

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 106**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/26** (2006.01)

**A61L 27/34** (2006.01)

**A61L 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.1996 E 06006313 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1704878**

54 Título: **Composiciones de polímeros reticulados y métodos para su uso**

30 Prioridad:

**18.12.1995 US 573799**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.08.2013**

73 Titular/es:

**ANGIODEVICE INTERNATIONAL GMBH (100.0%)  
BUNDESPLATZ 1  
6304 ZUG, CH**

72 Inventor/es:

**RHEE, WOONZA M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 420 106 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de polímeros reticulados y métodos para su uso

Esta invención se refiere, en general, a composiciones de polímeros reticulados que comprenden un primer polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleófilos reticulados utilizando un segundo polímero sintético que contiene múltiples grupos electrófilos.

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

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

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

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

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

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

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

West y Hubbell, *Biomaterials* (1995), 16:1153-1156, describen la prevención de adhesiones postoperatorias utilizando un hidrogel de polietilenglicol-co-diacrilato del ácido láctico fotopolimerizado y un hidrogel de polietilenglicol-co-polipropilenglicol físicamente reticulado, Poloxamer 407®.

El documento GB 697.334 describe la preparación de poliésteres, poliamidas o poliesteramidas de alto peso molecular. El documento EP-A-0680990 describe matrices de colágeno-polímeros sintéticos preparadas utilizando un reacción de múltiples etapas. El documento EP-A-0732109 describe el uso de agentes reticulantes hidrófobos para preparar composiciones de biomateriales reticulados. El documento WO-A-96/21469 describe derivados multiramificados, monofuncionales e hidrolíticamente estables del polietilenglicol y polímeros relacionados para la modificación de superficies y moléculas.

La presente invención proporciona una composición que comprende un polímero multinucleófilo, que comprende dos o más grupos amino primarios y un polímero multielectrófilo que comprende dos o más grupos succinimidilo, en el que el polímero multinucleófilo y el polímero multielectrófilo reaccionan de modo covalente para formar una red reticulada tridimensional, y en el que el polímero multinucleófilo es una poliisina, y en el que el polímero multinucleófilo contiene al menos tres grupos nucleófilos y el polímero multielectrófilo contiene al menos tres grupos electrófilos.

En otra realización, la presente invención proporciona el uso de una composición, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para la fabricación de un hilo o una espiral deshidratado para su transporte a través de un catéter a un sitio de malformación vascular.

Las realizaciones preferidas se indican en las subreivindicaciones.

Una característica de la invención es que las composiciones de polímeros reticulados son ópticamente transparentes, lo cual hace que las composiciones y los métodos de la invención sean particularmente adecuados

para su uso en aplicaciones oftálmicas, en las que la transparencia óptica es un requisito. Además, las composiciones de la invención están formadas por componentes biocompatibles y no inmunogénicos, que no dejan productos de reacción tóxicos, potencialmente inflamatorios o inmunogénicos, en el tejido del sitio de la administración.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

40 Los componentes de la presente invención no son inmunogénicos y, por tanto, no requieren un "ensayo dérmico" antes de comenzar el tratamiento, como sí requiere el colágeno xenogeneico. Además, a diferencia del colágeno, las composiciones de la invención no están sometidas a una ruptura enzimática por las metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, colagenasa) y, por tanto, se espera que tengan mayor persistencia a largo plazo *in vivo* que las composiciones de colágeno disponibles en la actualidad.

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

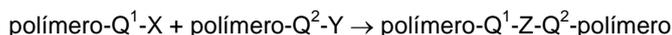
50  $\text{polímero-X}_m + \text{polímero-Y}_n \rightarrow \text{polímero-Z-polímero}$

en la que el polímero-  $X_m$  es una polilisina;  $m > 2$  y  $n > 2$ ;

Y = -CO<sub>2</sub>N(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CHO, -CHOCH<sub>2</sub>, -N=C=O, -SO<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, -N(COCH)<sub>2</sub>, -S-S-(C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N), etc., y puede ser iguales o diferentes; y el el polímero-Y<sub>n</sub> contiene dos o más grupos succinimidilo; Z = grupo funcional que resulta de la unión de un grupo nucleófilo (X) y un grupo electrófilo (Y).

5 El esqueleto del polímero multielectrófilo es preferiblemente un óxido de alquileno, en particular óxido de etileno, óxido de propileno, y sus mezclas.

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



en los que Q =

Estructura completa =

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

polímero-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X

-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

polímero-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X

-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

polímero-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X

-O<sub>2</sub>C-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

polímero-O<sub>2</sub>C-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X

-O<sub>2</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

polímero-O<sub>2</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X

-O<sub>2</sub>C-CR<sup>1</sup>H-

polímero-O<sub>2</sub>C-CRH-X

-O-R<sup>2</sup>-CO-NH

polímero-O-R-CO-NH-X

10 en los que n = 1-10 en cada caso; y en los que el polímero-Q<sup>1</sup>-X es una polilisina;

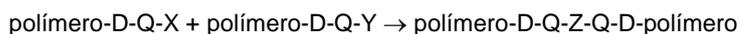
R<sup>1</sup> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, etc.;

R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>, CO-NH-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>.

Por ejemplo, cuando Q<sup>2</sup> = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (no existe Q<sup>1</sup> en este caso), Y = -CO<sub>2</sub>N(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; y X = -NH<sub>2</sub>, las reacciones y los grupos Z resultantes serían los siguientes:

15 polímero-NH<sub>2</sub> + polímero-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-N(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> → polímero-NH-OCH=CH<sub>2</sub>CO-polímero (amida)

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



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

#### Polímeros sintéticos

25 Para preparar las composiciones de la presente invención primero es necesario proporcionar un primer polímero sintético, y un segundo polímero sintético capaz de unirse covalentemente con los grupos nucleófilos sobre el segundo polímero sintético según la reivindicación 1.

Tal como se emplea en la presente, el término "polímero" se refiere, entre otros, a polialquilos, poliaminoácidos y polisacáridos. Además, para un uso externo u oral, el polímero puede ser poli(ácido acrílico) o Carbopol.

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión "polímero sintético" se refiere a polímeros que no son naturales y que se producen mediante síntesis química. Como tales, se excluyen proteínas naturales, tales como el colágeno, y polisacáridos naturales, tales como el ácido hialurónico. Se incluyen el colágeno sintético, el ácido hialurónico sintético y sus derivados. Los polímeros sintéticos que contienen grupos nucleófilos o electrófilos también se denominan en la presente "polímeros sintéticos multifuncionalmente activados". La expresión "multifuncionalmente activado" (o simplemente "activado") se refiere a polímeros sintéticos que tienen, o que sean modificado de modo químico para que tengan, dos o más grupos nucleófilos o electrófilos que son capaces de reaccionar entre sí (es decir, los grupos nucleófilos reaccionan con los grupos electrófilos) para formar enlaces covalentes. Los tipos de polímeros sintéticos multifuncionalmente activados incluyen polímeros difuncionalmente activados, tetrafuncionalmente activados, y polímeros ramificados en forma de estrella.

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

#### 5 Polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleófilos

El polímero multinucleófilo es una polilisina, que es un polímero producido de modo sintético del aminoácido lisina (145 PM). Los poli(lisinas) se han preparado a partir de 6 hasta 4.000 grupos amino primarios, que corresponden a unos pesos moleculares de 870 a 580.000.

10 Las poli(lisinas) para su uso en la presente invención preferiblemente tienen un peso molecular en el intervalo de 1.000 a 300.000; más preferiblemente, en el intervalo de 5.000 a 100.000; lo más preferiblemente, en el intervalo de 8.000 a 15.000.

En el mercado están disponibles poli(lisinas) de diferente peso molecular en Peninsula Laboratories, Inc. (Belmont, CA).

#### Polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos electrófilos

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

20 Los polímeros multielectrófilos para su uso en las composiciones de la invención son polímeros que contienen dos o más grupos succinimidilo capaces de formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre otras moléculas. Los grupos succinimidilo son muy reactivos con materiales que contiene grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>), tales como multi-amino-PEG, poli(lisina), o colágeno. Los grupos succinimidilo son ligeramente menos reactivos con materiales que contienen grupos tiol (-SH), tales como multitiol-PEG o polipéptidos sintéticos que contienen múltiples restos cisteína.

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

#### Polímeros hidrófilos

Se prefieren los polímeros hidrófilos y, en particular, diversos polietilenglicoles, para su uso en las composiciones de la presente invención. Tal como se emplea en la presente, el término "PEG" se refiere a polímeros que tienen la estructura repetida (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>.

35 En las figuras 4 a 13 se muestran estructuras de algunas formas específicas tetrafuncionalmente activadas de PEG, así como los productos de reacción generalizados obtenidos haciendo reaccionar los PEG tetrafuncionalmente activados con multiamino-PEG. Tal como se muestra en las figuras, el grupo succinimidilo es una estructura de anillo de 5 miembros representada como -N(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. En las figuras 4 a 13, el símbolo ^^ indica un enlace abierto. La figura de referencia 4 muestra la reacción de glutarato de succinimidilo-PEG tetrafuncionalmente activado, denominado en la presente SG-PEG, con multiamino-PEG, y el producto de la reacción obtenido.

40 Otra forma activada de PEG se denomina propionato de succinimidilo-PEG (SE-PEG). La fórmula estructural del SE-PEG tetrafuncionalmente activado y el producto de la reacción obtenido haciéndolo reaccionar con multiamino-PEG se muestran en la figura de referencia 5. En una fórmula estructural general para el compuesto, el subíndice 3 se reemplaza por "m". En la realización mostrada en la figura 4, m = 3 porque existen tres grupos CH<sub>2</sub> repetidos a cada lado del PEG.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Polímeros hidrófobos

También pueden utilizarse polímeros hidrófobos para preparar las composiciones de la presente invención. Los polímeros hidrófobos para su uso en la presente invención contienen, o pueden derivatizarse para que contengan, al menos tres grupos electrófilos, tales como grupos succinimidilo, preferiblemente cuatro grupos electrófilos. Tal como se emplea en la presente, la expresión "polímero hidrófobo" se refiere a polímeros que contienen una proporción relativamente pequeña de átomos de oxígeno o nitrógeno.

Los polímeros hidrófobos que ya contienen dos o más grupos succinimilo incluyen suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) ( $BS_3$ ), ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP), bis(2-succinimidooxicarbonilo) etil sulfona (BSOCOES), y 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSP), y sus análogos y derivados.

Los polímeros indicados anteriormente están disponibles en el mercado en Pierce (Rockford, IL), con el n.º de catálogo 21555, 21579, 22585, 21554, y 21577, respectivamente. Las fórmulas estructurales para los polímeros indicados anteriormente, así como los productos de reacción generalizados obtenidos haciendo reaccionar cada uno de estos polímeros con amino-PEG, se muestran a continuación en las figuras 14-18, respectivamente.

Los polímeros hidrófobos preferidos para su uso en la invención generalmente tienen una cadena carbonada no mayor que 14 carbonos. Los polímeros que tienen cadenas carbonadas sustancialmente más largas que 14 carbonos en general tienen una solubilidad muy baja en disoluciones acuosas y, así, tienen unos tiempos de reacción muy largos cuando se mezclan con disoluciones acuosas de polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleófilos.

#### Derivatización de polímeros para que contengan grupos funcionales

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

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

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

10 Pueden derivatizarse poliaminas, tales como etilendiamina ( $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$ ), tetrametilendiamina ( $H_2N-(CH_2)_4-NH_2$ ), pentametilendiamina (cadaverina) ( $H_2N-(CH_2)_5-NH_2$ ), hexametilendiamina ( $H_2N-(CH_2)_6-NH_2$ ), bis(2-hidroxiethyl)amina ( $HN-(CH_2CH_2OH)_2$ ), bis(2-aminoethyl)amina ( $HN-(CH_2CH_2NH_2)_2$ ), y tris(2-aminoethyl)amina ( $N-(CH_2CH_2NH_2)_3$ ) para producir poliácidos, que después pueden derivatizarse para que contengan al menos tres grupos succinimidilo haciéndolos reaccionar con las cantidades molares apropiadas de N-hidroxisuccinimida en presencia de DCC, según se describe en la solicitud de EEUU n.º de serie 08/403.358. Muchas de estas poliaminas están disponibles en el mercado en DuPont Chemical Company.

#### Preparación de composiciones de polímeros reticulados

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

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

30 Debido a que los polímeros que contienen múltiples grupos electrófilos también reaccionan con el agua, el segundo polímero sintético en general se conserva y se utiliza en una forma seca y estéril, para evitar la pérdida de la capacidad reticulante debido a la hidrólisis que se produce generalmente tras la exposición de dichos grupos electrófilos a un medio acuoso. Los procesos para preparar polímeros hidrófilos sintéticos que contengan múltiples grupos electrófilos en forma seca y estéril se indican en la solicitud de EEUU en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes n° de serie 08/497.573, presentada el 30 de junio de 1995. Por ejemplo, el polímero sintético seco puede moldearse por compresión para formar una membrana o lámina fina, que entonces puede esterilizarse utilizando irradiación con rayos gamma, o preferiblemente con rayos  $\epsilon$ . La membrana o lámina seca resultante puede cortarse en el tamaño adecuado o triturarse para formar partículas de tamaño más pequeño.

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

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

#### Incorporación de otros componentes en el polímero sintético reticulado

45 También puede incorporarse otras proteínas naturales, tales como colágeno y derivados de diversos polisacáridos naturales, tales como glicosaminoglicanos, en las composiciones de la invención. Cuando estos otros componentes también contienen grupos funcionales que reaccionan con los grupos funcionales sobre los polímeros sintéticos, su presencia durante el mezclado y/o la reticulación del primer y segundo polímero sintético producirá la formación de una matriz de polímero natural-polímero sintético reticulada. En particular, cuando el polímero natural (proteína o polisacárido) también contiene grupos nucleófilos, tales como grupos amino primarios, los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético reaccionarán con los grupos amino primarios sobre estos componentes, así como con los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético, para hacer que estos otros componentes formen parte de la matriz polimérica.

55 En general, los glicosaminoglicanos deben derivatizarse de modo químico mediante desacetilación, desulfatación o ambas, para que contengan grupos amino primarios disponibles para la reacción con los grupos electrófilos sobre las moléculas poliméricas sintéticas. Los glicosaminoglicanos que pueden derivatizarse según cualquiera o ambos de los métodos mencionados anteriormente incluyen los siguientes: ácido hialurónico, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B (sulfato de dermatano), sulfato de condroitina C, quitina (puede derivatizarse a quitosano), sulfato de queratano, queratosulfato, y heparina. La derivatización de los glicosaminoglicanos mediante

desacetilización y/o desulfatación, y la unión covalente de los derivados de glicosaminoglicanos resultantes con polímeros hidrófilos sintéticos se describe con más detalle en la solicitud de patente de EEUU otorgada, cedida junto con la presente, n.º de serie 08/146.843, presentada el 3 de noviembre, 1993.

5 De modo similar, los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético reaccionarán con los grupos amino primarios sobre los restos lisina o los grupos tiol sobre los restos cisteína de ciertas proteínas naturales. Las proteínas ricas en lisina, tales como el colágeno y sus derivados, son especialmente reactivas con los grupos electrófilos de los polímeros sintéticos. Tal como se emplea en la presente, el término "colágeno" pretende incluir colágeno de cualquier tipo, procedente de cualquier fuente, pero no se limita a colágeno extraído de tejidos o producido de modo recombinante, análogos del colágeno, derivados del colágeno, colágenos modificados, y colágenos desnaturalizados, tales como gelatina. La unión covalente del colágeno a polímeros hidrófilos sintéticos se describe en detalle en la patente de EEUU cedida junto con la presente n.º 5.162.430, expedida el 10 de noviembre, 1992, de Rhee *et al.*

15 En general, puede utilizarse colágeno procedente de cualquier fuente en las composiciones de la invención; por ejemplo, el colágeno puede extraerse y purificarse a partir de una fuente humana o de otro mamífero, tal como corion bovino o porcino y placenta humana, o puede producirse de modo recombinante o de otro modo. La preparación de colágeno purificado sustancialmente no antigénico en disolución a partir de piel de bovino es muy conocida en la técnica. La patente de EEUU, de propiedad de los solicitantes, n.º 5.428.022, expedida el 27 de junio, 1995, de Palefsky *et al.*, describe métodos para extraer y purificar colágeno de la placenta humana. La solicitud de EEUU en tramitación junto con la presente, de propiedad de los solicitantes, n.º de serie 08/183.648, presentada el 18 de enero, 1994, describe métodos para producir colágeno humano recombinantes en la leche de animales transgénicos, que incluyen vacas transgénicas. El término "colágeno" o "material de colágeno", tal como se emplea en la presente, se refiere a todas las formas de colágeno, incluyendo las que se han procesado o modificado de otra manera.

25 En las composiciones de la invención puede utilizarse colágeno de cualquier tipo que incluye, pero no se limita a los tipos I, II, III, IV, o cualquiera de sus combinaciones, aunque en general se prefiere el tipo I. Puede utilizarse colágeno que contenga atelopéptidos o telopéptidos; sin embargo, cuando se emplea colágeno de una fuente xenogénea, tal como colágeno de bovino, en general se prefiere el colágeno de atelopéptidos, por su menor inmunogenicidad comparado con el colágeno que contiene telopéptidos.

30 Se prefiere el colágeno que no ha sido previamente reticulado mediante métodos tales como calor, irradiación, o agentes reticulantes químicos, para su uso en las composiciones de la invención, aunque puede utilizarse colágeno previamente reticulado. Un colágeno fibrilar de atelopéptidos no reticulado está disponible en el mercado en Collagen Corporation (Palo Alto, CA) a unas concentraciones de colágeno de 35 mg/ml y 65 mg/ml, con la marca comercial Zyderm® I Collagen y Zyderm II Collagen, respectivamente. Un colágeno de atelopéptidos reticulado con glutaraldehído está disponible en el mercado en Collagen Corporation, a una concentración de colágeno de 35 mg/ml, con la marca comercial Zyplast® Collagen.

Los colágenos para su uso en la presente invención están generalmente en una suspensión acuosa a una concentración entre 20 mg/ml y 120 mg/ml; preferiblemente, entre 30 mg/ml y 90 mg/ml.

40 Aunque se prefiere el colágeno intacto, también puede utilizarse colágeno desnaturalizado, habitualmente denominado gelatina, en las composiciones de la invención. La gelatina puede tener el beneficio añadido de que se degrada con más rapidez que el colágeno.

Debido a su consistencia pegajosa, en general se prefiere el colágeno no fibrilar para su uso en las composiciones de la invención previstas para ser utilizadas como bioadhesivo. La expresión "colágeno no fibrilar" se refiere a cualquier material de colágeno modificado o no modificado que está en una forma sustancialmente no fibrilar a pH 7, según lo indica la transparencia óptica de una suspensión acuosa del colágeno.

45 El colágeno que ya está en forma no fibrilar puede utilizarse en las composiciones de la invención. Tal como se emplea en la presente, la expresión "colágeno no fibrilar" pretende incluir los tipos de colágeno que no son fibrilares en forma nativa, así como los colágenos que han sido químicamente modificados de manera que están en forma no fibrilar a pH neutro o cercano a este. Los tipos de colágeno que no son fibrilares (o microfibrilares) en forma nativa incluyen los tipos IV, VI, y VII.

50 Los colágenos químicamente modificados que están en forma no fibrilar a pH neutro incluyen colágeno succinilado y colágeno metilado, pudiéndose ambos preparar según los métodos descritos en la patente de EEUU n.º 4.164.559, expedida el 14 de agosto, 1979, de Miyata *et al.* Debido a su pegajosidad inherente, el colágeno metilado es particularmente preferido para su uso en composiciones bioadhesivas, según se describe en la solicitud de EEUU, de propiedad de los solicitantes, n.º de serie 08/476.825.

55 Los colágenos para su uso en las composiciones de polímeros reticulados de la presente invención pueden comenzar en forma fibrilar, y después hacerse no fibrilares mediante la adición de uno o más agentes de disgregación de fibras. Un agente de disgregación de fibras debe estar presente en una cantidad suficiente para hacer que el colágeno sea sustancialmente no fibrilar a pH 7, tal como se describió anteriormente. Los agentes de

disgregación de fibras para su uso en la presente invención incluyen diversos alcoholes biocompatibles, aminoácidos, sales inorgánicas, y carbohidratos, siendo particularmente preferidos los alcoholes biocompatibles. Los alcoholes biocompatibles preferidos incluyen glicerol y propilenglycol. Los alcoholes no biocompatibles, tales como etanol, metanol, e isopropanol, no se prefieren para su uso en la presente invención, debido a sus efectos potencialmente perjudiciales sobre el cuerpo de paciente que los recibe. Los aminoácidos preferidos incluyen arginina. Las sales inorgánicas preferidas incluyen cloruro de sodio y cloruro de potasio. Aunque pueden utilizarse carbohidratos, tales como diversos azúcares, incluyendo sacarosa, en la práctica de la presente invención, no se prefieren como tipo de agente disgregante de fibras, porque pueden tener efectos citotóxicos *in vivo*.

Debido a que es menos opaco y pegajoso que el colágeno no fibrilar, el colágeno fibrilar es menos preferido para su uso en composiciones bioadhesivas. Sin embargo, tal como se describe en la solicitud de EEUU, de propiedad de los solicitantes, n.º de serie 08/476.825, el colágeno fibrilar, o las mezclas de colágeno no fibrilar y fibrilar, pueden preferirse para su uso en composiciones adhesivas previstas para una persistencia a largo plazo *in vivo*, si la transparencia óptica no constituye un requisito.

Para las composiciones previstas para su uso en el aumento de tejidos se prefiere el colágeno fibrilar, porque tiene a formar geles reticulados más resistentes con una mayor persistencia a largo plazo *in vivo* que los preparados utilizando colágeno no fibrilar.

En general, el colágeno se añade al primer polímero sintético, después el colágeno y el primer polímero sintético se mezclan a fondo para lograr una composición homogénea. Después se añade el segundo polímero sintético y se mezcla en la mezcla de colágeno/primer polímero sintético, en donde se une covalentemente a grupos amino primarios o grupos tiol sobre el primer polímero sintético, y a grupos amino primarios sobre el colágeno, dando como resultado la formación de una red reticulada homogénea. Pueden incorporarse diversos derivados de glicosaminoglicanos desacetilados y/o desulfatados en la composición de una manera similar a la descrita anteriormente para el colágeno.

Para su uso en la adhesión de tejidos tal como se analiza a continuación, también puede resultar deseable incorporar proteínas, tales como albúmina, fibrina o fibrinógeno, a la composición de polímeros reticulados para estimular la adhesión celular.

Además, la introducción de hidrocoloides, tales como carboximetilcelulosa, puede estimular la adhesión y/o el hinchamiento de tejidos.

#### Administración de las composiciones de polímeros sintéticos reticulados

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

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

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

En otra realización de la invención, el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético se mezclan, después se extrusionan y se dejan reticular para formar una lámina u otra forma sólida. El sólido reticulado entonces se deshidrata para eliminar sustancialmente toda el agua no unida. El sólido secado resultante puede pulverizarse o triturarse para formar partículas, después se suspende en un vehículo fluido no acuoso que incluye ácido hialurónico, sulfato de dextrano, dextrano, colágeno no reticulado succinilado, colágeno no reticulado metilado, glucógeno, glicerol, dextrosa, maltosa, triglicéridos de ácidos grasos (tales como aceite de maíz, aceite de soja, y aceite de sésamo), y fosfolípido de yema de huevo. La suspensión de las partículas puede inyectarse a través de una aguja de calibre pequeño hacia un sitio de tejido. Cuando están en el interior del tejido, las partículas de polímeros reticulados se rehidratan y se hinchan hasta cinco veces su tamaño.

#### Uso de polímeros sintéticos reticulados para administrar compuestos cargados

Variando las cantidades molares relativas del primer polímero sintético y el segundo polímero sintético, es posible alterar la carga neta de la composición de polímeros reticulados resultantes, para preparar una matriz para la administración de un compuesto cargado (tal como una proteína o un fármaco). Así puede controlarse el transporte de proteínas o fármacos cargados, que normalmente se difunden con rapidez hacia el exterior de una matriz de vehículo neutra.

Por ejemplo, si se emplea un exceso molar de un primer polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleófilos, la matriz resultante tiene una carga neta positiva y puede emplearse para unir iónicamente y transportar compuestos cargados negativamente. Los ejemplos de compuestos cargados negativamente que pueden ser administrados desde estas matrices incluyen diversos fármacos, células, proteínas, y polisacáridos. Los colágenos cargados negativamente, tales como colágeno succinilado, y derivados de glicosaminoglicanos, tales como hialuronato de sodio, sulfato de queratano, queratosulfato, sulfato de condroitina sodio A, sulfato de dermatano sodio B, sulfato de condroitina sodio C, heparina, sulfato de condroitina esterificado C, y heparina esterificada, pueden incorporarse con eficacia en la matriz de polímeros reticulados, tal como se describió anteriormente.

Si se emplea un exceso molar de un segundo polímero sintético que contiene múltiples grupos electrófilos, la matriz resultante tiene una carga neta negativa, y puede utilizarse para unir iónicamente y transportar compuestos cargados positivamente. Los ejemplos de compuestos cargados positivamente que pueden ser administrados desde estas matrices incluyen diversos fármacos, células, proteínas, y polisacáridos. Los colágenos cargados negativamente, tales como colágeno metilado, y derivados de glicosaminoglicanos, tales como ácido hialurónico desacetilado esterificado, sulfato de condroitina desulfatado desacetilado esterificado A, sulfato de condroitina desulfatado desacetilado esterificado C, sulfato de queratano desulfatado desacetilado, queratosulfato desulfatado desacetilado, heparina desulfatada esterificada, y quitosano, pueden incorporarse con eficacia en la matriz de polímeros reticulados, tal como se describió anteriormente.

#### Uso de polímeros sintéticos reticulados para administrar agentes biológicamente activos

Las composiciones de polímeros reticulados de la presente invención también pueden utilizarse para la administración localizada de diversos fármacos y otros agentes biológicamente activos. Los agentes biológicamente activos, tales como factores del crecimiento, pueden administrarse desde la composición hacia un sitio de tejido local para favorecer la curación y la regeneración del tejido.

La expresión "agente biológicamente activo" o "agente activo", tal como se emplea en la presente, se refiere a moléculas orgánicas que ejercen sus efectos biológicos *in vivo*. Los ejemplos de agentes activos incluyen, sin limitación, enzimas, antagonistas o agonistas de receptores, hormonas, factores del crecimiento, médula ósea autógena, antibióticos, agentes antimicrobianos y anticuerpos. La expresión "agente activo" también pretende incluir combinaciones o mezclas de dos o más agentes activos, tal como se definió anteriormente.

Los agentes activos preferidos para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen factores del crecimiento, tales como factores del crecimiento transformantes (TGF), factores del crecimiento de fibroblastos (FGF), factores del crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores del crecimiento epidérmicos (EGF), péptidos activados del tejido conectivo (CTAP), factores osteogénicos, y análogos, fragmentes y derivados biológicamente activos de dichos factores del crecimiento. Los miembros de la familia de supergenes del factor del crecimiento transformante (TGF), que son proteínas reguladoras multifuncionales, son particularmente preferidos. Los miembros de la familia de supergenes de TGF incluyen los factores del crecimiento beta-transformantes (por ejemplo, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3); proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); factores del crecimiento de unión a heparina (por ejemplo, factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor del crecimiento de tipo insulínico (IGF)); inhibinas (por ejemplo, inhibina A, inhibina B); factores del crecimiento y diferenciación (por ejemplo, GDF-1); y activinas (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB).

Los factores del crecimiento pueden aislarse a partir de fuentes nativas o naturales, tales como a partir de células de mamífero, o pueden prepararse de modo sintético, tal como mediante técnicas de ADN recombinante o mediante diversos procesos químicos. Además, pueden utilizarse análogos, fragmentos o derivados de estos factores, con la condición de que muestren al menos algo de la actividad biológica de la molécula nativa. Por ejemplo, pueden prepararse análogos mediante la expresión de genes alterados mediante mutagénesis específica de sitio u otras técnicas de ingeniería genética.

Los agentes biológicamente activos pueden incorporarse en la composición de polímeros sintéticos reticulados mediante mezcla. Como alternativa, los agentes pueden incorporarse en la matriz de polímeros reticulados, según se describió anteriormente, enlazando estos agentes con los grupos funcionales sobre los polímeros sintéticos. Los procesos para unir covalentemente agentes biológicamente activos, tales como factores del crecimiento, utilizando polietilenglicoles funcionalmente activados se describen en la patente de EEUU cedida junto con la presente n.º 5.162.430, expedida el 10 de noviembre, 1992, de Rhee *et al.* Estas composiciones preferiblemente incluyen enlaces que puedan biodegradarse con facilidad, por ejemplo, como resultado de una degradación enzimática, lo cual produce la liberación del agente activo hacia el tejido diana, en el que ejerce su efecto terapéutico deseado.

5 Un método sencillo para incorporar agentes biológicamente activos que contienen grupos nucleófilos en la composición de polímeros reticulados implica mezclar el agente activo con el primer polímero sintético (o mezcla de primer polímero sintético/colágeno) antes de añadir el segundo polímero sintético. Este procedimiento produce la unión covalente del agente activo con la composición de polímeros reticulados, produciendo una composición de liberación sostenida muy eficaz.

El tipo y la cantidad de agente activo utilizado dependerá, entre otros factores, del sitio y trastorno concretos que se van a tratar, y de la actividad biológica y farmacocinética del agente activo seleccionado.

Uso de polímeros sintéticos reticulados para transportar células o genes

10 Las composiciones de polímeros reticulados de la presente invención también pueden utilizarse para transportar diversos tipos de células vivas o genes al sitio de administración deseado para formar tejido nuevo. El término "genes", tal como se emplea en la presente, pretende incluir material genético procedente de fuentes naturales, ácidos nucleicos sintéticos, ADN, ADN y ARN antisentido.

15 Cuando se emplean para transportar células, por ejemplo, células pluripotenciales mesenquimáticas, las células pueden transportarse para producir células del mismo tipo que el tejido al cual se transporta. Las células pluripotenciales mesenquimáticas no están diferenciadas y, por tanto, pueden diferenciarse para formar diversos tipos de células nuevas debido a la presencia de un agente activo, o los efectos (químicos, físicos, etc.) del entorno local del tejido. Los ejemplos de células pluripotenciales mesenquimáticas incluyen osteoblastos, condrocitos, y fibroblastos. Pueden transportarse osteoblastos al sitio de un defecto óseo para producir hueso nuevo; pueden transportarse condrocitos al sitio de un defecto de cartílago para producir cartílago nuevo; pueden transportarse fibroblastos para producir colágeno cuando sea necesario tejido conectivo nuevo; pueden transportarse células neurectodérmicas para formar nuevo tejido nervioso; pueden transportarse células epiteliales para formar nuevos tejidos epiteliales, tales como hígado, páncreas, etc.

25 Las células o los genes pueden tener un origen alogeneico o xenogeneico. Por ejemplo, las composiciones pueden utilizarse para transportar células o genes de otras especies que han sido genéticamente modificadas. Debido a que las composiciones de la invención no se degradan con facilidad *in vivo*, las células y los genes atrapados dentro de las composiciones de polímeros reticulados estarán aislados de las propias células del paciente y, así, no provocarán una respuesta inmunológica en el paciente. Para atrapar las células o los genes dentro de una matriz de polímeros reticulados, el primer polímero y las células o los genes pueden premezclarse, y después el segundo polímero se mezcla en la mezcla del primer polímero/células o genes para formar una matriz reticulada, atrapando con ello a las células o los genes dentro de la matriz.

30 Tal como se analizó anteriormente para los agentes biológicamente activos, cuando se emplean para transportar células o genes, los polímeros sintéticos preferiblemente también contienen grupos biodegradables para ayudar a la liberación controlada de las células o los genes en el sitio previsto de administración.

Uso de polímeros sintéticos reticulados como bioadhesivos

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

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

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

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

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

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

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

La otra superficie puede ser la superficie de un tejido nativo, la superficie de un tejido no nativo, o la superficie de un implante sintético. Tal como se emplea en la presente, la expresión "tejido no nativo" se refiere a tejidos biológicos que se han retirado del cuerpo de un paciente donante (que puede ser de la misma especie o de una especie diferente del paciente receptor) para su implantación en el cuerpo de un paciente receptor (por ejemplo, trasplantes de tejidos y órganos). Por ejemplo, las composiciones de polímeros reticulados de la presente invención pueden utilizarse para adherir la córnea de un donante al ojo de un paciente receptor.

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

#### Uso de polímeros sintéticos reticulados en aplicaciones oftálmicas

Debido a su transparencia óptica, las composiciones de polímeros reticulados de la invención que no contienen colágeno son particularmente adecuados para su uso en aplicaciones oftálmicas. Por ejemplo, puede fijarse una lenticula sintética para la corrección de la visión a la capa de Bowman de la córnea del ojo de un paciente utilizando los métodos de la presente invención. Tal como se describe en la solicitud de EEUU concedida, cedida junto con la presente, n.º de serie 08/147.227, presentada el 3 de noviembre, 1993, de Rhee *et al.*, un colágeno químicamente modificado (tal como colágeno succinilado o metilado) que está en forma sustancialmente no fibrilar a pH 7, puede reticularse utilizando un polímero hidrófilo sintéticos, después moldearse en una forma lenticular deseada, y después se le permite que termine la reticulación. La lenticula de colágeno reticulado resultante puede fijarse a la capa de Bowman de la córnea desepitelializada del ojo de un paciente utilizando los métodos de la presente invención. Mediante la aplicación de la mezcla de reacción que comprende el primer y el segundo polímero a la superficie anterior de la córnea, después poniendo en contacto la superficie anterior de la córnea con la superficie posterior de la lenticula antes de que se haya producido una reticulación sustancial, los grupos electrófilos sobre el segundo polímero también se unirán covalentemente con las moléculas de colágeno del tejido corneal y de la lenticula, para anclar con firmeza la lenticula en su lugar (como alternativa, la mezcla de reacción puede aplicarse primero a la superficie posterior de la lenticula, que después se pone en contacto con la superficie anterior de la córnea).

Las composiciones de la presente invención también son adecuadas para un uso en la sustitución vítrea.

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

Las composiciones de polímeros reticulados de la invención también pueden utilizarse para el aumento de tejido blando o duro dentro del cuerpo de un sujeto mamífero. Así, pueden ser mejores que los productos de materiales

con base de colágeno comercializados en la actualidad para el aumento de tejido blando, porque son menos inmunogénicos y más persistentes. Los ejemplos de aplicaciones de aumento de tejido blando incluyen aumento de esfínteres (por ejemplo, urinario, anal, esofágico) y el tratamiento de la rinitis y de cicatrices. Los ejemplos de aplicaciones de aumento de tejido duro incluyen la reparación y/o la sustitución de hueso y/o tejido cartilaginoso.

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

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

#### Uso de las composiciones de polímeros sintéticos reticulados para evitar adhesiones

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

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

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

#### Uso de polímeros sintéticos reticulados para revestir implantes

40 Otro uso de las composiciones de polímeros reticulados de la invención es como material de revestimiento para implantes sintéticos. En un método general para revestir una superficie de un implante sintético, el primer y el segundo polímero sintético se mezclan, y después se aplica una capa fina de la mezcla de reacción sobre la superficie del implante antes de que se haya producido una reticulación sustancial entre los grupos nucleófilos sobre el primer polímero sintético y los grupos electrófilos sobre el segundo polímero sintético. Para minimizar la reacción celular y fibrosa con el implante revestido, la mezcla de reacción se prepara preferiblemente para que tenga una carga neta neutra. La aplicación de la mezcla de reacción a la superficie del implante puede ser mediante extrusión, aplicación con pincel, pulverización (tal como se describió anteriormente), o mediante cualquier otro medio conveniente. Tras la aplicación de la mezcla de reacción a la superficie del implante se deja que la reticulación continúe hasta que se logra la reticulación completa.

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

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

Uso de los polímeros sintéticos reticulados para tratar el aneurisma

5 Las composiciones de polímeros reticulados de la invención pueden extrusionarse o moldearse en forma de un hilo o una espiral y después deshidratarse. El hilo o la espiral deshidratada resultante puede transportarse mediante un catéter hacia el sitio de una malformación vascular, tal como un aneurisma, para el objetivo de la oclusión vascular y, en último término, la reparación de la malformación. El hilo o la espiral deshidratado puede transportarse en una forma comprimida que se rehidratará dentro del vaso sanguíneo, hinchándose en varias veces su tamaño comparado con su estado deshidratado, al mismo tiempo que mantiene su forma original.

Otros usos para los polímeros sintéticos reticulados

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

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

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

**Ejemplos**

30 Los siguientes ejemplos se ofrecen para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo fabricar las realizaciones preferidas de los conjugados, las composiciones y los dispositivos. Se ha intentado asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, pesos moleculares, etc.) pero deben tomarse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o una presión cercana a ésta.

**Ejemplo 1 (referencia)***Preparación de composiciones de multiamino-PEG reticuladas*

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

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

**Ejemplo 2 (referencia)***Preparación de composiciones de multiamino-PEG reticuladas*

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

- Se disolvieron 10 gramos de Jeffamine ED-2001 (obtenido en Texaco Chemical Company, Houston, TX) en 9 ml de agua.
- 50 - Se disolvieron 10 gramos de Jeffamine ED-4000 (también obtenido en Texaco Chemical Company) en 9 ml de agua.
- Se disolvieron 0,1 gramos de diamino-PEG (3400 PM, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, AL) en 300 µl de agua.

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

Tabla 1. Preparación de composiciones de polímeros reticulados

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

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

**Ejemplo 3 (referencia)**

10 *Caracterización de las composiciones de multiamino-PEG reticuladas*

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

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

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

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

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

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

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

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

**Ejemplo 4 (referencia)**

35 *Preparación de composiciones de polilisina reticuladas*

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

5 **Ejemplo 5 (referencia)**

*Preparación y ensayo mecánico de las composiciones de multiamino-PEG reticuladas*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Ejemplo 6 (referencia)

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

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

10

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

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

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

#### Ejemplo 7 (referencia)

##### 15 Cultivo de células en una matriz de multiamino-PEG reticulada

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

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

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

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

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

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

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

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición que comprende un polímero multinucleófilo que comprende dos o más grupos amino primarios y un polímero multielectrófilo que comprende dos o más grupos succinimidilo, en la que el polímero multinucleófilo y el polímero multielectrófilo reaccionan covalentemente para formar una red reticulada tridimensional, y en la que el polímero multinucleófilo es una polilisina, y en la que el polímero multielectrófilo contiene al menos tres grupos nucleófilos y el polímero multielectrófilo contiene al menos tres grupos electrófilos.
- 2.- La composición de la reivindicación 1, en la que la poli(lisina) comprende de 6 a 4000 grupos amino primarios.
- 3.- La composición de la reivindicación 2, en la que la polilisina tiene un peso molecular en el intervalo de 1.000 a 300.000.
- 4.- La composición de la reivindicación 2, en la que la polilisina tiene un peso molecular en el intervalo de 5.000 a 100.000.
- 5.- La composición de la reivindicación 2, en la que la polilisina tiene un peso molecular en el intervalo de 8.000 a 15.000.
- 6.- La composición de la reivindicación 1, en la que el polímero multielectrófilo es un polímero hidrófilo.
- 7.- La composición de la reivindicación 6, en la que el polímero hidrófilo es un polietilenglicol (PEG) activado.
- 8.- La composición de la reivindicación 7, en la que el PEG activado es PEG-succinimidilo (SG-PEG).
- 9.- La composición de la reivindicación 7, en la que el PEG activado es PEG-propionato de succinimidilo (SE-PEG).
- 10.- La composición de la reivindicación 7, en la que el PEG activado es PEG-succinimidil succinamida (SSA-PEG).
- 11.- La composición de la reivindicación 7, en la que el PEG activado es PEG-carbonato de succinimidilo (SC-PEG).
- 12.- La composición de la reivindicación 7, en la que el PEG activado es un polímero de ramificación en estrella.
- 13.- Las composiciones de las reivindicaciones 7, 8 y 9, en las que el PEG activado está en una forma trifuncionalmente activada.
- 14.- Las composiciones de las reivindicaciones 7-11, en las que el PEG activado está en una forma tetrafuncionalmente activada.
- 15.- La composición de la reivindicación 1, que comprende además un agente formador de imágenes.
- 16.- La composición de la reivindicación 15, en la que el agente formador de imágenes se selecciona del grupo que consiste en sulfato de yodo o sulfato de bario, para la visualización después de la administración a un paciente mediante rayos X.
- 17.- La composición de la reivindicación 15, en la que el agente formador de imágenes es flúor, para la visualización después de la administración a un paciente mediante <sup>19</sup>F-MRI.
- 18.- La composición de la reivindicación 1, que comprende además una proteína o un polisacárido.
- 19.- La composición de la reivindicación 18, en la que la proteína es colágeno.
- 20.- La composición de la reivindicación 19, en la que el colágeno es colágeno no fibrilar intacto.
- 21.- La composición de la reivindicación 20, en la que el colágeno es colágeno no fibrilar químicamente modificado.
- 22.- La composición de la reivindicación 20, en la que el colágeno se selecciona de colágeno succinilado y colágeno metilado.
- 23.- La composición de la reivindicación 18, en la que la proteína se selecciona de albúmina, fibrina, o fibrinógeno.
- 24.- La composición de la reivindicación 18, en la que el polisacárido es glicosaminoglicano.
- 25.- La composición de la reivindicación 20, en la que el glicosaminoglicano está derivatizado para que contenga grupos amino primarios disponibles para la reacción con los grupos electrófilos.
- 26.- La composición de la reivindicación 20, en la que el glicosaminoglicano derivatiza mediante desacilación, desulfatación, o ambas.

27.- La composición de la reivindicación 22, en la que el glicosaminoglicano se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B (sulfato de dermatano), sulfato de condroitina C, quitina, sulfato de queratano, queratosulfato, y heparina.

28.- La composición de la reivindicación 1, que comprende además un agente biológicamente activo.

5 29.- La composición de la reivindicación 28, en la que el agente biológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en enzimas, antagonistas o agonistas de receptores, hormonas, factores del crecimiento, médula ósea autógena, antibióticos, agentes antimicrobianos, anticuerpos, células, genes, y combinaciones o mezclas de dos o más agentes activos.

10 30.- El uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la fabricación de un hilo o una espiral deshidratada para su transporte mediante un catéter hacia un sitio de malformación vascular.

31.- El uso según la reivindicación 30, en el que la malformación vascular es un aneurisma.

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

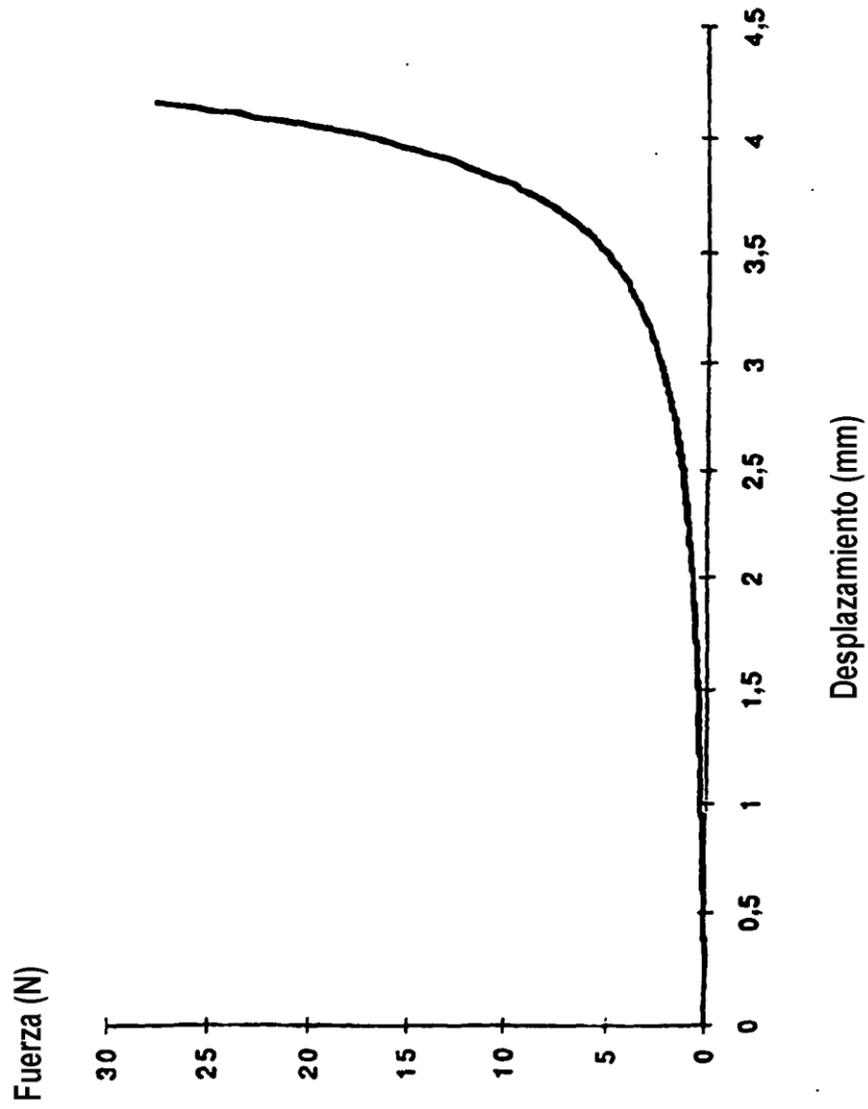


Fig. 1

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

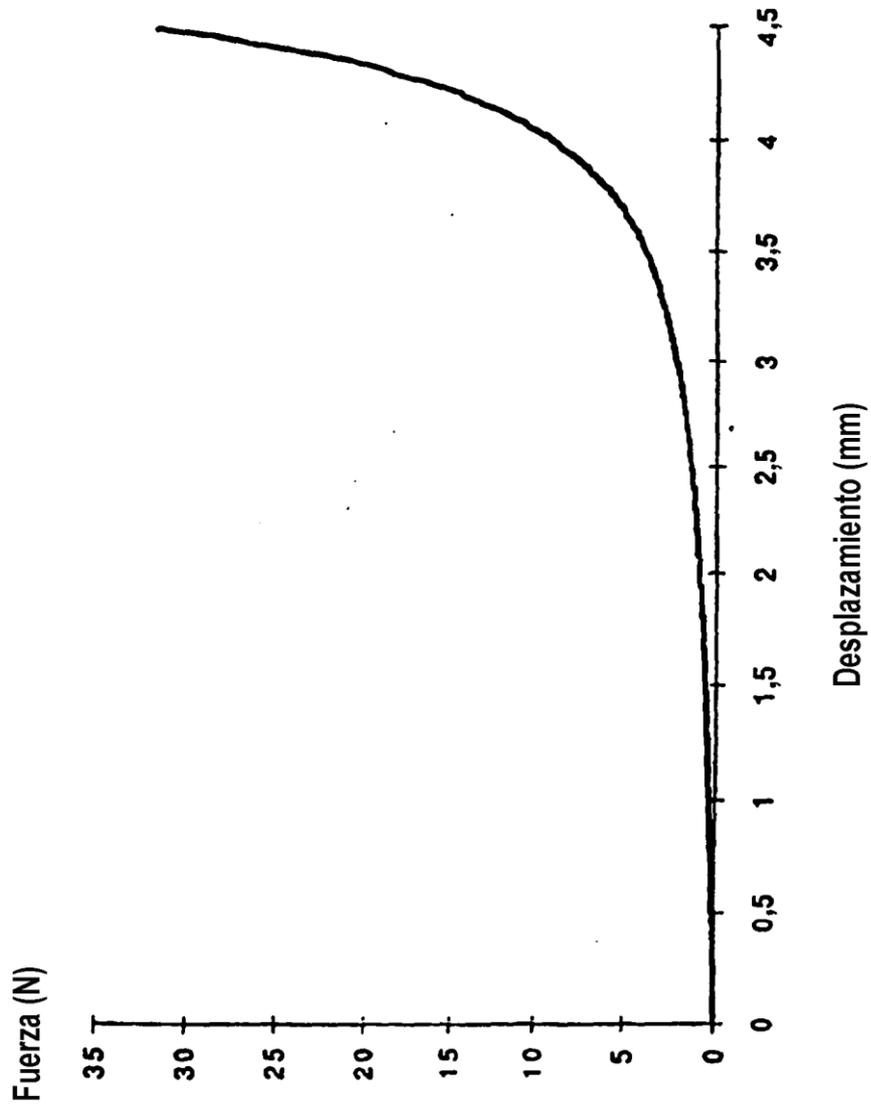


Fig. 2

Diamina

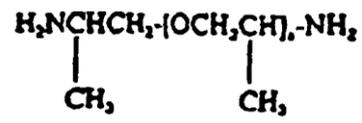


Fig. 3a

Triamina

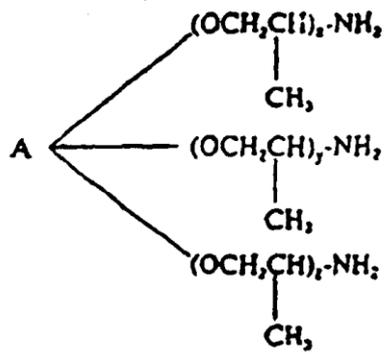


Fig 3b



SG-PEG, m = 3: Butilato de succinimidilo-PEG tetrafuncionalmente activado (enlace éter)

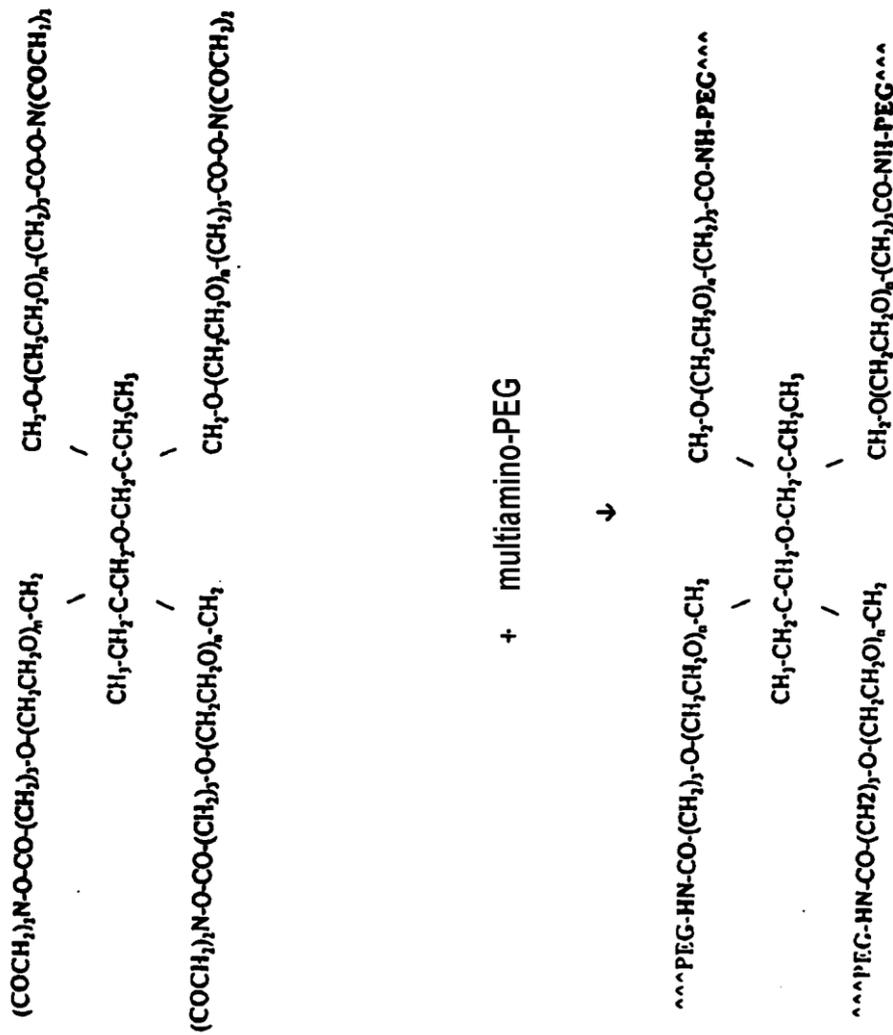


Fig. 5



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

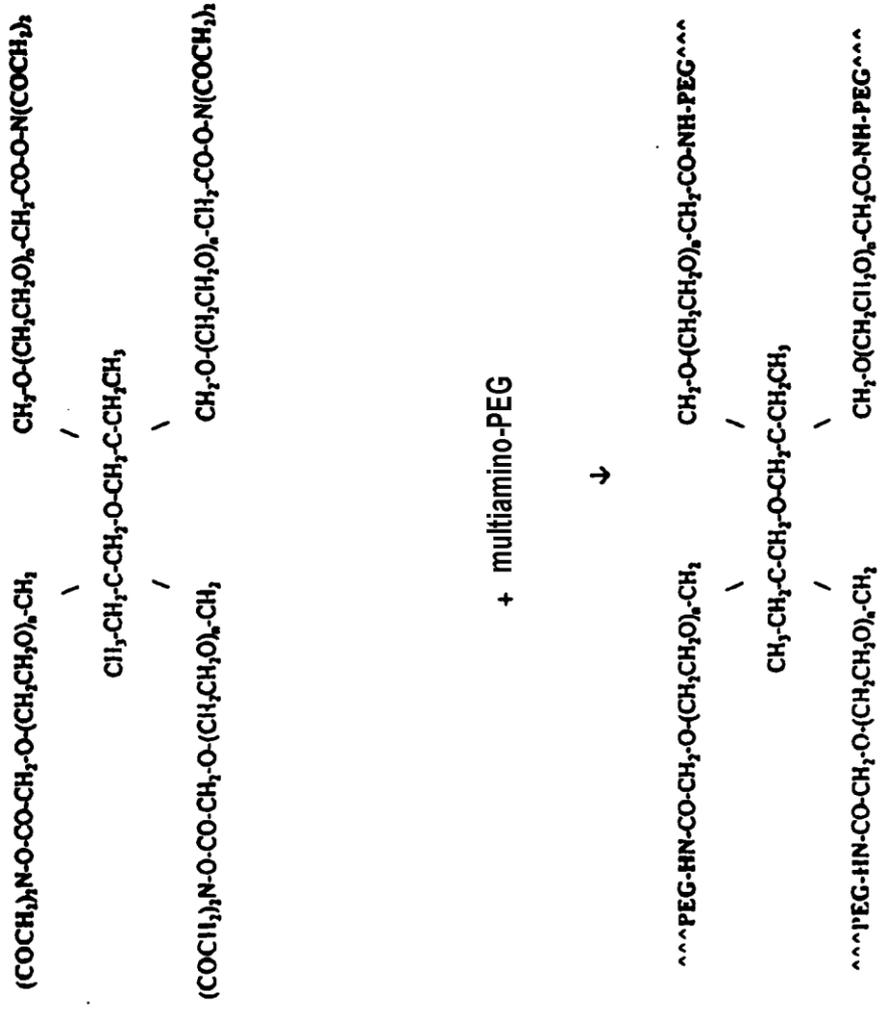


Fig. 7

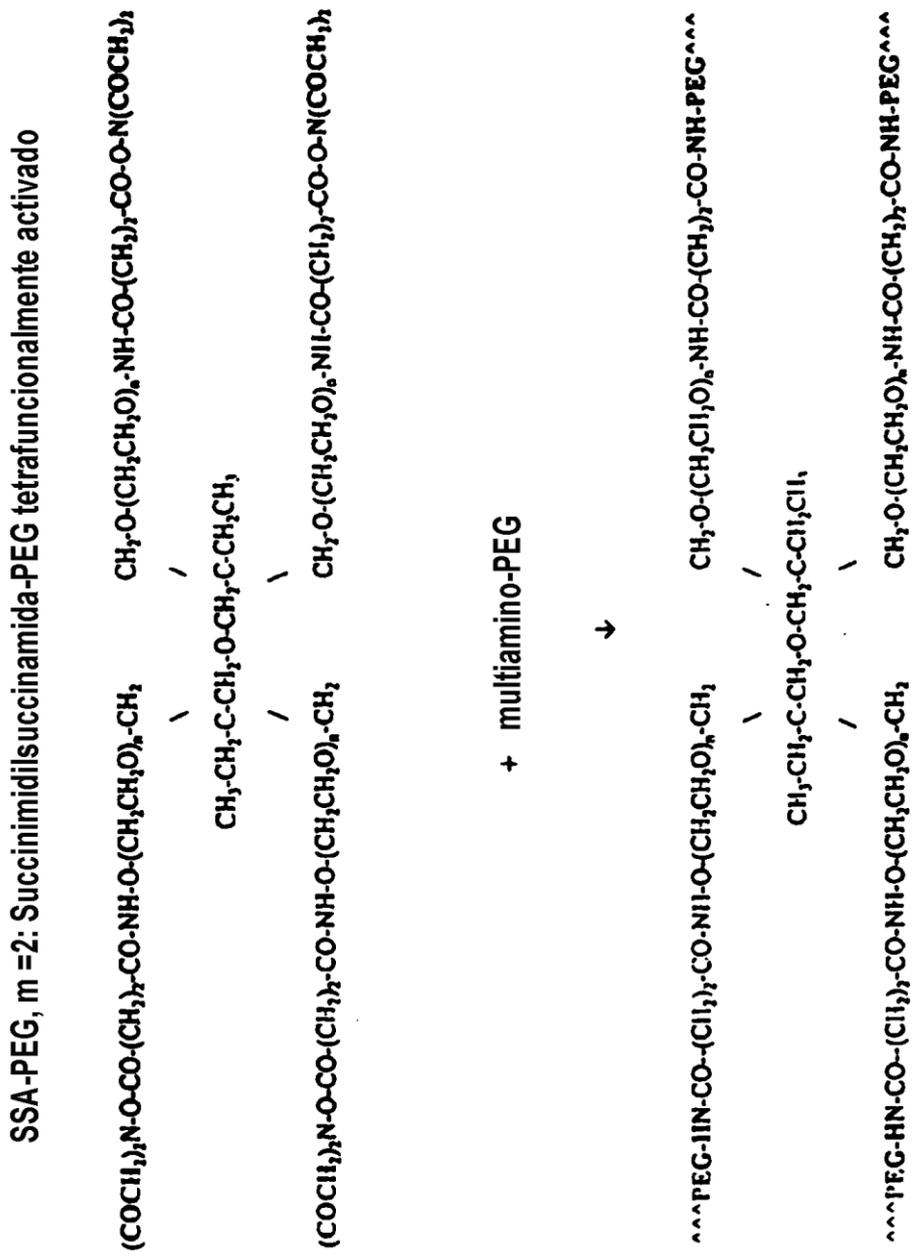


Fig. 8

SC-PEG, m = 0: Carbonato de succinimidilo-PEG tetrafuncionalmente activado

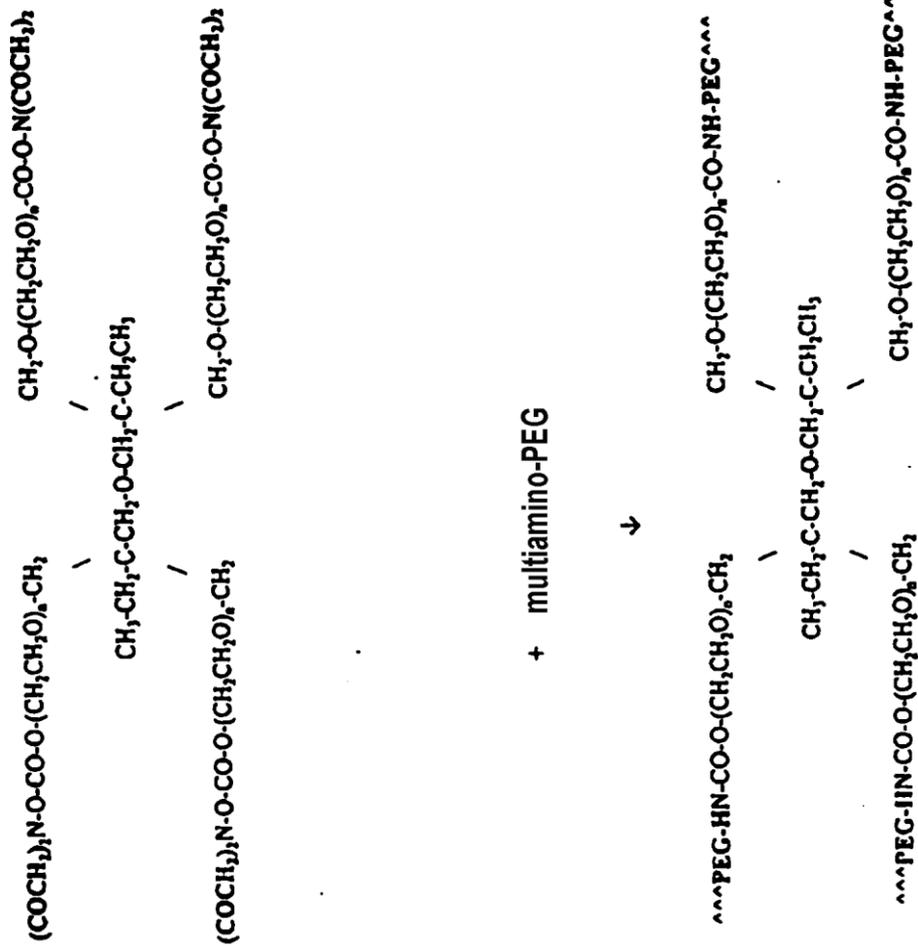


Fig. 9

A-PEG: Propionaldehído-PEG tetrafuncionalmente activado

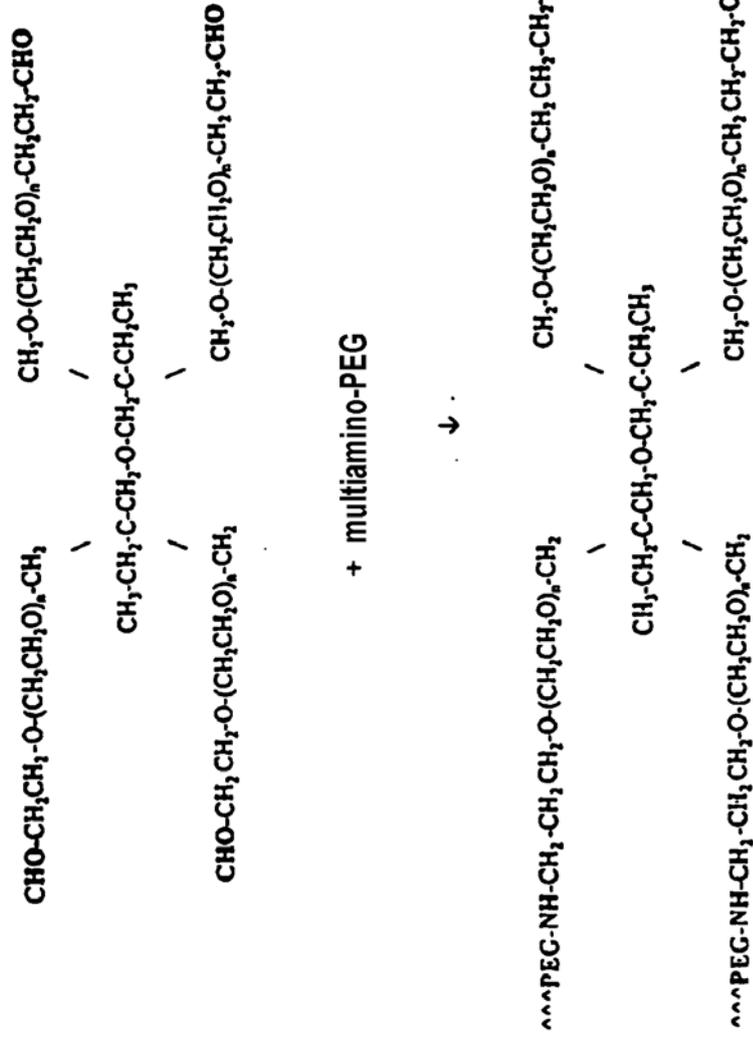


Fig. 10



I-PEG: Isocianato-PEG tetrafuncionalmente activado

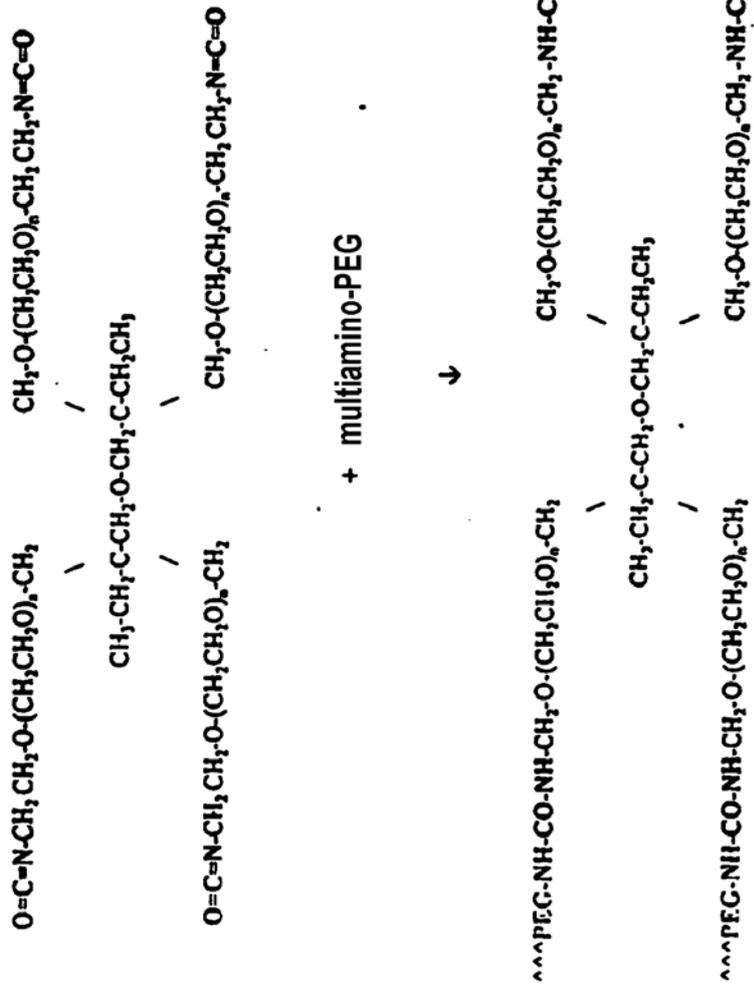


Fig. 12

V-PEG: Vinilsulfona-PEG tetrafuncionalmente activado

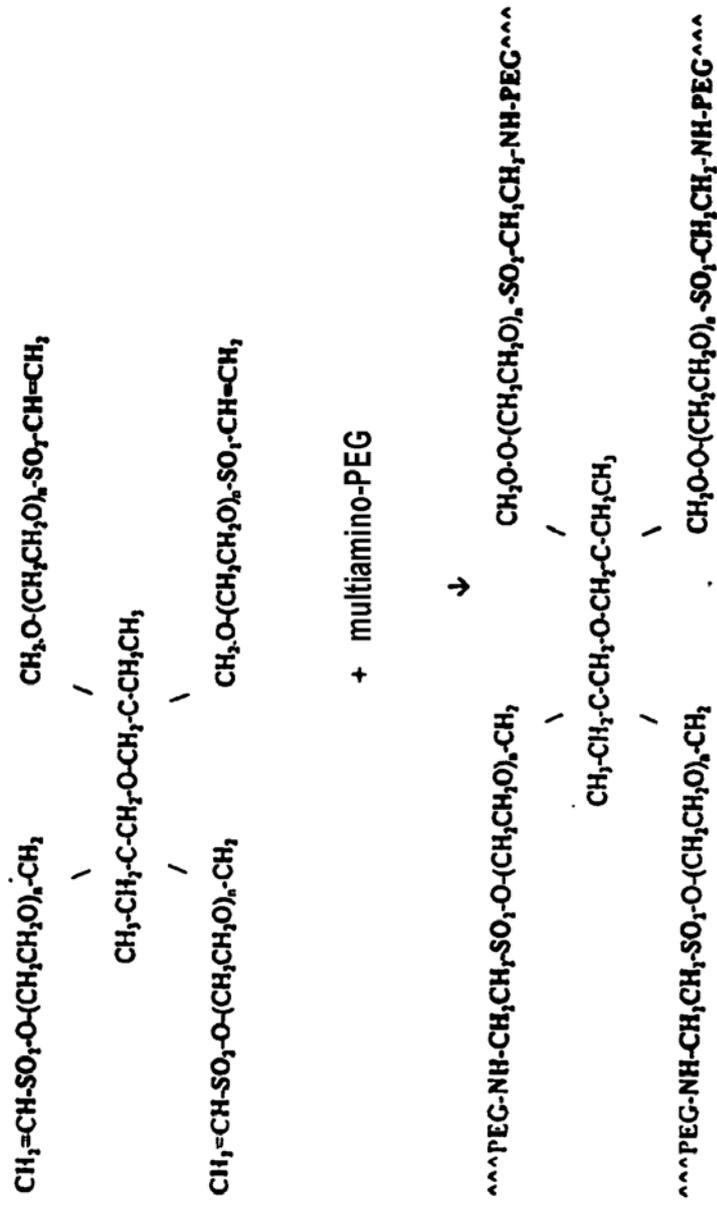


Fig. 13

Suberato de disuccinimidilo (DSS)

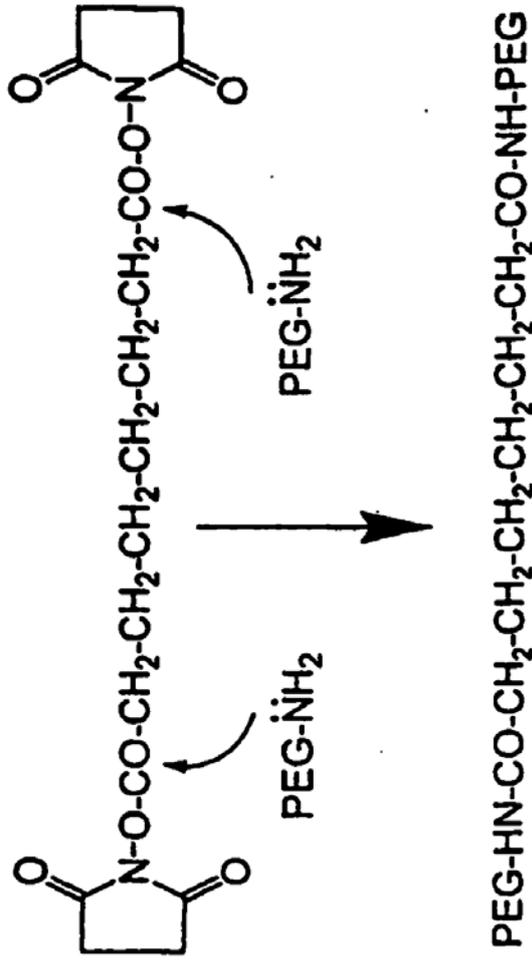


Fig. 14

Ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP)

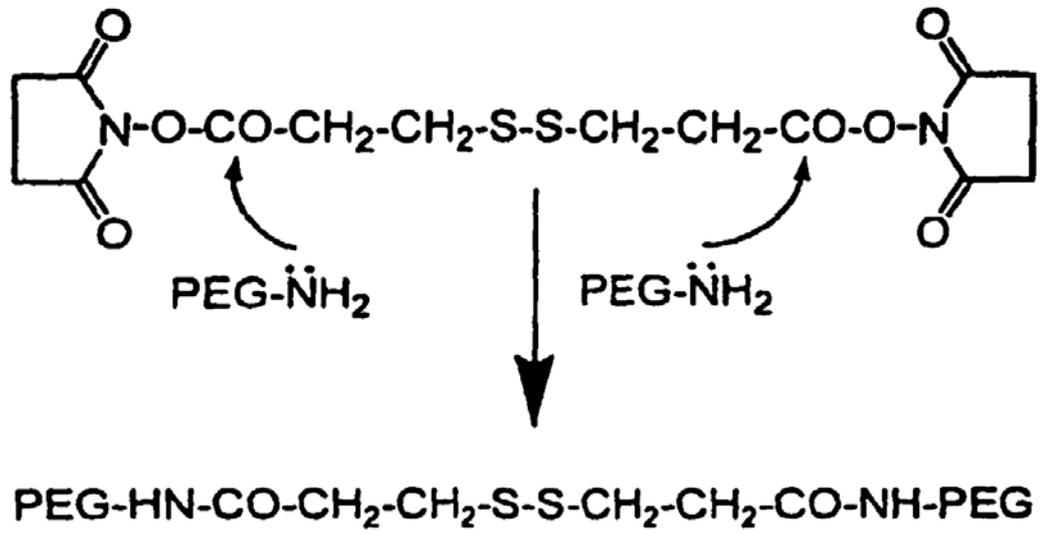


Fig. 15

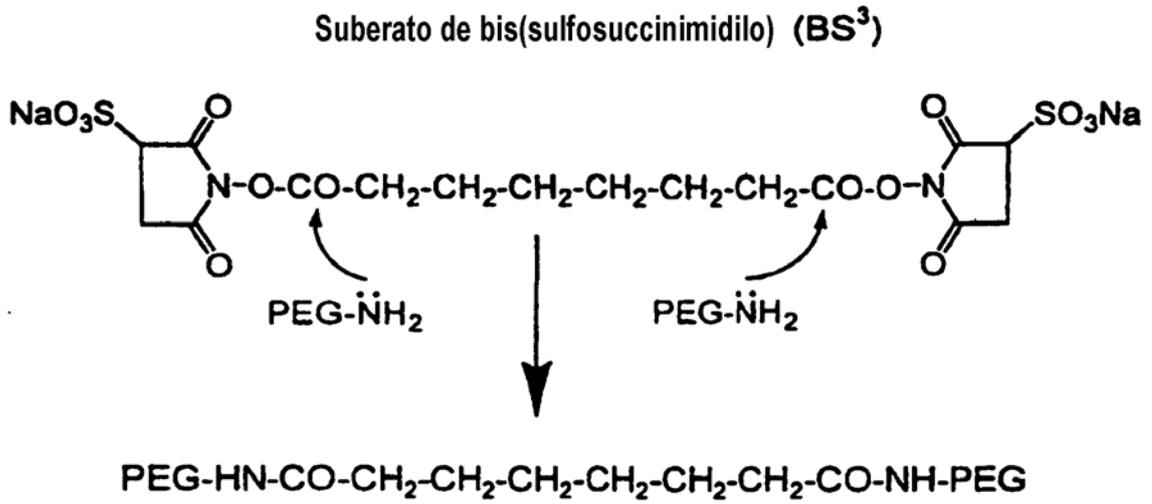


Fig. 16

Bis(2-succinimidooxycarboniloxi)etil sulfona (BSOCOES)

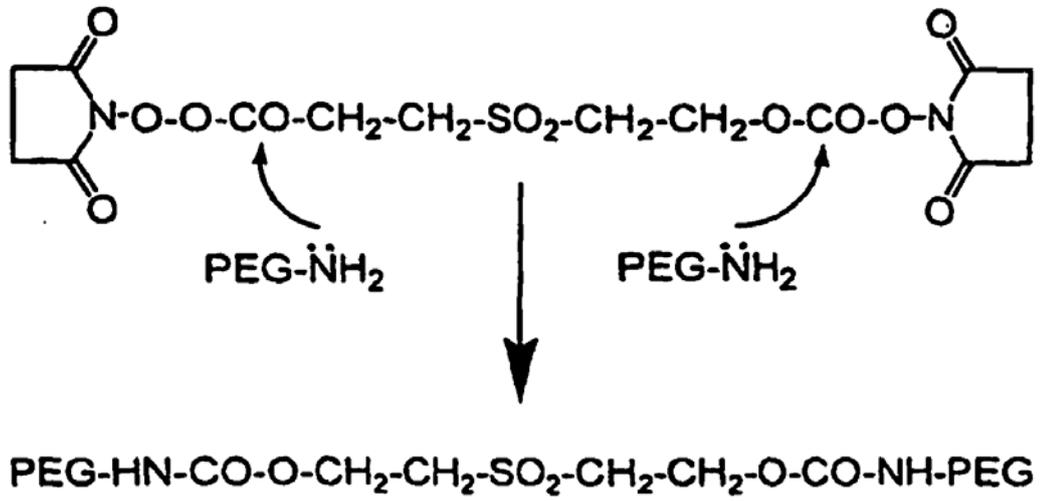


Fig. 17

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

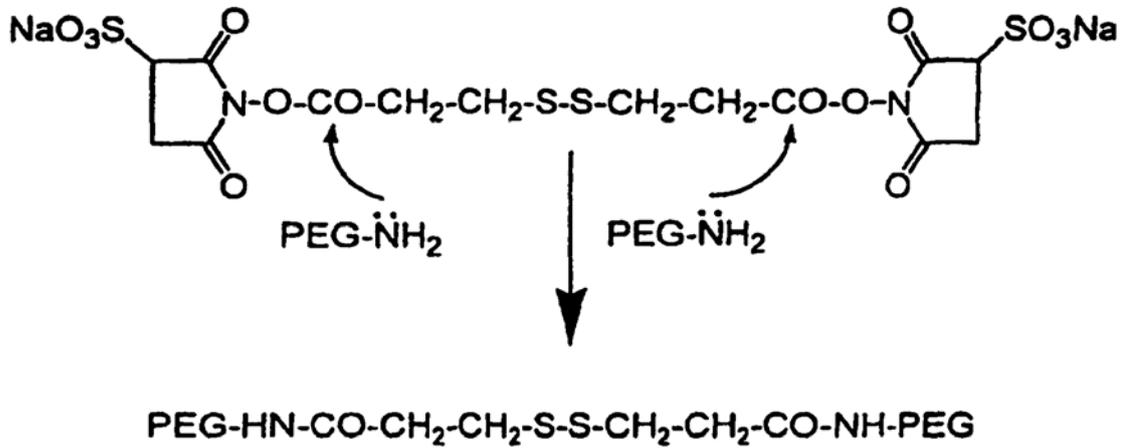


Fig. 18