistema de solventes también se puede modular mediante el empleo de un sistema de solventes mezclados, que comprenda el solvente orgánico y agua, para reducir la concentración global de solvente orgánico, pero que todavía proporcione buena solubilidad o dispersabilidad en el sistema de solventes mezclados.

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

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

25 **Aplicaciones médicas**

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

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

35 2. La reacción debe ser suficientemente auto-selectiva, con consideraciones de auto-selectividad que incluyan las siguientes. Para la formación de geles en la presencia de fármacos que contengan aminas, o en donde es indeseable la reacción con componentes celulares y tejidos, la insaturación conjugada debe reaccionar muy lentamente con las aminas al pH de aplicación de la solución precursora final. De preferencia, se desea una
40 velocidad de reactividad de la insaturación conjugada para el nucleófilo de reactividad intencional a la amina, en este caso el nucleófilo de reactividad no intencional o indeseable, en exceso de diez y más, de preferencia aún más alta. Típicamente, el planteamiento de la adición tipo Michael entre insaturaciones conjugadas y tioles no será útil para fármacos que contengan ellos mismos insaturaciones de conjugados o tioles. Las excepciones incluyen casos cuando la reactividad del grupo sobre el fármaco es considerablemente menor que la reactividad
45 sobre el grupo correspondiente en el precursor del biomaterial, y casos cuando esas reacciones no son dañinas, por ejemplo, cuando el injerto a la red del biomaterial no es dañina.

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

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

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

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

65 **Bio-funcionalidad adicional**

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

Péptidos de adhesión

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

Tabla 4: Secuencias del Dominio de enlace Celular de las Proteínas de Matriz Extra-Celular

Proteína	Secuencia	Papel
Fibronectina	RGDS	Adhesión de la mayoría de las células, por medio de $\alpha_5\beta_1$
	LDV	Adhesión
	REDV	Adhesión
Vitronectina	RGDV	Adhesión de la mayoría de las células, por medio de $\alpha_5\beta_1$
Laminina A	LRGDN	Adhesión
	IKVAV	Extensión de neurita
Laminina B1	YIGSR	Adhesión de muchas células, por medio del receptor de laminina 67 kD
	PDSGR	Adhesión
Laminina B2	RNIAEIIKDA	Extensión de neurita
Colágeno I	RGDT	Adhesión de la mayoría de las células
	DGEA	Adhesión de plaquetas, otras células
Trombospondina	RGD	Adhesión de la mayoría de las células
	VTXG	Adhesión de plaquetas

Según Yamada, Y., y Kleinman, H.K., Curr. Opin. Cell Biol 4:S19,1992.

Estos péptidos son potencialmente útiles para el control de una diversidad de reacciones celulares, tal como la unión de células, la migración y el crecimiento excesivo sobre una superficie del material (especialmente cuando el material no es degradable o se degrada lentamente), la migración celular a través de un material (esencialmente cuando el material es más fácilmente degradable mediante la incorporación de los sustratos de proteasa dentro de uno de los dos componentes precursores), y la inducción de fenotipos celulares particulares (por ejemplo, el estímulo a un macrófago para liberar los factores de crecimiento benéficos, pero no para formar las células gigantes de un cuerpo extraño). Los péptidos que se muestran en la Tabla 5 (SEQ ID NOS: 50-57) se fijan a los receptores superficiales de la célula que son glico-proteínas. Existen otras de estas secuencias de péptidos que se fijan a los proteoglicanos que contienen sulfato de heparina y sulfato de condroitina de la superficie de la célula, que se llaman péptidos fijadores de heparina familiar. Estos también se pueden incorporar para conferir adhesión celular por medio de la enlace a estos componentes de la superficie de la célula.

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

Proteína	Secuencia*
<u>x</u> BB <u>x</u> B <u>x</u> *	Secuencia de consenso
PR <u>R</u> AR <u>V</u>	Fibronectina
YE <u>K</u> PGSP <u>P</u> RE <u>V</u> VP <u>R</u> PR <u>P</u> GV	Fibronectina
<u>R</u> PSLA <u>K</u> Q <u>R</u> FR <u>H</u> NR <u>K</u> GY <u>R</u> SQ <u>R</u> G <u>H</u> S <u>R</u> G <u>R</u>	Vitronectina
<u>R</u> IQNLL <u>K</u> ITNL <u>R</u> I <u>K</u> F <u>V</u> <u>K</u>	Laminina
<u>K</u> (β)FA <u>K</u> LAAR <u>L</u> Y <u>R</u> KA	Anti-trombina III
<u>K</u> H <u>K</u> GRDVIL <u>K</u> <u>K</u> D <u>V</u> <u>R</u>	Molécula de adhesión de la célula neuronal
<u>Y</u> <u>K</u> <u>K</u> I <u>I</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u>	Factor 4 de la plaqueta

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

*x indica un aminoácido hidrófobo. Los aminoácidos básicos se muestran subrayados.

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

Péptidos de enlace del Factor de Crecimiento

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

Sitios de enlace de Ion de Metal

Los sitios de afinidad a iones de metal, tales como cationes de metal divalentes, pueden también ser incorporados en biomateriales, como se describe en el Ejemplo 28, el cual constituye un ejemplo de acuerdo con la presente invención. Sitios de enlace de metal ejemplares incluyen ácidos iminodiacéticos y péptidos que contienen uno o mas residuos histidina contiguos o aglomerados. Estos sitios de enlace de ion de metal pueden ligar metales que entonces interactúan con proteínas de enlace de metal deseadas. Esta asociación de las proteínas de enlace de metal con sitios de afinidad en biomateriales puede facilitar la encapsulación y la retención de proteínas de enlace de metal (v.gr., hormona del crecimiento humana) dentro de los biomateriales de la presente invención. El sitio de enlace de ion de metal acoplado sirve como una ramificación de enlace para ligar fármacos de proteína con esa afinidad de enlace de ion de metal.

Sitios de enlace de Carbohidratos

De manera similar, los grupos que ligan carbohidratos pueden incrementar la afinidad de los biomateriales a las glico-proteínas. Ejemplos de grupos que ligan carbohidratos incluyen fracciones ácido borónico tales como ácido fenilborónico (Ejemplo 28). De interés particular son las fracciones de ácido fenilborónico que ligan residuos de carbohidratos al pH fisiológico, tales como las mostradas en el Ejemplo 28.

Liberación controlada de compuestos farmacéuticamente activos ligados de manera covalente

De acuerdo con la presente invención, se han desarrollado métodos y compuestos para la unión covalente de compuestos farmacéuticamente activos a biomateriales y su liberación subsecuente. Se han desarrollado enlazadores que tienen cualidades que facilitan el acoplamiento a biomateriales y de preferencia promueven la eventual liberación del compuesto farmacéuticamente activo original, no modificado. Los biomateriales o compuestos precursores de biomateriales a que pueden unirse los compuestos farmacéuticamente activos son adecuados para colocación en muchos sitios dentro del cuerpo de un animal.

Los sistemas de la presente invención son similares a los sistemas tipo IVb en los cuales se añade a un fármaco un grupo polimerizable por radicales libres, con polimerización por radicales libres subsecuente del fármaco solo o con otros co-monómeros para formar un material (Baker, *supra* y Duncan y colaboradores, *supra*). Sin embargo, los grupos de la presente invención pueden ser polimerizados ya sea por reacciones de adición conjugada o por polimerización por radicales libres. Como en otros sistemas tipo IVb, se usa una molécula enlazadora para conectar un fármaco a un grupo activo en un polímero.

En contraste con las reacciones de sustitución nucleófila usadas por otros para acoplar un fármaco a un polímero, los métodos de la presente invención implican una reacción de adición conjugada entre un compuesto farmacéuticamente activo o un compuesto farmacéuticamente activo modificado y un grupo insaturado conjugado adicionadas a un polímero. Las reacciones de adición conjugada, que han sido descritas antes, son un sub-conjunto de las reacciones de adición nucleófila, y de esta manera son químicamente distintas de la reacción de sustitución nucleófila usada por otros. En reacciones de adición conjugada, no hay grupo que sale, como se requiere para las reacciones de sustitución nucleófila, y un nucleófilo se añade mediante un enlace doble o triple. La alta auto-selectividad de las reacciones de adición conjugada en comparación con las reacciones de sustitución nucleófila es ventajosa para la aplicación de este método a la formación *in situ* de biomateriales en presencia de moléculas biológicas sensibles.

El proceso aquí descrito implica el acoplamiento de una molécula enlazadora a un alcohol o amina en el compuesto farmacéuticamente activo mediante un enlace éster o amida, donde la molécula enlazadora presenta entonces un grupo químico útil en reacciones de adición conjugada. Después del acoplamiento del compuesto farmacéuticamente activo a un polímero mediante una reacción de adición conjugada, un tioéter o una amina secundaria está presente en la molécula enlazadora cerca del éster o amida carbonilo que une el enlazador al compuesto farmacéuticamente activo. La vida media a temperatura y pH fisiológico de este éster o amida es mucho mas larga que las vidas medias de muchos de los eslabones previamente descritos para entrega de fármacos a partir de biomateriales; sin embargo, la vida media de este enlace será mas corta que la vida media de un éster completamente alifático o amida debido al tioéter. Estas tasas de liberación terapéuticamente relevantes son un importante aspecto de la invención, pues la mayoría de los pro-fármacos que han sido previamente descritos han demostrado vidas medias en condiciones fisiológicas del orden de horas, mientras que muchos de los compuestos de la presente invención tienen enlaces en la ramificación farmacéuticamente activa o entre la ramificación farmacéuticamente activa y el polímero que hidrolizan en cuestión de semanas o meses. Tal mejora puede permitir la incorporación de mayores cantidades de compuesto farmacéuticamente activo dentro de los biomateriales, y puede alargar el tiempo durante el cual el biomaterial libera el compuesto farmacéuticamente activo.

Los compuestos farmacéuticamente activos pueden contener una variedad de grupos químicos, algunos de los cuales son nucleófilos y algunos de los cuales son electrófilos. En términos de estabilidad de fármaco, los grupos altamente reactivos son típicamente inpreferentes, y de esta manera rara vez se encuentran grupos altamente reactivos en los compuestos farmacéuticamente activos. Muchos ejemplos de compuestos farmacéuticamente activos pueden encontrarse que no contienen grupos nucleófilos distintos de los alcoholes. La reactividad de estos grupos alcohol es generalmente tan baja que el acoplamiento del compuesto farmacéuticamente activo a un material es un reto. Se requerirían largos tiempos de reacción, y cualesquiera reacciones en competencia serían sumamente problemáticas debido a que la purificación de un complejo de

compuesto farmacéuticamente activo y polímero sería sumamente difícil. Las técnicas de separación que son comúnmente usadas en química fueron desarrolladas para moléculas relativamente pequeñas y no son muy efectivas con polímeros debido a su elevado peso molecular. La mayor pureza que puede obtenerse para una ramificación farmacéuticamente activa acoplada a un enlazador en comparación con un polímero acoplado a un enlazador es importante para el uso clínico de compuestos precursores o biomateriales hechos a partir de estos compuestos, pues las impurezas remanentes pueden ocasionar efectos secundarios inpreferentes en mamíferos. De esta manera, pueden lograrse diversas ventajas convirtiendo un solo alcohol en el compuesto farmacéuticamente activo a un tiol o amina usando un enlazador. En el caso de oligonucleótidos o péptidos, esto puede ser bastante simple, pues el grupo que contiene tiol puede ser fácilmente añadido durante la síntesis de la molécula. En el caso de moléculas orgánicas, esto requiere de mas esfuerzo, pero es a menudo factible. Las modificaciones a la síntesis de un compuesto farmacéuticamente activo particular, especialmente uno que ya ha pasado aprobación regulatoria gubernamental, es altamente indeseable. De preferencia, cualquier modificación llevada a cabo para acoplar un compuesto farmacéuticamente activo en un biomaterial es realizada en una manera tal que el compuesto farmacéuticamente activo original es eventualmente regenerado por la hidrólisis del enlace éster o amida en la ramificación farmacéuticamente activa. Debido a que ciertos compuestos farmacéuticamente activos retienen su actividad terapéutica después de modificación de un grupo reactivo, tal como un alcohol o amina, los biomateriales que liberan compuestos con tales modificaciones pueden ser también terapéuticamente útiles.

La presente invención convierte un alcohol o amina en el compuesto farmacéuticamente activo a un grupo tiol o amina mas reactivo. Debido a la nucleofilicidad superior del grupo tiol en comparación con un grupo amina y debido a que los grupos amina son a menudo encontrados en compuestos farmacéuticamente activos, un enlazador que contiene un grupo tiol es deseable sobre uno que contiene un grupo amina. Sin embargo, en algunos casos, la presencia de una amina en vez de un tiol en el enlazador puede dar una tasa de liberación mas deseable del compuesto farmacéuticamente activo. Los métodos descritos en la presente incluyen añadir una molécula enlazadora al compuesto farmacéuticamente activo, mas que al biomaterial o el polímero. La naturaleza química de esta molécula enlazadora puede ser bastante diversa, pero consiste en la estructura general $R_1\text{-COOH}$ antes de reacción con el compuesto farmacéuticamente activo, donde R_1 es una ramificación orgánica que no contiene un grupo sustancialmente nucleófilo o electrófilo. Esta molécula que contiene ácido carboxílico es entonces condensada con un alcohol o amina a partir del compuesto farmacéuticamente activo.

En un caso, un átomo de azufre o nitrógeno reactivo está contenido dentro del grupo R_1 , y mediante el uso de químicas de desprotección adecuadas puede entonces generarse un tiol o una amina libres. En otro caso, R_1 es $\text{CH}_2=\text{CH-}$, que puede reaccionarse con una segunda molécula enlazadora de la estructura $R_2\text{-SH}$ o $R_2\text{-NH}_2$. Un átomo de azufre o nitrógeno pobremente reactivo está incluido en R_2 , y mediante el uso de químicas de desprotección adecuadas puede generarse un tiol o una amina libres. La unión de la molécula enlazadora es entonces seguida por purificación extensa, lo que no sería posible si los compuestos farmacéuticamente activos estuvieren unidos directamente a un biomaterial o polímero. De manera adicional, la unión de tales enlazadores puede ser incorporada en la síntesis global de un compuesto farmacéuticamente activo, mas que ocurra después de la síntesis completa del compuesto. De manera adicional, pueden diseñarse nuevos compuestos farmacéuticamente activos, con base en las estructuras de compuestos farmacéuticamente activos existentes, que son mas fácilmente unidos a un polímero usando los métodos descritos en la presente, pero que tengan farmaco-cinéticas similares al compuesto original.

Unión de compuestos farmacéuticamente activos a enlazadores que contienen tiol o amina

En un método de la invención, un compuesto farmacéuticamente activo cuyo carácter nucleófilo consiste en la presencia de aminas, alcoholes o nucleófilos mas débiles, se reacciona de modo que los grupos amina sean protegidos contra reacción adicional usando técnicas estándar. Un grupo alcohólico en el compuesto farmacéuticamente activo protegido o un compuesto farmacéuticamente activo que contiene solamente grupos alcohólicos reactivos es objetivado para reacción adicional con un derivado de un ácido mercaptopropiónico o ácido mercaptoacético en el cual el grupo mercapto es protegido o ácido aminopropiónico o glicina en el grupo amina sean protegidos. Un enlace éster es formado condensando el ácido carboxílico en compuesto que contiene tiol o amina protegido con el alcohol en el compuesto farmacéuticamente activo. El grupo protector en el grupo amina o mercapto y los grupos protectores, si los hay, en la ramificación farmacéuticamente activa, son entonces removidos usando técnicas estándar. Este producto es entonces reaccionado con un polímero soluble en agua contenido los grupos insaturados conjugados como se describe mas adelante en mayor detalle. En un método relacionado, un compuesto farmacéuticamente activo conteniendo una amina primaria o secundaria libre puede reaccionarse como se describió antes para formar un compuesto que contiene amida que puede unirse a un polímero.

Unión de compuestos farmacéuticamente activos a derivados acrilóilo

En otro método, un derivado acrilóilo, tal como ácido acrílico, es reaccionado con un alcohol en un compuesto farmacéuticamente activo, que puede contener grupos amina protegidos, para producir un éster. De manera alternativa, los derivados acrilóilo pueden reaccionarse con una amina en el compuesto farmacéuticamente activo para producir una amida. El acrilato resultante en el compuesto farmacéuticamente activo es entonces reaccionado con una molécula enlazadora conteniendo un tiol o una amina libres y un tiol o una amina

protegidos. El grupo protector en el tiol o la amina de la molécula enlazadora puede ser removido, y este tiol o amina puede entonces reaccionarse con un polímero soluble en agua conteniendo dos o mas grupos insaturados conjugados.

5 *Papeles llevados a cabo por los enlazadores*

Un aspecto importante de la invención es que los grupos tiol o amina en el enlazador provean una función dual. Primero, los grupos permiten una reacción rápida y cuantitativa con un polímero vía una reacción de adición conjugada, de modo que el compuesto farmacéuticamente activo pueda ser acoplado al polímero. Segundo, la presencia de un tioéter cerca del enlace éster o amida que une el compuesto farmacéuticamente activo al enlazador acrecienta la tasa de hidrólisis del enlace, con relación a un éster o amida alifático simple. Típicamente, se espera que un éster completamente alifático tenga una vida media de hidrólisis en agua amortiguada a un pH de 7.4, 37°C del orden de años, debido a la hidrofobicidad de la cadena alifática. Si se une un grupo acrilato al polietilenglicol vía un éster, el acceso incrementado de agua al enlace éster del acrilato reduce la vida media en agua amortiguada a un pH de 7.4, 37°C a alrededor de tres meses. De manera similar, si un grupo acrilato unido a un polietilenglicol es reaccionado con un compuesto que contiene tiol, el tioéter resultante cerca del éster reduce la vida media de la hidrólisis a aproximadamente tres semanas. Los compuestos de la invención que tienen la fórmula $D-O_2C-(CH_2)_n-SH$ tienen una vida media de aproximadamente cuatro días cuando n es 1 y 18 días cuando n es 2. Los compuestos que contienen amida correspondientes tienen una vida media mas larga, aproximadamente cuatro veces mas larga que los ésteres, lo que es clínicamente relevante. De manera adicional, se sabe que un tiol unido al carbono alfa con relación a un enlace éster tiene una vida media a un pH de 7.4, 37°C de aproximadamente cuatro días (Nicolaou y colaboradores, patente US 5,817,840). Los compuestos que tienen la fórmula $D-O_2C-(CH_2)_n-NH$ tienen una vida media de alrededor de cuatro meses. En términos de la entrega de compuestos farmacéuticamente activos, el programa de dosificación deseable para la administración a un mamífero de componentes precursores de un biomaterial o un biomaterial no es mas de una vez al día, de preferencia alrededor de una vez por semana a una vez por mes. De esta manera, una vida media de hidrólisis de entre una hora y un año, de preferencia entre un día y nueve meses, con mayor preferencia entre dos días y seis meses, y con la mayor preferencia entre cuatro días y tres semanas, es deseable para aplicaciones clínicas.

De manera adicional, un enlazador altamente soluble en agua puede facilitar la reacción del compuesto farmacéuticamente activo modificado con un polímero incrementando la solubilidad del compuesto modificado. Si el enlazador es hidrófilo, el enlazador puede incrementar la tasa de liberación del compuesto farmacéuticamente activo exponiendo el enlace hidrolizable al agua. Si el enlazador es hidrófobo, el enlace puede ser removido del ambiente del agua, y la hidrólisis puede ser mas lenta. Si el enlazador contiene un grupo nucleófilo tal como una amina, entonces el nucleófilo puede reaccionar con el enlace éster o amida que acopla el compuesto farmacéuticamente activo al polímero, y de esta manera puede acelerar la liberación del compuesto farmacéuticamente activo original, no modificado. De manera adicional, el enlazador puede comprender uno o mas aminoácidos, un péptido degradable enzimáticamente, un sitio de adhesión, un sitio de enlace de factor de crecimiento, un sitio de proteasa, una ramificación hidrocarburo, o una secuencia de péptido para objetivación a un sitio deseado.

Compuestos farmacéuticamente activos modificados que contienen un tiol o una amina libres

En adición a moléculas orgánicas que ocurren naturalmente o sintetizadas, ADN terapéutico, ARN, péptidos, o proteínas pueden ligarse covalentemente dentro del biomaterial, como se describió antes. De manera adicional, el ADN, ARN, péptido o proteína puede ser modificado de modo que tenga un solo tiol libre, que es entonces reaccionado directamente con un polímero soluble en agua que contiene grupos insaturados conjugados múltiples y el producto es reticulado. En este caso, que constituye una alternativa al método de la invención usando un enlazado, los compuestos farmacéuticamente activos originales no son regenerados; sin embargo, la modificación de ADN, ARN, péptido y terapias a base de proteínas es mucho mas común y aceptable que la modificación de productos farmacéuticos tradicionales. La modificación al ADN, ARN, péptido o proteína usualmente no afecta la actividad de la molécula si la modificación es realizada en un sitio en la molécula que está distante del sitio activo.

En el caso de péptidos o de oligonucleótidos, un tiol o una amina pueden añadirse en un sitio distante al sitio activo de la molécula, por inclusión del aminoácido cisteína o por el uso de un oligonucleótido derivado. En estos casos, la molécula que contiene tiol o amina puede reaccionarse directamente con un grupo acrilato en el polímero. La molécula que se libera debido a la hidrólisis no es la molécula original, pero contiene un tiol o amina que se modifica con ácido propiónico. Como porciones de los péptidos y oligonucleótidos terapéuticos que están distantes del sitio activo pueden variarse en gran medida sin una pérdida de actividad, estos compuestos habitualmente conservan su actividad terapéutica.

Acoplamiento de compuestos farmacéuticamente activos a un polímero y reticulación subsecuente (como alternativa para usar un enlazador como se reivindica)

El tiol o la amina libres que se añade a, o que está originalmente presente en, el compuesto farmacéuticamente activo, es entonces usado para acoplar el compuesto farmacéuticamente activo a un polímero. Los

biomateriales son a menudo formados de polímeros hidrófobos, pero éstos no son preferentes aquí pues la liberación del compuesto farmacéuticamente activo unido de manera covalente depende de la presencia de agua alrededor del compuesto farmacéuticamente activo. De esta manera, el compuesto farmacéuticamente activo puede ser unido a polímeros solubles en agua o polímeros hinchables en agua. Los polímeros solubles en agua pueden ser formados en un material en una variedad de maneras, mediante la formación de reticulaciones covalentes o físicas. Las reticulaciones covalentes pueden ser establecidas añadiendo grupos a los polímeros que son capaces de polimerización por radicales libres (Hubbell y colaboradores, patente US 5,410,016), sustitución nucleófila (Zhao y colaboradores, Polymer Preprints 38(1):526-527, 1997), y otros métodos químicos, incluyendo reacciones de adición conjugada.

La unión del compuesto farmacéuticamente activo al polímero soluble en agua o polímero hinchable en agua debe llevarse a cabo en una manera que es complementaria a la reticulación subsecuente del polímero soluble en agua para formar un biomaterial. Para lograr este acoplamiento de compuesto farmacéuticamente activo a un polímero y la subsecuente reticulación del polímero, otros han usado polímeros solubles en agua bifuncionales que contienen una clase de grupos químicos para la unión del compuesto farmacéuticamente activo y otra clase de grupos químicos para la reacción de reticulación. Como se esperaría, los polímeros bifuncionales son mas costosos y mas difíciles de producir que los polímeros monofuncionales. Aquí, monofuncional se refiere al hecho de que solamente un tipo de grupo funcional está presente en el polímero, no que cada molécula de polímero contenga un solo grupo funcional. En la presente invención, los polímeros monofuncionales tienen un solo tipo de grupo funcional y son usados para dos diferentes tipos de reacciones.

Un tipo de reacción es usado para la unión de compuestos farmacéuticamente activos, el cual de acuerdo con la presente invención es por medio de un enlazdor, y el otro tipo de reacción es usado para reticulación. El tipo de grupo funcional que es útil en este contexto es un grupo que es un aceptante en una reacción de adición conjugada. Estos grupos incluyen acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, derivados de acrilonitrilo, quinonas, sus derivados, y otros grupos con enlaces dobles conjugados. Tales reacciones entre un tiol y un acrilato prosiguen rápidamente en agua amortiguada a un pH cercano al neutro (con una vida media del orden de minutos). De esta manera, la reacción para acoplar el compuesto farmacéuticamente activo al polímero el cual de acuerdo con la presente invención es por medio de un enlazdor, puede ocurrir bajo condiciones sumamente tenues que no lesionarán el compuesto farmacéuticamente activo. La reacción puede también ser llevada a cabo en un solvente orgánico o una mezcla de agua y un solvente orgánico polar.

En agua amortiguada a un pH cercano al neutro, la reacción entre el tiol y el acrilato ocurre mucho mas rápidamente que la reacción entre dos tioles (para formar un enlace bisulfuro) o la reacción entre dos acrilatos (para formar un polímero, asumiendo una ausencia de iniciadores de radicales libres). De preferencia, la reacción entre el tiol y el acrilato ocurre 10, con mayor preferencia 100, y con la mayor preferencia 1,000 veces mas rápidamente que la reacción entre dos de los tioles. La reacción entre el tiol y el acrilato es también de preferencia 100, con mayor preferencia 1,000, y con la mayor preferencia 10,000 veces mas rápida que la reacción entre dos de los acrilatos en ausencia de iniciadores de radicales libres. Para la reacción correspondiente entre una amina y el acrilato, la tasa de reacción es de preferencia 10, con mayor preferencia 100, y con la mayor preferencia 1,000 veces mas rápida que la reacción entre dos de los acrilatos en ausencia de iniciadores de radicales libres.

La reacción de reticulación subsecuente puede ocurrir generalmente por dos rutas principales, utilizando ya sea polimerización por radicales libres (Lau y colaboradores, Bioorg. Med. Chem. 3:1305-1312, 1995) o por reacciones de adición conjugada. Los grupos insaturados conjugados que son reaccionados con buenos nucleófilos vía reacciones de adición conjugada pueden también polimerizarse generalmente por mecanismos de radicales libres. De esta manera, en tanto a menos un grupo insaturado conjugado permanezca en el polímero después del acoplamiento del compuesto farmacéuticamente activo, entonces ese polímero puede ser incorporado en un biomaterial mediante mecanismos de radicales libres. La presencia de al menos un grupo insaturado sin reaccionar en el polímero es asegurada manteniendo el número de grupos insaturados en exceso en comparación con los grupos tiol o amina, o acoplados a, la ramificación farmacéuticamente activa. La segunda ruta para reticular estos materiales implica hacer reaccionar los grupos insaturados conjugados remanentes en el polímero acoplados a una ramificación farmacéuticamente activa con moléculas enlazadoras conteniendo dos o mas nucleófilos, tales como el péptido GCNNRGDNNCG (SEQ ID NO: 73) que incrementa la adhesión celular a las membranas de basamento. La reticulación para formar un material ocurre entonces mediante otra reacción de adición conjugada.

Tales reacciones de reticulación, como se describió antes, pueden ocurrir en presencia de células y tejidos vivos (Lau y colaboradores, *supra*). De esta manera, el material que contiene el fármaco puede ser colocado o reticulado en prácticamente cualquier sitio dentro del cuerpo. El material sirve como un depósito para la entrega de agentes terapéuticos en el sitio deseado de actividad. Un ejemplo útil consiste en la entrega de un agente terapéutico a partir de un biomaterial dispuesto o polimerizado en el tejido que contiene un tumor maligno. De manera alternativa, un tumor maligno puede ser removido de un tejido quirúrgicamente, y un biomaterial que contiene una ramificación farmacéuticamente activa ligada de manera covalente puede ser colocado o polimerizado cerca del sitio de remoción del tumor maligno. La liberación del compuesto farmacéuticamente activo original o modificado a partir de este biomaterial puede impedir la siembra de células tumorales que son expulsadas del tumor durante su remoción o puede impedir el desarrollo adicional de células malignas que no pudieron ser removidas durante la cirugía.

Aunque la forma de realización deseable de la invención es el uso de reacciones de adición conjugada para unir un polímero a un grupo tiol o amina acoplado a un compuesto farmacéuticamente activo, puede usarse una

reacción de sustitución nucleófila para reaccionar el grupo tiol o amina con el polímero. Esta forma de realización usa un enlazador para acrecentar la reacción del compuesto farmacéuticamente activo con el polímero para permitir la liberación del compuesto farmacéuticamente activo original durante un periodo de tiempo debido a la hidrólisis del enlazador.

5

Liberación controlada de compuestos farmacéuticamente activos ligados indirectamente

En adición a la enlace covalente de compuestos farmacéuticamente activos, es posible liberar compuestos farmacéuticamente activos ligándolos de manera directa, mediante fracciones de enlace que están ellas mismas ligadas de manera covalente, como alternativa a la presnete invención.

10

Aunque el acoplamiento de un agente farmacéuticamente activo directamente a un polímero es atractivo y ventajoso, puede también ser ventajoso acoplarlo de manera indirecta. Usando tales medios, no se necesita realizar síntesis orgánica directamente sobre el agente, sino mas bien en una ramificación de enlace que muestra afinidad de enlace al agente. Si la ramificación de enlace, que también puede ser representada por el símbolo D usado en la presente, es acoplada a un polímero con un enlazador hidrolizable que interviene, la presencia de la ramificación de enlace da como resultado la enlace de un agente farmacéuticamente activo, y la pérdida de la ramificación de enlace dará como resultado la pérdida de sitios de enlace para el agente y de esta manera liberará el agente farmacéuticamente activo del polímero. En caso de un biomaterial coloidal o un material de gel, cuando la ramificación de enlace está acoplada al material, su presencia de manera tridimensional a través del material provee acoplamiento sostenido, incluso si la tasa de disociación entre la ramificación farmacéuticamente activa y la ramificación de enlace es relativamente elevada: cuando ocurre un evento de disociación, el agente farmacéuticamente activo tiene la oportunidad de difundirse solamente a una pequeña distancia antes de ligarse a otra ramificación de enlace. Esta tasa de re-enlace depende de la densidad de fracciones de enlace dentro del material. Al liberarse la ramificación de enlace del material mediante hidrólisis del sitio de hidrólisis que interviene, esta concentración se reduce, llevando a la liberación proporcionalmente mas rápida del agente biológicamente activo. Como tal, puede tomarse dos enfoques: (1) acoplamiento directo, donde D representa el agente farmacéuticamente activo mismo, y (2) acoplamiento indirecto, donde D representa una ramificación de enlace con afinidad de enlace al agente farmacéuticamente activo.

15

20

25

30

35

40

45

50

Existen diversas clases de fracciones de enlace. Muchas proteínas biológicamente activas poseen afinidad de enlace por iones de metal inmovilizados, especialmente iones tales como Cu^{2+} , Co^{2+} , y Zn^{2+} . Estas proteínas tienen típicamente residuos histidina superficiales o pares de residuos histidina separados por dos aminoácidos en una alfa-hélice. Un ejemplo de una proteína farmacéuticamente activa con afinidad por tales iones de metal inmovilizados es la hormona del crecimiento humana. De esta manera, sitios de enlace de ion de metal, tales como grupos ácido iminodiacético, histidina, o péptidos his-X-X-his, pueden ser incorporados como fracciones de enlace D. Muchos agentes biológicamente activos de proteínas son producidos como glico-proteínas, es decir poseyendo estructuras de sacárido ligadas. Existen fracciones de enlace para tales estructuras, tales como residuos de ácido borónico. Se han descrito residuos de ácido borónico particularmente favorables, unos teniendo un pKa en el rango de relevancia fisiológica, como se enseña por Winblade y colaboradores (Biomacromolecules 1:523-533, 2000). Como tales, pueden incorporarse fracciones de ácido fenilborónico como fracciones de enlace D. Muchos agentes farmacéuticamente activos de proteínas ligan estructuras de polisacáridos tales como heparina, y como tal, se puede acoplar a heparina como D o acoplar a péptidos de enlace de heparina como D mas heparina soluble. Las fracciones de enlace pueden también ser identificadas de manera combinatorial usando una variedad de técnicas, tales como sistemas de despliegue de péptido en fago o péptido en perla en síntesis en fase sólida de mezclado y división. Como tales, péptidos determinados de manera combinatorial y otras moléculas pueden incorporarse como moléculas de enlace D. Muchas moléculas orgánicas hidrófobas, pequeñas, se ligan como huéspedes como complejos de inclusión dentro de anfitriones tales como ciclodextrinas. Como tales, las fracciones ciclodextrina pueden ser incorporadas como fracciones de enlace D.

Liberación controlada de compuestos farmacéuticamente activos atrapados

En adición a la enlace covalente de compuestos farmacéuticamente activos directamente, y la enlace indirecta de compuestos farmacéuticamente activos vía la enlace covalente de fracciones de enlace, es posible liberar compuestos farmacéuticamente activos atrapándolos dentro de redes de biomateriales. En materiales reticulados, la red polimérica forma una barrera física a la difusión, particularmente de fármacos macro-moleculares tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, ARN y ADN. El tamaño de la red puede ser ajustado mediante el diseño de los componentes de la red; v.gr., los materiales reticulados formados con concentraciones de masa de triacrilato de PEG pueden formar redes mas permeables que aquéllas formadas con una concentración de masa igual de octa-acrilato de PEG bajo condiciones equivalentes. De esta manera, la permeabilidad de un fármaco macro-molecular puede ser modulada por el diseño de la red de biomaterial para obtener la liberación controlada del fármaco.

55

60

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

65

Lo ejemplos 1-15 se han divulgado en WO 00/44808. Los ejemplos 1-15 no involucran el concepto de la

presnete invención, i.e. el uso de un enlazador específico para enlazar D y P, pero se incluyen con propósitos ilustrativos.

EJEMPLOS DE REFERENCIA 1-15

Ejemplo 1: Preparación de Reactivos Básicos

Acrilación del diol de poli(etilenglicol)

- Se agregó polietilenglicol, peso molecular 8,000 (50 gramos, 6.24 mmol, 12.5 mmol grupos hidroxilo, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos) a tolueno (500 ml) y se secó mediante destilación azeotrópica. Se enfrió esta mezcla a 0°C y se agregaron 100 ml de diclorometano anhidrico (Aldrich). Se agregó trietilamina (2.61 ml, 18.75 mmol, 1.5 eq. Basado en grupos hidroxilo, Aldrich), seguido por la adición por goteo de cloruro de acrililo (2.03 ml, 18.75 mmol, 1.5 eq., Aldrich). Se mantuvo la reacción bajo Ar durante toda la noche en la oscuridad. Se filtró el producto y después se recuperó mediante precipitación en hexano con agitación. Se volvió a disolver el producto en 75 ml de diclorometano y se precipitó nuevamente en hexano con agitación. Se secó el producto durante toda la noche bajo vacío. El producto se disolvió en 500 ml de agua con 25 gramos de NaCl, y se ajustó el pH a un pH 6. Se extrajo la solución con diclorometano (Aldrich) 3 veces (no se deberá agitar vigorosamente la primera extracción con diclorometano para evitar la formación de una emulsión). Las fracciones de diclorometano se combinaron y se agregaron al hexano de agitación. Se recuperó el producto mediante filtración y se secó bajo vacío durante toda la noche. Mediante 1H-NMR, se acrilata el 80 por ciento de los alcoholes sobre el polietilenglicol (se hace referencia al producto como diacrilato de polietilenglicol).

Acrilación del triol de poli(etilenglicol)

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

Crotonilación y dimetilacrilación del diol de poli(etilenglicol)

- Se sintetizaron de manera simultánea PEG-8000 (PEG-8000-2C) de crotonoilo (crotonilo, $-\text{OOC}-\text{CH}=\text{CHCH}_3$) y PEG-8000 (PEG-8000-2DMA) de dimetacrililoilo (dimetilacrililoilo, $-\text{OOC}-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) en reacciones lado a lado. Se disolvieron 27 gramos de PEG-8000 (3.375 mmol, 6.75 mmol grupos hidroxilo; Aldrich) en benceno y se destilaron de manera azeotrópica hasta que el destilado apareció transparente. Se permitió que la solución de PEG-benceno se enfriara a la temperatura ambiente. Después, se transfirieron 100 ml de la solución de manera anhidra a un matraz de separación de fondo redondo. Se agregó trietilamina (1.1 ml a la muestra de 100 ml y 1.7 ml a la muestra más grande (150 ml), 3 equivalentes que se basan en los grupos de hidroxilo; Aldrich) a cada matraz. Se agregó por goteo crotonoilo-Cl (1.2 ml, 3 equivalentes que se basan en grupos hidroxilo; Fluka) a la muestra de 150 ml. Se agregó por goteo el dimetacrililoilo-C1 (0.9 ml, 3 equivalentes que se basan en grupos hidroxilo; Fluka) a la muestra de 100 ml. Se corrieron las reacciones 20 horas en la oscuridad. Se filtraron las soluciones a través de papel y se precipitaron en hexano. Se secaron al vacío los dos precipitados. Se determinaron los grados de modificación mediante 1H NMR para que fueran el 85 por ciento para el PEG-8000-2C y 89 por ciento para el PEG-8000-2DMA (por grado de esterificación).

Preparación de PEG de bis(benzoquinonas)

PASO A) Preparación de PEG de bis-carboxilo

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

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

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

repitió el procedimiento dos veces. Se determinó el grado de modificación mediante ¹H-NMR.

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

- 5 Se disolvieron 5 gramos (1.4 mmol, 5.2 meq) de PEG de 3400 bis (2,5-dimetoxianilida de carboxilo) en 50 ml de diclorometano seco en atmósfera de nitrógeno seco; después se agregaron 1.2 gramos (6 mmol, 0.82 ml) de yodotri-metilsilano y se agitó la solución durante 24 horas a la temperatura ambiente. Después se lavó la solución de diclorometano con agua hasta alcanzar la neutralidad, se secó sobre sulfato de sodio, se concentró a un volumen pequeño y se precipitó en hexano. Se determinó el rendimiento de la reacción mediante ¹H-NMR

10

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

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

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

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

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

PASOS B al E

30

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

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

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

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

Preparación de PEG de bis(4-vinilpiridilo)

40

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

45

Síntesis del péptido

- 50 Se sintetizaron los péptidos en un sintetizador de péptidos Pioneer de Perspective Biosystems (Framingham, Massachusetts, Estados Unidos), usando el esquema de protección Fmoc estándar. Se disociaron los péptidos a partir de resina, usando 8.8 ml de ácido trifluoroacético (Perspective Biosystems), 0.5 ml de agua, 0.5 ml de fenol (Aldrich), y 0.2 ml de triisopropilsilano (Aldrich) por gramo de resina, durante 2 horas a la temperatura ambiente. Se precipitó la solución en éter, y se recuperó el producto mediante filtración, y se secó bajo vacío. Se purificaron los péptidos mediante cromatografía C18, y las fracciones que contenían el producto se identificaron mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los péptidos se almacenaron bajo Ar a B20°C.

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

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

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

- 65 Se disolvieron 50 mg de PEG-8000-2A a 0.1 g/ml en 500 microlitros de 4:1 50 mM regulador del pH de bicarbonato (pH 8.4):acetonitrilo. Se agregaron 1.1 microlitros de tris-(3-mercaptopropionato) de trimetilolpropano (1.25 equivalentes que se basan en acrilatos) y se mezcló la solución mediante someterla a remolino. El tris-(3-mercaptopropionato) de trimetilolpropano no se pudo mezclar perfectamente en la solución, sino que

formó una suspensión de gotitas pequeñas en la fase acuosa. El material no se geló en dos horas, sino que se dejó descansar durante toda la noche. Aproximadamente a las 12 horas después de la adición del tris-(3-mercaptopropionato) de trimetilolpropano, se había formado un material reticulado sólido. Se agregó agua al material, el cual se hinchó con el agua pero no se disolvió (escala de tiempo: semanas antes de que se

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

dar reacciones a un pH de 8.0-8.5. Se hicieron los geles por cuadruplicado.

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

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

5

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

10

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

15

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

30

35

40

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

45

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

50

55

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

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

- 5 Los geles de adición de conjugados se fabricaron con 0.1 gramos/ml de PEG-2500-3A y 1.1 acrilatos por sulfhidrilo en GCKYNRDCG. Se dilataron los geles durante 24 horas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (algunos en condiciones libres de suero y algunos en suero bovino fetal al 10 por ciento) que contenía agentes antibióticos y anti-micóticos al 1 por ciento. Se sembraron fibroblastos de prepucio humano (pasaje 7; que se pasaron con tripsina/EDTA) sobre los geles. A partir de puntos de tiempo de dos horas a 48 horas, las
- 10 células permanecieron redondas y no se extendieron. Las células se acumularon cada vez más. El comportamiento celular fue independiente del suero en el medio. Las células de control se sembraron sobre el cultivo de tejido que se trató con poliestireno se extendió de manera normal.

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

- 15 Los geles de adición de conjugados se fabricaron con PEG-2500-3A, GCKYNRDCG, así como un péptido que contenía RGD (GCKYGRGDSPG) que se incorporó de una manera colgante. Los geles se fabricaron con 0.1 gramos de PEG-2500-3A/ml y 1.1 acrilatos por sulfhidrilo en GCKYNRDCG. Los geles se dilataron por más de
- 20 36 horas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (algunos en condiciones libres de suero y algunos en suero bovino fetal al 10 por ciento) que contenía agentes antibióticos y anti-micóticos al 1 por ciento. Cuando se incorporó el péptido RGD en uno de cada 12 acrilatos del PEG-2500-3A, fibroblastos de prepucio humano (pasaje 8, que se pasaron mediante tripsina/EDTA) se adhirieron a los geles (tanto aquellos que se dilataron en condiciones libres de suero, como aquellos en el medio que contenía suero). A las 6 horas después de haberse
- 25 sembrado, se distribuyeron las células de manera uniforme sobre la superficie del gel, y se extendió aproximadamente el 50 por ciento de las células sembradas (en las dos condiciones de medio).

Interacciones de las células con las redes de polietilenglicol

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

Ejemplo 4: Análisis químico de los productos de reacción

La cinética de reacción se midió con reactivo de Ellman

- 45 Se usó reactivo de Ellman para medir la concentración de tioles en una solución. El ensayo utilizó una solución de 40 mg de nitrobenzotriazol metano de dinitrobenzotriazol (Sigma) en 10 ml de 0.1 M regulador de pH de fosfato de pH 8 (reactivo de Ellman). Se probó una solución por la presencia de tioles mediante la adición de la solución a 3 ml del regulador de pH de fosfato. Se agregó el reactivo de Ellman (100 µl) y se mezcló. Después de 15 minutos,
- 50 se midió la absorbencia de la solución en 412 nm. Se asumió un coeficiente de absorción molar de 14150. Usando la cisteína del aminoácido, el reactivo de Ellman no reveló ninguna formación del enlace de bisulfuro detectable a pH 10 por 30 minutos a la temperatura ambiente. Si se agregó cisteína a un exceso de diacrilato de PEG, peso molecular 8000, en las mismas condiciones, la concentración de tioles cayó a 0.2 por ciento del valor original en segundos, y no disminuyó adicionalmente a los 30 minutos, lo que demuestra la desaparición
- 55 rápida de los tioles en la presencia del diacrilato de PEG. En la Figura 2 se muestra la reacción de la adición de conjugados entre el diacrilato de PEG y la cisteína del aminoácido. El péptido con la secuencia de aminoácidos Ac-GCKYGRGDSP-NH₂ (SEQ ID NO: 62) se probó de manera similar. Se disolvió el diacrilato de PEG en el regulador de pH de fosfato a un pH de 8 a una concentración de 25 µmol en 1 ml. Se agregó el péptido (1 µmol) a la solución de diacrilato de PEG, y se monitoreó la
- 60 desaparición de los tioles usando el reactivo de Ellman (vea Figura 3). Se realizó la reacción a diferentes pH y, adicionalmente, se evaluó la formación de los enlaces del bisulfuro por medio de disolver el péptido a las mismas concentraciones pero en la ausencia del diacrilato de PEG. La vida media para la reacción fue de aproximadamente 3 minutos a un pH de 7.4, y solamente unos pocos segundos a un pH de 8, a la temperatura ambiente.
- 65 Otro método para seguir en línea la reacción entre los tioles y el diacrilato de PEG es monitorear la absorbencia de la mezcla de reacción a 233 nm. A esta longitud de onda, la absorbencia se debe en principio a cuatro

sustancias: los componentes del tiol, las impurezas del bisulfuro en el componente del tiol, el acrilato y el producto (el éster propiónico de β -alquitio). Los experimentos se condujeron en 10^{-2} M suero regulado con fosfato a diferentes temperaturas entre los 20°C y los 37°C.

- Al realizar los experimentos a diferentes proporciones de reactivos, pero manteniendo constante la concentración molar total de los grupos reactivos (Figura 4), se pueden calcular los coeficientes de extinción de todas las especies que se ajustan a los valores de absorción, antes y después de la reacción. Este procedimiento permitió seguir de manera independiente la evolución en tiempo de la concentración de los reactivos y los productos: PEGDA y la cisteína mostraron un solo comportamiento exponencial, con las mismas constantes cinéticas y esto probó que la reacción fue de primer orden para cada reactivo. Se habían registrado las veces de vida media entre 2 y 10 minutos, dependiendo de la temperatura y la concentración de los reactivos. En la Tabla 7, se alistan las constantes cinéticas.

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

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

- También se valoró la reacción del diacrilato de PEG con las aminas primarias. El diacrilato de PEG se mezcló con un péptido con la secuencia de aminoácidos GDGSGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 63), la cual contiene solamente una amina primaria en el termino amina del péptido. Se midió la presencia de aminas usando el ensayo de fluorescamina. Se disolvió la fluorescamina (Sigma) en acetona seca a 1.5 mg/ml. Se agregó el péptido (1 mg) a 100 μ l de 0.1 M regulador de pH de fosfato a pH de 8. El diacrilato de PEG, peso mol. 8000 (100 mg) se disolvió a 900 μ l en 0.1 M regulador de pH de fosfato a un pH de 8 y se mezcló con la solución del péptido. Se tomaron muestras de la reacción y se agregaron 100 μ l de 1.5 mg de fluorescamina en acetona seca, y se elevó a 1 ml con 50 mM de regulador de pH de borato a un pH de 9.
- Se midió la intensidad de fluorescencia usando un espectrofluorímetro, y se calcularon las concentraciones mediante la comparación con una curva estándar que se produjo usando la glicina del aminoácido. La vida media para la reacción de la amina con un acrilato fue de aproximadamente 90 minutos a un pH de 8 y 37°C.

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

- Se realizó la cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna Shodex OHPak SB-803 (Showa Denko, Tokio, Japón), usando detección de rayos ultravioleta, midiendo la absorbencia desde 200-400 nm. El levigante fue suero regulado con fosfato 810 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl, pH 7.4). El diacrilato de PEG tuvo una absorbencia máxima a 205 nm, mientras que el péptido que se usó, GCGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 64) tuvo una absorbencia máxima a 220 y 270 nm, debido a la presencia de enlaces de amida, y una tirosina. El diacrilato de PEG se disolvió en 0.1 M regulador del pH de fosfato a un pH de 8 a una concentración de 25 μ mol en 1 ml. Se separó una muestra de la solución usando la cromatografía de exclusión de tamaño, y el polietilenglicol que se levigó como un solo pico con una absorbencia máxima a 205 nm, y sin absorbencia a 220 o 270 nm. Después, se agregó el péptido (12.5 μ mol) a la solución de diacrilato de PEG, y se hizo reaccionar a la temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se separó una muestra usando la cromatografía de exclusión de tamaño, y se detectó un solo pico, con absorbencia máxima a 205, 220, y 270 nm, con el mismo tiempo de retención que el diacrilato de PEG. Esto indicó que el péptido reaccionó con el diacrilato de PEG. Se realizaron estudios similares usando cromatografía C18, usando un gradiente desde agua al 95 por ciento con ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento, acetonitrilo al 5 por ciento hasta agua al 40 por ciento con ácido trifluoroacético al 0.1 por ciento, acetonitrilo al 60 por ciento. El péptido Ac-GCGYGRGDSP-NH₂, se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 20 por ciento, mientras que el PEG o el diacrilato de PEG-3400 se levigó a aproximadamente acetonitrilo al 40 por ciento. La incubación de 1 mol del péptido por 2 moles de diacrilato de

PEG-3400 en agua regulada por pH a un pH de 8 llevó a la desaparición del pico relacionado con el péptido que se leviga a acetonitrilo al 20 por ciento, con la emergencia de bandas de absorbencia a 220 y 270 nm que se levigaron conjuntamente con el pico de PEG a acetonitrilo al 40 por ciento. La recolección de los picos y el análisis mediante la espectrometría de masa MALDI-TOF indicó que el pico asociado con PEG contenía una mezcla de diacrilato de PEG-3400 sin modificar, y una especie nueva con el peso molecular que fue la suma del diacrilato de PEG-3400 y los pesos moleculares del péptido.

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

Se mezcló la cisteína del aminoácido en solución (0.1M fosfato, pH 8) con PEGs funcionalizados (PEG-8000-2A, PEG-8000-2C, y PEG-8000-2DMA) de manera que los tioles y los grupos no saturados conjugados estaban inicialmente en concentraciones equimolares (20 micromolar). En la presencia de las funcionalidades del dimetacrililo, la velocidad de consumo del tiol fue esencialmente cero durante la escala de tiempo que se siguió (10 minutos). En la presencia de las funcionalidades del crotonilo menos obstructoras de manera espacial (una sustitución de metilo en el enlace doble), se incrementó la velocidad de consumo del tiol. En la presencia de los acrilato todavía menos obstructores, la concentración de tioles disminuyó de manera más rápida, pero no fue hacia la terminación en el curso de tiempo que se siguió. Vea Figura 5. En un experimento similar en donde la concentración de los grupos no saturados conjugados fue diez veces aquella de los grupos de tiol, el consumo de tioles por parte de los acrilatos fue extremadamente rápido. La reacción se completó por medio de tomar la primera muestra en el tiempo de 1 minuto (no se muestran los datos).

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

Hidrólisis en la solución

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

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

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

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

Se disolvieron 13.9 mg de PEG-2500-3A en 69.5 microlitros (50 mg/25 microlitros) de PBS•TEA (10 mM PBS que contenía 13 microlitros de trietanolamina/ml). Se disolvieron 7.0 mg de GCYKNRDCG en 65 microlitros de PBS•TEA (2.7 mg/25 microlitros). Se agregaron los equivalentes (25 microlitros) de las dos soluciones a las cavidades de una placa de 96 cavidades de poliestireno tratado de cultivo de tejido de fondo plano de Corning. A medida que se agregaba la segunda de las dos soluciones precursoras, se usó la punta de la pipeta para agitar la mezcla durante 2-3 segundos. Después se permitió que los geles se asentaran a 37°C. Después se transfirieron los geles a tubos que contenían 10 mM solución salina regulada por pH de HEPES, pH 7.4. Se incubaron los geles a 37°C, y se siguió visualmente la desaparición de los geles sólidos. Entre los días 14 y 21, todos los geles sólidos habían desaparecido, lo que indica que se habían degradado mediante la hidrólisis del enlace de éster entre el péptido y el PEG.

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

Se disolvieron 13.9 mg de PEG-2500-3A en 69.5 microlitros (5.0 mg/25 microlitros) de PBS•TEA (10 mM PBS que contenía 13 microlitros de trietanolamina/ml). Se disolvieron 7.0 mg de GKKKKGCYKNRDCG (SEQ ID NO: 65) en 65 microlitros de PBS•TEA (2.7 mg/25 microlitros). Se agregaron los equivalentes (25 microlitros) de las dos soluciones a las cavidades de una placa de 96 cavidades de poliestireno tratado de cultivo de tejido de fondo plano de Corning. A medida que se agregaba la segunda de las dos soluciones precursoras, se usó la punta de la pipeta para agitar la mezcla durante 2-3 segundos. Después se permitió que los geles se asentaran a 37°C. Después se transfirieron los geles a tubos que contenían 10 mM solución salina regulada por pH de HEPES, pH 7.4. Se incubaron los geles a 37°C, y se siguió visualmente la desaparición de los geles sólidos. Se agregaron las lisinas extras que se encontraron en el péptido ("AGKKKK...") a modo de proporcionar nucleófilos adicionales al medio ambiente local del enlace de éster. Adicionalmente, la naturaleza catiónica de los grupos también podría llevar a una elevación del pH local. Se espera que la combinación de estos dos efectos mejore la velocidad de la hidrólisis del enlace de éster entre el péptido y el polímero.

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

Síntesis de geles mediante adición de conjugados

Debido a que las enzimas y los péptidos son quirales, se alteró la estereoquímica de GCYKNRDCG para hacer un nucleófilo estable a la plasmina para los geles formado mediante adición de conjugados. Este péptido estable a la plasmina fue: GCY-DLys-N-DArg-DCG (SEQ ID NO: 66). La secuencia no se alteró de otra manera a fin de mantener las propiedades de solubilidad al agua extremadamente buenas del GCYKNRDCG. Se usó el HPLC C18 analítico (gradiente de acetonitrilo lineal de más de 0.1 por ciento TFA en agua) para confirmar la estabilidad a la plasmina relativa del GCY-DLys-N-DArg-DCG. Se ejecutaron los siguientes ejemplos: plasmina; GCYKNRDCG; plasmina □ GCYKNRDCG; GCY-DLys-N-DArg-DCG; y plasmina + GCY-DLys-N-DArg-DCG. La plasmina (micromolar) estuvo presente al 1/1000 la concentración del péptido (milimolar) y por tanto no afectó los cromatogramas de absorbencia sobrepuestos. La sobre-posición de los rastros (absorbencia a 220 nm o 278 nm) de las levigaciones del péptido contra aquellas del péptido B plasmina, demostraron que la mayoría del péptido GCYKNRDCG se degradó en aproximadamente 1 hora a 37°C. El péptido GCY-DLys-N-DArg-DCG sin embargo, no se vio afectado por la plasmina a las 24 horas, y permaneció sin afectación durante el tiempo de vida de la plasmina en la muestra (muestra que se inyectó para C18 a las 2 semanas).

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

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

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

Síntesis del gel

Se permitió que el diacrilato de polietilenglicol de peso mol. 8000 (230 mg/ml) se disolviera en solución salina regulada por pH de HEPES (10 mmol HEPES, Sigma, 8 gramos/ litro NaCl, pH 7.4) durante 1 hora. Se agregó trietanolamina (Aldrich, 15.3 µl/ml), y se ajustó el pH de la solución a un pH de 8 con 6N HCl. Se disolvieron los péptidos que contenían cisteína en 116.5 µl de solución salina regulada por pH de HEPES, y se agregaron a 870 µl de la solución de PEG con remolino. Después de 5 minutos, se agregaron 3.5 µl de pirrolidona de N-

vinilo y 10 µl de una solución de 10mM de Eosina Y, seguido por remolino. Se formaron los geles mediante la exposición a la luz a 75 mW/cm² durante 1 minuto (Cermx Xenon Lightsource, que transmite luz entre 470 y 520 nm; ILC Technology, Sunnyvale, California, Estados Unidos). Se permitió que los geles se dilataran en solución salina regulada por pH Tris, pH 7.4 (4.36 gramos Tris HCl, 0.64 gramos base de Trizma, 8 gramos

NaCl, 0.2 gramos KCl por 1 litro, todos de Sigma) durante 36 horas.

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

Se prepararon los geles de PEG como se describió anteriormente, usando el péptido GCGYGRGDSPG. La mayoría de las células tienen receptores que reconocen la secuencia GRGDSPG, y las células interactuarán

con las superficies que despliegan péptidos que contienen RGD inmovilizados. Para probar las interacciones de las células con los geles de PEG que contienen los péptidos que se incorporaron mediante la adición de conjugados, se formaron los geles y se sembraron células endoteliales de vena umbilical humana sobre los geles. Se observó el cambio en la forma de las células en la superficie, lo cual indica que las células estaban interactuando con los péptidos en la superficie. Se hace referencia al cambio en la forma como diseminación, y

hace referencia al cambio en la forma de las células de esféricas a planas y poligonales en la superficie. No ocurrió ninguna diseminación celular en los geles de PEG sin el péptido, y se confirmó la especificidad del péptido GCGYGRGDSPG mediante la comparación con los geles que contenían el péptido GCGYGRD~~G~~SPG, el cual contiene los mismos aminoácidos, pero en una secuencia diferente, y el cual no tiene actividad biológica.

Se sembraron las células sobre los geles a una concentración de 400 células por mm², y se contó el número de células diseminadas por área a diferentes tiempos (vea Figura 6). Los experimentos se realizaron usando el medio de cultivo celular normal. Las células solamente se pudieron diseminar sobre los geles que contenían el péptido GCGYGRGDSPG, el cual se incorporó dentro de los geles utilizando una reacción de adición de conjugados.

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

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

Se polimerizaron los geles como esferas por medio de agregar la solución gelante de arriba de 1 ml de ciclohexano que contenía 94 mg de Hypermer B239 (ICI Surfactants, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), con sometimiento a remolino a 37°C durante 10 minutos. Se produjeron esferas con diámetros que fluctuaban de 2 µm a 20 µm, lo cual demostró aproximadamente un incremento del 50 por ciento en el diámetro después del cambio de un pH de 7.4 a un pH de 5.8.

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

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

Ejemplo 10: Apuntando las micro-esferas de triacrilato de PEG a células y tejidos que usan los péptidos incorporados por medio de la adición de conjugados

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

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

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

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

Se liberó mioglobina de la proteína (17,000 Da) a partir de los hidrogeles que se fabricaron mediante la adición de conjugados entre los tioles y los acrilatos. Se mezcló PEG-3500-3A a 0.2 gramos/ml en PBS, pH 7.4 con una solución del péptido sensible a la plasmina GCKNRDCG, de manera que la concentración de tioles y acrilatos fue la misma y la concentración final de PEG-3500-3A fue del 10 por ciento (solución precursora). A algo de la solución precursora, se agregó mioglobina (5.2 µl de 9.8 mg/ml solución de mioglobina por 195 µl de solución precursora). Se seleccionó la mioglobina como una proteína modelo para los factores de crecimiento, tal como BMP-2, debido a su tamaño similar. Se hicieron 200 µl alícuotas de solución precursora con y sin mioglobina sobre esponjas de colágeno hemostático. A algunas esponjas de control se agregaron 5.2 µl de los 9.8 mg/ml de solución de mioglobina, sin precursores de gel. A algunas esponjas, se agregó PBS en lugar de mioglobina. Después de que los geles se hubieron solidificado dentro de las esponjas, se incubó cada muestra en 4 ml de 10 mM PBS, pH 7.4, que contenía azida de sodio al 0.1 por ciento, para evitar la contaminación bacteriana y fungal. A las 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 7 días, y 13 días, se removió la fase de solución de cada muestra y se reemplazó con PBS fresco con azida de sodio al 0.1 por ciento. Después del día 13, se reemplazaron las soluciones con 0.08 unidades de plasmina en 4 ml de PBS, marcándose la discontinuidad mediante la línea vertical en la Figura 7. Se desarrollaron las soluciones usando el micro-ensayo de proteína Bradford de BIORAD y se compararon con la curva estándar que se hizo a partir de las soluciones de mioglobina de concentración conocida. Las muestras con la mioglobina dentro del material del hidrogel mostraron una liberación retardada de la mioglobina (difusión limitada) pero liberaron, después de la degradación del hidrogel mediante la plasmina de la enzima, una cantidad total de proteína sin diferencia con el total que se liberó a partir de las esponjas solas (sin hidrogel) (no se muestran los datos).

Liberación empleando sitios de afinidad incorporados

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

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

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

Las proteínas fijadoras de heparina que incluyen los factores de crecimiento fijadores de heparina se fijan de manera no covalente al material en la formación del material. Si la proteína que se va a fijar no contiene una secuencia fijadora de heparina nativa, se construye una proteína de fusión (usando técnicas biológicas

moleculares e iniciando a partir del nivel del ADN), para contener la secuencia de la proteína nativa y un dominio de fijación de heparina sintético.

Por ejemplo, el factor de crecimiento del nervio (NGF) se expresa como una proteína de fusión en la *E. Coli* de manera que la proteína contiene un dominio de fijación de heparina en el término N y la secuencia de NGF en el término C de la proteína. Esto se consigue por medio de construir un gen sintético que contiene el ADN que

codifica para la proteína de fusión deseada. La secuencia de la proteína que se va a expresar es como sigue:
MgSHHHHHSSGLVPRGSHMKDPKRLYRSRKLPVELESSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEV
MVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNYSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFRIDTACVC
VLSRKAVRZ (SEQ ID NO: 69)

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

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

GAATTCCTGGCATATGAAAGACCCGAAACGTCTGTACCGTTCTCGTAAACTGCCCGTGGAACCTCGAGAGC
TCTTCCCACCCGATTTTCCATCGTGGCGAGTTCTCCGTGTGTGACTCTGTCTCTGTATGGGTAGGCGATAAA
ACCACTGCCACTGATATCAAAGGCAAAGAGGTGATGGTGCTGGGAGAAGTAAACATTAACAACCTCTGTATTCA
AACAGTACTTCTTCGAAACTAAGTGCCGTGACCCGAACCCGGYTAGACTCTGGGTGTGCGGGCATCGATTCT
AAACACTGGAACCTCTTACTGCACCACTACTCACACTTTTCGTTAAAGCGTTGACTATGGATGGTAAACAGGCTG
CCTGGCGTTTCATCCGTATCGATACTGCATGCGTGTGTGACTGTCCCGTAAAGCTGTTTCGTTAAGGATCC
(SEQ ID NO: 70).

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

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

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

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

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

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

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

liberación a partir de un material sólido sirve para localizar la liberación de fármacos a un sitio deseado, por ejemplo, el sitio de la formación del material. La liberación a partir de un material sólido en donde la liberación del fármaco se realiza mediante la actividad extra-celular, tal como la expresión de las enzimas proteolíticas, controla la velocidad de liberación de manera que la actividad celular (por ejemplo, la migración de las células)

- 5 determina la velocidad de la liberación.
- Los grupos funcionales de un fármaco (tal como los fármacos anti-cáncer doxorubicina o daunorrubicina) están protegidos con la excepción de los grupos funcionales de amina. Los grupos de amina en el fármaco se acoplan a un aminoácido o péptido mediante la formación de un enlace de amida. El aminoácido o péptido se seleccionan para que sean de terminal amino degradable con el aminoácido (Y) o el péptido (XXXXY; SEQ ID
- 10 NO: 72), debido a el enlace de amida que une el aminoácido o el péptido al fármaco, mediante una enzima proteolítica, tal como la plasmina que disocia la terminal amino a la lisina y la arginina. Ya sea que se incluya el tiol (por ejemplo, cisteína) en el péptido acoplado o se acopla después al aminoácido o porción del péptido del conjugado de péptido-fármaco. Se les quita la protección al fármaco y los grupos funcionales del péptido (para dar SH-XXXXY-fármaco). En la formación del material, el conjugado tiol-péptido-fármaco se acopla de manera
- 15 covalente al material a modo de adición de conjugados del tiol sobre una insaturación conjugada en el precursor del material. El fármaco se libera a partir del material mediante la actividad enzimática, tal como la plasminólisis, que disocia el enlace de amida (Y-fármaco) que enlaza el fármaco al material.
- De manera alternativa, los grupos funcionales de un fármaco (tal como el diclofenaco antagonista de la prostaglandina) se protegen con la excepción de los grupos funcionales de carboxilo. Se activan los grupos
- 20 carboxilo y se acoplan a un péptido mediante la formación de un enlace de amida en el término amino del péptido. El péptido se diseñó para contener un tiol (por ejemplo, cisteína) y para que fuera de terminal carboxilo degradable para el péptido, en consecuencia en el enlace de amida que une el péptido al fármaco, mediante una enzima proteolítica que disocia la terminal carboxilo en los aminoácidos específicos (Y). Se quita la protección del fármaco y los grupos funcionales del péptido. En la formación del material, el conjugado de tiol-
- 25 péptido-fármaco (fármaco-YXXXX-SH se acopla de manera covalente al material a modo de adición de conjugados del tiol sobre una insaturación conjugada en el precursor del material. El fármaco se libera a partir del material mediante la actividad enzimática que disocia el enlace de amida (fármaco-Y) que enlaza el fármaco al material.

30 **Ejemplo 13: Regeneración de Tejidos**

Formación de hueso ectópico (subcutáneo) en ratas

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

Regeneración de hueso

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

60 **Regeneración de piel**

- El material de hidrogel puede ser útil en la curación y regeneración de la piel, por ejemplo, en el cierre de úlceras en el pie de diabéticos, llagas por presión, y úlceras por insuficiencia venosa. Un hidrogel, por ejemplo, como se describió anteriormente, se puede usar para liberar factores de crecimiento que mejoran el cierre de
- 65 estas heridas, tales como factor de crecimiento de células endoteliales vasculares, un TGFβ, activina, factor de crecimiento de queratinocito, factor de crecimiento que se deriva de la plaqueta, factor de crecimiento

epidérmico, o un número de otros factores de crecimiento. Se pueden incorporar estos factores de crecimiento dentro del hidrogel ya sea mediante entrapamiento o mediante afinidad bio-específica (por ejemplo, mediante afinidad por la heparina).

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

Materiales estructurales que se forman mediante reacciones de adición de conjugados

10 Se combinaron tetraquis(3-mercaptopropionato)(QT) de pentaeritritol (424 mg) y 997 mg de diacrilato de polietilenglicol 570 (PEGDA) puro y se mezclaron bien mediante someterlos a remolino. Se removieron las burbujas de aire mediante sonicación. Se agregó solución de PBS 0.01 M que se preparó a un pH de 9.0 (10 mM PBS ajustado a un pH de 9.0 con trietanolamina (EtOH₃N) que se mezcló con un volumen igual de 10 mM PBS ajustado a un pH de 9.0 con 1N NaOH) (473 mg) a los precursores mezclados. Se volvió a someter a remolino la mezcla durante aproximadamente 2 minutos para mezclar bien y dispersar los precursores en la
15 solución acuosa. Después del remolino, se sonificó nuevamente la mezcla para remover las burbujas de aire. A la temperatura ambiente, el material se geló en aproximadamente 20 a 30 minutos. El gel resultante demostró una resistencia final de aproximadamente 2 MPa y aguantó deformaciones de aproximadamente 35 por ciento en compresión (Figura 8).

20 **Control de las propiedades mecánicas mediante hidrofobicidad (triacrilato de pentaeritritol)**

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

30 **Variación de la proporción de tioles con acrilatos**

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

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

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

45

Control de propiedades mecánicas mediante la adición de partículas

Se combinaron los precursores, QT y PEGDA 570 como se describió anteriormente. Antes de la adición del regulador del pH activador (PBS a pH 9.0), se agregaron partículas de BaSO₄ al 10 por ciento en peso, fixe de equilibrio (0.8 µg), a los precursores mezclados. Se agregó el regulador del pH activador y después se sometieron a remolino las mezclas completas y después se permitió que se gelaran. Se usaron las mismas
50

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

Mejoramiento de las propiedades mecánicas mediante el uso de emulsificantes

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

Preparaciones de materiales en solventes que incluyen solventes orgánicos

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

Modulación de las propiedades mecánicas mediante la adición de aditivos hidrófilos

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

Cinética de la gelación de QT y PEGDA 570

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

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

Bio-compatibilidad de los geles en los sitios del tejido

Los precursores, QT, PEGDA 570, los reguladores del pH, y el monooleato de sorbitán se filtraron esterilizados. Se esterilizaron las partículas Blanc Fixe mediante autoclave. Se prepararon espigas de gel usando los precursores, Blanc Fixe y monooleato de sorbitán. Se prepararon otras espigas usando solamente los dos precursores. Las espigas de gel que se prepararon con solamente los dos precursores, se prepararon usando el mismo procedimiento que se citó anteriormente, excepto que la mezcla activada y sometida a remolino se colocó en moldes para formar espigas antes de la gelación y se prepararon las espigas de gel que contenían la partícula inorgánica y el tensioactivo por medio de combinar los procedimientos que se describieron anteriormente. Las espigas se implantaron dentro de los músculos dorsales derecho e izquierdo de conejos.

También se usaron espigas de referencia de polietileno. Después de 4 semanas se realizaron las secciones histológicas de los implantes y el tejido circundante. Con los dos tipos de geles que se probaron, no hubo diferencias significativas aparentes en comparación con los materiales de referencia. Se asociaron macrófagos raros, fibroblastos y neovasos con las espigas de gel que se implantaron. No se indujo necrosis, degeneración ni ninguna otra señal de intolerancia por parte de estas composiciones de gel.

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

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

Los sistemas reticulados de polímero funcional final han mostrado que las propiedades mecánicas se pueden manipular mediante el uso de distribuciones de peso molecular de múltiples modos. Al incluir un contenido molar bajo de un precursor de peso molecular elevado en un sistema de peso molecular bajo, tiene un efecto sinérgico que da propiedades mecánicas mejoradas que se pueden conseguir mediante cualesquiera de los pesos moleculares solos. Las redes que contienen solamente cadenas cortas son quebradizas y las redes que contienen solamente el componente más grande tienen una resistencia final muy baja. Mientras tanto, los sistemas de modo doble que tienen predominantemente las cadenas pequeñas con una proporción molar pequeña del componente más grande, muestran redes con una resistencia final elevada en comparación con el sistema de peso molecular más grande y con extensibilidad mejorada en comparación con el sistema de un solo modo de cadena corta (Pathak, *supra*, Llorente, M.A. y colaboradores, J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed., 19:621, 1981)

El contenido molar bajo de un precursor de peso molecular más grande (es decir, PEGDA 20,000 o PEVAL 20,000) puede reemplazar algo del PEGDA 570, lo que crea un sistema de dos modos. Se pueden combinar los tres sistemas precursores (es decir, QT, PEGDA 570 y PEGDA 20,000) en un sistema acuoso a un pH que proporciona suficiente cinética de reacción. Los resultados son geles más fuertes. El equilibrio hidrófilo/hidrófobo de este tercero (precursor de peso molecular más grande) también se puede aprovechar para propiedades moduladas adicionales.

Ejemplo 15: Preparación de Materiales que Responden a las Condiciones Ambientales

Sensibilidad a la temperatura de los precursores

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

Sensibilidad al pH de los precursores

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

Ejemplo 16: formación de un biomaterial reticulado que contiene la cadena lateral de paclitaxel acoplada a PEG mediante un enlazador que contiene tiol

Una molécula enlazadora que contiene tiol fue unida a un compuesto modelo, la cadena lateral de paclitaxel (figura 16). Este producto fue posteriormente unido a una insaturación conjugada enlazada mediante PEG (figura 16) y los grupos insaturados conjugados enlazados mediante PEG remanentes fueron reticulados para formar un biomaterial. En términos de químicas de unión, este compuesto modelo provee un modelo barato de paclitaxel, y los resultados obtenidos con este derivado son relevantes al trabajo con la molécula completa de paclitaxel, así como otras moléculas orgánicas que contienen un grupo alcohol o amino.

Preparación de éster metílico de 2-O-(3-tio-propionato) de la cadena lateral de paclitaxel

PASO A) Preparación de ácido 3-tritilitio-propiónico

Una solución de 0.87 ml (10 mmoles) de ácido 3-mercapto-propiónico y 2.86 g (11 mmoles) de trifenilmetanol en 40 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) fue agitada por 30 minutos a 60°C. Después de que la solución fue enfriada a temperatura ambiental, se añadieron 1.43 ml (11.4 mmoles) de eterato de borotri-fluor y la mezcla de reacción fue agitada a 60°C por cuatro horas. La solución fue concentrada al vacío y el residuo fue disuelto en 500 ml de NaHCO₃ al 5%. La solución acuosa fue lavada con 250 ml de éter dietílico, acidulada a un pH de 3 usando H₂SO₄ 1M, y extraída dos veces con 500 ml de acetato de etilo. Las fracciones combinadas de acetato de etilo fueron lavadas con 250 ml de solución salina y secadas sobre Na₂SO₄. El producto fue obtenido como un sólido blanco en un rendimiento del 90%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ 2.23 (t, 2H, CH₂S), 2.46 (t, 2H, CH₂COOH), 7.23-7.43 (m, 15H, Trt)

PASO B) preparación de (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(3-tritilitio-propionato)-3-fenil-isoserina) de la cadena lateral de paclitaxel, modificada, protegida

Una solución de 120 mg (0.4 mmoles) de éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(3-tritilitio-propionato)-3-fenil-isoserina y 280 mg (0.8 mmoles) de ácido 3-tritilitio-propiónico en 4 ml de diclorometano y 1 ml de DMF fue enfriada a 0°C. Luego se añadieron 126 µl (0.8 mmoles) de diisopropilcarbodiimida y unos cuantos cristales de dimetilaminopiridina fueron añadidos y la reacción fue agitada a 0°C por dos horas. Después de que estuvo completa la reacción con base en el análisis TLC de la mezcla de reacción, los solventes fueron removidos al vacío, y el producto crudo fue disuelto en 50 ml de diclorometano. La solución orgánica fue lavada con H₂SO₄ 1M, 5% de NaHCO₃, y solución salina, en forma consecutiva, y secada sobre Na₂SO₄. Después de purificación por cromatografía de columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:2 v/v), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 74%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ 2.00-2.55 (m, 4H, CH₂S y CH₂COO), 3.67 y 3.73 (s, 3H, OCH₃), 5.51 y 5.38 (d, 1H, CHO), 5.72 y 5.83 (d d, 1H, CHPh), 6.35 y 6.96 (d, 1H, NH), 7.15-7.59 (m, 23H, Ar Tax y Trt), 7.96 y 7.76 (d t, 2H, Ar Tax)

RMN-¹³C (CDCl₃) δ 27.71 y 26.68 (CH₂S), 35.67 y 33.46 (CH₂COO), 52.78 y 52.88 (CHPh), 5.31 y 53.44 (HCO), 66.96 y 67.14 (C(Ph)₃ Trt), 74.82 y 74.53 (OCH₃), 126.58-144.66 (Ar Tax y Trt), 165.41 y 166.86 (COOMe), 168.19 (COOCH), 170.48 (CONH)

PASO C) Desprotección para formar éster metílico de 2-3-(tio-propionato) de la cadena lateral de paclitaxel (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(3-tio-propionato)-3-fenil-isoserina)

Una solución del compuesto tritil protegido en diclorometano fue añadida a una solución de TFA triisopropilsilano, y agua (95:2.5:2.5), y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura de habitación por una hora. Los solventes fueron removidos al vacío, y el producto fue obtenido después de cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:2 v/v).

RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.59-1.64 (m, 1H, SH), 2.67-2.77 (m, 4H, CH₂SH y CH₂COO), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.50 (d, 1H, CHO), 5.90 (d d, 1H, CHPh), 7.04 (d, 1H, NH), 7.26-7.80 (m, 8H, Ar Tax), 7.81 (d 5, 2H, Ar Tax)

RMN-¹³C (CDCl₃) δ 19.56 (CH₂SH), 38.15 (CH₂COO), 52.94 (CHPh), 53.42 (CHOCO), 74.63 (OCH₃), 126.56-137.39 (Ar Tax), 166.89 (COOMe), 168.28 (COOCH), 170.41 (CONH)

Preparación de diacrilamida de PEG-3400

Se hizo reaccionar durante la noche polietilenglicol, peso molecular de 3,400 (100 g, 0.05882 moles -OH) con mesilcloruro (13.65 ml, 0.1764 moles, tres equivalentes (eq.)) en presencia de trietilamina (24.58 ml, 3 eq.) en 600 ml de tolueno/ 100 ml de diclorometano a temperatura de habitación. El producto fue filtrado y recuperado por precipitación en éter dietílico. El producto fue secado al vacío y fue luego disuelto en 400 ml de solución de hidróxido de amoníaco al 25%. Esta solución fue agitada por tres días a temperatura de habitación en una botella cerrada fuertemente. El amoníaco fue entonces evaporado agitando la solución en un recipiente abierto por cinco días a temperatura de habitación. El producto fue recuperado por adición de hidróxido de sodio 1M hasta que se alcanzó un pH de 13 y mediante tres extracciones con diclorometano. La fase en diclorometano fue concentrada al vacío, y el producto fue precipitado por goteo en éter dietílico. El rendimiento fue de 80 g.

RMN-¹H, PEG 3.6 ppm, CH₂-CH₂-NH₂ 2.85 ppm. La presencia de un grupo amina en el término PEG fue detectada por RMN, con base en la presencia de un triplete a 2.85 ppm, correspondiente a los hidrógenos en el

carbono en la posición alfa con relación a la amina. Por comparación con el pico de la columna de PEG (3.6 ppm), se calculó que el producto contenía 99.3% de diamina de PEG y 0.7% de α -monoamina, ω -monohidroxilo de PEG.

- La diamina de PEG-3400 (20 g, 11.765 mmoles $-\text{NH}_2$) fue secada por destilación azeótropa en 400 ml de tolueno y luego enfriada a temperatura de habitación. Se añadió diclorometano (50 ml), y la mezcla fue enfriada en un baño de hielo. La mezcla fue reaccionada durante la noche con cloruro de acrililo (1.43 ml, 17.647 mmoles, 1.5 eq.) En presencia de trietilamina (2.46 ml, 17.647 mmoles, 1.5 eq.). La solución fue filtrada y precipitada en éter dietílico. El rendimiento de diacrilamida de PEG-3400 fue de 17 g.
- RMN- ^1H (CDCl_3) δ 3.6 (168 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 5.6 (dd, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CON}-$), 6.1, 6.2 (dd, 2.27 H, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CON}-$). El espectro infrarrojo contenía picos I y II de amida en 1.539.79 y 1,673.90 cm^{-1} .

Reacción de adición conjugada entre éster metílico de 2-O-(3-tio-propionato) de la cadena lateral de paclitaxel y una insaturación conjugada enlazada mediante PEG

- A una solución de 10 mg (25 μmoles) de éster metílico de 2-O-(3-tio-propionato) de la cadena lateral de paclitaxel conteniendo un enlazador de 3-tio-propionato y 361 mg (100 μmoles) de diacrilamida de PEG-3400 en 1 ml de metanol seco se añadieron 3.3 μl (25 μmoles) de trietanolamina. La solución fue agitada en la oscuridad bajo una atmósfera de argón a temperatura de habitación por cuatro horas. El solvente fue removido mediante un flujo de nitrógeno gaseoso, y luego el residuo disuelto en 1 ml de ácido acético acuoso 50 mM y purificado usando una columna PD10 (Pharmacia). Las fracciones conteniendo PEG fueron recolectadas y liofilizadas. El producto fue obtenido en un rendimiento de 91% (con base en diacrilamida de PEG-3400).

Formación de biomaterial de PEG reticulado conteniendo éster metílico de la cadena lateral de paclitaxel ligado de manera covalente

- A 1 ml de la mezcla de diacrilamida de PEG-3400 y α -monoacrilamida, ω -mono(éster metílico de la cadena lateral de paclitaxel) se añadió N-vinil pirrolidona (3.5 μl) y Eosin Y (10 μl de una solución 10 mM en solución salina amortiguada con HEPES, pH de 7.4). Esta solución fue expuesta a la luz visible a alrededor de 500 nm (75 mW/cm^2) por un minuto, produciendo una red reticulada.

- De manera alternativa, a 1 ml de la mezcla de diacrilamida de PEG-3400 y α -monoacrilamida, ω -mono(éster metílico de la cadena lateral de paclitaxel) se añade el péptido GCCNNNNNCCG (15.4 mg, 13.8 moles, la secuencia de este péptido está diseñada para proveer solubilidad en agua) de modo de producir una relación de un tiol a una acrilamida. Esta solución es incubada a 37°C por una hora para producción de una red reticulada. Los geles pueden ser polimerizados como esferas añadiendo 50 μl de la solución de gelación conteniendo una relación 3.5:10 de N-vinil pirrolidona a Eosin Y, como se describió antes, a 1 ml de ciclohexano conteniendo 94 mg de Hypermer B239 (ICI Surfactants, de Wilmington, Delaware, Estados Unidos), con aplicación de vórtice a 37°C por una hora. Se espera que se produzcan esferas con diámetros que varían de 2 a 20 μm .

Ejemplo 17: formación de un biomaterial reticulado conteniendo una versión modificada de la cadena lateral de paclitaxel acoplada a PEG mediante un enlazador péptido

- Se unió un grupo acrilato al grupo hidroxilo en la cadena lateral de paclitaxel (figura 17). Un enlazador péptido soluble en agua puede entonces añadirse. Si un enlazador conteniendo un residuo lisina fuera usado en este método, entonces la lisina nucleófila incrementaría la tasa de hidrólisis del fármaco a partir del biomaterial, o si se usara un enlazador conteniendo un residuo hidrófobo, entonces la tasa de hidrólisis sería reducida por la remoción de agua desde el lugar del enlace éster.

- Preparación del éster metílico de acrilato de la cadena lateral de paclitaxel (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-acrilato-3-fenil-isoserina)**

- Una solución de 120 mg (0.4 mmoles) de éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-3-fenil-isoserina y 55 μl (0.8 mmoles) de ácido acrílico en 4 ml de diclorometano y 1 ml de DMF fue enfriada a 0°C. Luego se añadieron 126 μl (0.8 mmoles) de diisopropilcarbodiimida y unos cuantos cristales de dimetilaminopiridina y la mezcla de reacción fue agitada a 0°C por dos horas. Los solventes fueron removidos al vacío y el producto crudo disuelto en 50 ml de diclorometano. La solución orgánica fue lavada con KHSO_4 1M, NaHCO_3 al 5%, y solución salina, y secada sobre Na_2SO_4 . El producto puro fue obtenido después de cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:2 v/v).
- RMN- ^1H (CDCl_3) δ 3.76 (s, 3H, OCH_3), 5.53 (d, 1H, CHO), 5.90 (d d, 1H, CHPh), 5.91 (d d, 1H, CHCH $_2$), 6.18 (d d, 1H, CHCH $_2$), 6.45 (d d, 1H, CHCH $_2$), 7.06 (d, 1H, NH), 7.29-7.55 (m, 8H, Ar Tax), 7.80 (d t, 2H, Ar Tax)
- RMN- ^{13}C (CDCl_3) δ 52.87 (CHOH), 53.56 (CHPh), 74.44 (OCH_3), 126.63-137.44 (ArTax), 126.97 (CHCH $_2$), 132.78 (CHCH $_2$), 164.82 (COO acrilato), 166.84 (COOMe), 168.38 (CONH)

- Preparación de enlazador péptido**

Se sintetiza un péptido usando técnicas de fase sólida a base de Fmoc de modo de contener un solo residuo cisteína desprotegido, con la secuencia Acetil-Gly-Cys-Gly-Tyr-Gly-Arg-Gly-Asn-Gln-Cys(tbutio)-NH₂. El grupo Cys(tbutio) es introducido usando Fmoc-Cys(tbutio)-OH (Novabiochem). Después del corte de la resina con 88:5:5:2 de ácido trifluoroacético:agua:fenol:triisopropilsilano, el péptido es precipitado en éter dietílico y recolectado por filtración. El péptido crudo es purificado por cromatografía C18 de escala semi-preparativa, y la identidad del pico aislado es verificada por espectrometría de masa MALDI-TOF.

Reacción de adición conjugada entre éster metílico de acrilato de cadena lateral de paclitaxel y el enlazador péptido

El éster metílico del acrilato de cadena lateral de paclitaxel (1.25 mg, 3.68 μ moles) es dispersado en 1 ml de solución salina amortiguada con HEPES, conteniendo trietanolamina 115 mM, pH de 8, y reaccionado con el péptido anterior (8.4 mg, 7.36 μ moles) por una hora a 37°C. El acoplamiento del derivado de paclitaxel al péptido es monitoreado usando cromatografía C18 y detección UV. Siguiendo la reacción completa del péptido con el éster metílico de acrilato de cadena lateral de paclitaxel vía una reacción de adición conjugada, se añade ditiotretol (2.27 mg, 14.72 μ moles) a la mezcla por una hora a temperatura de habitación para desproteger el grupo tbutio en el residuo cisteína del péptido. La purificación del producto de cadena lateral de paclitaxel enlazado con péptido es lograda usando cromatografía C18 de escala semi-preparativa.

Reacción de adición conjugada entre enlazador péptido en la cadena lateral de paclitaxel modificada y una insaturación conjugada enlazada mediante PEG

El producto de cadena lateral de paclitaxel enlazado a péptido anterior (5.45 mg, 3.68 μ moles) es dispersado en 1 ml de solución salina amortiguada con HEPES 10 mM, conteniendo trietanolamina 115 mM, pH de 8, y reaccionado con diacrilamida de PEG-3400 del Ejemplo 16 (100 mg, 29.4 μ moles) por una hora a 37°C. El producto puede entonces ser reticulado como se describe en el Ejemplo 16.

Ejemplo 18: formación de un biomaterial reticulado conteniendo la cadena lateral de paclitaxel acoplada a PEG mediante un enlazador que contiene amina

Este ejemplo describe la estrategia de síntesis para el éster metílico de 2-O-(3-amino-propionato) de la cadena lateral de paclitaxel. El acoplamiento de esta cadena lateral de paclitaxel modificada a una insaturación conjugada enlazada por medio de PEG y la reticulación de este producto para formar un biomaterial pueden llevarse a cabo como se describe en el Ejemplo 16 para los compuestos que contienen tiol correspondientes.

Preparación de éster metílico de 2-O-(3-amino-propionato) de cadena lateral de paclitaxel

PASO A) Preparación de una cadena lateral de paclitaxel, modificada, protegida (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(3-boc-amino-propionato)-3-fenil-isoserina)

Esta reacción del éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-3-fenil-isoserina (0.4 mmoles) y ácido 3-Boc-amino-propiónico (0.8 mmoles) en 4 ml de diclorometano puede ser llevada a cabo como se describe para la reacción análoga en el Ejemplo 16 para la preparación del éster metílico de 2-O-(3-tio-propionato) de cadena lateral de paclitaxel.

PASO B) Desprotección para formar éster metílico de 2-(3-amino-propionato) de cadena lateral de paclitaxel (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(3-amino-propionato)-3-fenil-isoserina)

Una solución saturada de HCl en éter dietílico es añadida a una solución del compuesto Boc-prottegido en diclorometano, y la mezcla de reacción es agitada a temperatura de habitación por una hora. Los solventes son removidos al vacío, y el producto es obtenido como su sal HCl.

Ejemplo 19: formación de un biomaterial reticulado que contiene paclitaxel acoplado a PEG mediante un enlazador que contiene tiol

Puede unirse 3-mercaptopropionato al alcohol 2' en paclitaxel (figura 16). Este producto puede entonces ser unido a una insaturación conjugada enlazada mediante PEG (figura 16) y reticulado para formar un biomaterial como se describe en el Ejemplo 16 para la reacción análoga usando compuestos que tienen la cadena lateral de paclitaxel.

Preparación de 2'-O-3-tio-propionato de paclitaxel

PASO A) Preparación de 2'-O-3-tritiltio-propionato de paclitaxel protegido

Una solución de 87 mg (0.1 mmoles) de paclitaxel y 35 mg (0.1 mmoles) de ácido 3-tritiltio-propiónico en 4 ml de diclorometano fue enfriada a 0°C. Luego se añadieron 16 μ l (0.1 mmoles) de diisopropilcarbodiimida y unos

cuantos cristales de dimetilaminopiridina y la mezcla de reacción fue agitada a 01C por una hora y otras dos horas a temperatura de habitación. El solvente fue removido al vacío y el producto crudo disuelto en 25 ml de diclorometano. La solución orgánica fue lavada con KHSO₄ 1M, NaHCO₃ al 5%, solución salina, y secada sobre Na₂SO₄. El producto puro fue obtenido después de cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:1).

PASO B) Desprotección para formar 2'-O-3-tio-propionato de paclitaxel

El paso de desprotección fue llevado a cabo añadiendo una solución de TFA, triisopropilsilano, y agua (95:2.5:2.5) al compuesto tritil protegido en diclorometano. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura de habitación por una hora. Los solventes fueron removidos al vacío, y el producto fue obtenido después de cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:1).

Ejemplo 20: formación de un biomaterial reticulado que contiene una versión modificada de paclitaxel acoplado a PEG mediante un enlazador péptido

Un grupo acrilato puede ser unido al alcohol 2' en paclitaxel (figura 17). Un enlazador péptido soluble en agua puede entonces ser añadido mediante una reacción de adición conjugada, y este producto puede ser acoplado a una insaturación conjugada enlazada mediante PEG, como se describe en el Ejemplo 16, y reticulado como se describe en el Ejemplo 16.

Preparación de 2'-O-acrilato de paclitaxel

Una solución de 85 mg (0.1 mmoles) de paclitaxel y 70 mg (0.2 mmoles) de ácido acrílico en 4 ml de diclorometano es enfriada a 01C. Luego, se añadieron 32 µl (0.2 mmoles) de diisopropilcarbodiimida y unos cuantos cristales de dimetilaminopiridina, y la mezcla de reacción es agitada a 01C por dos horas. El solvente es removido al vacío, y el producto crudo es disuelto en 50 ml de diclorometano. La solución orgánica es lavada con KHSO₄ 1M, NaHCO₃ al 5%, solución salina y secada sobre Na₂SO₄. El producto puro es obtenido después de cromatografía en columna.

Ejemplo 21: formación de un biomaterial reticulado que contiene doxorubicina acoplado a PEG mediante un enlazador que contiene tiol

Como se describió para paclitaxel, el fármaco doxorubicina puede ser modificado con un enlazador que contiene tiol. La unión de este producto a una insaturación conjugada enlazada mediante PEG y la reticulación de los grupos insaturados conjugados remanentes para formar un biomaterial puede ser llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 19 para el derivado de paclitaxel.

Preparación de doxorubicina-O-3-tio-propionato

PASO A) Preparación de N-Boc-doxorubicina

Una solución de 116 mg (0.2 mmoles) de doxorubicina HCl en NaOH 1M es agitada y enfriada en un baño de hielo. Se añade una solución de 48 mg (0.22 mmoles) de dicarbonato de di-tert-butilo en dioxano, y la mezcla de reacción es agitada por dos horas a temperatura de habitación. El dioxano es removido al vacío, y la solución acuosa es acidulada con KHSO₄ 1M a un pH de 2-3. La solución acuosa es extraída con acetato de etilo. La fase orgánica es lavada con solución salina, secada sobre Na₂SO₄, y concentrada al vacío.

PASO B) Preparación de N-Boc-doxorubicina-O-3-tritiltio-propionato

La reacción de N-Boc-doxorubicina (0.2 mmoles) y ácido 3-tritiltio-propiónico (0.1 mmoles) en diclorometano usando diisopropilcarbodiimida (0.1 mmoles) y dimetilaminopiridina puede ser llevada a cabo como se describió en el Paso A del Ejemplo 19 para paclitaxel en vez de N-Boc-doxorubicina.

PASO C) Desprotección para formar doxorubicina-O-3-tio-propionato

La desprotección del compuesto N-Boc protegido es análoga al Paso B del Ejemplo 19 para la desprotección del derivado de paclitaxel tritil protegido.

Ejemplo 22: formación de un biomaterial reticulado que contiene metoxiestradiol acoplado a PEG mediante un enlazador que contiene tiol

2-metoxiestradiol tiolado puede ser sintetizado como se describe mas adelante. Este compuesto puede entonces ser incorporado en un biomaterial como se describe en los Ejemplos 19 y 21 para paclitaxel y doxorubicina.

Preparación de 2-metoxiestradiol tiolado

La reacción de 2-metoxiestradiol (0.5 mmoles) y ácido 3-tritilitio-propiónico (0.25 mmoles) en diclorometano usando diisopropilcarbodiimida (0.25 mmoles) y dimetilaminopiridina puede ser llevada a cabo como se describe en el Paso A en el Ejemplo 19 para paclitaxel. La desprotección de este compuesto tritil protegido es análoga al Paso B en el Ejemplo 19 para la desprotección del derivado de paclitaxel tritil protegido.

Ejemplo 23: incorporación de un péptido que contiene tiol en un biomaterial y la cinética de liberación del péptido modificado del biomaterial (sin enlazador; ejemplo de referencia)

Un péptido terapéutico que se sabe afecta la adhesión celular a la membrana de basamento fue acoplado a una insaturación conjugada enlazada por medio de PEG. El acoplamiento ocurrió debido a la adición de un solo residuo de cisteína a la secuencia del péptido activo. Al liberarse el péptido del biomaterial reticulado, el péptido original no fue regenerado, debido a que el tiol del residuo cisteína fue modificado con ácido propiónico. Sin embargo, la naturaleza de este y otros péptidos terapéuticos es tal que la actividad del péptido no debe verse afectada por la presencia de esta cisteína modificada en el extremo del péptido.

Preparación de péptido

Un péptido, que contiene un solo residuo cisteína, fue sintetizado usando técnicas en fase sólida a base de Fmoc, con la secuencia Acetil-Gly-Cys-Gly-Tyr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-NH₂. Después del corte de la resina con 88:5:5:2 ácido trifluoroacético:agua:fenol:triisopropilsilano, el péptido fue precipitado en éter dietílico y recolectado por filtración. El péptido crudo fue purificado mediante cromatografía C18 en escala semi-preparativa, y la identidad del pico aislado fue verificada por espectrometría de masa MALDI-TOF.

Preparación de diacrilato de polietilenglicol

Polietilenglicol, peso molecular de 3,400 (PEG-3400, 20 g, 11.765 mmoles -OH) fue secado por destilación azeótropa en tolueno y enfriado a temperatura de habitación. Se añadió diclorometano para producir una solución clara a 0°C. La mezcla fue enfriada en un baño de hielo y reaccionada durante la noche con cloruro de acrilóilo (1.43 ml, 17.647 mmoles, 1.5 eq.) en presencia de trietilamina (2.46 ml, 17.647 mmoles, 1.5 eq.). La solución fue filtrada y precipitada en éter dietílico. Diacrilato de polietilenglicol-3400 fue obtenido con un rendimiento de 17 g.

Reacción de adición conjugada entre un péptido y una insaturación conjugada enlazada mediante PEG

El péptido (3.92 mg, 3.68 µmoles) fue disuelto en 115 µl de solución salina amortiguada con MES 1 mM, pH de 5.8, y mezclado con 870 µl de diacrilamida de PEG-3400 (100 mg, 29.4 µmoles, del Ejemplo 16) disuelta en solución salina amortiguada con HEPES 10 mM, pH de 8, conteniendo trietanolamina 115 mM, y dejado asentar por 10 minutos a 37°C. El acoplamiento completo del péptido al PEG modificado fue verificado usando reactivo de Ellman.

Formación de biomaterial de PEG reticulado conteniendo péptido ligado de manera covalente

Para facilitar la foto-polimerización/foto-reticulación de la solución anterior del péptido y diacrilamida de PEG, se añadieron N-vinil pirrolidona (3.5 µl) y Eosin Y (10 µl de una solución 10 mM en solución salina amortiguada con HEPES, pH de 7.4). La solución fue expuesta a la luz visible a alrededor de 500 nm (75 mW/cm²) por un minuto, produciendo una red reticulada conteniendo péptido hidrolizable. La liberación del péptido del material fue monitoreada usando cromatografía C18. Después de 10 días a un pH de 7.4, 37°C, alrededor de una tercera parte del péptido había sido liberada del material.

Cinética de liberación del péptido modificado del biomaterial

Para estudiar la liberación hidrolítica del péptido del polímero, el péptido (15.7 mg, 14.71 µmoles) fue disuelto en 115 µl de solución salina amortiguada con MES 1 mM, pH de 5.8, y la presencia de un tiol libre en el péptido fue verificada por reactivo de Ellman. Se disolvió diacrilato de PEG-3400 (100 mg, 29.41 µmoles) en 885 µl de solución salina amortiguada con HEPES 10 mM, pH de 8, conteniendo trietanolamina 115 mM. La unión del péptido al PEG fue seguida usando cromatografía C18. Se usó un gradiente de 95% de agua con 0.1% de TFA/5% de acetonitrilo a 40% de agua con 0.1% de TFA/60% de acetonitrilo. El péptido libre levigó a alrededor de 20% de acetonitrilo, y el diacrilato de PEG levigó a alrededor de 40% de acetonitrilo. Dentro de 10 minutos del mezclado del péptido y el diacrilato de PEG, el pico del péptido ya no fue observado, y la absorbencia relacionada con el péptido a 273 nm se encontró co-levigar con el diacrilato de PEG. Espectrometría de masa MALDI-TOF verificó que el péptido estuviera acoplado al PEG. La mezcla fue entonces incubada a un pH de 8, 37°C, y la liberación del péptido del PEG fue seguida por la aparición de un pico que levigó a 20% de acetonitrilo. El análisis de espectrometría de masa MALDI-TOF de este pico mostró que contenía un compuesto con un peso molecular igual al del péptido original mas 72 unidades de masa, indicando que el péptido fue ahora modificado con ácido propiónico. Este resultado indica que el tiol en el péptido que contiene

cisteína había reaccionado con el grupo acrilato en el PEG mediante una reacción de adición conjugada y que el péptido modificado fue liberado debido a la hidrólisis del enlace éster entre el péptido modificado y el PEG. La tasa de liberación del péptido modificado fue medida, dando una vida media de 4.86 días para la liberación del péptido modificado a 37°C, pH de 8. Con base en la dependencia de pH predicha de esta hidrólisis, la vida

media para liberación a 37°C es de alrededor de tres semanas a un pH de 7.4. La tasa de hidrólisis de diacrilato de PEG-3400 en solución salina amortiguada con HEPES 10 mM, pH de 8, conteniendo trietanolamina 115 mM, también fue medida. Se encontró que el ácido acrílico hidrolizaba a partir del diacrilato de PEG-3400 con una vida media de 24 días a 37°C, pH de 8, indicando una vida media para liberación de alrededor de tres meses a 37°C, pH de 7.4.

Ejemplo 24: incorporación de un oligonucleótido tiolado en un biomaterial y la cinética de liberación de oligonucleótido tiolado del biomaterial (sin enlazador; ejemplo de referencia)

Este ejemplo describe un método para la incorporación de un oligonucleótido tiolado en un biomaterial y medir la tasa de liberación del oligonucleótido debido a la hidrólisis del biomaterial. Un oligonucleótido conteniendo un solo grupo tiol es sintetizado a la medida (Synthegen, LLC, de Houston, Texas, Estados Unidos). El oligonucleótido (3.675 μ moles) es añadido a 100 mg de diacrilato de PEG del Ejemplo 23 (29.4 μ moles) en 1 ml de solución salina amortiguada con HEPES 10 mM con trietanolamina 115 mM, pH de 8. Después de 15 minutos, se añaden a la solución N-vinil pirrolidona (3.5 μ l) y Eosin Y (10 μ l de una solución 10 mM en solución salina amortiguada con HEPES, pH de 7.4). Esta solución es expuesta a la luz visible a alrededor de 500 nm (75 mW/cm²) por un minuto para producción de una red reticulada conteniendo el oligonucleótido. La hidrólisis de la liberación del oligonucleótido tiolado con ácido propiónico al agua amortiguada que rodea el material puede ser monitoreada mediante adsorción de UV a 260 nm.

Ejemplo 25: formación de biomateriales coloidales

Este ejemplo describe un método de producir un biomaterial coloidal vía reacciones de adición conjugada. Un biomaterial coloidal se refiere a un gran copolímero de dimensiones mayores de 5 nm y menores de 1 μ m. El biomaterial coloidal puede contener moléculas, tales como péptidos, que objetivan el coloide a las células.

Una mezcla (1 ml) de diacrilamida de PEG-3400 y α -monoacrilamida de PEG-3400, ω -mono(éster metílico de cadena lateral de paclitaxel) (Ejemplo 16) es incubada a 37°C por una hora. El péptido GCNNRGDNNCG (31.0 mg, 27.6 μ moles), que contiene una secuencia RGD para objetivación a las células, puede también ser incluido en esta mezcla en una relación de un tiol a una acrilamida. Se espera que este método produzca un copolímero lineal de alto peso molecular de PEG-3400 y péptido, que es rematado en los extremos con mono(éster metílico de cadena lateral de paclitaxel) de PEG-3400 que puede formularse como una composición inyectable.

Ejemplo 26: formación de un biomaterial reticulado que contiene la cadena lateral de paclitaxel acoplada a PEG mediante un enlazador que contiene tiol

El Ejemplo 16 describe la formación de un biomaterial que contiene la cadena lateral de paclitaxel enlazada a un polímero. Este biomaterial fue formado usando un componente precursor teniendo la fórmula D-OC(O)(CH₂)₂-S-(CH₂)₂C(O)NH-P, donde D es una ramificación farmacéuticamente activa (v.gr., paclitaxel -en este ejemplo se está usando el éster metílico de la cadena lateral de paclitaxel por razones económicas) y P es un polímero (v.gr., PEG). La cadena lateral de paclitaxel es usada como un modelo para toda la molécula de paclitaxel debido a que es mas barata y debe tener una cinética de liberación similar al paclitaxel entero pues el paclitaxel entero es acoplado mediante su cadena lateral. Para generar otros biomateriales que liberan un fármaco tal como paclitaxel mas lentamente, puede usarse un enlazador conteniendo grupos metileno (CH₂) adicionales entre el fármaco y el grupo tiol en el enlazador. La síntesis de tal biomaterial formado usando un componente precursor teniendo la fórmula D-OC(O)(CH₂)₃-S-(CH₂)₂C(O)NH-P es descrita mas adelante y se ilustra en la figura 18.

Preparación de éster metílico de 2-O-(4-tio-butirato) de la cadena lateral de paclitaxel

PASO A) Preparación de ácido 4-tritilitio-butírico

Una solución de 0.48 g (2 mmoles) de ácido 4,4-ditiodibutírico en dioxano recién destilado (20 ml) fue agitada bajo una atmósfera de nitrógeno. Luego se añadieron 0.52 ml (2.1 mmoles) de tributilfosfina y 50 μ l de agua, y la mezcla de reacción fue agitada por cuatro horas a temperatura de habitación. Después de remover los solventes al vacío, el producto crudo fue destilado en 25 ml de DMF junto con 1.15 g (4.4 mmoles) de trietilmetanol, y la solución fue agitada por 30 minutos a 60°C. Después de que la solución fue enfriada a temperatura ambiental, se añadieron 580 μ l (4.6 mmoles) de éterato de borotri-fluor y la mezcla de reacción fue agitada durante la noche a 80°C. La solución fue concentrada al vacío y el producto purificado por cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:1 v/v). Después de re-cristalización a partir de acetato de etilo/hexano, el producto fue obtenido como agujas blancas con un rendimiento del 50%. RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.67 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.27 (m, 4H, CH₂S y CH₂COOH), 7.15-7.48 (m, 15H, Trt), 10.49

(br s, 1H, COOH)

RMN-¹³C (CDCl₃) δ 23.76 (CH₂CH₂CH₂), 31.1 (CH₂S), 32.9 (CH₂COOH), 66.7 (C(Ph)3Trt), 126.6-144.8 (Ar Trt), 179.0 (COOH)

5 **PASO B) Preparación de cadena lateral de paclitaxel modificada, protegida (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(4-tritilbutirato)-3-fenil-isoserina)**

Esta reacción de 133 mg (0.44 mmoles) de éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-3-fenil-isoserina y 177 mg (0.49 mmoles) de ácido 4-tritilbutírico con 76 µl (0.49 mmoles) diisopropilcarbodiimido y unos cuantos cristales de dimetilaminopiridina fue llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 16, Paso B. El producto fue obtenido como un sólido blanco en rendimiento del 77% después de cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:3 a 1:2 v/v).

10 RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.60 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.20 (m, 2H, CH₂COOH), 2.33 (m, 2H, CH₂S), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.40 (d, 1H, CHO), 5.84 (d d, 1H, CHPh), 6.96 (br d, 1H, NH), 7.16-7.54 (m, 23H, Ar Tax y Trt), 7.79 (d t, 2H, Ar Tax)

15 RMN-¹³C (CDCl₃) δ 23.7 (CH₂CH₂CH₂), 31.1 (CH₂S), 32.7 (CH₂COOH), 52.8 (CHPh), 53.4 (HCOCO), 66.7 (C(Ph)₃ Trt), 74.3 (OCH₃), 126.5-144.8 (Ar Tax y Trt), 166.8 (COOMe), 168.4 (COOCH), 171.7 (CONH)

20 **PASO C) Desprotección para formar éster metílico de 2-O-(4-tio-butirato) de cadena lateral de paclitaxel (éster metílico de N-benzoil-(2R,3S)-2-O-(4-tio-butirato)-3-fenil-isoserina)**

La remoción del grupo tritilo del tior fue llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 16, Paso C. Después de cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/ hexano 1:3 a 1:2 v/v), el producto fue obtenido como un sólido blanco.

25 RMN-¹H (CDCl₃) δ 1.29 (t, 1H, SH), 1.89 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.53 (m, 4H, CH₂SH y CH₂COO), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 5.47 (d, 1H, CHO), 5.89 (d d, 1H, CHPh), 6.99 (d, 1H, NH), 7.28-7.57 (m, 8H, Ar Tax), 7.80 (m, 2H, Ar Tax)

30 RMN-¹³C (CDCl₃) δ 23.6 (CH₂CH₂CH₂), 28.7 (CH₂SH), 32.1 (CH₂COO), 52.9 (CHPh), 53.4 (CHOCO), 74.4 (OCH₃), 126.5-137.5 (Ar Tax), 166.9 (COOMe), 168.4 (COOCH), 171.7 (CONH)

Reacción de adición conjugada entre el éster metílico de 2-O-(4-tio-butirato) de cadena lateral de paclitaxel y una insaturación conjugada enlazada mediante PEG

35 La conjugación de 11 mg (25 µmoles) de éster metílico de la cadena lateral de paclitaxel conteniendo un enlazador de 4-tio-butirato con 361 mg (100 µmoles) de diacrilamida de PEG-3400 fue llevada a cabo análoga a la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 16.

Ejemplo 27: cinética para la liberación de la cadena lateral de paclitaxel a partir de conjugados enlazados por PEG y a partir de hidrogeles

40 Los Ejemplos 16 y 26 describen la formación de formas de liberación sostenida de paclitaxel, usando la cadena lateral de paclitaxel por economía en la síntesis. Este ejemplo describe las características de liberación que son obtenidas con estas dos formas, en las cuales hay ya sea tres o cuatro átomos de carbono entre la cadena lateral de paclitaxel y el azufre en el enlazador que conecta la cadena lateral de paclitaxel con el polímero, i.e., n es 2 o 3 respectivamente.

Liberación de conjugados enlazados por PEG en solución

50 Una solución de 50 mg de conjugado enlazado con PEG (del Ejemplo 16 o 26) en 1 ml de PBS, pH de 7.4, fue incubada a 37°C. De manera periódica, muestras de 50 µl fueron retiradas y se añadió 1 µl de HCl 1M para ajustar el pH a 4. Las muestras fueron almacenadas a -30°C hasta analizarse. La cantidad de compuesto liberado fue medida con HPLC usando una columna C18 en fase invertida (Nova-Pak® C18, 3.9 x 150 mm, Waters Associates Inc.), un módulo de separación Waters 2690 (Waters Associates Inc.), y un arreglo detector de foto-diodo Waters 996 (Waters Associates Inc.). Se usó como sistema de levigación un gradiente lineal de 0.1% de TFA en agua/acetonitrilo 75:25 v/v a 25:75 v/v en 17.5 minutos a una tasa de flujo de 1 ml/min. Los cromatogramas fueron analizados con software Waters Millennium® 32 (versión 3.05.01). Los resultados son ilustrados en la figura 19A.

60 Un hidrogel foto-polimerizado al 10% peso/volumen de 10 mg de conjugado enlazado por medio de PEG (preparado como se describió en el Ejemplo 16) fue incubado a 37°C en 1 ml de PBS, pH de 7.4. De manera periódica, se retiraron muestras de 50 µl y se reemplazaron con amortiguador fresco. La cantidad de compuesto liberado fue medida con HPLC como se describió antes (figura 19B).

65 Como se ilustra en las figuras 19A y 19B, la tasa de liberación de fármaco por hidrólisis del enlazador en un conjugado enlazado por PEG o hidrogel puede ser modulada variando la longitud de la cadena entre el fármaco y el átomo de azufre (o nitrógeno) en el enlazador. El conjugado enlazado por PEG y el hidrogel que contiene tres átomos de carbono entre el fármaco (es decir, la cadena lateral de paclitaxel) y el átomo de azufre en el enlazador liberaron el fármaco mas rápidamente que el conjugado enlazado por PEG correspondiente y el

hidrogel conteniendo un grupo metileno (CH_2) adicional separando el fármaco y el átomo de azufre en el enlazador. Si se desea, dos o mas conjugados enlazados mediante PEG con enlazadores que contienen diferentes números de grupos separando el fármaco del átomo de azufre (o nitrógeno) en el enlazador pueden combinarse para formar un hidrogel con una tasa de liberación global mas farmacológicamente favorable.

Ejemplo 28: incorporación de fracciones de enlace en biomaterial

Los enfoques de afinidad pueden ser empleados para obtener liberación sostenida tanto de proteínas como de moléculas pequeñas. La incorporación de heparina ligada o sitios de afinidad a la heparina en biomateriales para facilitar la enlace de proteínas de enlace de heparina, tales como factores de crecimiento de enlace de heparina, al biomaterial, es descrita anteriormente. Por ejemplo, biomateriales conteniendo sitios de afinidad a la heparina pueden ser formados en presencia de proteínas de enlace de heparina para incrementar la cantidad de proteínas de enlace de heparina que están acopladas indirectamente al biomaterial vía afinidad a la ramificación de enlace de heparina o mediante la enlace de heparina a la ramificación de enlace del péptido de

enlace de heparina. Al degradar el biomaterial, las proteínas encapsuladas son liberadas. Este ejemplo describe la incorporación de otras fracciones de enlace en biomateriales. Muchas proteínas contienen sitios de enlace para iones de metal divalentes, tales como Cu^{2+} , Co^{2+} , y Zn^{2+} . Esta afinidad puede ser explotada para la liberación sostenida de proteínas de enlace de ion de metal. Un ligando sintético de enlace de ion de metal, tal como un ácido iminodiacético, residuo His, péptido His-Gly-Gly-His, u oligómero de residuos His, puede ser incorporado en geles para servir como fracciones de enlace, que entonces están disponibles para ligar las proteínas de enlace de ion de metal, tales como la hormona del crecimiento humana. Estos sitios de enlace pueden ser incorporados mediante un enlazador hidrolizable para proveer una retención y una liberación mas controladas.

La preparación de un ligando de enlace de ion de metal de ácido iminodiacético es descrita mas adelante (figura 20).

Preparación de un ligando de enlace de ion de metal de 2-tio-etilimina diacetato

PASO A) Preparación de 2-tritiltio-etilamina

Una solución de hidrocloreuro de cisteamina (2-tio-etilamina hidrocloreuro) y trifenilmetanol en DMF fue agitada a 60°C por 30 minutos. Después de enfriar la solución a temperatura ambiental, se añadió eterato de borotrifluor y la mezcla de reacción fue agitada a 80°C. La mezcla de reacción fue concentrada al vacío y el residuo fue dispersado en NaHCO_3 acuoso al 5% y extraída con acetato de etilo hasta que ya no hubo sólido presente en la capa de agua. La solución orgánica fue lavada con solución salina, secada sobre Na_2SO_4 , y concentrada al vacío, dando como resultado un 87% de producto crudo. El producto fue disuelto en agua, ligeramente acidulado con KHSO_4 1M, dando como resultado un precipitado que fue re-cristalizado en acetato de etilo/metanol, obteniendo agujas blancas en un rendimiento del 75%.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 2.32 (t, 2H, CH_2S), 2.53 (t, 2H, CH_2N), 7.06-7.24 (m, 15H, Trt), 7.84 (br s, 2H, NH_2)

RMN- ^{13}C (CDCl_3) δ 29.8 (CH_2S), 38.8 (NCH_2), 67.3 (C(Ph)_3 Trt), 126.8-129.6 y 144.5 (Ar Trt)

PASO B) Preparación de éster dietílico de diacetato de 2-tritiltio-etilimina

A una solución de 1.78 g (5 mmoles) de 2-tritiltio-etilamina y 1.67 ml (15 mmoles) de bromoacetato de etilo en 100 ml de THF se añadieron 2.09 ml (15 mmoles) de trietilamina. Después de agitación por tres días a temperatura de habitación, se añadieron otros 15 mmoles de bromoacetato de etilo y 15 mmoles de trietilamina. Después de un tiempo total de reacción de seis días, la mezcla de reacción fue concentrada al vacío y el producto fue purificado por cromatografía en columna (sílice, levigante: acetato de etilo/hexano 1:2 v/v). El producto fue obtenido como un aceite en un rendimiento del 88%.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 1.23 (t, 6H, OCH_2CH_3), 2.34 (s, 2H, CH_2S), 2.62 (t, 2H, CH_2N), 3.36 (s, 4H, NCH_2COOH), 4.11 (q, 6H, OCH_2CH_3), 7.18-7.41 (m, 15H, Trt)

RMN- ^{13}C (CDCl_3) δ 14.2 (OCH_2CH_3), 30.3 (CH_2S), 53.7 (NCH_2), 54.9 (NCH_2COOH), 60.5 (OCH_2CH_3), 66.7 (C(Ph)_3 Trt), 126.6-129.6 y 144.9 (Ar Trt), 171.0 (COOEt)

PASO C) Preparación de ácido 2-tritiltio-etilimina diacético

A una solución de éster dietílico de 2-tritiltio-etilimina diacetato en 20 ml de dioxano y 7.5 ml de metanol se añadieron 7.5 ml de NaOH acuoso 4M. Después de agitación por una hora a temperatura de habitación, la mezcla de reacción fue concentrada al vacío y el residuo fue suspendido en agua. La solución acuosa fue acidulada con KHSO_4 1M y extraída con acetato de etilo. La solución de acetato de etilo fue lavada con solución salina, secada sobre Na_2SO_4 , y concentrada al vacío. El producto fue obtenido como un sólido blanco en un rendimiento cuantitativo.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ 2.52 (t, 2H, CH_2S), 2.63 (t, 2H, CH_2N), 3.38 (s, 4H, NCH_2COOH), 7.17-7.39 (m, 15H, Trt), 9.55 (br s, 2H, COOH)

RMN- ^{13}C (CDCl_3) δ 26.8 (CH_2S), 54.5 (NCH_2), 55.6 (NCH_2COOH), 67.6 (C(Ph)_3 Trt), 127.1-129.5 y 144.1 (Ar Trt), 169.6 (COOH)

PASO D) Preparación de diacetato de 2-tio-etilimina

Una solución de ácido 2-tritilitio-etilimina en diclorometano fue añadida a una solución de TFA, triisopropilsilano y agua (95:2.5:2.5 v/v/v). Después de agitar por una hora a temperatura de habitación, los solventes fueron removidos al vacío y el residuo fue dispersado en una solución de NaHCO_3 al 5%, libre de oxígeno. La solución acuosa fue lavada con éter dietílico, acidulada con KHSO_4 1M y extraída con acetato de etilo. La solución orgánica fue lavada con solución salina, secada sobre Na_2SO_4 y concentrada al vacío.

Muchas glico-proteínas contienen dioles vecinales en los residuos de azúcar unidos a la proteína. Estas pueden ser explotadas para liberación sostenida. Fracciones ácido borónico, tales como grupos ácido fenilborónico, pueden ser incorporadas en biomateriales para uso en interacción por afinidad mediante formación reversible de complejos con los dioles vecinales. Se ha demostrado que las fracciones fenil boronato de la forma $-\text{NH}-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{B}(\text{OH})_2$ tienen un pK_a que es particularmente favorable (es decir, valores cercanos al pH fisiológico) (Winblade y colaboradores, Biomacromoléculas 1:523-533, 2000).

La síntesis de un ligando de ácido fenilborónico para incorporación en biomateriales para servir como fracciones de enlace para glico-proteínas a los biomateriales es descrita mas adelante (figura 21).

Síntesis de un ligando de ácido fenilborónico**PASO A) Preparación de ácido 4-((N-2-tritilitioetil)aminometil) bencenoborónico**

Se sintetiza ácido 4-((N-2-tritilitioetil)aminometil) bencenoborónico vía una aminación reductiva de ácido 4-formil fenilborónico y 2-tritilitio-etilamina (del Ejemplo 27) con triacetoxiborohidruro de acuerdo con los procedimientos de Abdel-Magid y colaboradores (J. Org. Chem. 61:3849-3862, 1996).

PASO B) Preparación de ácido 4-(N-2-tioetil)aminometil) bencenoborónico

La desprotección del tiol es llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 27, Paso D.

Es particularmente útil la incorporación de las fracciones de enlace usando ya sea enlazadores que son hidrolizables o enlazadores que contienen sitios de corte de proteasa. Adicionalmente, también son útiles los geles que contienen sitios de enlace por afinidad sin tales enlazadores. De acuerdo con la invención se adicional enlazadores. Al liberarse el fármaco del portador de matriz polimérica, el gradiente de concentración entre la matriz de liberación sostenida y el ambiente se reduce, llevando a una liberación mas lenta. Esto puede ser compensado usando el presente método. Al proseguir el tiempo, tanto el gradiente de concentración como el número de sitios de afinidad se reducen, llevando a una liberación que es mas lenta por una parte por un menor gradiente de concentración pero acelerada por otra parte por un menor número de sitios de enlace por afinidad. Estas dos interacciones pueden oponerse entre sí, llevando a un perfil de liberación que es mas cercano al lineal. Mas aún, puede usarse mas de un enlazador, llevando a algunos sitios que son liberados rápidamente y otros que son liberados mas lentamente, para obtener un perfil de liberación mas deseable.

Pueden usarse fracciones de enlace por afinidad de varias características. Estas pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, o incluso fracciones péptidas, nucleótidas u orgánicas que son seleccionadas de manera combinatorial en cuanto a la afinidad apropiada al fármaco. Para fármacos orgánicos hidrófobos, puede ser particularmente útil la incorporación de ciclodextrinas, para proveer afinidad a través de las interacciones anfitrión (ciclodextrina)-huésped (fármaco) asociadas con este par.

Ejemplo 29: liberación de compuestos farmacéuticamente ctivos encapsulados por atrapamiento en biomateriales (ejmplo de referencia)

La red polimérica formada alrededor de un fármaco incorporado (particularmente un fármaco macro-molecular tal como ADN, ARN, polisacárido o proteína) puede dar como resultado liberación sostenida. La red polimérica puede estar diseñada para tener una permeabilidad y un grado de degradación que son apropiados para lograr la liberación que precede a la degradación (alta permeabilidad inicial, baja tasa de degradación) o se controla por degradación (baja permeabilidad inicial, alta tasa de degradación). Los enlazadores enseñados en la presente pueden ser usados para obtener tasas de degradación preferentes.

Los siguientes ejemplos describen tasas de liberación obtenidas usando hidrogeles poliméricos degradables obtenidos haciendo reaccionar multi-acrilatos de PEG lineales o de brazos múltiples con di-tioles de PEG lineales. El enlazador formado de esta manera es $\text{P-OC(O)-(CH}_2)_2\text{-S-(CH}_2)_2\text{-P}$

Síntesis de PEGs Acrilatados

Se preparó tetra-acrilato de PEG a partir de PEG de cuatro brazos, peso molecular de 14,800 (10 g, 0.676 mmoles, Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama, Estados Unidos, $\text{MN} = 11,880$, $\text{Mw} = 15,460$ por GPC en THF con detección de índice refractivo). El PEG de cuatro brazos fue secado por destilación azeotrópica en 300 ml de tolueno por una hora usando una trampa de Dean-Stark. Después de enfriamiento a menos de 50°C bajo argón, se añadieron 50 ml de diclorometano y trietilamina (0.75 ml, 2.0 equivalentes, Aldrich, de Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos). La reacción fue iniciada por la adición por goteo de cloruro de acrilóilo (0.33 ml, 1.5 equivalentes, Aldrich). La reacción prosiguió con agitación durante la noche en la oscuridad a

temperatura de habitación bajo argón. La solución amarillo pálido resultante fue filtrada a través de un lecho de alúmina neutro. Se añadió carbonato de sodio a la solución de tolueno-diclorometano y se agitó por dos horas. El carbonato de sodio fue removido por filtración, y el volumen de la solución fue reducido por evaporación rotatoria. El PEG fue precipitado del tolueno por adición de éter dietílico en un baño de hielo y fue recuperado por filtración. El precipitado fue lavado con éter dietílico y secado al vacío. Rendimiento: 8.7 g, RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.6 ppm (340.74 H, PEG), 4.3 ppm (t, 2.12 H, -CH₂-CH₂-O-CO-CH=CH₂), 5.8 ppm (dd, 1.00 H, CH₂=CH-COO-), 6.1 ppm, 6.4 ppm (dd, 2.00 H, CH₂=CH-COO-).

Se preparó octa-acrilato de PEG de manera similar a PEG de ocho brazos, peso molecular de 20,000 (Shearwater Polymers, Mn = 18,140, Mw = 19,210 por GPC en THF con detección de dispersión de luz de láser). RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.6 ppm (209.96 H, PEG), 4.3 ppm (t, 2.00 H, -CH₂-CH₂-O-CO-CH=CH₂), 5.8 ppm (dd, 1.00 H, CH₂=CH-COO-), 6.1 ppm, 6.4 ppm (dd, 2.01 H, CH₂=CH-COO-).

Triacrilato de PEG, peso molecular de 2,800, fue preparado de manera similar a partir de PEG de tres brazos, peso molecular de 2,000 (un regalo de Neocrin Company, de Irvine, California, Estados Unidos, Mn = 2,768, Mw = 2,856 por GPC en THF con detección de índice refractivo).

RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.6 ppm (83.97 H, PEG), 4.3 ppm (t, 2.04 H, -CH₂-CH₂-O-CO-CH=CH₂), 5.8 ppm (dd, 1.04 H, CH₂=CH-COO-), 6.1 ppm, 6.4 ppm (dd, 1.95 H, CH₂=CH-COO-).

Diacrilato de PEG, peso molecular de 3,400, fue preparado de manera similar al PEG con peso molecular de 3,400 (Aldrich, Mn de aproximadamente 3,400 de acuerdo con el fabricante).

RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.6 ppm (156.34 H, PEG), 4.3 ppm (t, 2.26 H, -CH₂-CH₂-O-CO-CH=CH₂), 5.8 ppm (dd, 1.0 H, CH₂=CH-COO-), 6.1 ppm, 6.4 ppm (dd, 2.0 H, CH₂=CH-COO-).

Se preparó mono-acrilato de PEG de manera similar a partir de mono-éter metílico de PEG, peso molecular de 5,000 (Fluka, de Buchs, Suiza, Mn de aproximadamente 5,000, de acuerdo con el fabricante). RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.6 ppm (94.38 H, PEG), 4.3 ppm (t, 1.93 H, -CH₂-CH₂-O-CO-CH=CH₂), 5.8 ppm (dd, 1.00 H, CH₂=CH-COO-), 6.1 ppm, 6.4 ppm (dd, 2.08 H, CH₂=CH-COO-).

Los polietilenglicoles de brazos múltiples fueron hechos por los diversos fabricantes iniciando la polimerización de etilenglicol con los alcóxidos de multi-alcoholes de bajo peso molecular. De esta manera, el eslabón al núcleo del PEG de brazos múltiples fue a través de un enlace éter.

Formación de gel

Para producir geles reticulados de un porcentaje dado de PEG, se hicieron dos soluciones, una conteniendo acrilato de PEG al porcentaje final deseado de PEG, y otra conteniendo ditiol de PEG al porcentaje final deseado de PEG. Para producir geles de PEG al 40%, se disolvió multi-acrilato de PEG a una concentración nominal de 40% peso/volumen en PBS 50 mM, pH de 7.4 (10.85 g/l Na₂HPO₄·7 H₂O), 0.88 g/l de NaH₂PO₄ anhidro, y 4.8 g/l de NaCl).

Justo antes de uso, ditiol de PEG, de peso molecular a 3,400 (Shearwater Polymers), fue disuelto por separado a una concentración nominal de 40% peso/volumen en PBS 50 mM, pH de 7.4. Debido a los volúmenes sumamente pequeños usados, el cambio de volumen de una solución amortiguadora al ocurrir disolución de PEG fue asumido ser igual a 1 ml por g de PEG. De esta manera, se añadieron 60 µl a 40 mg de PEG para producir una solución de PEG al 40% peso/volumen nominal. De manera similar, soluciones de PEG al 30% peso/volumen fueron formadas por adición de 70 µl de PBS a 30 mg de PEG. Para producir geles de PEG al 30%, se disolvió multi-acrilato de PEG a una concentración nominal de 30% peso/volumen en PBS 50 mM, pH de 7.4, y se disolvió por separado ditiol de PEG a una concentración nominal de 30% peso/volumen en PBS 50 mM, pH de 7.4. La disolución del PEG requirió de entre 3 y 10 minutos. Las soluciones de multi-acrilato de PEG y ditiol de PEG fueron combinadas en las relaciones definidas en la Tabla 9, tal que la relación de los grupos tiol a los grupos acrilato fuera siempre de 1:1.

Tabla 9. Formulaciones de geles de PEG reticulados usados en los presentes estudios

Tipo de gel	Solución de multi-acrilato de PEG, µl	Solución de ditiol de PEG, peso mol. 3,400, µl
Octa-acrilato de PEG, peso mol. 20,000	59.5	40.5
Tetra-acrilato de PEG, peso mol. 14,800	68.5	31.5
Triacrilato de PEG, peso mol. 2,800	33.8	66.2

Liberación de proteína

Para estudios de liberación de proteína, se añadieron partículas sólidas de albúmina de suero de bovino (Cohn,

ramificación V, Sigma, de St. Louis, Missouri, Estados Unidos, usadas tal como se recibieron y caracterizadas por microscopía de contraste de fases a una amplificación de 2.5 x) a la solución de multi-acrilato de PEG y se mezclaron con una punta de pipeta. La solución de ditiol de PEG fue añadida, y la solución fue mezclada con una punta de pipeta y luego transferida al centro de una diapositiva de microscopio de vidrio, hidrófoba (7.5 x 2.5 cm, revestida de acuerdo con las instrucciones del proveedor con SigmaCote, de Sigma). Separadores cuadrados de Teflón (2 x 20 cm, 700 µm de grosor) fueron colocados en los extremos de la diapositiva de vidrio, y se colocó sobre ella una segunda diapositiva hidrófoba. Las dos diapositivas fueron sujetadas por pasadores de amarre. La gota de la solución de PEG hizo contacto solamente con el vidrio hidrófobo y se esparció para formar un disco circular con un grosor de 700 µm. Se curaron los geles por dos horas a 37°C en una incubadora humidificada.

Hinchamiento y degradación del gel

Se caracterizaron el hinchamiento y la degradación de los geles fueron caracterizados. Se formaron los geles como antes en jeringas de plástico de 1 ml, con un volumen total de 100 µl (la punta de la jeringa había sido removida con una navaja de rasurar). Los geles fueron curados por dos horas a 37°C en una incubadora humidificada. Después del curado, los geles fueron expulsados de las jeringas, y las dimensiones iniciales fueron medidas con calibradores digitales. Los geles fueron entonces añadidos a 5 ml de PBs 50 mM, pH de 7.4, y almacenados a 37°C. Las dimensiones de los geles fueron medidas con calibradores durante el tiempo hasta que se disolvieron plenamente los geles. De manera adicional, la cantidad de PEG liberada al PBS fue medida después de 24 horas por cromatografía de exclusión de tamaños (Shodex OHPak SB-802-5HQ o SB-803HQ, 8 x 300 mm, levigante: fosfato 10 mM, NaCl 0.3 M, pH de 7.4, 0.3 ml/min, con detección de índice refractivo). Para medir de manera mas precisa la ramificación de volumen del polímero en los geles, la flotabilidad de los geles fue medida con un kit de determinación de densidad en etanol en una báscula Mettler-Toledo AG (Mettler-Toledo, de Greifensee, Suiza). La densidad del gel fue medida después de 24 horas de hinchamiento es agua desionizada. El gel fue entonces secado por congelación, y el peso de PEG en cada gel fue determinado. El volumen del gel hinchado fue calculado a partir de la ecuación $V_s = (W_a - W_n)/\rho_n$, donde V_s es el volumen del gel hinchado, W_a es el peso del gel hinchado en aire, W_n es el peso en etanol, V_p fue calculado a partir del peso después de secado por congelación y la densidad de polímero seco, tomada como 1.1198 g/ml. La ramificación de volumen del polímero en el gel hinchado fue entonces calculada como $v_2 = V_p/V_s$.

Para estudios de hinchamiento y degradación, los volúmenes de geles cilíndricos fueron medidos como una función del tiempo hasta que habían disuelto completamente los geles. La relación de hinchamiento, Q , fue calculada como: $Q = V_t/V_0$, donde V_t es el volumen al tiempo t y V_0 es el volumen inicial del gel. La ramificación de volumen de PEG en el gel fue estimada de $v_{PEG} = m_{PEG}/(\rho_{PEG} \cdot V_t)$, donde m_{PEG} es la masa inicial de PEG en el gel, y ρ_{PEG} es la densidad de PEG sólido, 1.1198 g/ml. Después de las primeras 24 horas de hinchamiento, se intercambiaron los 5 ml de solución amortiguadora sobre el gel, y el amortiguador removido fue analizado usando HPLC por exclusión de tamaños para determinar la cantidad de PEG liberada de los geles. El PEG liberado fue asumido no haberse incorporado dentro del gel durante el proceso de gelación, y un valor corregido para la masa inicial de PEG fue entonces usado para cálculos subsecuentes para mejor aproximar la masa de PEG en realidad reticulada en el material. La Tabla 10 muestra la cantidad de PEG liberada al amortiguador dentro de las 24 horas del hinchamiento y la masa inicial corregida de PEG en los geles.

Tabla 10. Cantidad de PEG incorporado dentro de la fase del gel durante la reticulación

Gel	Cantidad PEG liberada de gel, primeras 24 horas (mg/ 100 µl gel)	Masa inicial corregida de PEG (mg/ 100 µl gel)	Moles de reticulaciones gel perfectamente reticulado (µmoles) usando masa no corregida/ masa corregida
Octa-acrilato de PEG, peso molecular 20,000, 40% PEG	7	33	4.76/3.93
Tetra-acrilato de PEG, peso molecular 14,800, 40% PEG	7	33	3.70/3.05
Tetra-acrilato de PEG, peso molecular 14,800, 30% PEG	7	23	2.77/2.12
Triacrilato de PEG, peso molecular 2,800,	16	24	6.97/4.19

40% de PEG			
------------	--	--	--

El hinchamiento de los geles es desplegado en las figuras 22A y 22B, ilustrando que los geles habían alcanzado un volumen inicial de equilibrio después de unas cuantas horas. Para geles perfectamente reticulados, el valor de Q que se observa después de las primera cuantas horas de hinchamiento debe ser determinado principalmente por el peso molecular de PEG entre reticulaciones y la concentración de PEG durante reticulación, con una pequeña dependencia en la funcionalidad de la reticulación. Para geles hechos a partir de octa-acrilato de PEG, tetra-acrilato de PEG, o triacrilato de PEG, el peso molecular entre las reticulaciones en un gel perfecto sería de 8,400, 10,800 y 5,267, respectivamente. Para geles formados a una concentración inicial de PEG de 40% peso/volumen, no se encontró correlación entre el valor de planicie inicial de Q y el peso molecular entre reticulaciones, indicando que el grado de terminación de la reacción de reticulación puede ser sumamente importante con este sistema.

Después de reticulación, los geles fueron colocados en un gran volumen de agua amortiguada. Dentro de las primeras pocas horas siguientes, los geles se hincharon de manera considerable pero alcanzaron un volumen de equilibrio dentro de 24 horas. La relación de hinchamiento Q describe el volumen del gel con relación a su volumen bajo las condiciones de reticulación (figura 22A). La figura 22B muestra la ramificación de volumen calculada de PEG en el gel durante el primer día de hinchamiento.

En punto de tiempo posteriores, los geles continuaron hinchándose debido a la hidrólisis de los enlaces dentro del gel. Se ha demostrado previamente que enlaces éster similares a los encontrados dentro de estos geles tienen una vida media de primer orden de alrededor de 11 días a un pH de 7.4 y 37°C en solución salina amortiguada. El comportamiento de hinchamiento y la eventual degradación de los geles debido a la hidrólisis de los enlaces éster dependería de la manera mas intensa en la funcionalidad de la reticulación; al incrementarse la funcionalidad, deben romperse mas enlaces antes de que comience a reducir el número de reticulaciones en el gel. De las figuras 23A y 23B puede observarse que un incremento en la funcionalidad del multi-acrilato de PEG llevó a un incremento en el tiempo requerido para completar la degradación del gel.

Liberación de proteínas

Para estudiar la liberación de proteínas de los geles, se añadió albúmina sólida de suero de bovino a la solución precursora del gel, como se describió antes, para producir geles de un total de 100 µl de solución precursora líquida. Después de curar a dos horas a 37°C en un ambiente humidificado, los geles fueron añadidos a 5 ml de PBs 50 mM, pH de 7.4. Las muestras fueron mantenidas a 37°C en un baño de agua agitado. Cada 24 horas, los 5 ml de solución amortiguada fueron reemplazados y su absorbencia medida en un espectrofotómetro a 280 nm. La concentración de proteína en la solución de PBS fue determinada a partir de una curva estándar. No hubo componentes de los geles distintos de la albúmina que absorbieran luz a 280 nm. El límite de detección por esta técnica fue de aproximadamente 2.3% de la proteína total por día (es decir, se requirió una liberación de alrededor de 178 µg de albúmina por día para detección). La cantidad acumulada de proteína liberada del gel no fue normalizada a 100%, sino que mas bien todas las cantidades de proteína son valores absolutos, y los porcentajes están basados en la cantidad de proteína añadida a cada gel (7.5 mg de albúmina). Los hidrogeles formados por la reacción de adición conjugada fueron investigados como vehículos de entrega potenciales para fármacos de proteína. La liberación de albúmina de suero de bovino de los geles fue medida cada 24 horas hasta que casi toda la proteína hubiera sido liberada. La liberación controlada de proteína fue observada de geles hechos con tetra-acrilato de PEG y octa-acrilato de PEG que fueron reticulados a una concentración de PEG del 40% (figura 24). Para geles hechos con tetra-acrilato de PEG, se observó liberación casi lineal por los primeros cuatro días, con la liberación de alrededor de 20% de proteína por día. Para geles hechos con octa-acrilato de PEG, se observaron cuatro regímenes distintos. Después de una liberación inicial de alrededor de 10% de la proteína en el primer día, se requirieron otros cuatro días para la liberación del siguiente 15% de proteína. Esto fue seguido por la liberación del orden cero del siguiente 65% de la proteína durante cinco días, con liberación de 10 a 15% de proteína cada día. En contraste, la proteína fue liberada rápidamente de geles hechos con triacrilato de PEG, y geles hechos con tetra-acrilato de PEG que fueron reticulados a una concentración de PEG del 30%. Antes de la incorporación al hidrogel, las partículas de albúmina de suero de bovino fueron primero caracterizadas por microscopía óptica y se encontraron consistir en plaquetas con diámetros de 118 µm $\pm$ 47 µm. La influencia del tamaño de las partículas de albúmina de suero de bovino fue también probada moliendo el polvo sólido al recibirse del proveedor usando mortero y pestillo bajo nitrógeno líquido. Las partículas mas pequeñas fueron entonces incorporadas en geles de tetra-acrilato de PEG al 40%. El perfil de liberación de la proteína no fue afectado por el uso de las partículas mas pequeñas.

Para geles en los cuales se observó liberación controlada, las partículas de proteína pueden verse dentro de los geles por todo el periodo de liberación. Para todos los geles, la desaparición de las partículas de proteína del gel fue coincidente con la consumación de la entrega de mas de 90% de la proteína en el gel. De esta manera, la solubilidad de la albúmina de suero de bovino en soluciones que contiene PEG fue factiblemente el factor mas importante para lograr liberación controlada de la proteína. Cuando una solución que contiene albúmina disuelta fue mezclada con una solución que contiene PEG disuelto, la albúmina se precipitó, dependiendo de las concentraciones y el peso molecular del PEG. De manera similar, cuando las partículas de albúmina de suero de bovino fueron añadidas a una solución de PEG, la cinética de la disolución de la albúmina fue

fuertemente afectada por la presencia de PEG. Los sólidos de albúmina se disolvieron por completo en amortiguador PBS 50 mM, pH de 7.4, en tres minutos, en ausencia de PEG. Con PEG al 10%, peso molecular de 8,000, en solución, el tiempo a la disolución de las partículas de albúmina se incrementó a seis minutos. Con PEG al 30 o 40%, peso molecular de 8,000, la proteína no se disolvió después de siete días. Con PEG al 20%, peso molecular de 8,000, las partículas de proteína se disolvieron para formar una segunda fase líquida dentro de una hora. Este fue presumiblemente un verdadero co-acervado con una fase rica en proteína, pobre en polímero, y una fase rica en polímero, pobre en proteína.

Calidad de la proteína liberada

Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida de sulfato dodecílico de sodio (SDS-PAGE) para demostrar que la albúmina permanecía sin modificar por tiol de PEG y acrilato de PEG durante la formación de hidrogel. La albúmina de suero de bovino fue disuelta en solución salina amortiguada con HEPES 50 mM, pH de 7.4, a una concentración de 1.5 mg/ml. Para reducir los enlaces bisulfuro en albúmina antes de reaccionar con los derivados de PEG, se añadieron 10 µl de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil) fosfina (11.1 mg/ml en agua desionizada, Pierce Chemicals) a 500 µl de la solución de albúmina. Los siguientes derivados de PEG fueron añadidos a alícuotas de la solución de albúmina en relaciones estequiométricas especificadas: ditiol de PEG con peso molecular de 3,400, mono-acrilato de PEG, éster mono-NHS, peso molecular de 3,400 (Shearwater Polymers), o diacrilato de PEG, peso molecular de 3,400. En adición, se añadió ácido acrílico (anhídrido, Aldrich) a soluciones de albúmina selectas a fin de enfriar súbitamente los grupos tiol libres en ditiol de PEG e impedir el intercambio de tiol con albúmina durante la preparación de la muestra para SDS-PAGE. Para preparación de la muestra, se combinaron 10 µl de cualquier mezcla de reacción dada con 6 µl de agua desionizada y 4 µl de amortiguador corriente de SDS-PAGE 5x conteniendo ditioneitol (DTT) 1 M a menos que se señale lo contrario. Las muestras fueron entonces ebullicidas por alrededor de tres minutos. Se usaron como estándares marcadores de peso molecular (Bio-Rad, de Hercules, California, Estados Unidos) de 31, 45, 66.2, 116 y 200 kDa.

El análisis por SDS-PAGE mostró que bajo condiciones fisiológicas casi no hubo reacción aparente entre albúmina y diacrilato de PEG, peso molecular de 3,400, o entre albúmina y ditiol de PEG, peso molecular de 3,400 (figuras 22A y 22B). En particular, la figura 25A muestra que la albúmina incubada con diacrilato de PEG por una hora permaneció casi totalmente no modificada y de esta manera corrió virtualmente de manera idéntica a albúmina nativa durante SDS-PAGE (carril 2 vs. carril 2). La reacción de albúmina reducida con ácido acrílico tampoco cambió la migración de la proteína (carril 4). La pequeña mancha sobre la banda de albúmina en la figura 25A, carril 3, puede indicar que un pequeño porcentaje de la proteína fue modificado por diacrilato de PEG. Esta observación está en gran contraste con la reacción obvia y abundante del éster de PEG-NHS con albúmina bajo condiciones fisiológicas (figura 25A, carril 4), o entre diacrilato de PEG y albúmina cuando la albúmina fue previamente reducida y mantenida bajo condiciones de desnaturalización (figura 25A, carril 5). Aunque la albúmina reaccionó claramente con ditiol de PEG por intercambio de tiol cuando ebulle la mezcla de reacción para SDS-PAGE (figura 25A, carril 9; no hubo DTT en la muestra), la albúmina de hecho no fue modificada cuando los tioles libres de PEG fueron enfriados súbitamente con ácido acrílico antes de la preparación de la muestra para SDS-PAGE (figuras 25B, carril 7). Esto muestra que la reacción de albúmina con ditiol de PEG no ocurre bajo condiciones fisiológicas sino que ocurre durante el paso de ebullición requerido para preparación de la muestra para electroforesis en gel. La falta de reactividad entre albúmina y diacrilato de PEG o ditiol de PEG fue también evidente a partir de una observación adicional: la albúmina que había sido incorporada en un gel de tetra-acrilato de PEG/ditiol de PEG y liberada del gel el sexto día de la incubación con amortiguador no fue modificada ni con tetra-acrilato de PEG ni ditiol de PEG (figura 25B, carril 3).

Otras modalidades

A partir de la descripción precedente, será aparente que se pueden hacer variaciones y modificaciones a la invención en la presente para adaptarla para diferentes usos y condiciones. Estas modalidades también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Además, el uso de una amina como un componente precursor del biomaterial es una modalidad que cae dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Todas las publicaciones y patentes que se mencionan en esta especificación se incorporan a la presente como referencia, hasta el mismo grado que si se hubiera indicado de manera específica e individual que cada publicación o patente individual se incorpora como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un biomaterial formado de la reticulación de al menos un primer y un segundo componente precursor, en dicho primer componente precursor se selecciona del grupo que consiste de:
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-S-(CH₂)₂-COX-P,
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-NH-(CH₂)₂-COX-P,
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-NH-U-P,
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-S-U-P,
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-S-L-S-CH₂-CH₂-CO-X-P;
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-S-L-U-P;
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-NH-L-S-CH₂-CH₂-CO-X-P;
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-NH-L-S-U-P;
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-S-L-NH-CH₂-CH₂-CO-X-P;
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-S-L-NH-U-P;
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-NH-L-NH-CH₂-CH₂-CO-X-P; o
 - D-Y-C(O)-(CH₂)_n-NH-L-NH-U-P,
- donde D es una ramificación farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; n es 1, 2 ó 3; Y es O, NH o N; L es un enlazador lineal o ramificado; X es O o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua que tiene uno o mas grupos insaturados conjugados; y U es el producto de adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está unido al polímero.
2. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde la vida media del enlace éster o amida en dicha ramificación farmacéuticamente activa es de entre un día y nueve meses en una solución acuosa a un pH de 7.4 y 37°C.
3. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicha ramificación de enlace es heparina, una ramificación de enlace de heparina, una ramificación de enlace de ion de metal, una ramificación de carbohidratos, una ramificación de enlace de carbohidratos, o una ramificación que enlaza grupos hidrofílicos.
4. El biomaterial de la reivindicación 3, donde dicho ramificación de enlace de ion de metal es una ramificación de enlace de Cu²⁺, una ramificación de enlace de Co²⁺, o una ramificación de enlace de Zn²⁺.
- 5 (11). El biomaterial de la reivindicación 3, en donde dicha ramificación de enlace de carbohidratos es un ácido fenilborónico.
6. El biomaterial de la reivindicación 5, en donde dicho ácido fenilborónico está enlazado a dicho biomaterial por medio de un amino secundario sobre el aro de fenil de dicho ácido fenilborónico.
7. El biomaterial de la reivindicación 3, en donde dicha ramificación que enlaza grupo hidrofóbicos es ciclodextrina.
8. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto o ramificación farmacéuticamente activo es derivado o seleccionado del grupo que consiste en moléculas orgánicas sintéticas, moléculas orgánicas que ocurren naturalmente, moléculas de ácido nucleico, péptidos o proteínas bio-sintéticos, péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, y péptidos o proteínas que ocurren naturalmente, modificados.
9. El biomaterial de la reivindicación 8, en donde dicha molécula que ocurre naturalmente orgánica o sintética es paclitaxel, doxorubicina, camptotecina, 5-fluorodesoxiuridina, estradiol, 2-metoxiestradiol, o un derivado de éstos.
10. El biomaterial de la reivindicación 8, en donde dicha proteína o péptido biosintético que ocurre naturalmente o que ocurre modificado naturalmente se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento, hormonas de crecimiento humano y sus derivados.
11. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicho segundo componente precursor es diferente de dicho primer componente precursor y comprende al menos dos enlaces conjugados insaturados o grupos nucleófilos.
12. El biomaterial de la reivindicación 11, en donde dicho segundo componente precursor no comprende una

ramificación de enlace farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace.

13. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicho biomaterial comprende una ramificación de enlace o un compuesto farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace.

14. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicho polímero soluble en agua o polímero hinchable en agua es seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(hidroxipropil metacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli(dimetil acrilamida), poli(vinil pirrolidona), poli(ácido acrílico), poli(etiloxazolona), copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de propileno), o copolímeros solubles en agua o hinchables en agua que comprenden estos polímeros, y sus derivados que comprenden grupos insaturados conjugados.

15. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dichos grupos insaturados conjugados son seleccionados del grupo que consiste en acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, acrilonitrilos, vinilsulfonas y quinonas.

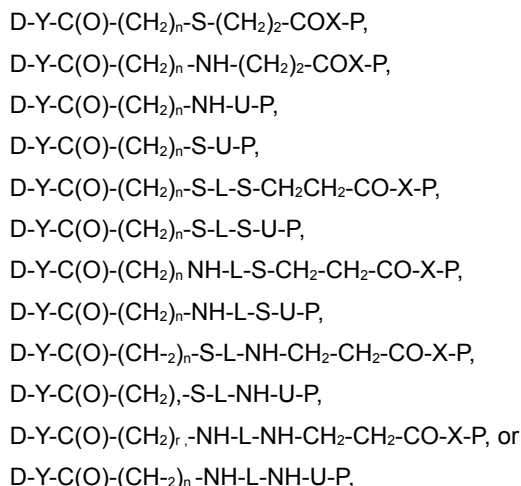
16. El biomaterial de la reivindicación 11, en donde dicho polímero soluble en agua o polímero hinchable en agua es seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-alcohol vinílico), poli(hidroxipropil metacrilamida), poli(N-isopropilacrilamida), poli(dimetil acrilamida), poli(vinil pirrolidona), poli(ácido acrílico), poli(etiloxazolona), copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de propileno), o copolímeros solubles en agua o hinchables en agua que comprenden estos polímeros, y sus derivados que comprenden grupos insaturados conjugados.

17. El biomaterial de la reivindicación 11, en donde dichos grupos insaturados conjugados de dicho segundo precursor son seleccionados del grupo que consiste en acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, acrilonitrilos, vinilsulfonas y quinonas.

18. El biomaterial de la reivindicación 11, en donde dichos grupos nucleófilos de dicho segundo componente precursor se seleccionan del grupo que consiste de tioles y aminas.

19. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde la vida media del enlace éster o amida en dicha ramificación de enlace farmacéuticamente activa es entre 1 hora y 1 año en una solución acuosa a pH 7,4 y 37°C.

20. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicho segundo componente se selecciona del grupo constituido por:



en donde D es una ramificación de enlace farmacéuticamente activa o una ramificación de enlace; n es 1, 2, ó 3; Y es O, NH o N; L es un grupo lineal o ramificado; X es O o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua que comprenden uno o más grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está adherido a dicho polímero.

21. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicha reticulación comprende una reacción de adición conjugada entre dichos primero y segundo componentes precursores.

22. El biomaterial de la reivindicación 1, en donde dicha reticulación comprende una polimerización por radicales libres entre dichos primero y segundo componentes precursores.

23. El biomaterial de la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un mamífero.

24. Un compuesto farmacéuticamente activo de la fórmula $D-O_2C-(CH_2)_n-SH$, $D-N(O)C-(CH_2)_n-SH$, $D-O_2C-(CH_2)_n-NH_2$ o $D-N(O)C-(CH_2)_n-NH_2$ en donde n es 1, 2, ó 3, y D es un resto farmacéuticamente activo.

25. El compuesto farmacéuticamente activo de la reivindicación 24, en donde ramificación de enlace farmacéuticamente activa es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 ó 10.

26. El compuesto farmacéuticamente activo de la reivindicación 24 ó 25, que comprende además al menos un polímero reticulado en el compuesto farmacéuticamente activo por una reacción de adición conjugada entre un grupo tiol o un grupo amino del compuesto farmacéuticamente activo y un grupo insaturado conjugado del polímero.

27. Un componente precursor apropiado para su uso en la formación de un biomaterial, en donde dicho componente precursor se selecciona del grupo constituido por:

$D-Y-C(O)-(CH_2)_n-S-(CH_2)_2-COX-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_2-COX-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-NH-U-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-S-U-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-S-L-S-CH_2CH_2-CO-X-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-S-L-S-U-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-NH-L-S-CH_2-CH_2-CO-X-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-NH-L-S-U-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-S-L-NH-CH_2-CH_2-CO-X-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-S-L-NH-U-P$,
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-NH-L-NH-CH_2-CH_2-CO-X-P$, or
 $D-Y-C(O)-(CH_2)_n-NH-L-NH-U-P$,

en donde D es una ramificación de enlace farmacéuticamente activa una una ramificación de enlace; n es 1, 2, ó 3; Y es O, NH o N; L es un grupo lineal o ramificada; X es O o N; P es un polímero soluble en agua o un polímero hinchable en agua que comprenden uno o más grupos insaturados conjugados; y U es el producto de la adición de un nucleófilo a un grupo electrófilo que está adherido a dicho polímero.

28. Los componentes precursores de la reivindicación 27 que además tienen al menos una de las siguientes características:

- La vida media del enlace éster o amida en dicha ramificación de enlace farmacéuticamente activo es como se define en la reivindicación 2,
- Dicha dicha ramificación de enlace o resto de enlace es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7,
- Dicha dicha ramificación de enlace o resto farmacéuticamente activo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10,
- Dicho componente precursor comprende al menos dos enlaces conjugados insaturados o grupos nucleófilos,
- Dichos grupos conjugados insaturados son como se definen en la reivindicación 15, y
- Dichos grupos nucleófilos son como se definen en la reivindicación 18.

Figura 1

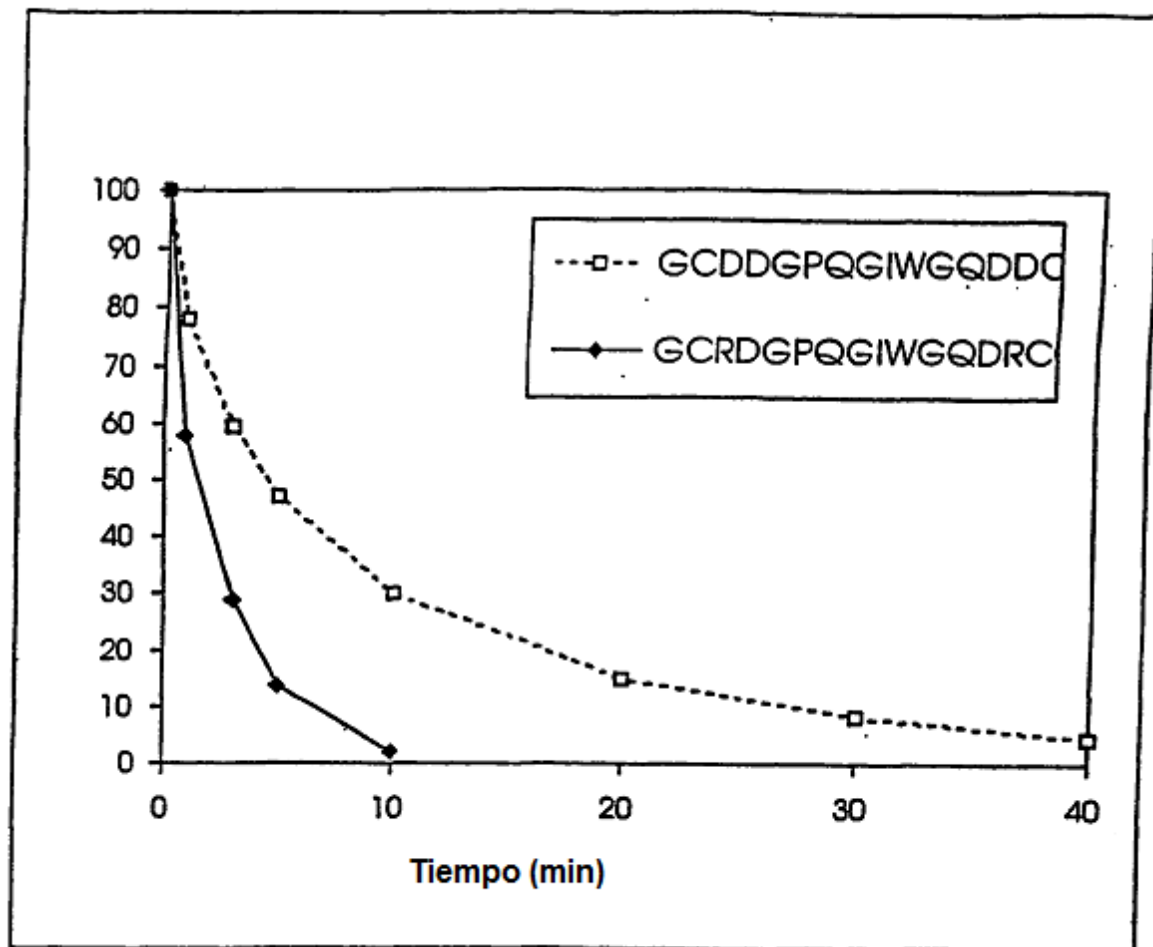


Figura 2

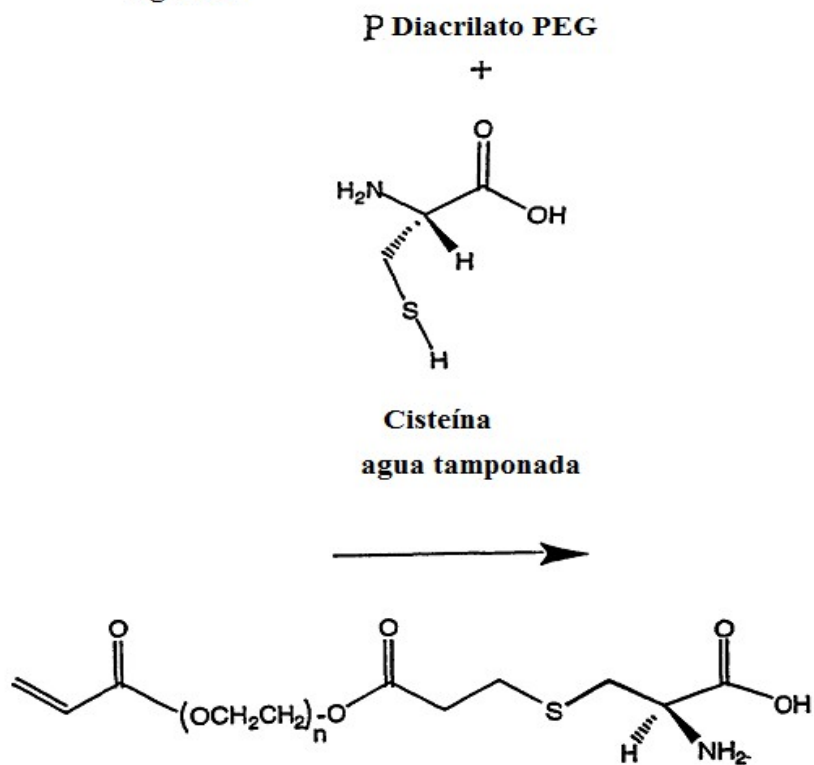


Figura 3

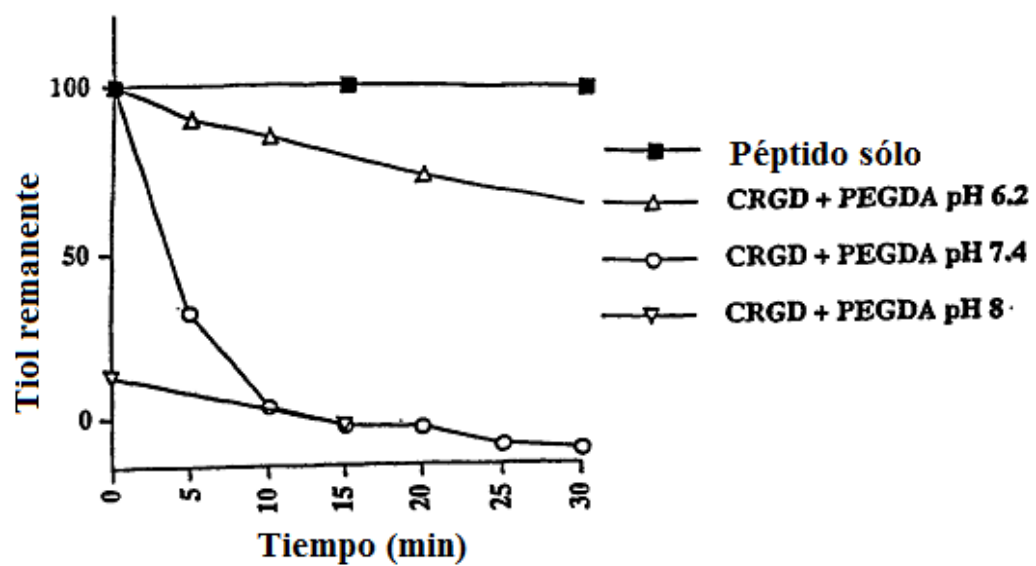


Figura 4

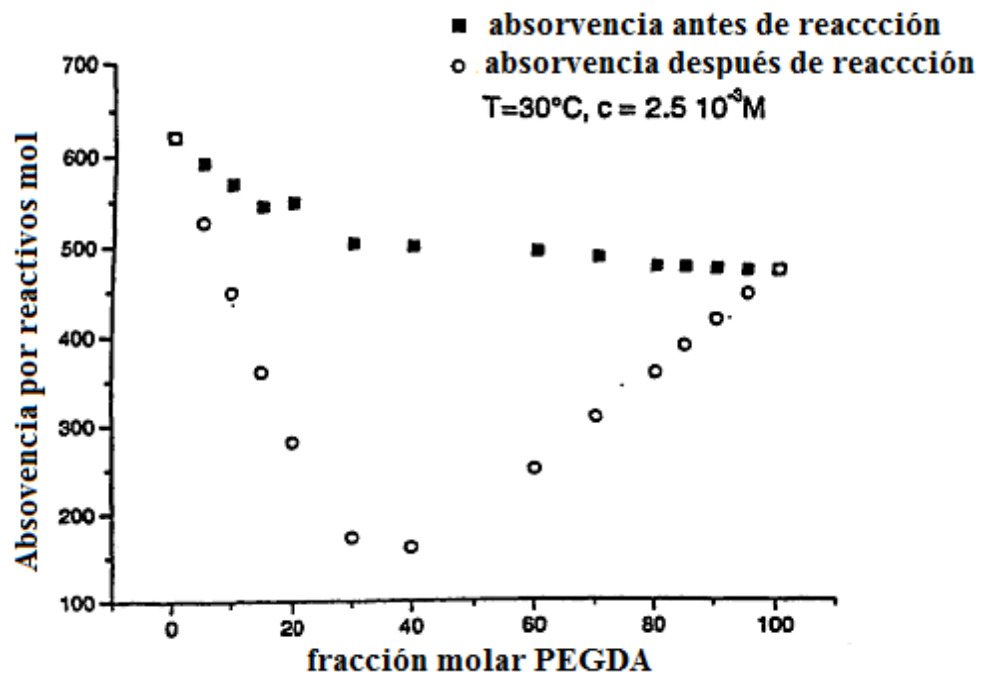


Figura 5

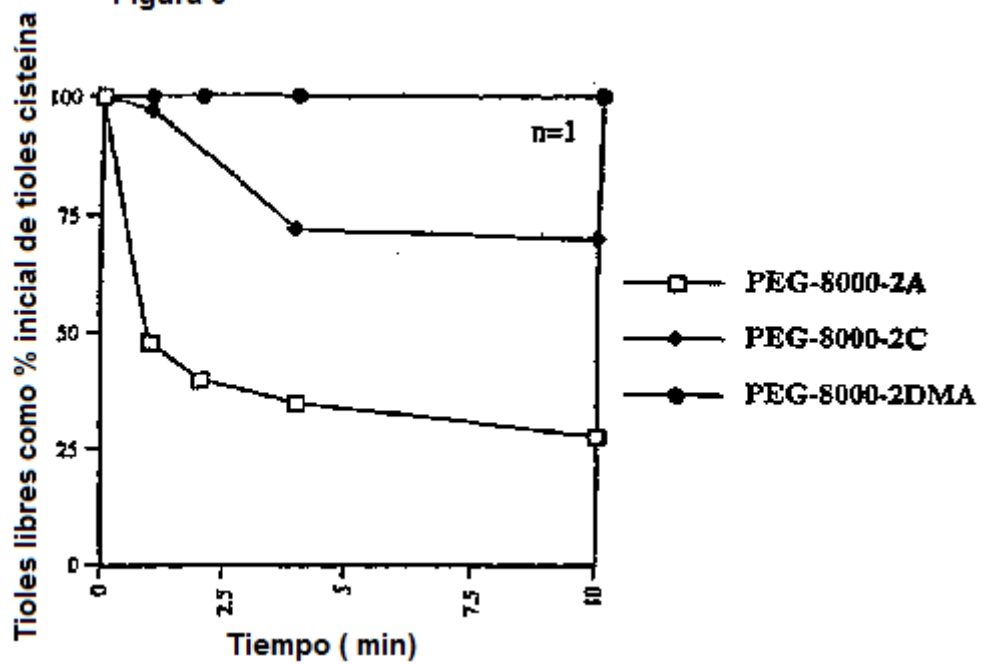


Figura 6

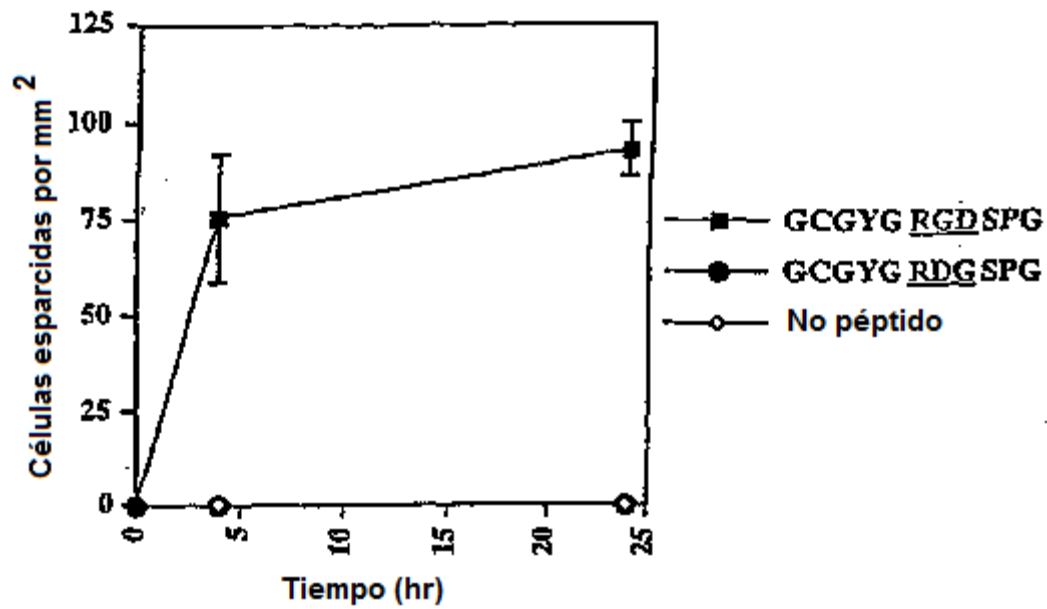


Figura 7

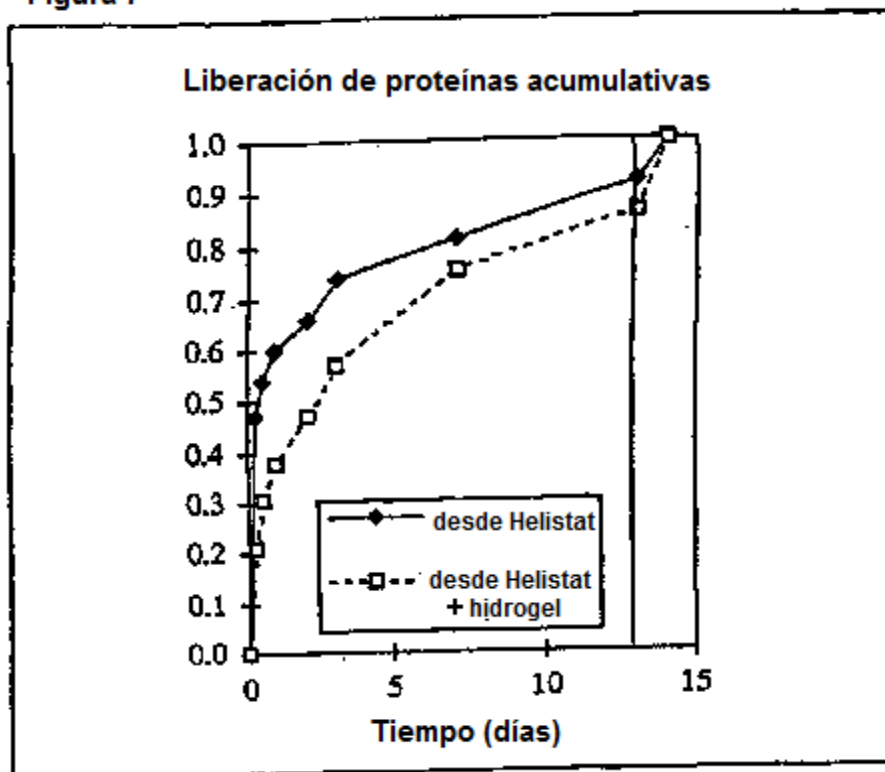


Figura 8

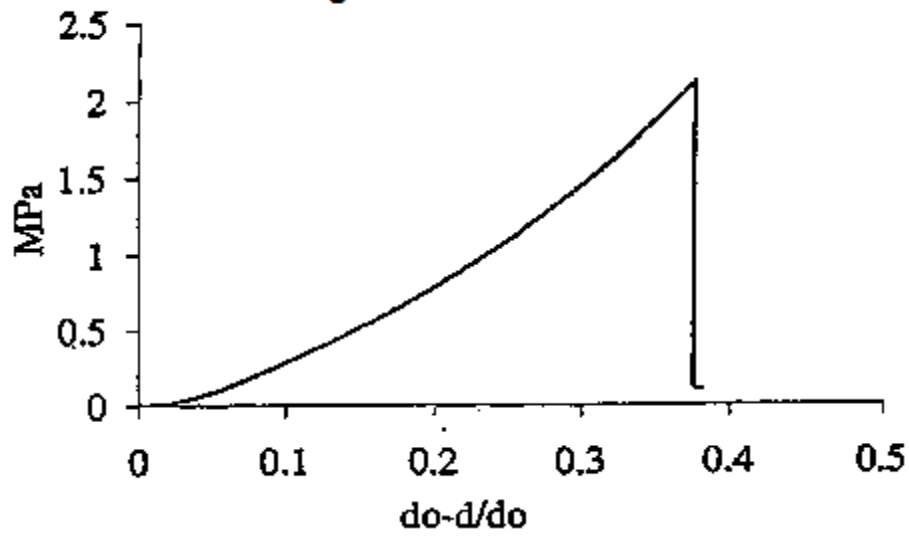


Figura 9

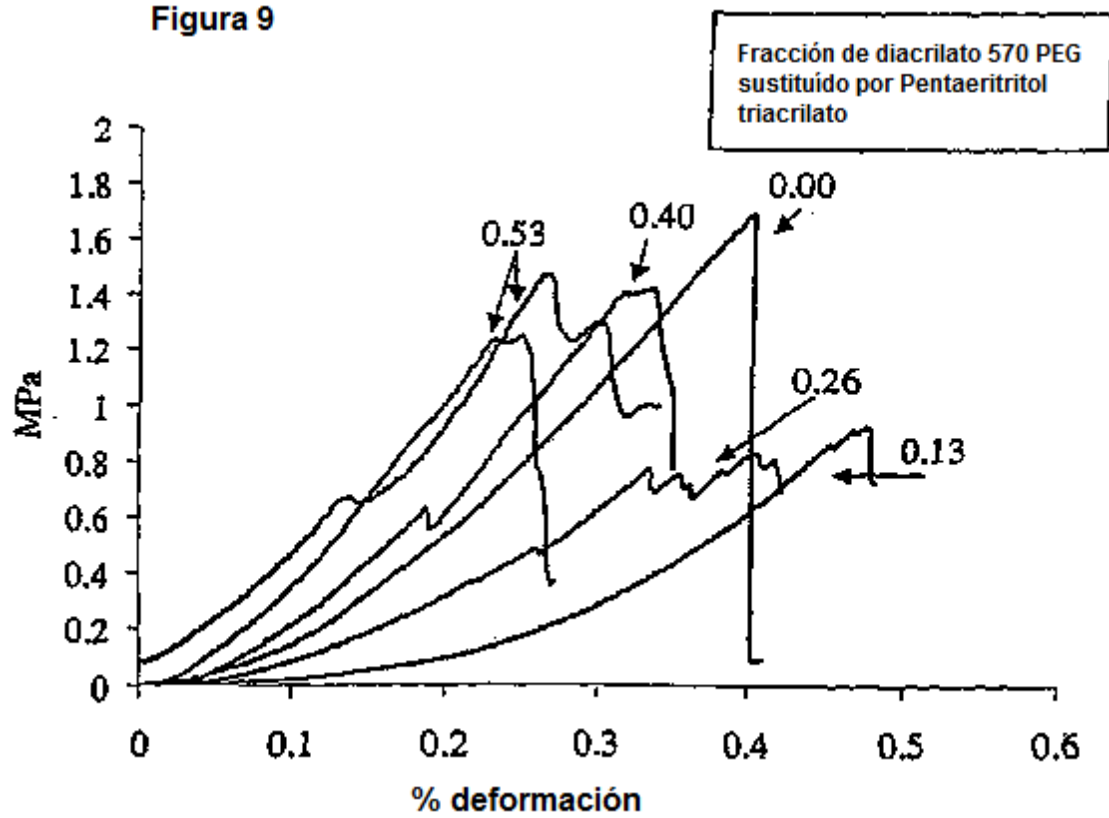


Figura 10

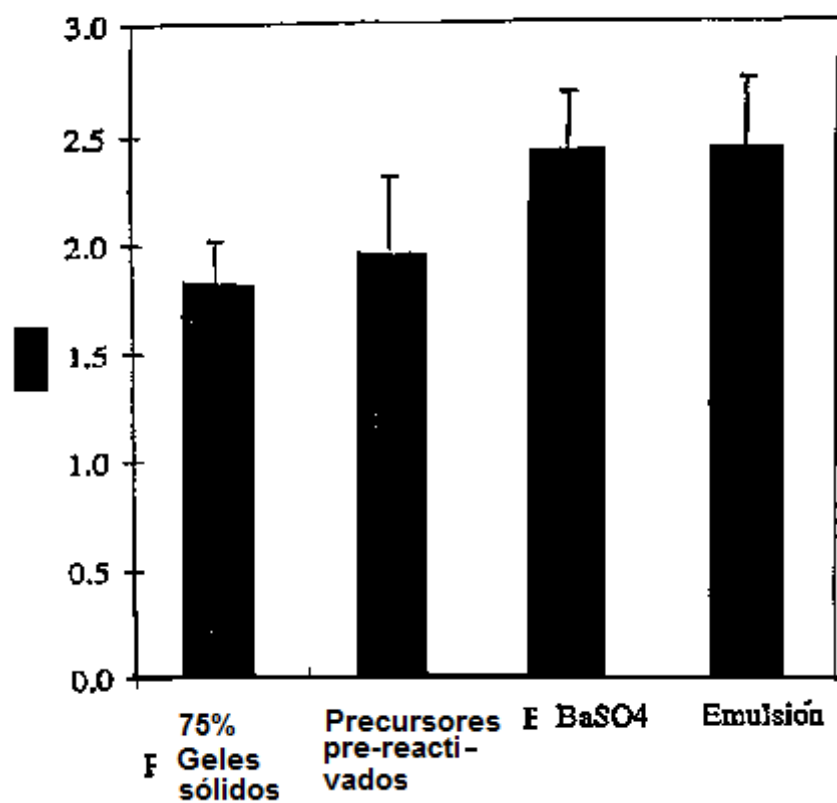
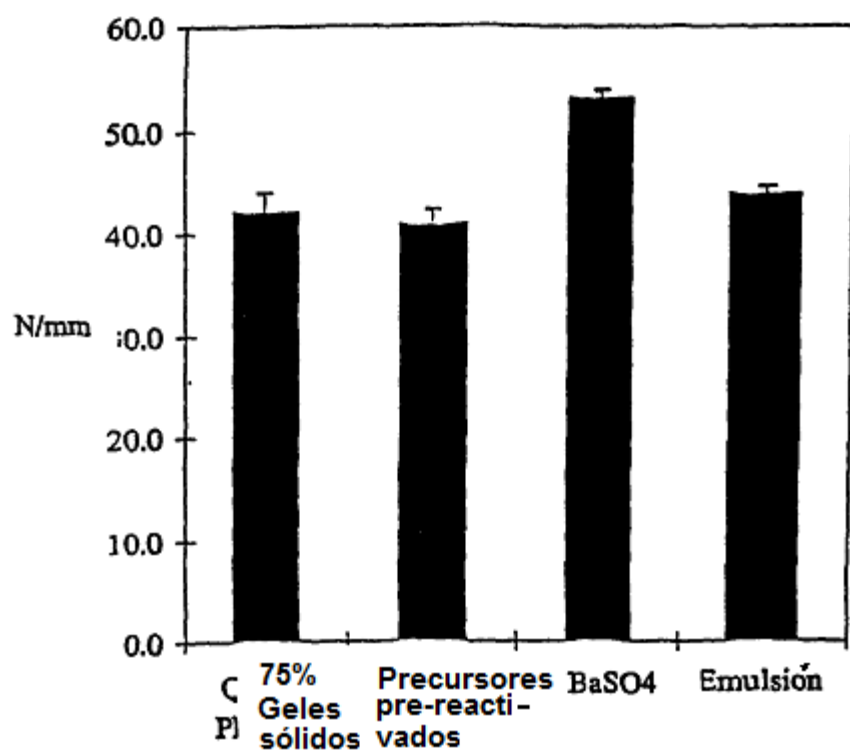


Figura 11



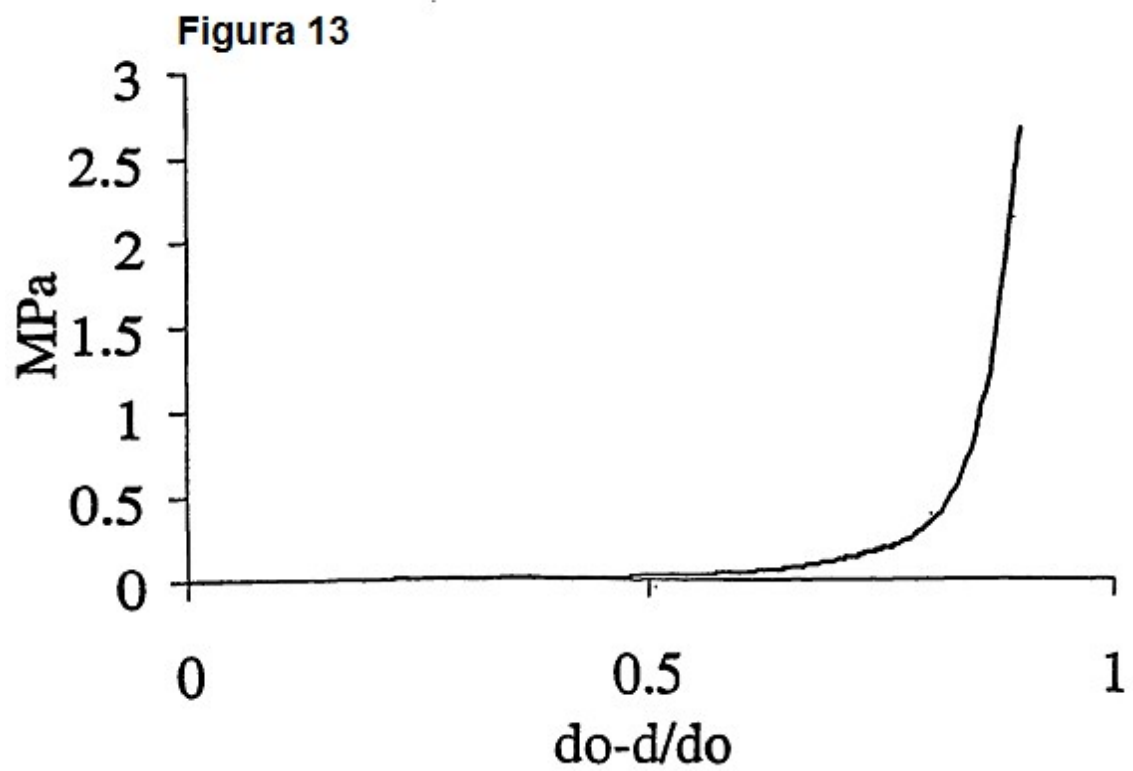
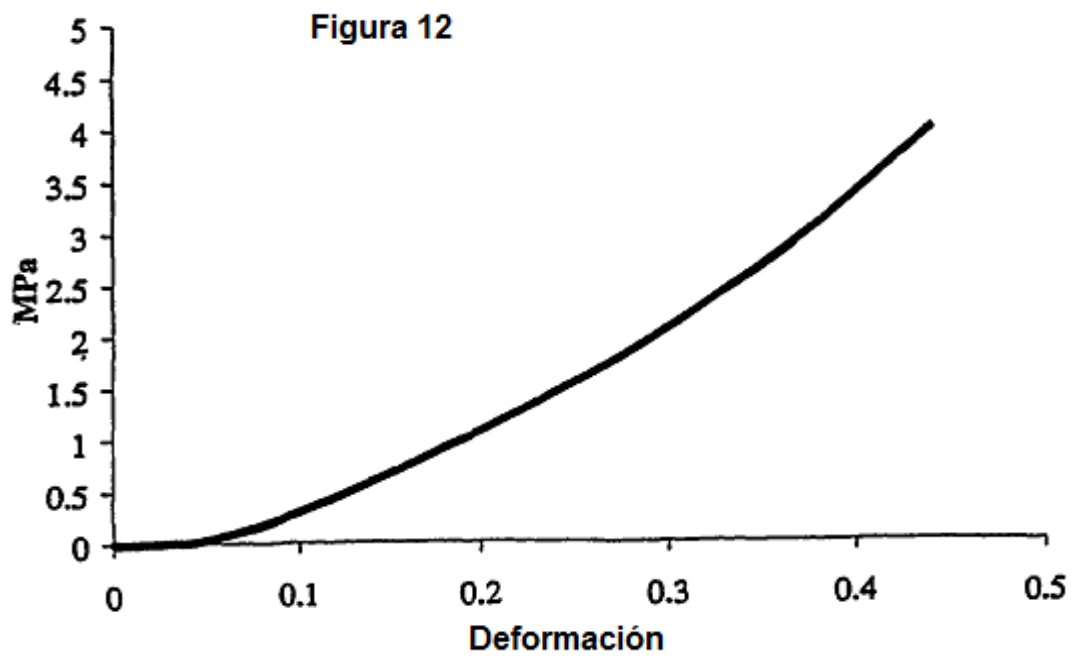


Figura 14

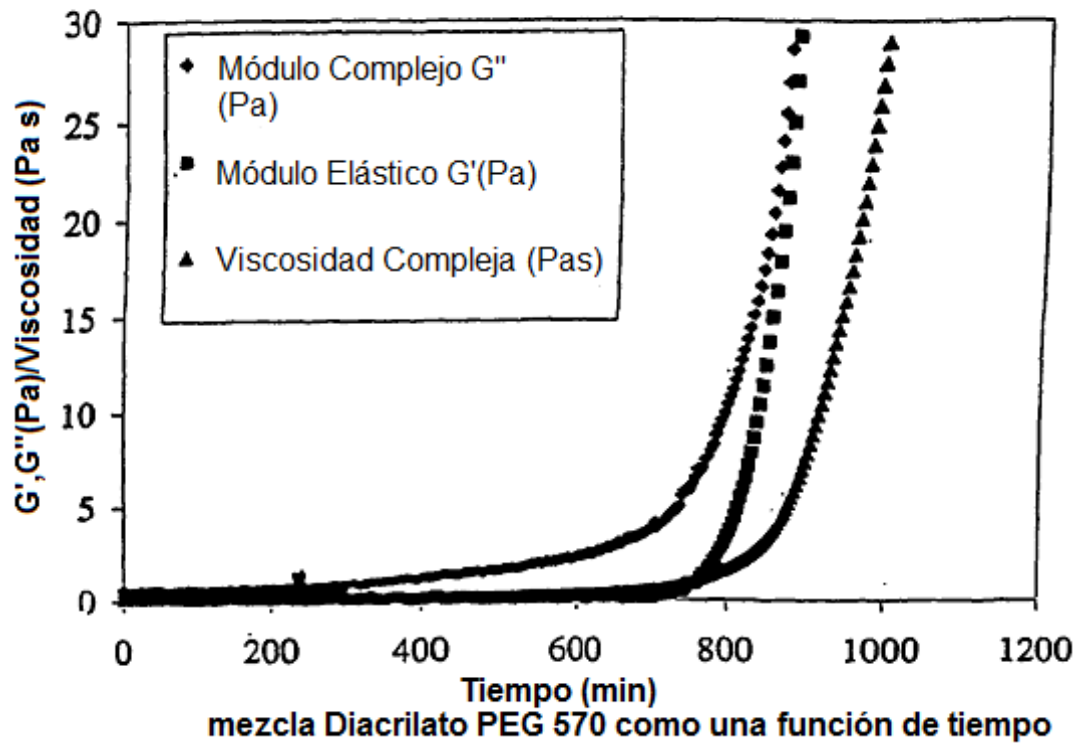


Figura 15

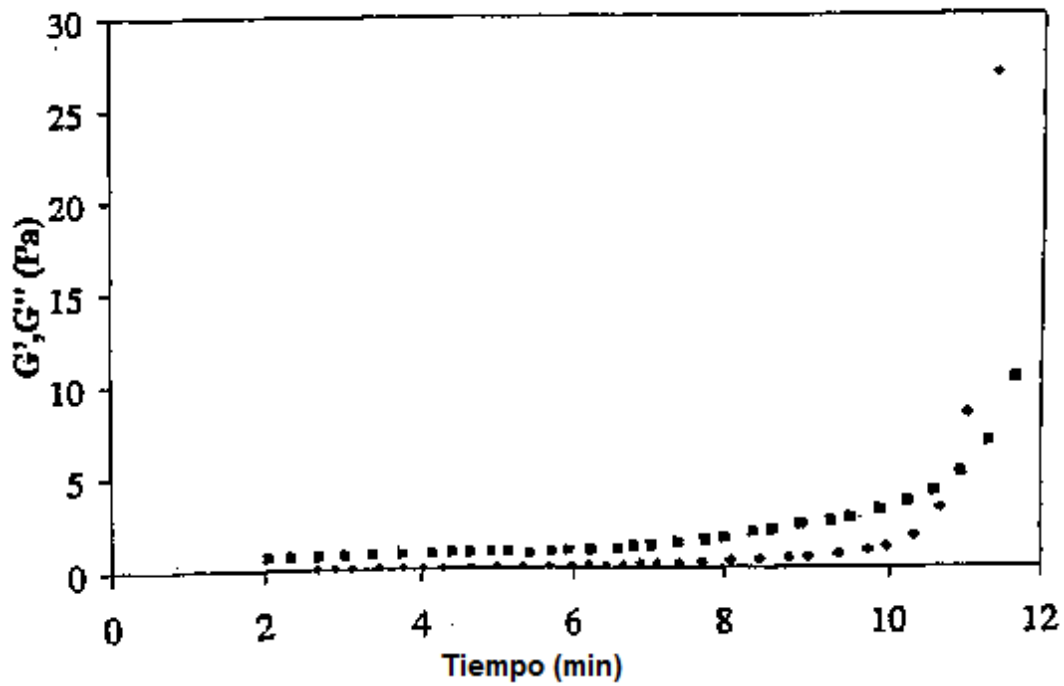
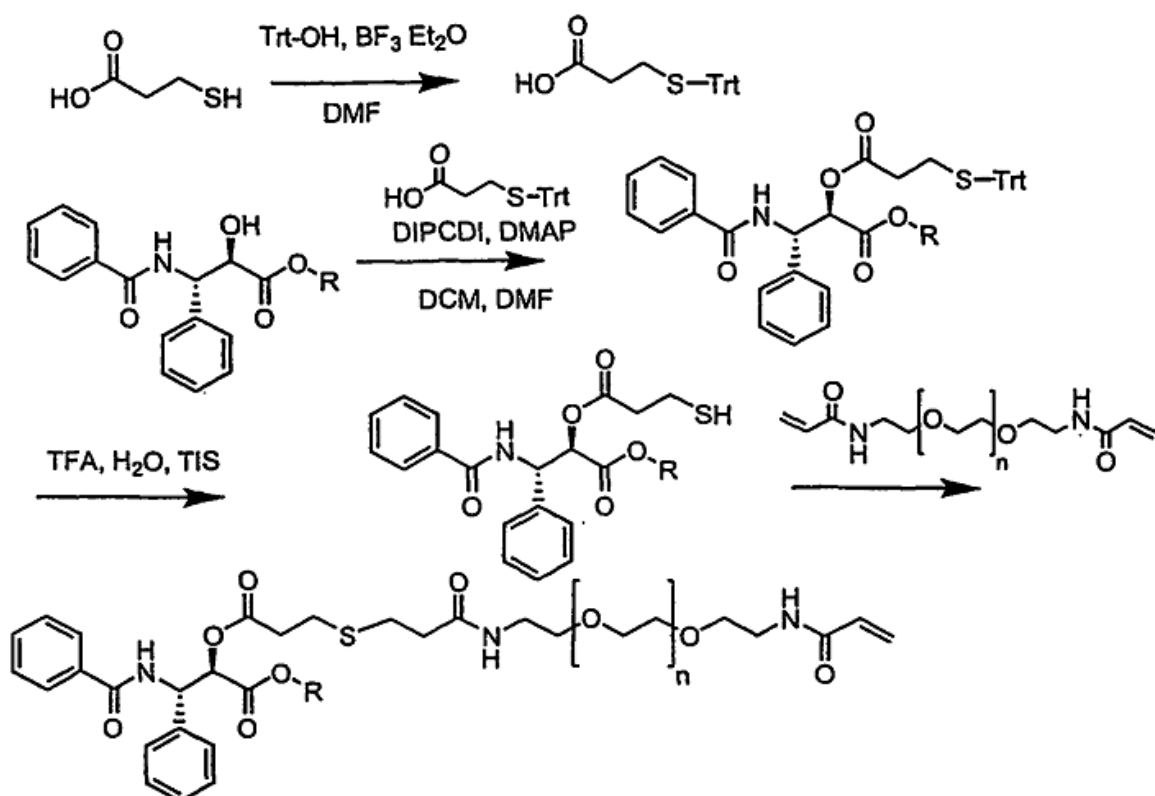


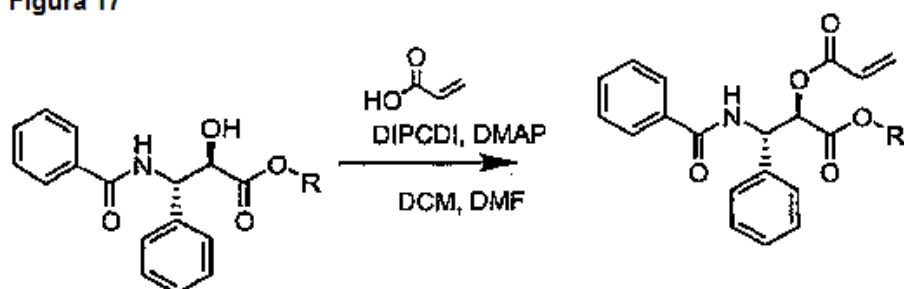
Figura 16



R = Me para éster metilo de cadena lateral de paclitaxel

R = 5-beta,20-epoxi-1,2-alfa,4,7-beta,10-beta,13-alfa-hexahidroxi-tax-11-en-9-uno 4,10-diacetato 2-bonzoato para paclitaxel

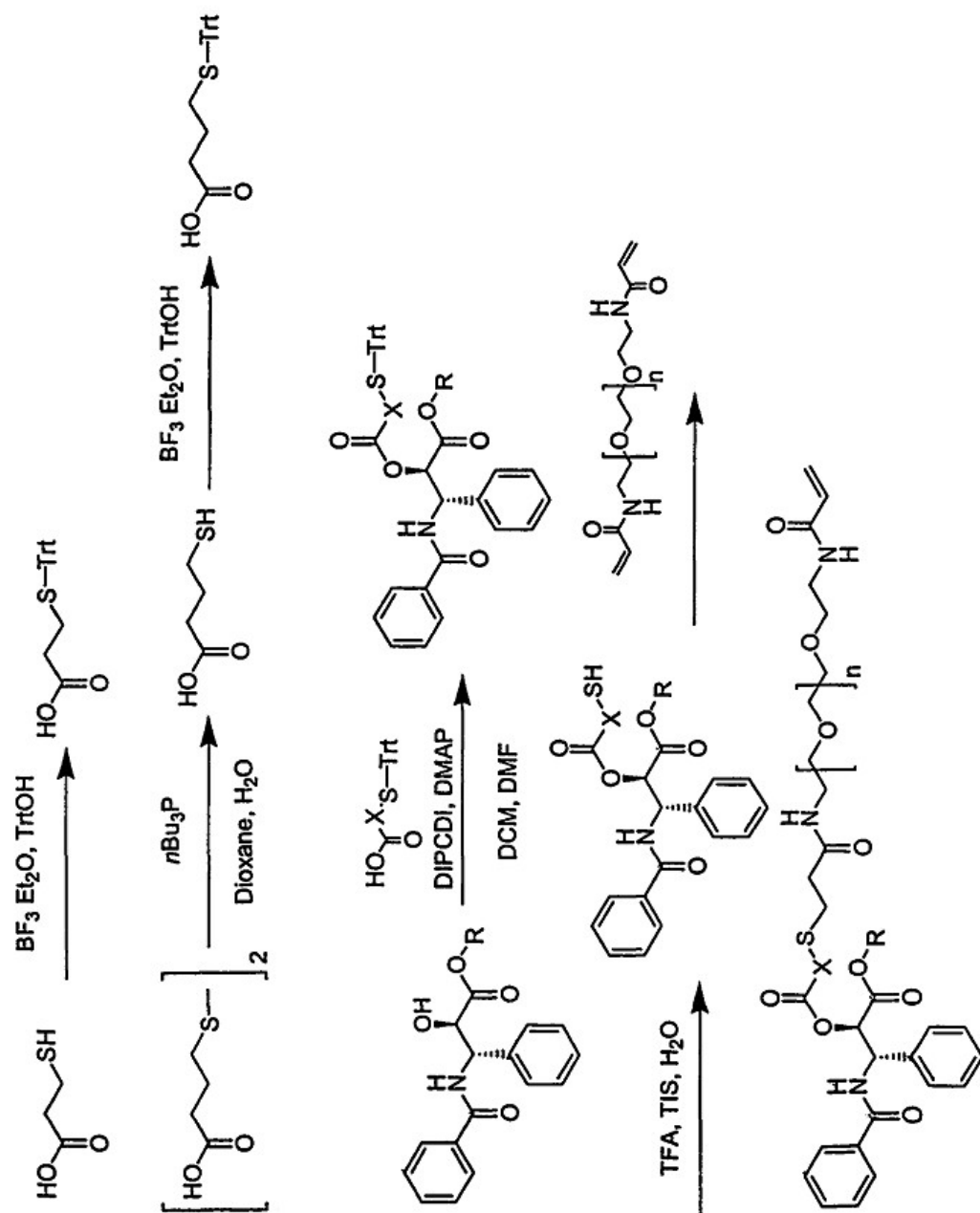
Figura 17



R = Me para éster metilo de cadena lateral de paclitaxel

R = 5-beta,20-epoxi-1,2-alfa,4,7-beta,10-beta,13-alfa-hexahidroxi-tax-11-en-9-uno 4,10-diacetato 2-bonzoato para paclitaxel

Figura 18



Figuras 19A y 19B

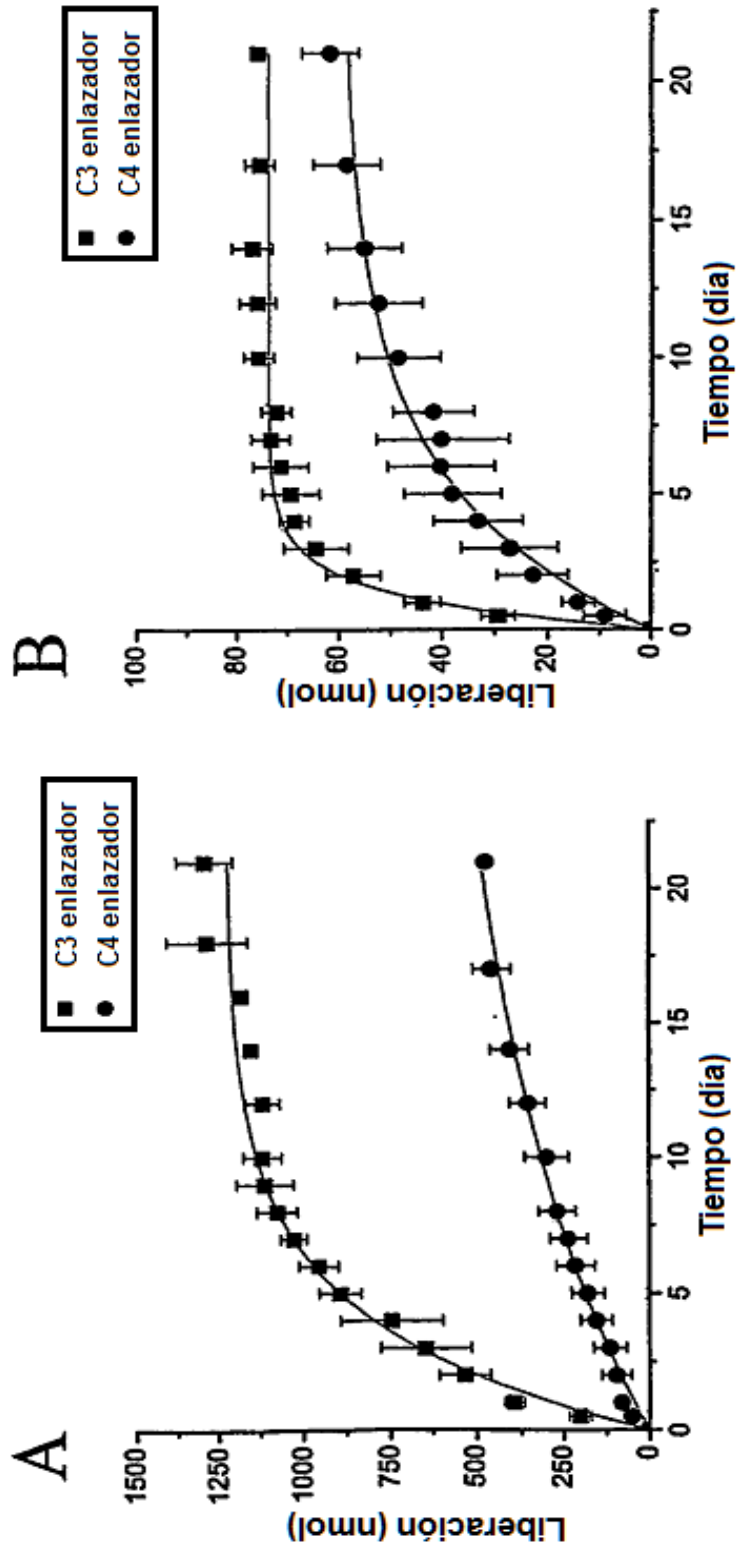


Figura 20

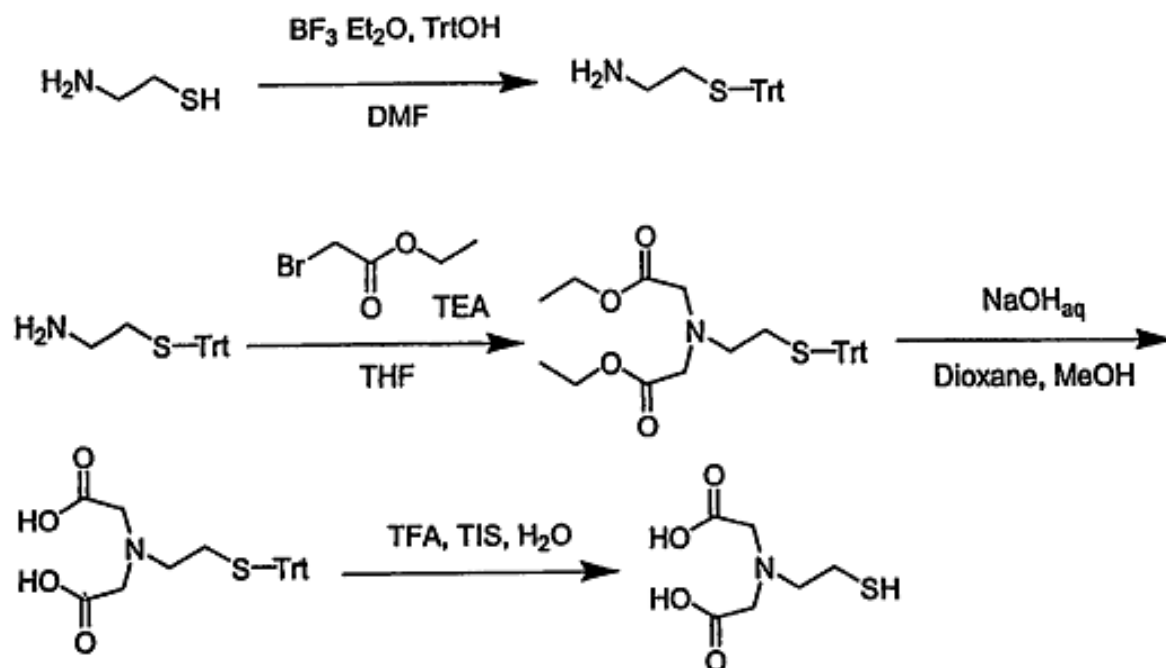


Figura 21

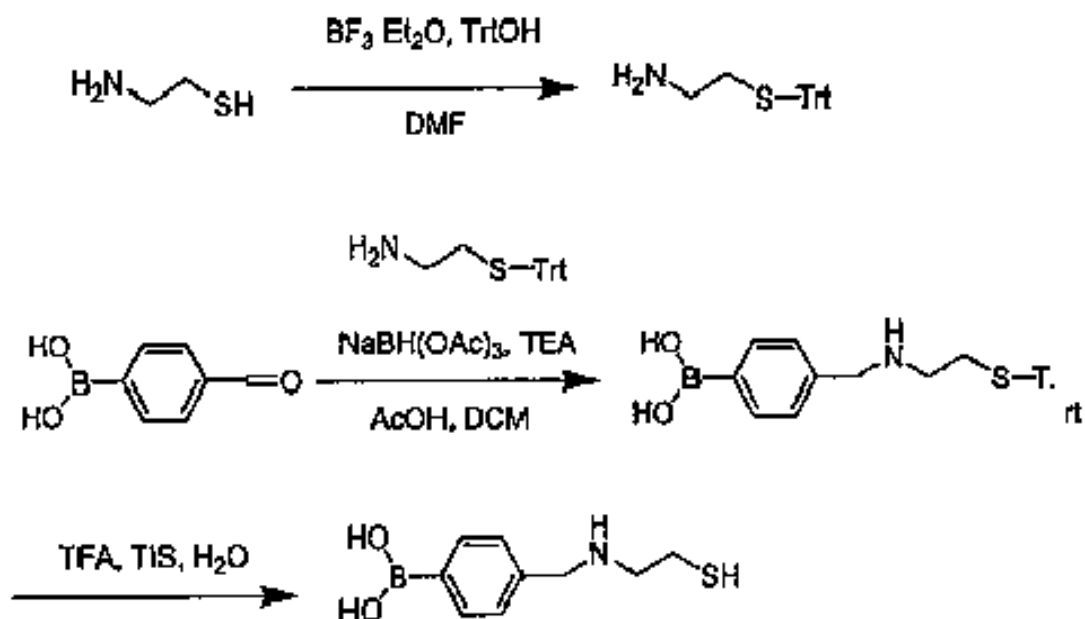


Figura 22A

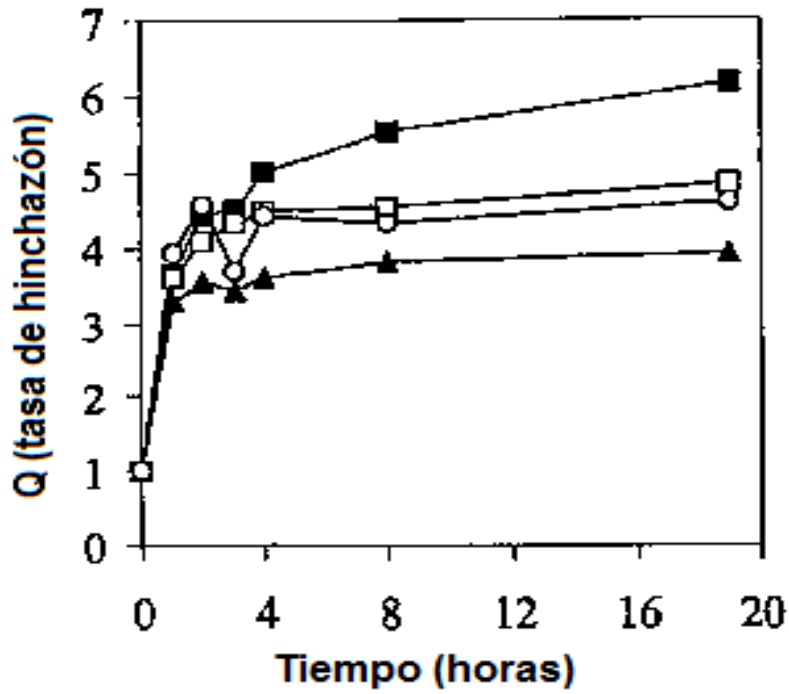


Figura 22B

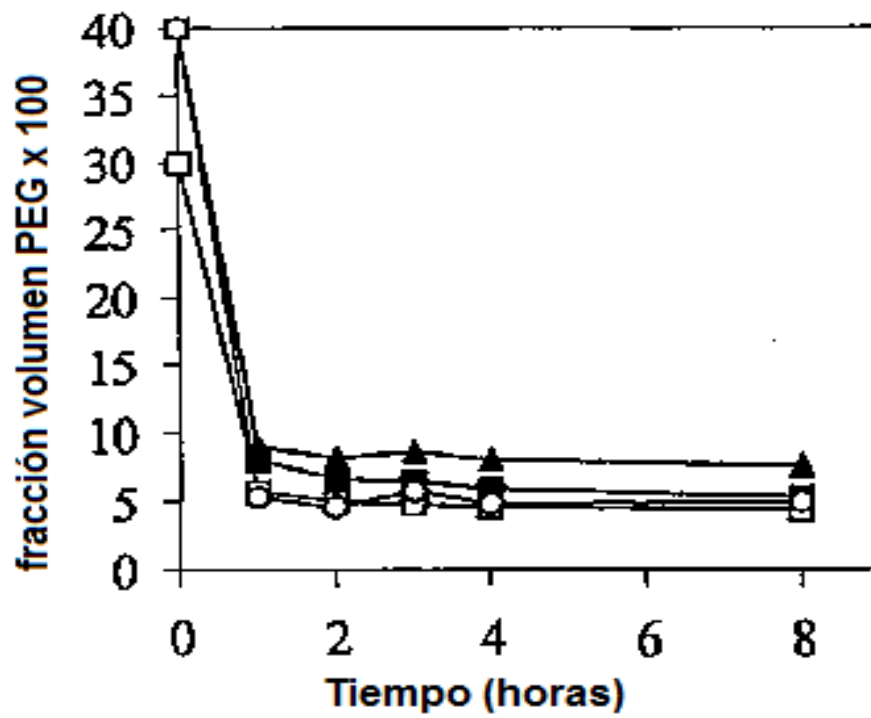


Figura 23A

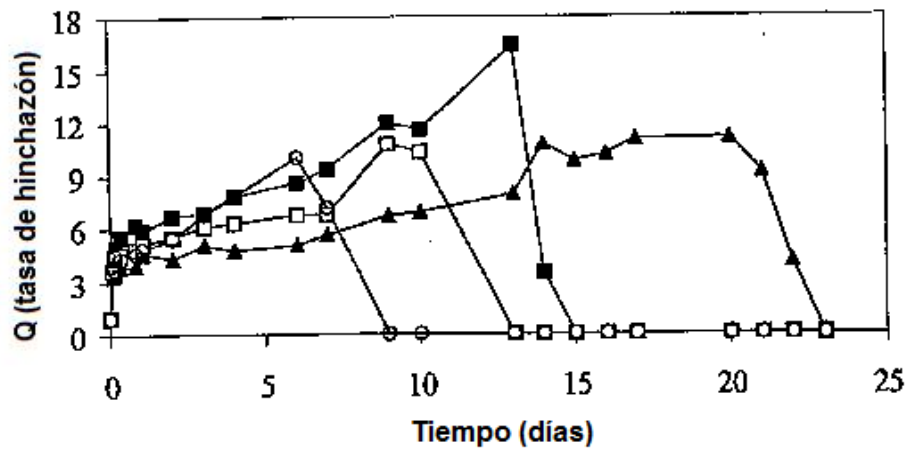


Figura 23B

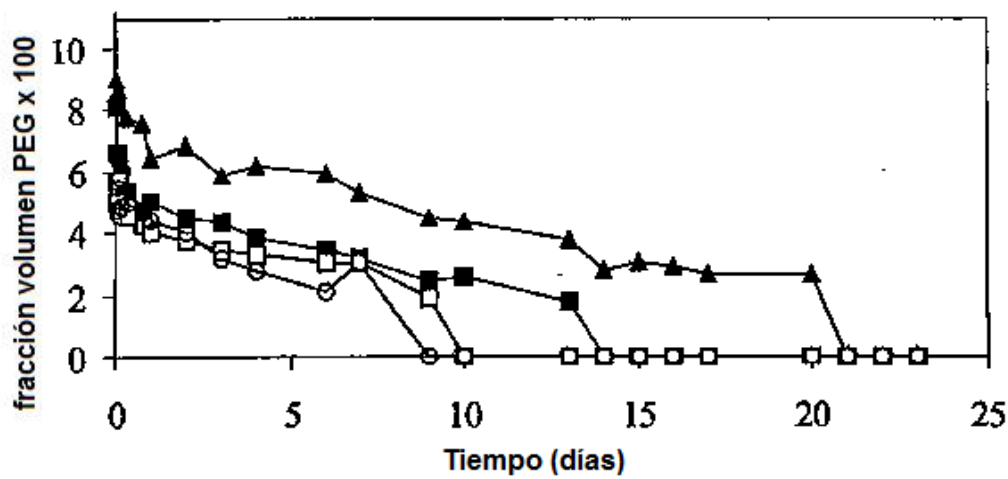
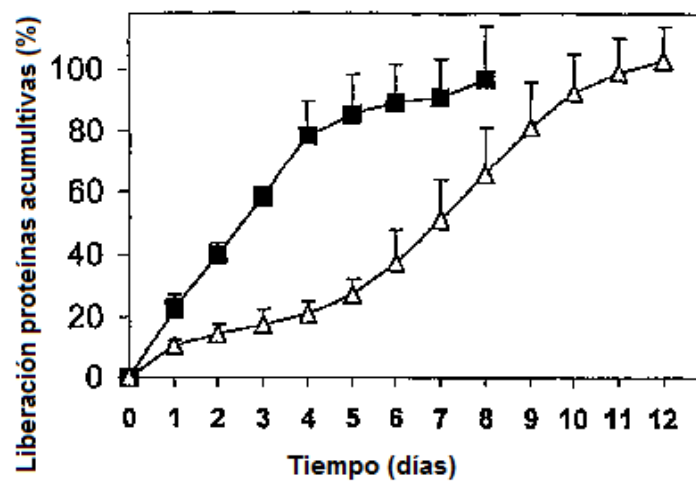


Figura 24



Figuras 25A y 254B

