

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 017**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2003 E 03799796 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1539799**

54 Título: **Compuestos reticulados, y métodos de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

21.06.2002 US 390504 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
615 ARAPEEN DRIVE, SUITE 310
SALT LAKE CITY, UTAH 84108, US**

72 Inventor/es:

**PRESTWICH, GLENN, D.;
SHU, XIAO, ZHENG;
LUO, YI;
KIRKER, KELLY, R. y
LIU, YANCHUN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 449 017 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

Compuestos reticulados, y métodos de preparación y uso de los mismos

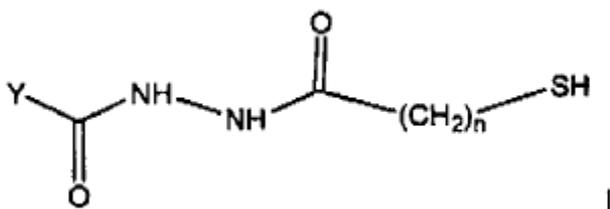
5 **Antecedentes**

El uso de macromoléculas en aplicaciones farmacéuticas ha recibido una atención considerable. A veces, es deseable acoplar dos o más macromoléculas para producir nuevos armazones de macromoléculas con múltiples actividades. Sin embargo, las tecnologías existentes usadas para acoplar dos o más macromoléculas presentan numerosas dificultades. Por ejemplo, las condiciones alcalinas o las altas temperaturas necesarias para crear hidrogeles con alta resistencia mecánica son pesadas y duras. Aunque el uso de agentes de reticulación para producir armazones macromoleculares ha tenido cierto éxito, los agentes de reticulación suelen ser moléculas citotóxicas relativamente pequeñas, y el armazón resultante se ha de extraer o lavar muy bien para eliminar las trazas de los reactivos sin reaccionar y subproductos (Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F. *Adv. Drug Del. Rev.* 2002, 54, 13-36), lo que impide su uso en muchas aplicaciones médicas. Se necesita un armazón macromolecular fisiológicamente compatible que se pueda producir de una manera directa antes de que sea útil como ayuda terapéutica. En el presente documento, se describen compuestos y métodos que son capaces de acoplar dos o más moléculas, tales como macromoléculas, en condiciones suaves.

20 **Resumen de las realizaciones**

En el presente documento, se describen compuestos reticulados. También se describen en el presente documento métodos de preparación y uso de los compuestos reticulados.

25 Vista desde un primer aspecto, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula I:



en la que:

30 Y-C(O) es un resto de una macromolécula, que es un polipéptido, una glucoproteína, un polisacárido, una proteína o un polímero sintético; y
 n = 2 0 3,
 en la que Y-C(O) es un resto de una macromolécula distinta de hialuronano.

35 Vista desde un segundo aspecto, la invención proporciona un método para acoplar dos o más compuestos, que comprende hacer reaccionar un grupo tiol de un primer compuesto, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, con un grupo reactivo con tiol de al menos un segundo compuesto que comprende el grupo funcional reactivo con tiol, formando así un compuesto acoplado en el que cuando el grupo funcional reactivo con tiol es un tiol, la reacción se produce en presencia de un oxidante.

40 Vista desde un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto acoplado que se puede obtener de acuerdo con el método del segundo aspecto de la invención.

45 Vista desde un cuarto aspecto, la invención proporciona el uso de una composición del tercer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para administrar un factor de crecimiento, un agente antiinflamatorio, un agente contra el cáncer, un analgésico, un agente antiinfeccioso, un agente contra la unión a células, células vivas o para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto.

50 Vista desde un quinto aspecto, la invención proporciona el uso de la composición del tercer aspecto de la invención, que comprende un fármaco terapéutico o células vivas, para la fabricación de un medicamento para administrar células vivas, migración celular, mejorar el crecimiento celular o la regeneración de tejido en un sujeto.

55 Vista desde un sexto aspecto, la invención proporciona una composición del tercer aspecto de la invención para su uso en un método para administrar un factor de crecimiento, un agente antiinflamatorio, un agente contra el cáncer, un analgésico, un agente antiinfeccioso, un agente contra la unión a células, células vivas o para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto.

Vista desde un séptimo aspecto, la invención proporciona una composición del tercer aspecto de la invención, que comprende un fármaco terapéutico o células vivas, para su uso en un método para administrar células vivas, migración celular, mejorar el crecimiento celular o la regeneración de tejido en un sujeto.

- 5 Las ventajas de la invención, en parte, se expondrán en la descripción que se presenta a continuación y, en parte, se harán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de las realizaciones descritas más adelante. Las ventajas descritas más adelante se realizarán y conseguirán por medio de los elementos y las combinaciones señaladas en particular en las reivindicaciones anexas.

10 Breve descripción de las figuras

Las Figuras incluidas que se incorporan en y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran varios aspectos descritos a continuación.

- 15 La Figura 1 muestra el esquema de reacción para la producción de derivados tiolados de HA.
La Figura 2 muestra (a) la absorción a 242 nm en función del pH para la solución de HA-DTPH y HA-DTBH; y (b) la representación logarítmica del $\log [(A_{\max}-A_i)/A_i]$ frente al pH. Los valores de pK_a corresponden a la intersección con el eje de abscisas.
- 20 La Figura 3 muestra el hinchamiento de películas de HA-DTPH y HA-DTBH en PBS a pH 7,4. Los círculos y triángulos abiertos son las películas acopladas mediante oxidación con H_2O_2 al 0,3 % tras la oxidación del aire, y los círculos y triángulos cerrados son películas acopladas únicamente por la oxidación del aire.
La Figura 4 muestra el contenido de disulfuro en las películas de HA-DTPH y HA-DTBH. Clave: **a** = solo oxidación del aire; **b** = oxidación del aire seguida de la oxidación con H_2O_2 .
- 25 La Figura 5 muestra la liberación de azul de dextrano a partir de HA-DTPH en PBS que contiene diferentes concentraciones de DTT a pH 7,4.
La Figura 6 muestra la proliferación de fibroblastos en hidrogel de HA-DTPH tras un cultivo *in vitro* de 0, 1, 2 y 3 días.
La Figura 7 muestra la síntesis de HA tiolado y gelatina.
- 30 La Figura 8 muestra el efecto de la concentración de sal en la formación de complejos de polielectrolitos en soluciones mixtas de HA-gelatina. Se disolvieron HA-DTPH y gelatina-DTPH, ambos al 3,0 % (p/v), en PBS 0,02 M, se ajustó el pH a 7,4 (3,0 % p/v) y, a continuación, se mezclaron las soluciones en diferentes proporciones. Se determinó la absorción a los 15 min (círculos abiertos, sin sal añadida) y 2 h (diamantes abiertos, NaCl al 1,0 %) tras la preparación de la solución en una celda espectrofotométrica de 0,5 cm.
- 35 La Figura 9 muestra la determinación de la densidad de disulfuro en películas de gelatina de HA-DTPH-hidrogel de DTPH. Las películas de hidrogel se prepararon con polímero al 3,0 % (p/v) en PBS 0,02 M (pH 7,4) con NaCl al 1,0 % (p/v), y luego se hidrolizaron exhaustivamente en ácido ($n = 3$). Se usaron reactivos de NTSB y DTNB como se ha descrito para obtener los contenidos totales de azufre y tiol. Se calculó la densidad teórica de disulfuro (círculos abiertos) a partir de la densidad de tiol (0,77 mmol/g de HA-DTPH, 0,51 mmol/g de gelatina-DTPH).
- 40 La Figura 10 muestra la relación de hinchamiento de equilibrio de las películas de HA-gelatina. La relación se midió en PBS a 37 °C, 300 rpm ($n = 3$). Las películas de hidrogel se prepararon con polímero al 3,0 % (p/v) en PBS 0,02 M (pH 7,4) con NaCl al 1,0 % (p/v).
- 45 La Figura 11 muestra la degradación enzimática de las películas mixtas de HA-gelatina. La pérdida de peso de las películas de hidrogel de HA-gelatina en soluciones enzimáticas de 300 U/ml (HAsa, triángulos abiertos; colagenasa, cuadrados abiertos; círculos abiertos, HAsa más colagenasa) a 37 °C, 150 rpm ($n = 3$). **Panel A:** HA-gelatina, 20:80. **Panel B:** HA-gelatina, 40:60. Las películas de hidrogel se prepararon con polímero al 3,0 % (p/v) en PBS 0,02 M (pH 7,4) con NaCl al 1,0 % (p/v).
- 50 La Figura 12 muestra la unión de las células y la difusión de los fibroblastos de películas de HA-gelatina. Imágenes microscópicas fluorescentes de fibroblasto 3T3 de Balb/c adherente y difundido en la superficie de películas de hidrogel de HA-gelatina tras 24 h de cultivo *in vitro*. Las células se sembraron inicialmente a 25.000 células/cm² y se tiñeron con F-DA. **Panel a:** película de HA al 100 %; **Panel b:** HA-gelatina, 80:20; **Panel c:** HA-gelatina, película de 40:60; y **Panel d:** película de gelatina-DTPH al 100 %. Ampliación original: paneles **a, b, c** y **d** x 100.
- 55 La Figura 13 muestra la proliferación de fibroblasto 3T3 de Balb/c sobre la superficie de película de hidrogel de HA-gelatina. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² y se determinó el número de células mediante el ensayo de MTT tras un día y tres días de cultivo *in vitro* ($n = 5$). Como control, se usó poliestireno (PS) de cultivo de tejidos, y la densidad relativa de células en el poliestireno de cultivo de tejidos tras un día de cultivo *in vitro* se define como 1,0. El recuadro muestra la relación de proliferación (RP) en función del porcentaje de gelatina (% G) del hidrogel.
- 60 La Figura 14 muestra las estructuras de ésteres y amidas α,β -insaturados de poli(etilenglicol) reticulados con HA tiolado y gelatina tiolada.
La Figura 15 muestra la adición de conjugado entre PEGDA, PEGDM, PEGDAA, PEGDMA y cisteína.
La Figura 16 muestra la adición de conjugado de HA-DTPH, HA-DTBH y PEG-acrilato.
La Figura 17 muestra la digestión de HA-DTPH-PEGDA con HAsa.
- 65 La Figura 18 muestra la viabilidad de los fibroblastos T31 tras 28 días de cultivo *in vitro* en hidrogel de HA-DTPH-PEGDA, microscopio confocal, ampliación x = 200.

La Figura 19 muestra la proliferación de fibroblastos T31 en gel de HA-DTPH-PEGDA.

La Figura 20 muestra la vista global de los explantes de HA-DTPH-PEGDA sembrados con fibroblastos T31 tras la implantación subcutánea *in vivo* en ratones atímicos.

5 La Figura 21 muestra el examen histológico de los explantes tras la incubación en ratones atímicos durante 2 semanas (**panel A**), 4 semanas (**panel B**), y 8 semanas (**panel C**), inmunohistoquímica (fibronectina). Ampliación original x 200.

La Figura 22 muestra la síntesis de HA-DTPH-MMC.

La Figura 23 muestra la síntesis de HA-DTPH-PEGDA-MMC.

10 Las Figuras 24a y 24b muestran los resultados de la liberación de MMC *in vitro*.

Descripción detallada

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que la siguen, se hará referencia a una serie de términos y expresiones que se definirán con los siguientes significados.

15 Cabe señalar que, como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos, y similares.

20 "Opcional" u "opcionalmente" significa que puede el hecho o la circunstancia descritos a continuación pueden producirse o no, y que la descripción incluye casos en los que el hecho o la circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, la expresión "alquilo inferior opcionalmente sustituido" significa que el grupo alquilo inferior puede o no puede estar sustituido y que la descripción incluye tanto alquilo inferior no sustituido como alquilo inferior en el que hay sustitución.

30 Los intervalos se pueden expresar en el presente documento como de "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, anteponiendo el término "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Además, se entenderá que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como de manera independiente del otro punto final.

35 Las referencias realizadas la memoria descriptiva y en las reivindicaciones finales a partes en peso, de un determinado elemento o componente de una composición o un artículo, denotan la relación en peso entre el elemento o componente y cualquier otro elemento o componente de la composición o del artículo para el que se expresa una parte en peso. Por lo tanto, en un compuesto que contiene 2 partes en peso de componente X y 5 partes en peso de componente Y, X e Y están presentes en una relación en peso de 2:5, y están presentes en dicha relación de manera independiente de si hay componentes adicionales contenidos en el compuesto.

40 Un porcentaje en peso de un componente, a menos que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que el componente está incluido.

45 Un resto de una especie química, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones finales, se refiere al resto que es el producto resultante de las especies químicas en un determinado esquema de reacción, o formulación o producto químico posterior, de manera independiente de si el resto se ha obtenido realmente de las especies químicas. Por ejemplo, un polisacárido que contiene al menos un grupo -COOH se puede representar mediante la fórmula Y-COOH, donde Y es el resto (es decir, el resto) de la molécula de polisacárido.

50 Las variables tales como R³-R⁵, R⁷, R⁸, E, L, J, G, M, Q, U, V, X, Y y Z usadas a lo largo de la solicitud son las mismas variables como se han definido anteriormente a menos que se indique lo contrario.

55 La expresión "grupo alquilo", como se usa en el presente documento, es un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Un grupo "alquilo inferior" es un grupo alquilo que contiene de uno a seis átomos de carbono.

60 La expresión "grupo polialquileno", como se usa en el presente documento, es un grupo que tiene dos o más grupos CH₂ vinculados entre sí. El grupo polialquileno se puede representar por la fórmula -(CH₂)_n-, donde n es un número entero de 2 a 25.

65 La expresión "grupo poliéter", como se usa en el presente documento, es un grupo que tiene la fórmula -[(CHR)_nO]_m, donde R es hidrógeno o un grupo alquilo inferior, n es un número entero de 1 a 20 y m es un número entero de 1 a 100. Los ejemplos de grupos de poliéter incluyen óxido de polietileno, óxido de polipropileno y óxido de polibutileno.

La expresión "grupo polioéter", como se usa en el presente documento, es un grupo que tiene la fórmula $-(CHR)_nS)_m-$, donde R es hidrógeno o un grupo alquilo inferior, n es un número entero de 1 a 20 y m es un número entero de 1 a 100.

- 5 La expresión "grupo poliimino", como se usa en el presente documento, es un grupo que tiene la fórmula $-(CHR)_nNR)_m-$, donde cada R es, de manera independiente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior, n es un número entero de 1 a 20 y m es un número entero de 1 a 100.

- 10 La expresión "grupo poliéster", como se usa en el presente documento, es un grupo producido por la reacción entre un compuesto que tiene al menos dos grupos de ácido carboxílico con un compuesto que tiene al menos dos grupos hidroxilo.

- 15 La expresión "grupo poliamida", como se usa en el presente documento, es un grupo producido por la reacción entre un compuesto que tiene al menos dos grupos de ácido carboxílico con un compuesto que tiene al menos dos grupos amino no sustituidos o monosustituidos.

- 20 La expresión "grupo arilo", como se usa en el presente documento, es cualquier grupo aromático basado en carbono incluyendo, pero sin limitación, benceno, naftaleno, etc. El término "aromático" también incluye "grupo heteroarilo", que se define como un grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Los ejemplos de heteroátomos incluyen, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, alquilo, alquinilo, alquenilo, arilo, haluro, nitro, amino, éster, cetona, aldehído, hidroxilo, ácido carboxílico o alcoxi.

25 **I. Reticulación mediante acoplamiento oxidativo**

- La Figura 1 representa un método para la producción de un compuesto tiolado derivado de hialuronano (no de la invención). La primera etapa implica la reacción de una macromolécula que tiene la fórmula Y-COOH con el compuesto de dihidrazida/disulfuro que tiene la fórmula A. La reacción se realiza en presencia de un agente de condensación. Un agente de condensación es cualquier compuesto que facilita la reacción entre el grupo dihidrazida del compuesto A y el grupo COOH de la macromolécula. En una realización, el agente de condensación es una carbodiimida, incluyendo, pero sin limitación, 1-etil-3-[3-(dimetilamin)propil]-carbodiimida (EDCI). Como se representa en la Figura 1, tras la primera etapa, se produce una mezcla de productos (B y C). El enlace disulfuro de los compuestos B y C se escinde con un agente reductor. En una realización, el agente reductor es ditiotretitol. La escisión de los enlaces disulfuro de los compuestos B y C produce el compuesto tiolado derivado de hialuronano.

- 40 La macromolécula de la que Y-C(O) es un resto en los compuestos del primer aspecto de la invención es cualquier compuesto, distinto de hialuronano, que tenga al menos un grupo que pueda reaccionar con un compuesto de hidrazida. En una realización, la macromolécula tiene al menos un grupo -COOH, o la sal o el éster del mismo. En otra realización, la macromolécula es un oligonucleótido, un ácido nucleico o un análogo del mismo metabólicamente estabilizado, un polipéptido, un lípido, una glucoproteína o un glicolípido. En otra realización, la macromolécula, que es diferente de hialuronano, es un polisacárido, una proteína o un polímero sintético.

- 45 En una realización, la macromolécula puede ser un compuesto farmacéuticamente aceptable. En una realización, los compuestos farmacéuticamente aceptables pueden incluir sustancias capaces de prevenir una infección sistémicamente en el sistema biológico o localmente en el sitio del defecto, como por ejemplo, péptidos incluyendo, pero sin limitación, acetato de leuprolida (un agonista de LH-RH), nafarelina y similares. Todos los compuestos están disponibles en Sigma Chemical Co. (Milwaukee, WI).

- 50 En otra realización, el compuesto farmacéuticamente aceptable puede ser una sustancia o un precursor metabólico que sea capaz de potenciar el crecimiento y la supervivencia de células y tejidos o aumentar el funcionamiento de las células para la que es útil, como por ejemplo, una sustancia que potencia el crecimiento nervioso tal como un gangliósido, un factor de crecimiento nervioso y similares; un agente promotor del crecimiento del tejido duro o blando, tal como fibronectina (FN), hormona de crecimiento humana (HGH), un factor estimulante de colonias, proteína morfogénica ósea, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), interleucina 1 (IL-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), material óseo seco y similares; agentes antineoplásicos tales como anticuerpos específicos de tumores conjugados con toxinas, factor de necrosis tumoral y similares.

- 65 En otra realización, el compuesto farmacéuticamente aceptable puede incluir hormonas tales como la progesterona, la testosterona y la hormona estimulante de folículos (FSH) (control de la natalidad, mejora de la fertilidad), la insulina y similares; agentes cardiovasculares tales como la estreptocinasa y similares; y otras sustancias similares. Todos los compuestos están disponibles en Sigma Chemical Co. (Milwaukee, WI). Los polisacáridos útiles en los métodos descritos en el presente documento tienen al menos un grupo, tal como un

grupo de ácido carboxílico, o la sal o el éster del mismo, que puede reaccionar con una dihidrazida. En una realización, el polisacárido es un glucosaminoglucano (GAG). Un GAG es una molécula con muchas subunidades alternantes. Por ejemplo, HA es (GlcNAc-GlcUA)-*x*. Otros GAG están sulfatados en diferentes azúcares. Genéricamente, los GAG se representan por la fórmula A-B-A-B-A-B, donde A es un ácido urónico y B es un aminoazúcar que bien está sulfatada bien en O o en N, donde las unidades A y B pueden ser heterogéneas con respecto al contenido epimérico o la sulfatación. Se puede usar cualquier polímero natural o sintético, diferente de hialuronano, que contenga ácido urónico. En una realización, Y-C(O) de la fórmula I es un resto de un GAG sulfatado.

Hay muchos tipos diferentes de GAG, con las estructuras comúnmente entendidas, que, por ejemplo, se encuentran dentro de las composiciones divulgadas, tales como sulfato de condroitina, dermatano, heparano, heparina, sulfato de dermatano y sulfato de heparano. Se puede usar cualquier GAG conocido en la técnica en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Los glucosaminoglucanos se pueden adquirir en Sigma, y muchos otros proveedores bioquímicos. El ácido algínico, la pectina y la carboximetilcelulosa son, entre otros, polisacáridos que contienen ácido carboxílico útiles en los métodos descritos en el presente documento.

En los compuestos del primer aspecto de la invención, Y-C(O) es un resto de un polisacárido distinto de hialuronano (HA). El HA es un GAG no sulfatado. El hialuronano es un polisacárido hidrosoluble de origen natural muy conocido compuesto de dos azúcares ligados alternativamente, ácido D-glucurónico y *N*-acetilglucosamina. El polímero es hidrofílico y altamente viscoso en solución acuosa a concentraciones relativamente bajas de soluto. A menudo, se produce de forma natural en forma de sal de sodio, hialuronato de sodio. Los métodos de preparación del hialuronano y las sales del mismo disponibles comercialmente son muy conocidos. El hialuronano se puede adquirir en Seikagaku Company, Clear Solutions Biotech, Inc., Pharmacia Inc., Sigma Inc., y otros muchos proveedores. Para el hialuronano de alto peso molecular, a menudo, está en el intervalo de 100 a 10.000 unidades de disacárido. El límite inferior del peso molecular del hialuronano es de 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000 o 100.000, y el límite superior es de 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 600000, 700000, 800000, 900000 o 1.000.000, en donde cualquiera de los límites inferiores se puede combinar con cualquiera de los límites superiores.

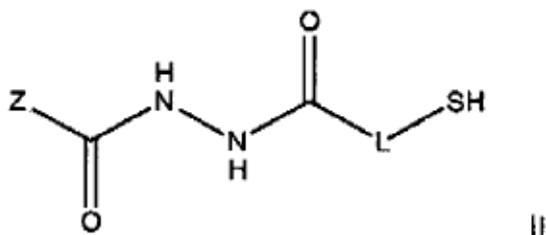
Y-C(O) de la fórmula I también puede ser un resto de un polímero sintético. El polímero sintético tiene al menos un grupo de ácido carboxílico, o la sal o el éster del mismo, que es capaz de reaccionar con una hidrazida. En una realización, el resto de polímero sintético de la fórmula I comprende ácido glucurónico, ácido poliacrílico, ácido poliaspártico, ácido politartárico, ácido poliglutámico o ácido polifumárico.

En otra realización, Y-C(O) de la fórmula I es un resto de una proteína. Las proteínas útiles en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, una proteína de la matriz extracelular, una proteína de la matriz extracelular modificada químicamente o un derivado parcialmente hidrolizado de una proteína de la matriz extracelular. Las proteínas pueden ser polipéptidos recombinantes o de origen natural que poseen un dominio interactivo celular. La proteína también puede ser una mezcla de proteínas, en la que una o más de las proteínas están modificadas. Los ejemplos específicos de las proteínas incluyen, pero sin limitación, colágeno, elastina, decorina, laminina o fibronectina.

En una realización, Y-C(O) es un resto de un polisacárido o una proteína.

El segundo compuesto tiolado de acuerdo con el segundo aspecto de la invención puede ser igual o diferente al primer compuesto tiolado. En una realización, la macromolécula de la que Z-C(O) es un resto en el segundo compuesto tiolado puede ser cualquier macromolécula descrita anteriormente. En una realización, la macromolécula de la que Z-C(O) es un resto en el segundo compuesto tiolado es un polisacárido que tiene al menos un grupo SH. Se pueden usar cualquiera de los polisacáridos descritos anteriormente como la macromolécula de la que Z-C(O) es un resto en el segundo compuesto tiolado. En otra realización, el segundo compuesto tiolado comprende un glucosaminoglucano sulfatado. En una realización adicional, el segundo compuesto tiolado incluye sulfato de condroitina, dermatano, heparano, heparina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, ácido algínico, pectina, carboximetilcelulosa o hialuronano que tiene al menos un grupo SH.

En otra realización, el segundo compuesto tiolado tiene la fórmula II:



en la que

- 5 Z-C(O) es un resto de una macromolécula; y
L es un grupo polialquileo, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliimino, un grupo arilo, un poliéster o un grupo polioéter.

10 El resto Z-C(O) macromolecular puede ser cualquiera de las macromoléculas descritas anteriormente. En una realización, la macromolécula de la que Z-C(O) es un resto en el segundo compuesto tiolado puede ser una proteína que tenga al menos un grupo tiol. En una realización, la proteína comprende una proteína de la matriz extracelular o una proteína de la matriz extracelular modificada químicamente. En otra realización, la proteína comprende colágeno, elastina, decorina, laminina o fibronectina.

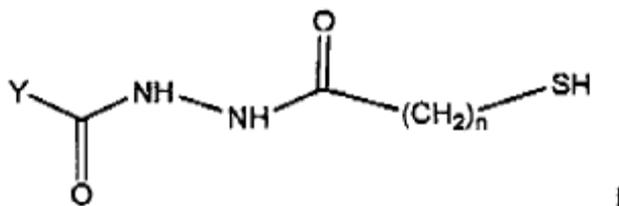
15 En otra realización, L de la fórmula II es un grupo polialquileo. En otra realización, L de la fórmula II es un grupo polialquileo C₁ a C₂₀. En otra realización, L de la fórmula II es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂. En una realización, Z-C(O) es un resto de hialuronano y L de la fórmula II es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂. En una realización adicional, Z-C(O) es un resto de gelatina y L de la fórmula II es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂.

20 En otra realización del método del segundo aspecto, se describe en el presente documento un método para la fabricación de un compuesto reticulado que implica hacer reaccionar:

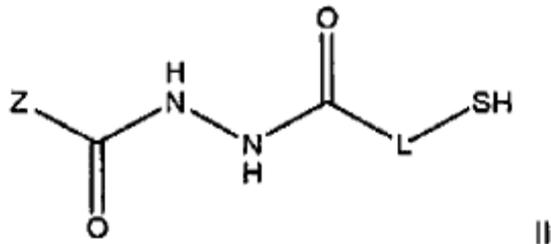
- 25 (a) un primer compuesto tiolado que comprende una proteína que tiene al menos un grupo SH; y
(b) un segundo compuesto tiolado que comprende un resto de polisacárido o polímero sintético que tiene al menos un grupo SH,

en presencia de un oxidante.

En dicha realización, el primer compuesto tiolado tiene la fórmula I:



30 y el segundo compuesto tiolado tiene la fórmula II:



en la que

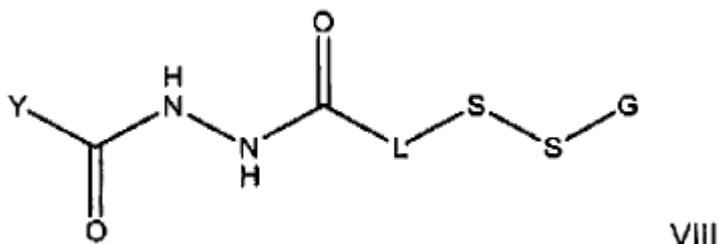
- 35 Y es un resto de proteína;
Z-C(O) es un resto de polisacárido o un resto de un polímero sintético; y cada
L es un grupo polialquileo, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliéster, un grupo poliimino, un grupo arilo o un grupo polioéter.

En una realización, L de la fórmula II es CH_2CH_2 o $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$. En otra realización, Z es un resto de hialuronano.

La reacción entre el primer y el segundo compuestos tiolados se lleva a cabo en presencia de un oxidante. En una realización, la reacción entre el primer y el segundo compuestos tiolados puede llevarse a cabo en presencia de cualquier gas que contenga oxígeno. En una realización, el oxidante es aire. Dicha realización también contempla la adición de un segundo oxidante para acelerar la reacción. En otra realización, la reacción se puede realizar bajo una atmósfera inerte (es decir, libre de oxígeno) y añadirse un oxidante a la reacción. Los ejemplos de oxidantes útiles en este método incluyen, pero sin limitación, yodo molecular, peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos de alquilo, ácidos peroxi, dialquilsulfóxidos, metales de alta valencia tales como Co^{+3} y Ce^{+4} , óxidos de metales de manganeso, plomo y cromo, y agentes de transferencia de halógeno. Los oxidantes divulgados en Capozzi, G.; Modena, G., en "The Chemistry of the Thiol Group Part II"; Patai, S., Ed.; Wiley: Nueva York, 1974; pág. 785-839, son útiles en los métodos descritos en el presente documento.

La reacción entre el primer y el segundo compuestos tiolado se puede llevar a cabo en una solución tampón que sea ligeramente básica. La cantidad del primer compuesto tiolado con respecto a la cantidad del segundo compuesto tiolado puede variar. En una realización, la proporción en volumen del primer compuesto tiolado con respecto al segundo compuesto tiolado es de 99:1, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 o 1:99. En una realización, el primer y el segundo compuestos tiolados reaccionan en el aire y se dejan secar a temperatura ambiente. En dicha realización, el material seco se puede exponer a un segundo oxidante tal como peróxido de hidrógeno. Luego se puede lavar el compuesto resultante con agua para eliminar cualquier primer y/o segundo compuesto tiolado sin reaccionar y cualquier oxidante no usado. Una de las ventajas de preparar el compuesto acoplado a través de la metodología de acoplamiento oxidativo descrito en el presente documento es que la reticulación puede ocurrir en un medio acuoso en condiciones fisiológicamente benignas y sin la necesidad de reactivos de reticulación adicionales.

Los compuestos producidos usando los métodos descritos anteriormente tienen al menos un fragmento que comprende la fórmula VIII:



en la que

Y-C(O) es un resto de una macromolécula que es un polipéptido, una glucoproteína, un polisacárido, una proteína o un polímero sintético, en la que Y-C(O) no es un resto de hialuronano; L es CH_2CH_2 o $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$; y G-S es un resto de un compuesto tiolado.

En una realización, Y de la fórmula VIII es un resto de cualquiera de los glucosaminoglucanos descritos anteriormente, incluyendo, pero sin limitación, sulfato de condroitina, dermatano, heparano, heparina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, ácido algínico, pectina, carboximetilcelulosa o hialuronano.

El término "fragmento", como se usa en el presente documento, se refiere a la propia molécula entera o a una parte o un segmento de una molécula mayor. Por ejemplo, Y de la fórmula VIII puede ser un polisacárido de alto peso molecular que se reticula por un enlace disulfuro con otro polisacárido, polímero sintético o polímero tiolado para producir el compuesto acoplado. Como alternativa, el compuesto acoplado puede tener múltiples enlaces disulfuro. El compuesto tiene, como mínimo, una unidad representada en la fórmula VIII, que representa al menos un enlace disulfuro como resultado de al menos un primer compuesto tiolado que reacciona con al menos un segundo compuesto tiolado a través de la oxidación.

La macromolécula (Y) y el compuesto tiolado (G) pueden ser cualquiera de las macromoléculas descritas anteriormente. En una realización, Y de la fórmula VIII es un polisacárido, una proteína o un polímero sintético.

II. Compuestos de acoplamiento a través de la reacción entre un compuesto de tiol y un compuesto reactivo con tiol

En otra realización del segundo aspecto de la invención, se describe en el presente documento un método para acoplar dos o más compuestos mediante la reacción de una primera macromolécula tiolada que tiene al menos un grupo SH, y de acuerdo con el primer aspecto de la invención, con al menos un compuesto que tiene un grupo

funcional electrófilo reactivo con tiol. En una realización, el compuesto tiene al menos dos grupos funcionales reactivos con tiol.

5 En dicha realización, se puede usar cualquiera de las macromoléculas descritas anteriormente. Se pueden usar dos o más macromoléculas diferentes en este método. Por ejemplo, se puede usar una segunda macromolécula tiolada en combinación con la primera macromolécula tiolada. En dicha realización, la primera y segunda macromolécula tiolada pueden ser compuestos iguales o diferentes.

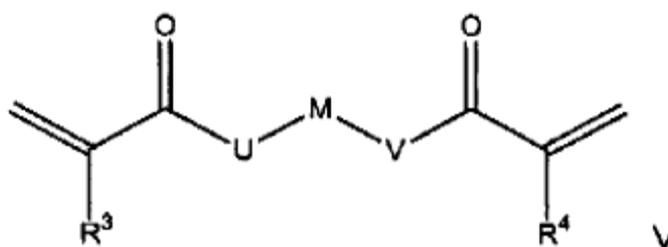
10 En una realización, la macromolécula es un polisacárido. En dicha realización, el polisacárido es un glucosaminoglucano sulfatado, incluyendo, pero sin limitación, sulfato de condroitina, dermatano, heparano, heparina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, ácido algínico, pectina o carboximetilcelulosa. En otra realización, el polisacárido es hialuronano.

15 En otra realización, la macromolécula es un compuesto que tiene la fórmula I, en la que Y-C(O) es un resto de una proteína. En dicha realización, se puede usar cualquiera de las proteínas descritas anteriormente. En una realización, la proteína es colágeno, elastina, decorina, laminina o fibronectina.

20 En dicha realización del método, se usa un compuesto que tiene al menos un grupo electrófilo reactivo con tiol. La expresión "grupo electrófilo reactivo con tiol", como se usa en el presente documento, es cualquier grupo que es susceptible al ataque nucleófilo por los electrones del par iónico en el átomo de azufre del grupo tiol o por el anión tiolato. Los ejemplos de grupos electrófilos reactivos con tiol incluyen grupos que tienen buenos grupos salientes. Por ejemplo, un grupo alquilo que tiene un haluro o un grupo alcoxi unido a él o un grupo α -halocarbonilo son ejemplos de grupos electrófilos reactivos con tiol. En otra realización, el grupo electrófilo reactivo con tiol es un grupo vinilo deficiente en electrones. La expresión "un grupo vinilo deficiente en electrones", como se usa en el presente documento, es un grupo que tiene un doble enlace carbono-carbono y un grupo aceptor de electrones unido a uno de los átomos de carbono. En la fórmula $C_{\beta} = C_{\alpha}X$, se representa un grupo vinilo deficiente en electrones, donde X es el grupo aceptor de electrones. Cuando el grupo aceptor de electrones se une a C_{α} , el otro átomo de carbono del grupo vinilo (C_{β}) es más susceptible al ataque nucleófilo por el grupo tiol. Este tipo de adición a un doble enlace carbono-carbono activado se denomina adición de Michael. Los ejemplos de grupos aceptores de electrones incluyen, pero sin limitación, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo éster, un grupo aldehído, un grupo ceto, un grupo sulfona o un grupo amida. Los ejemplos de compuestos que poseen grupos electrófilos reactivos con tiol incluyen, pero sin limitación, maleimidias, vinilsulfonas, acrilonitrilos, α -metilenésteres, metiluros de quinona, ésteres de acrilóilo o amidas, o un α -halo-ésteres o amidas.

35 En una realización, el compuesto reactivo con tiol tiene dos grupos vinilo deficientes en electrones, en el que los dos grupos vinilo deficientes en electrones son iguales. En otra realización, el compuesto reactivo con tiol es un diacrilato, un dimetacrilato, una diacrilamida, una dimetacrilamida o una combinación de los mismos.

En otra realización, el compuesto reactivo con tiol tiene la fórmula V:



40 en la que

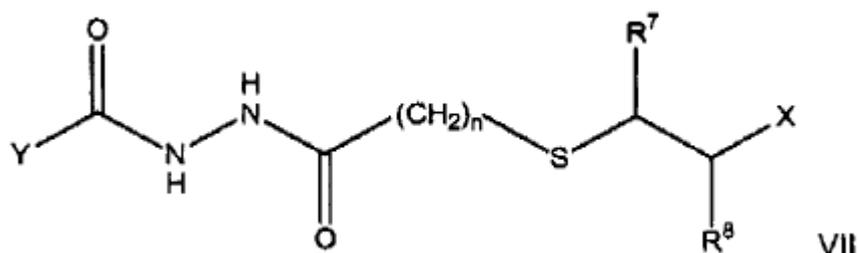
R^3 y R^4 son, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior;
 U y V son, de manera independiente, O o NR^5 , en el que R^5 es, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior; y
 M es un grupo polialquileno, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliimino, un poliéster, un grupo arilo o un polioéter.

50 En una realización, R^3 y R^4 son hidrógeno, U y V son oxígeno, y M es un grupo poliéter. En otra realización, R^3 y R^4 son hidrógeno, U y V son NH, y M es un grupo poliéter. En una realización adicional, R^3 y R^4 son metilo, U y V son oxígeno, y M es un grupo poliéter. En otra realización, R^3 y R^4 son metilo, U y V son NH, y M es un grupo poliéter.

55 En otra realización, el compuesto reactivo con tiol es cualquiera de los compuestos farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente que contienen al menos un grupo electrófilo reactivo con tiol. La Figura 22 representa una realización de este aspecto. La mitomicina C (MMC) se convierte en el correspondiente acrilato (acrilato de MMC). A

continuación, se acopla el acrilato de MMC con el compuesto de tiol y hialuronano modificado con hidrazida HA-DTPH para producir HA-DTPH-MMC. HA-DTPH-MMC contiene uno o más grupos tiol libres, que luego se pueden acoplar con PEGDA para producir HA-DTPH-PEGDA-MMC, que se representa en la Figura 23.

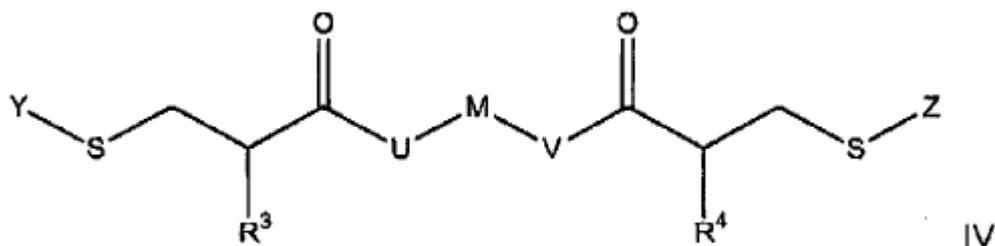
- 5 En otra realización, la primera macromolécula tiolada tiene la fórmula I descrita anteriormente, en la que Y-C(O) es un resto de polisacárido, y el compuesto reactivo con tiol tiene la fórmula V descrita anteriormente, en el que R³ y R⁴ son, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior; U y V son, de manera independiente, O o NR⁵, en el que R⁵ es, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior; y M es un grupo poliéter.
- 10 Los compuestos producidos mediante el acoplamiento de un compuesto tiolado de Fórmula I con un compuesto que tiene al menos un grupo funcional electrófilo reactivo con tiol poseen al menos un fragmento de fórmula VII:



en la que

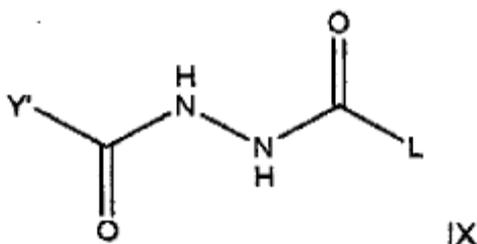
- 15 n es 2 o 3;
R⁷ y R⁸ son, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior;
X es un grupo aceptor de electrones; e
Y-C(O) es un resto de una macromolécula que es un polipéptido, una glucoproteína, un polisacárido, una proteína o un polímero sintético distinto de hialuronano.
- 20 En la presente realización, X e Y de la fórmula VII pueden ser cualquiera de los grupos y macromoléculas donantes de electrones, respectivamente, anteriormente descritos. En una realización, Y-C(O) es un resto de un polisacárido distinto de hialuronano o un glucosaminoglucano sulfatado. En otra realización, R⁷ es hidrógeno y R⁸ es hidrógeno o metilo. En otra realización, Y-C(O) es un resto de un glucosaminoglucano sulfatado; R⁷ es hidrógeno; R⁸ es hidrógeno o metilo; y X es un grupo éster o un grupo amida.
- 25

En una realización, el fragmento tiene la fórmula IV:



en la que

- 30 R³ y R⁴ son, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior;
U y V son, de manera independiente, O o NR⁶, en el que R⁵ es, de manera independiente, hidrógeno o alquilo inferior;
Y tiene la fórmula IX:

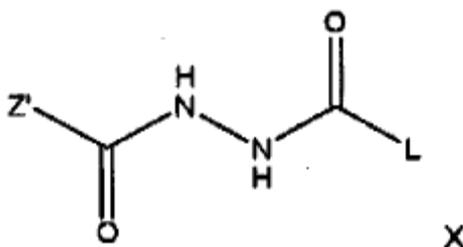


- 35 en la que

Y-C(O) es un resto de una proteína, donde la proteína es cualquiera de las proteínas descritas anteriormente;
L es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂,

- 5 en la que el grupo L está unido covalentemente al átomo de azufre;
Z es un resto de polisacárido o un resto de polímero sintético; y M es un grupo polialquileo, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliéster, un grupo polimino, un grupo arilo o un grupo politioéter.

En una realización, Z de la fórmula IV tiene la fórmula X:



- 10 en la que

- 15 Z'-C(O) es un resto de polisacárido o un resto de un polímero sintético; y
L es un grupo polialquileo, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliéster, un grupo polimino, un grupo arilo o un grupo politioéter,

en el que el grupo L está unido covalentemente al átomo de azufre.

- 20 En una realización, la reacción entre el compuesto reactivo con tiol y el compuesto de tiol se realiza generalmente a un pH de 7 a 12, de 7,5 a 11, de 7,5 a 10 o de 7,5 a 9,5, o un pH de 8. En una realización, el disolvente usado puede ser agua (sola) o una solución acuosa que contiene disolvente orgánico. En una realización, cuando se usa el sistema disolvente mixto, se puede usar una base tal como una amina primaria, secundaria o terciaria. En una realización, se usa un exceso de compuesto de tiol con respecto al compuesto reactivo con tiol con el fin de garantizar que todo el compuesto reactivo con tiol se consuma durante la reacción. Dependiendo de la selección del compuesto reactivo con tiol, el compuesto de tiol, el pH de la reacción y el disolvente seleccionado, el acoplamiento puede producirse en un período de minutos a varios días. Si la reacción se realiza en presencia de un oxidante, tal como aire, el compuesto de tiol puede reaccionar consigo mismo o con otro compuesto de tiol mediante adición oxidativa formando un enlace disulfuro, además de reaccionar con el compuesto reactivo con tiol.

30 **III. Proteínas reticuladas**

De acuerdo con ciertas realizaciones del segundo aspecto de la invención, el compuesto de fórmula I comprende un resto de una proteína.

- 35 La proteína puede ser cualquier proteína que tenga al menos un grupo reactivo con hidrazida. En una realización, el grupo reactivo con hidrazida puede ser un grupo -COOH (o la sal o el éster del mismo), un grupo aldehído o un grupo cetona. En la presente realización, se pueden usar las técnicas divulgadas en las publicaciones internacionales N^o WO 02/06373 A1 y WO 02/090390 A1. En una realización, la proteína puede ser una proteína de la matriz extracelular, una proteína de la matriz extracelular parcialmente hidrolizada, o una proteína de la matriz extracelular modificada químicamente. En otra realización, la proteína es colágeno, elastina, decorina, laminina o fibronectina.

- 45 En dichas realizaciones, el segundo componente puede comprender vidrio, cuya superficie se ha silanizado con un grupo funcional electrófilo reactivo con tiol. Como alternativa, el segundo compuesto puede comprender grupos electrófilos reactivos con tiol reticulables tales como, pero sin limitación, hidrazida acrílica o hidrazida metacrílica.

IV. Composiciones farmacéuticas

- 50 En una realización del tercer aspecto de la invención, cualquiera de los compuestos producidos mediante los métodos descritos anteriormente puede incluir al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica resultante puede proporcionar un sistema para la liberación continua, sostenida, de fármacos y otros agentes biológicamente activos a los tejidos adyacentes o distantes del sitio de aplicación. El agente biológicamente activo es capaz de proporcionar un efecto biológico, fisiológico o terapéutico local o sistémico en el sistema biológico en el que se aplica. Por ejemplo, el agente puede actuar para controlar la infección o la inflamación, estimular el crecimiento celular y la regeneración tisular, controlar el crecimiento tumoral, actuar como analgésico, potenciar la unión contra células y mejorar el crecimiento óseo, entre otras funciones. Además,

cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede contener combinaciones de dos o más compuestos farmacéuticamente aceptables.

En una realización, los compuestos farmacéuticamente aceptables pueden incluir sustancias capaces de prevenir una infección sistémicamente en el sistema biológico o localmente en el sitio del defecto como, por ejemplo, agentes antiinflamatorios tales como, pero sin limitación, pilocarpina, hidrocortisona, prednisolona, cortisona, diclofenaco sódico, indometacina, 6 α -metil-prednisolona, corticosterona, dexametasona, prednisona y similares; agentes antibacterianos, incluyendo, pero sin limitación, penicilina, cefalosporinas, bacitracina, tetraciclina, doxiciclina, gentamicina, cloroquina, vidarabina y similares; agentes analgésicos incluyendo, pero sin limitación, ácido salicílico, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno, piroxicam, flurbiprofeno, morfina y similares; anestésicos locales, incluyendo, pero sin limitación, cocaína, lidocaína, benzocaína y similares; inmunógenos (vacunas) para estimular los anticuerpos contra la hepatitis, la gripe, el sarampión, la rubéola, el tétanos, la poliomielitis, la rabia y similares; péptidos incluyendo, pero sin limitación, acetato de leuprolida (un agonista de LH-RH), nafarelina y similares. Todos los compuestos se encuentran disponibles en Sigma Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Además, es útil una sustancia o un precursor metabólicos que sea capaz de potenciar el crecimiento y la supervivencia de células y tejidos o aumentar el funcionamiento de las células como, por ejemplo, una sustancia promotora del crecimiento nervioso tal como un gangliósido, un factor de crecimiento nervioso y similares; un agente promotor del crecimiento de tejido duro o blando tal como la fibronectina (FN), hormona de crecimiento humana (HGH), un factor estimulante de colonias, proteína morfogénica ósea, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), interleucina-1 (IL-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), material óseo seco y similares; y agentes antineoplásicos tales como metotrexato, 5-fluorouracilo, adriamicina, vinblastina, cisplatino, anticuerpos específicos de un tumor conjugados a toxinas, factor de necrosis tumoral y similares.

Otras sustancias útiles incluyen hormonas tales como la progesterona, la testosterona y la hormona folículo estimulante (FSH) (control de la natalidad, aumento de la fecundidad), insulina y similares; antihistamínicos tales como difenhidramina y similares; agentes cardiovasculares tales como papaverina, estreptoquinasa y similares; agentes anti-úlceras tales como yoduro de isopropamida y similares; broncodilatadores tales como sulfato de metaproteral; aminofilina y similares; vasodilatadores tales como teofilina, niacina, minoxidil y similares; agentes del sistema nervioso central tales como tranquilizante, agente bloqueador B-adrenérgico, dopamina y similares; agentes antipsicóticos tales como risperidona, antagonistas de narcóticos tales como naltrexona, naloxona, buprenorfina; y otras sustancias similares. Todos los compuestos se encuentran disponibles en Sigma Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar usando técnicas conocidas en la materia. En una realización, la composición se prepara mezclando un compuesto descrito en el presente documento con un compuesto farmacéuticamente aceptable. El término "mezclar" se define como la mezcla de los dos componentes juntos de manera que no haya ninguna reacción química o interacción física. El término "mezclar" también incluye la reacción química o interacción física entre el compuesto y el compuesto farmacéuticamente aceptable. En el compuesto, se puede llevar a cabo el enlace covalente con los fármacos terapéuticos reactivos, por ejemplo, los que tienen grupos carboxilo reactivos. Por ejemplo, en primer lugar, se pueden convertir los productos químicos que contienen carboxilato, tales como los fármacos antiinflamatorios ibuprofeno o hemisuccinato de hidrocortisona, en los correspondientes ésteres activos de N-hidroxisuccinimida (NHS) y, posteriormente, se pueden hacer reaccionar con el grupo NH₂ del polisacárido modificado con dihidrazida. En segundo lugar, también es posible el atrapamiento no covalente de un agente farmacológicamente activo en un polisacárido reticulado. En tercer lugar, las interacciones electrostáticas o hidrófobas pueden facilitar la retención de un compuesto farmacéuticamente aceptable en un polisacárido modificado. Por ejemplo, el grupo hidrazido puede interactuar de forma no covalente, por ejemplo, con esteroides que contengan ácido carboxílico y sus análogos, y fármacos antiinflamatorios tales como ibuprofeno (ácido 2-(4-iso-butilfenil)propiónico). El grupo hidrazido protonado puede formar sales con una amplia variedad de materiales aniónicos tales como proteínas, heparina o sulfatos de dermatano, oligonucleótidos, ésteres de fosfato y similares.

Se apreciará que las cantidades reales preferidas de compuesto activo en un determinado caso variarán según el compuesto específico que se esté utilizando, las composiciones formuladas en particular, el modo de aplicación, y el sitio y el sujeto por tratar en particular. Las dosis para un huésped dado se pueden determinar usando las consideraciones convencionales, por ejemplo, mediante la comparación habitual de las actividades diferenciales de los presentes compuestos y de un agente conocido, por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado. Los médicos y los formuladores, los expertos en la materia para determinar las dosis de los compuestos farmacéuticos, no tendrá problemas para determinar la dosis de acuerdo con las recomendaciones convencionales ("Physicians Desk Reference", Barnhart Publishing (1999)).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden formular en cualquier excipiente que el sistema biológico o la entidad pueda tolerar. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. También se pueden usar vehículos no acuosos tales como aceites fijos, aceites vegetales tales como aceite de oliva y aceite de sésamo, triglicéridos, propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencien la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, cresoles, formalina y alcohol bencílico.

Los vehículos farmacéuticos son conocidos para los expertos en la materia. Lo más común es que estos sean vehículos convencionales para la administración a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico.

Las moléculas destinadas a la administración farmacéutica se pueden formular en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensoactivos y similares, además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares.

La composición farmacéutica se puede administrar en una serie de maneras, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y en la zona que se vaya a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica, vaginal, rectal, intranasal).

Las preparaciones para administración incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de vehículos no acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales, si son necesarios para el uso colateral de las composiciones y los métodos divulgados, incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos intravenosos, si son necesarios para el uso colateral de las composiciones y los métodos divulgados, incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También puede haber conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Las formulaciones para una administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizados, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables.

La dosis depende de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección por tratar, pero normalmente será una o más dosis al día, durando el tratamiento de varios días a varios meses o hasta que un experto habitual en la materia determine que la administración tenga que cesar. Los expertos habituales en la materia pueden determinar fácilmente las dosis, metodologías de dosificación y tasas de repetición óptimas.

En una realización, cualquiera de los compuestos y las composiciones farmacéuticas pueden incluir células vivas. Los ejemplos de células vivas incluyen, pero sin limitación, fibroblastos, hepatocitos, condrocitos, células madre, médula ósea, células musculares, miocitos cardíacos, células neuronales o células de los islotes pancreáticos, en los que las células madre no son células madre embrionarias humanas.

V. Usos

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden usar para una variedad de usos relacionados con la administración de fármacos, la administración de moléculas pequeñas, la cicatrización de heridas, la cicatrización de quemaduras y la regeneración de tejidos. Las composiciones divulgadas son útiles para las situaciones que se benefician de un entorno pericelular hidratado, en el que se deseen la unión de otros componentes de la matriz, la presentación de factores de crecimiento y diferenciación, la migración celular o la regeneración de tejidos.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento se pueden aplicar directamente en o sobre cualquier sistema biológico sin purificación, ya que se compone de materiales biocompatibles. Los ejemplos de sitios en los que se pueden aplicar los compuestos incluyen, pero sin limitación, tejido blando tal como músculo o grasa; tejido duro tal como hueso o cartílago; superficies de regeneración de tejidos; un espacio vacío tal como la bolsa periodontal; una incisión quirúrgica u otra bolsa o cavidad formada; una cavidad natural tal como las cavidades orales, vaginales, rectales o nasales, el fondo de saco del ojo y similares; la cavidad peritoneal y los órganos contenidos en la misma, y otros sitios en o sobre los que los compuestos se puedan aplicar incluyendo un defecto de la superficie de la piel tal como un corte, una raspadura o una superficie quemada.

Los presentes compuestos pueden ser biodegradables, y enzimas de origen natural actuarán para degradarlos con el tiempo. Los componentes del compuesto pueden ser "bioabsorbibles", en tanto en cuanto los componentes del compuesto se descompongan y sean absorbidos dentro del sistema biológico, por ejemplo, por una célula, un tejido y similares. Además, los compuestos, especialmente los compuestos que no hayan sido rehidratados, se pueden aplicar a un sistema biológico para absorber fluido de una zona de interés.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar como un vehículo para una amplia variedad de sustancias biológicamente activas liberables que tengan un valor curativo o terapéutico para seres humanos o animales. Muchas de estas sustancias que pueden ser transportadas por el compuesto se han tratado anteriormente. Entre los materiales biológicamente activos que son adecuados para la incorporación en los geles de la invención, se incluyen fármacos terapéuticos, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, agentes antipiréticos, fármacos esteroideos y no esteroideos para un uso antiinflamatorio, hormonas, factores de crecimiento, agentes anticonceptivos, antivirales, antibacterianos, antimicóticos, analgésicos, hipnóticos, sedantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares, anestésicos locales, antiespasmódicos, fármacos antiulcerosos, agonistas peptídicos, agentes simpaticomiméticos, agentes cardiovasculares, agentes antitumorales, oligonucleótidos y sus análogos, etcétera. Se añade una sustancia biológicamente activa en cantidades farmacéuticamente activas.

En una realización, los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para la administración de células vivas a un sujeto. En la realización, se puede usar cualquiera de las células vivas descritas anteriormente.

En otra realización, los compuestos y las composiciones se pueden usar para la administración de factores de crecimiento y moléculas relacionadas con factores de crecimiento. Por ejemplo, los factores de crecimiento pueden ser una sustancia promotora del crecimiento nervioso tales como un gangliósido, un factor de crecimiento nervioso y similares; un agente promotor del crecimiento de tejido duro o blando tal como fibronectina (FN), hormona de crecimiento humana (HGH), un factor estimulante de colonias, proteína morfogénica ósea, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), interleucina-1 (IL-1). Los factores de crecimiento preferidos son bFGF y TGF- β . También se prefieren el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF).

En otra realización, se pueden usar antiinflamatorios que portan grupos carboxilo, tales como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno e indometacina. Otras sustancias biológicamente activas son péptidos, que sean de origen natural, polipéptidos sintéticos o de origen no natural, o sus isómeros, tales como pequeñas hormonas peptídicas o análogos de hormonas e inhibidores de la proteasa. También se pueden usar espermicidas, antibacterianos, antivirales, antifúngicos y antiproliferativos tales como fluorodesoxiuracilo y adriamicina. Todas estas sustancias son conocidas en la técnica. Los compuestos se encuentran disponibles en Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

La expresión "fármacos terapéuticos", como se usa en el presente documento, pretende incluir los definidos en la Ley Federal estadounidense de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. La farmacopea de Estados Unidos (USP) y el Formulario Nacional (NF) son las normas reconocidas en materia de potencia y pureza de los productos farmacológicos más comunes.

En una realización, el compuesto farmacéuticamente aceptable es pilocarpina, hidrocortisona, prednisolona, cortisona, diclofenaco sódico, indometacina, 1,6 α -metil-prednisolona, corticosterona, dexametasona y prednisona. Sin embargo, las composiciones de la invención también son útiles cuando la administración de un compuesto farmacéuticamente aceptable es para un propósito médico seleccionado del grupo de administración de agentes anticonceptivos, tratamiento de adherencias postquirúrgicas, potenciación del crecimiento cutáneo, prevención de formación de cicatrices, curación de heridas, realización de viscoscirugía, realización de viscosuplementación, ingeniería de tejidos.

La tasa de administración del fármaco depende de la hidrofobicidad de la molécula que se esté liberando. Las moléculas hidrófobas, tales como dexametasona y prednisona, se liberan lentamente del compuesto a medida que este se hincha en un medio acuoso, mientras que las moléculas hidrófilas, tales como pilocarpina, hidrocortisona, prednisolona, cortisona, diclofenaco sódico, indometacina, 6 α -metil-prednisolona y corticosterona, se liberan rápidamente. La capacidad del compuesto para mantener una liberación sostenida lenta de antiinflamatorios esteroideos convierte a los compuestos descritos en el presente documento en extremadamente útiles para la curación de heridas tras un trauma o una intervención quirúrgica. Además, el compuesto se puede usar como un sistema de barrera para aumentar el crecimiento celular y la regeneración tisular.

En ciertas realizaciones, la invención es útil en relación con métodos de administración de moléculas o reactivos relacionados con la angiogénesis y la vascularización, tales como agentes de administración tales como VEGF, que estimulan la microvascularización, agentes que pueden inhibir la angiogénesis y la vascularización, tales como aquellos compuestos y reactivos útiles para este fin descritos en, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nº 6.174.861 para "Methods of inhibiting angiogenesis via increasing in vivo concentrations of endostatin protein";

6.086.865 para "Methods of treating angiogenesis-induced diseases and pharmaceutical compositions thereof"; 6.024.688 para "Angiostatin fragments and method of use"; 6.017.954 para "Method of treating tumors using O-substituted fumagillol derivatives"; 5.945.403 para "Angiostatin fragments and method of use"; 5.892.069 "Estrogenic compounds as anti-mitotic agents"; 5.885.795 para "Methods of expressing angiostatic protein"; 5.881.372 para
 5 "Aggregate angiostatin and method of use"; 5.854.221 para "Endothelial cell proliferation Inhibitor and method of use"; 5.854.205 para "Therapeutic antiangiogenic compositions and methods"; 5.837.682 para "Angiostatin fragments and method of use"; 5.792.845 para "Nucleotides encoding angiostatin protein and method of use"; 5.733.876 para "Method of inhibiting angiogenesis"; 5.698.586 para "Angiogenesis inhibitory agent"; 5.661.143 para "Estrogenic compounds as anti-mitotic agents"; 5.639.725 para "Angiostatin protein"; 5.504.074 para "Estrogenic
 10 compounds as anti-angiogenic agents"; 5.290.807 para "Method for regressing angiogenesis using o-substituted fumagillol derivatives"; y 5.135.919 para "Method and a pharmaceutical composition for the inhibition of angiogenesis".

La invención también es útil en relación con métodos para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto en
 15 necesidad de dicha mejora, poniéndose en contacto cualquiera de los compuestos o de las composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento con una herida de un sujeto en necesidad de mejorar la cicatrización de heridas. La invención también es útil en relación con métodos para administrar al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable a un paciente en necesidad de dicha administración, poniéndose en contacto cualquiera de los compuestos o de las composiciones farmacéuticas descritos en la presente memoria con
 20 al menos un tejido capaz de recibir dicho compuesto farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones divulgadas se pueden usar para el tratamiento de una amplia variedad de defectos en los tejidos de un animal, por ejemplo, un tejido con un vacío tal como una bolsa periodontal, una herida cutánea superficial o profunda, una incisión quirúrgica, un defecto de hueso o de cartilago y similares. Por ejemplo, los compuestos
 25 descritos en el presente documento pueden estar en la forma de una película de hidrogel. La película de hidrogel se puede aplicar en un defecto del tejido óseo tal como una fractura de un hueso del brazo o de la pierna, un defecto en un diente, un defecto del cartilago de la articulación, oído, nariz o garganta, y similares. La película de hidrogel compuesta del compuesto descrito en el presente documento también puede funcionar como un sistema de barrera para la regeneración tisular guiada, proporcionando una superficie sobre o a través de la cual las células pueden crecer. Para mejorar la regeneración de un tejido duro tal como el tejido óseo, se prefiere que la película de hidrogel proporcione soporte para el nuevo crecimiento celular que reemplazará la matriz a medida que sea absorbida o erosionada gradualmente por los fluidos corporales.
 30

La película de hidrogel compuesta de un compuesto descrito en el presente documento se puede administrar sobre
 35 células, tejidos y/u órganos, por ejemplo, mediante inyección, pulverización, rociado, cepillado, pintado, recubrimiento, y similares. La administración también puede ser a través de una cánula, catéter, jeringa con o sin aguja, aplicador de presión, bomba, y similares. El compuesto se puede aplicar sobre un tejido en forma de película, por ejemplo, para proporcionar un apósito de película en la superficie del tejido y/o adherir un tejido a otro tejido o película de hidrogel, entre otras aplicaciones.
 40

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar por inyección. Para muchos usos clínicos, cuando el compuesto está en forma de una película de hidrogel, los hidrogeles inyectables se prefieren por tres razones principales. En primer lugar, se podría formar un hidrogel inyectable en cualquier forma deseada en el sitio de la lesión. Debido a que los hidrogeles iniciales pueden ser soles o masillas moldeables, los sistemas se
 45 pueden colocar en formas complejas y, posteriormente, reticular para ajustarse a las dimensiones requeridas. En segundo lugar, el hidrogel se adheriría al tejido durante la formación del gel, y el enclavamiento mecánico resultante derivado de la microrrugosidad superficial reforzaría la superficie de contacto entre el tejido y el hidrogel. En tercer lugar, la introducción de un hidrogel reticulable *in situ* se podría llevar a cabo usando una aguja o por métodos laparoscópicos, minimizando de este modo la invasividad de la técnica quirúrgica.
 50

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar la enfermedad periodontal, pudiéndose extirpar el tejido gingival que recubre la raíz del diente para formar un envoltorio o bolsa, y administrarse la composición en la bolsa y contra de la raíz expuesta. Los compuestos también se pueden administrar en un diente defectuoso haciendo una incisión a través del tejido gingival para dejar la raíz al descubierto, y luego aplicando el
 55 material a través de la incisión sobre la superficie de la raíz mediante colocación, cepillado, inyección, o por otros medios.

Cuando se usan para tratar un defecto en la piel u otro tejido, los compuestos descritos en el presente documento pueden estar en forma de una película de hidrogel que se puede aplicar encima de la zona deseada. En dicha
 60 realización, la película de hidrogel es maleable y se puede manipular para ajustarla a los contornos del defecto tisular.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden aplicar en un dispositivo implantable tal como una sutura, pinzas, prótesis, catéter, tornillo metálico, placa ósea, pasador, un vendaje tal como una gasa, y similares,
 65 para mejorar la compatibilidad y/o el rendimiento o la función de un dispositivo implantable con un tejido corporal en el sitio de un implante. Los compuestos se pueden usar para recubrir el dispositivo implantable. Por ejemplo, los

compuestos se podrían usar para recubrir la superficie rugosa de un dispositivo implantable con el fin de mejorar la compatibilidad del dispositivo, proporcionando una superficie lisa biocompatible que redujera la aparición de abrasiones por el contacto de los bordes ásperos con el tejido adyacente. Los compuestos también se pueden usar para mejorar el rendimiento o la función de un dispositivo implantable. Por ejemplo, cuando el compuesto es una película de hidrogel, la película de hidrogel se puede aplicar a un vendaje de gasa para mejorar su compatibilidad o adhesión con el tejido en el que se aplica. La película de hidrogel también se puede aplicar alrededor de un dispositivo tal como un catéter o colostomía insertado a través de una incisión en el cuerpo para ayudar a sujetar el catéter/la colostomía en su sitio y/o para llenar el vacío entre el dispositivo y el tejido, y formar un precinto compacto para reducir la infección bacteriana y la pérdida de fluido corporal.

Se entiende que las composiciones y los métodos divulgados se pueden aplicar a un sujeto en necesidad de regeneración de los tejidos. Por ejemplo, se pueden incorporar células en los compuestos descritos en el presente documento para su implantación. En una realización el sujeto es un mamífero. Los mamíferos preferidos en los que se aplican las composiciones y los métodos son ratones, ratas, vacas o ganado, caballos, ovejas, cabras, gatos, perros y primates, incluyendo monos, chimpancés, orangutanes y seres humanos. En otra realización, los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento se pueden aplicar a las aves.

Cuando se estén usando en los campos relacionados con la regeneración tisular tales como la cicatrización de heridas o quemaduras, no es necesario que los métodos y las composiciones divulgados eliminen la necesidad de una o más terapias aceptadas relacionadas. Se considera beneficioso cualquier disminución del tiempo de recuperación o aumento de la calidad de la recuperación obtenido por el receptor de las composiciones o los métodos divulgados. También se entiende que algunas de las composiciones y de los métodos divulgados se pueden usar para prevenir o reducir las adherencias fibróticas que se producen como resultado del cierre de una herida como consecuencia de un trauma tal como una cirugía. También se entiende que los efectos colaterales proporcionados por las composiciones y los compuestos divulgados, tales como la mejora de la resistencia bacteriana o una reducción del dolor, etc., son deseables, pero no necesarios.

Se entiende que cualquier realización particular dada de las composiciones y de los métodos divulgados se puede comparar fácilmente con los ejemplos específicos y las realizaciones divulgados en el presente documento, incluyendo los reactivos no basados en polisacáridos analizados en los ejemplos. Mediante la realización de una comparación de este tipo, se puede determinar fácilmente la eficacia relativa de cada realización particular. Los ensayos particularmente preferidos para los diversos usos son los ensayos que se divulgan en los ejemplos del presente documento, y se entiende que estos ensayos, aunque no son necesariamente limitantes, se pueden realizar con cualquiera de las composiciones y de los métodos divulgados en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una exposición y una descripción completas de cómo los compuestos, las composiciones y los métodos descritos, y las reivindicados del presente documento están hechas y evaluadas, y se pretende que sean puramente ilustrativas y que no limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o a temperatura ambiente, y la presión es la atmosférica o cercana a la atmosférica. Hay numerosas variaciones y combinaciones de las condiciones de reacción, por ejemplo, concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones, y otros intervalos y condiciones que se pueden usar para optimizar la pureza del producto y el rendimiento obtenidos a partir del proceso descrito. Solo se requerirá la experimentación razonable y rutinaria para optimizar dichas condiciones de proceso.

La descripción del punto II sobre los hidrogeles de hialuronano reticulados con disulfuro mediante adición oxidativa no es un ejemplo de la invención, pero es útil para comprenderla.

1. Materiales

El hialuronano derivado de la fermentación (HA, sal de sodio, PM_p 1,5 MDa) se obtuvo en Clear Solutions Biotech, Inc. (Stony Brook, NY). La 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDCI), el ácido 3,3'-ditiobis(propanoico), el ácido 4,4'-ditiobis(butanoico) y el poli(etilenglicol)acrilato (PM_p 375) y el hidrato de hidrazina eran de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco, hialuronidasa testicular bovina (HAsa, 330 U/mg) y azul de dextrano (PM_p 200.000) era de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El ditiotreitól (DTT) era de Diagnostic Chemicals Limited (Oxford, CT). El ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) fue de Acros (Houston, TX). La 3,3'-ditiobis(dihidrazida propanoica) (DTP) y 4,4'-ditiobis(dihidrazida butírica) (DTB) se sintetizó como se ha descrito previamente en Vercruyssen K. P., Marecek D. M., Marecek J. F. y Prestwich G. D.. "Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid", *Bioconjugate Chem* 1997; 8:686-694, que se incorpora por referencia en su totalidad. El poli(etilenglicol)-diacrilato (PEGDA), poli(etilenglicol)-dimetacrilato (PEGDM), poli(etilenglicol)-diacrilamida (PEGDAA) y poli(etilenglicol)-dimetacrilamida

(PEGDMA) se sintetizaron a partir de poli(etilenglicol) o poli(etilenglicol)diamina (PM_p 3400, Shearwater Polymers) como se describe en Elbert D. L. y Hubbell J. A. "Conjugate addition reactions combined with free-radical crosslinking for the design of materials for tissue engineering", *Biomacromolecules* 2001; 2: 430-441, que se incorpora por referencia en su totalidad. La gelatina de piel bovina (Tipos B y A, resistencia de gel de aprox. 225 Bloom), la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), la cisteína, la hialuronidasa testicular bovina (HAsa, 330 U/mg), la colagenasa bacteriana de *Clostridium histolyticum*. (CE 3.4.24.3, 388 U/mg se obtuvieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5, bromuro de difenil-tetrazolio (MTT) se obtuvieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) se adquirió en Acros (Houston, TX).

Instrumentación analítica. Los datos espectrales de RMN de protón se obtuvieron usando un Varian INOVA 400 a 400 MHz. Los datos espectrales se obtuvieron usando un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453 (Palo Alto, CA). La cromatografía de permeación en gel (CPG) se realizó usando el siguiente sistema: bomba de HPLC Waters 515, refractómetro diferencial Waters 410, detector de absorbancia sintonizable Waters® 486, columnas Ultrahydrogel 250 o 1000 (7,8 mm de d.i. x 130 cm) (Milford, MA). El eluyente fue tampón de fosfato 200 mM (pH 6,5)/MeOH = 80:20 (v/v) y el caudal fue de 0,3 o 0,5 ml/min. El sistema se calibró con muestras estándar de HA proporcionadas por el Dr. U. Wik (Farmacia, Uppsala, Suecia). Las imágenes de fluorescencia de células viables se registraron usando una Nikon Eclipse TE300 con capacidades de epi-fluorescencia. La proliferación celular se determinó mediante un ensayo bioquímico (Kit de proliferación Cell-Titer 96, Promega, Madison, WI), ensayo de MTT o ensayo de MTS a 550 nm, que fue registrado en un lector de microplacas OPTI Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Síntesis de dihidrazidas de tioácidos. Las formas oxidadas de los reticuladores de tiol requeridos 3,3'-ditiobis(hidrazida propanoica) (DTP) y 4,4'-ditiobis(hidrazida butanoica) (DTB) se sintetizaron a partir de sus diácidos como se ha descrito previamente para la DTP en Vercruyse, K. P. Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Prestwich, G. D., *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 686-694, que se incorpora por referencia en su totalidad. Por lo tanto, los ácidos dicarboxílicos libres se convirtieron en diésteres mediante calentamiento a reflujo en etanol con catálisis ácida. Los diésteres se hidrazinizaron con hidrato de hidrazina para formar las dihidrazidas correspondientes. DTP (Vercruyse, K. P.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Prestwich, G. D. *Bioconjugate Chem* 1997, 8, 686-694): Rendimiento, 92 %; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,05 (s, 2 H, N-NH-C(O)), δ 4,21 (s, 4 H, NH₂-NC(O)), δ 2,88 (t, 4 H, C(O)-C-CH₂-S), δ 2,40 (t, 4 H, NC(O)-CH₂-C). DTB: rendimiento, 52 %; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,95 (s, 2 H, N-NH-C(O)), δ 4,15 (s, 4 H, NH₂-NC(O)), δ 2,66 (t, 4 H, CC-CH₂-S), δ 2,10 (t, 4 H, C(O)-CH₂-C-C), δ 1,82 (p, 4 H, C(O)-C-CH₂-CS), EM-IE, m/z, 266,0 (M⁺, 1,44); 133,0 (SC₃H₆CON₂H₃⁺, 46,78); 101,0 (C₃H₆CON₂H₃⁺, 100,0). EMAR para C₈H₁₈O₂N₄. Encontrado: 266,0864; calculado: 266,0871.

Preparación de HA de bajo peso molecular (BPM) mediante la degradación de ácido. Se disolvió HA de alto peso molecular (1,5 MDa) (20 g) en 2,0 l de agua destilada, y se ajustó el pH de la solución a aprox. 0,5 mediante la adición de HCl concentrado. Se llevó a cabo la degradación a 37 °C, agitación a 130 rpm durante 24 h. Tras ello, se ajustó el pH de la solución a 7,0 mediante la adición de NaOH 1,0 N antes de la transferencia a un tubo de diálisis (corte de PM_p = 3.500) y se sometió a diálisis frente a agua durante cuatro días. Después, se centrifugó la solución, y se liofilizó el sobrenadante, dando 15 g de HA de BPM (PM_p: 246 kDa, PM_n: 120 kDa, índice de polidispersidad: 1,97).

II. Hidrogeles de hialuronano reticulado con disulfuro mediante adición oxidativa

Preparación de HA tiolado

Se prepararon derivados de HA tiolado con diferentes cargas siguiendo un protocolo general (Figura 1). En un ejemplo representativo, se disolvió HA de BPM (20 g, 50 mmol) en 2,0 l de agua, se añadieron 23,8 g de DTP o 26,6 g de DTB (100 mmol) mientras se agitaba. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 4,75 mediante la adición de HCl 1,0 N. A continuación, se añadieron 19,2 g de EDCI (100 mmol) en forma sólida. Se mantuvo el pH de la mezcla de reacción a 4,75 con alícuotas de HCl 1,0 N. Se detuvo la reacción mediante la adición de NaOH 1,0 N, elevando el pH de la mezcla de reacción hasta 7,0. Después, se añadieron 100 g de DTT (aprox. 650 mmol) en forma sólida y se elevó el pH de la solución hasta 8,5 mediante la adición de NaOH 1,0 N. Tras agitar durante 24 h, se ajustó el pH de la mezcla de reacción a pH 3,5 mediante la adición de HCl 1,0 N. Se transfirió la solución acidificada a un tubo de diálisis (corte de PM_p = 3.500) y se sometió a diálisis exhaustivamente frente a HCl diluido (pH 3,5, aproximadamente 0,3 mM) que contenía NaCl 100 mM, seguido de diálisis frente a HCl diluido, pH 3,5. A continuación, se centrifugó la solución, y se liofilizó el sobrenadante. Se midió la pureza del HA tiolado (HA-DTPH y HA-DTBH) mediante CPG y RMN de ¹H, y se determinó el grado de sustitución (GS) mediante RMN de ¹H. Los tioles libres de la cadena lateral de HA-DTPH y HA-DTBH se determinaron mediante un método de Ellman modificado (Butterworth, P. H. W.; Baum, H.; Porter, J. W. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967, 118, 716-723). El GS (%) y el contenido de tiol (%) se definieron como el número de restos DTP (o DTB) y tioles por cada 100 unidades de disacáridos, respectivamente. Resultados representativos: HA-DTBH (PM_p: 165 kDa, PM_n: 63 kDa, índice de polidispersidad: 2,62, GS: 72 %) y HA-DTPH (PM_p: 136 kDa, PM_n: 61 kDa, índice de polidispersidad: 2,23, GS: 58 %). Las estructuras de HA-DTPH y HA-DTBH se confirmaron por espectroscopía de RMN de ¹H en D₂O.

El GS se controló principalmente por las proporciones molares de HA/DTP/EDC y el tiempo de reacción (Tabla 1). Mediante la selección de los parámetros de reacción adecuados, se puede controlar el grado de sustitución en un amplio intervalo (28 % a 67 %) (Tabla 1). También se observaron resultados similares en el caso de HA modificado con DTB.

5

Tabla 1. Optimización de la modificación con DTP de HA.

Proporción molar de HA:DTP:EDCI	Tiempo de reacción (min)	Grado de sustitución (%)
1:2:2	5	28,8
1:2:2	10	41,7
1:2:2	30	49,2
1:2:2	60	54,4
1:2:2	120	66,8
1:1:2	10	38,9
1:4:2	10	42,5
1:2:1	10	31,1
1:2:0:5	10	26,8

Determinación del pK_a. Se determinó el pK_a de los tioles en HA-DTPH y HA-DTBH espectrofotométricamente basándose en la absorción UV de los tiolatos según lo propuesto por Benesch y Benesch (Benesch, R.; Benesch, R. E. *Proc. Nat. Acad. Science.* EE.UU. 1958, 44, 848-853). Se disolvieron soluciones de HA-DTPH y HA-DTBH (aprox. 5 mg) en 100 ml de HCl 0,001 N que contenían NaCl 0,1 N (fuerza iónica estable). Se midieron de inmediato las soluciones recién preparadas en la región UV con una exploración de 190 a 300 nm.

10

Los valores de pK_a se determinaron espectrofotométricamente basándose en la absorción UV de los tiolatos (Benesch). Con el aumento del pH, la absorción de las soluciones aumentó bruscamente - especialmente al pH cercano al pK_a de los tioles (Figura 2a). De acuerdo con el procedimiento presentado por Lutolf *et al.* (Lutolf, M. P.; Tirelli, N.; Cerritelli, S.; Cavalli, L.; Hubbell, J. A. *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 1051-1056), la intersección con la abscisa en una representación gráfica de $\log[(A_{\max}-A_i)/A_i]$ frente al pH dio el valor de pK_a. Hubo una buena aproximación lineal de los cinco puntos centrales tanto para HA-DTPH como para HA-DTBH, dando un valor de 8,87 para HA-DTPH y de 9,01 para HA-DTBH. El pK_a de HA-DTPH fue ligeramente inferior al de HA-DTBH, porque el tiol en HA-DTPH se activó más fácilmente en las proximidades del grupo amida (Figura 2b).

15

20

En comparación con HA-DTBH, el pK_a inferior de los tioles en HA-DTPH sugirió el aumento de la reactividad y el aumento de la capacidad para regenerar la estructura disulfuro en las mismas condiciones. Se usó un procedimiento cualitativo para evaluar la reformación del disulfuro. Cuando las soluciones de HA-DTPH y HA-DTBH estaban en contacto con el aire, aumentó la viscosidad y se formó un gel debido a la oxidación de los tioles en disulfuros por el O₂. A mayor pH, las soluciones tanto de HA-DTBH como de HA-DTPH formaron más fácilmente geles, porque los tioles se convirtieron en tiolatos más reactivos a pH más alto (Tabla 2). Por ejemplo, con solución de HA-DTPH al 3,0 % (GS: 58 %), la solución a un pH 7,0, 8,0, y 9,0 se gelificó en 15 min, mientras que a pH 5,0 y 6,0, no se observó ningún aumento obvio de la viscosidad de la solución tras 30 minutos (Tabla 2). Los tioles de HA-DTBH fueron menos reactivos, y por lo tanto la gelificación de la solución de HA-DTBH (3,0 % p/v, GS: 72 %) fue lenta (Tabla 2).

25

30

Tabla 2. Gelificación inducida por aire de solución de HA-DTPH y HA-DTBH (3,0 % p/v) determinada por un método de inversión del tubo de ensayo

35

pH	HA-DTPH		HA-DTBH	
	15 min	30 min	15 min	30 min
5,0	S	S	S	S
6,0	S	S	S	S
7,0	G	G	SV	SV
8,0	G	G	SV	G
9,0	G	G	SV	G

S = solución; G = gel; SV = solución muy viscosa

Gelificación de soluciones de HA tiolado. Se determinó la transición de solución (estado líquido) a gel (estado no líquido) mediante una prueba de flujo utilizando un método de inversión de tubos de ensayo publicado por Jeong *et al.* (Jeong, B.; Bae, Y. H.; Kim, S. W. *Macromol.* 1999, 32, 7064-7069). Se disolvieron HA-DTBH y HA-DTPH en PBS, dando soluciones al 3,0 % (p/v) en atmósfera de N₂. Se ajustó el pH de las soluciones a 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 y 9,0

40

en NaOH 1,0 N. Se inyectaron inmediatamente soluciones recién preparadas (1,0 ml) con diferente pH en tubos de vidrio (0,8 cm de diámetro, 7,5 cm de longitud). Tras la exposición al aire a temperatura ambiente durante 15 o 30 minutos, se invirtió el tubo de ensayo. Si no se observó fluidez a simple vista en 1 min, se llegó a la conclusión de que se había formado un gel.

5 **Preparación de películas de HA reticulado por disulfuro.** Se disolvieron HA-DTBH y HA-DTPH en PBS, dando soluciones al 3,0 % (p/v) y se ajustó el pH de la solución a 7,4 mediante la adición de NaOH 1,0 N. Se incluyeron geles cargados con el fármaco, azul de dextrano al 0,15 % (p/v) (PM_p: 200.000) como un fármaco modelo. A continuación, se vertieron 25 ml de la solución en una placa de Petri de 9 cm y se dejaron secar a temperatura ambiente. Tras aprox. tres días, había una película. Según fue necesario, se oxidó la película adicionalmente mediante la inmersión en H₂O₂ al 0,3 % durante 1 h. A continuación, se enjuagó la película con agua destilada, se cortó en discos de 6 mm de diámetro y se secó a temperatura ambiente durante un día y luego a 0,13 kPa durante una semana, dando películas con 0,1 mm de espesor.

15 **Determinación del hinchamiento.** Se pesaron discos de película de HA-DTBH y HA-DTPH (6 mm de diámetro) (P₀), sumergidos en viales de vidrio que contenían 10 ml de PBS (pH 7,4), y se colocaron en una incubadora de agitación a 37 °C, a 300 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados, se pesaron las películas húmedas (P₁) inmediatamente después de eliminar el agua superficial mediante transferencia entre dos trozos de papel de filtro. La proporción de hinchamiento (R) se define como P₁/P₀.

20 El hinchamiento de las películas de HA-DTPH y HA-DTBH en PBS fue de acuerdo con el contenido de disulfuro de las películas como se muestra en la Figura 3. Las películas oxidadas al aire se hincharon considerablemente debido al bajo grado de reticulación, con una proporción de hinchamiento a las 5,5 h de 16,2 para la película de HA-DTBH y de 9,5 para la de HA-DTPH. Estas proporciones son similares a los hidrogeles de dihidrazida adípica de HA reticulado con dialdehído de PEG usados para la liberación del fármaco (Luo, Y.; Kirker, K. R.; Prestwich, G. D. J. *Controlled Rel.* 2000, 69, 169-184) y la reparación de heridas (Kirker, K. R.; Luo, Y.; Nielson, J. H.; J. Shelby; Prestwich, G. D. *Biomaterials* 2002, 23, 3661-3671). Tras la oxidación con H₂O₂, la proporción de hinchamiento disminuyó hasta 3,5 para la película de HA-DTBH y 2,9 para la película de HA-DTPH.

25 **Determinación del contenido de disulfuro.** Se degradaron los discos de película de HA-DTBH y HA-DTPH por hidrólisis ácida (HCl 0,1 N). Se midió el contenido de azufre total (disulfuro más tiol) usando 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB) de acuerdo con Thannhauser *et al.* (Thannhauser, T. W.; Konishi, Y.; Scheraga, H. A. *Meth. Enzymol.* 1987, 143, 115-119). Además, se midió el contenido de tiol libre mediante el método de Ellman (Ellman G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, 74, 443-450). El contenido de disulfuro se calculó a partir de la diferencia entre el contenido de azufre total y el contenido de tiol libre.

30 La Figura 4 muestra que la oxidación con H₂O₂ diluido aumentó el número de enlaces disulfuro. Por ejemplo, el contenido en disulfuro de la película de HA-DTPH aumentó de 0,175 a 0,212 mmol/g tras la oxidación con H₂O₂. En el caso de la película de HA-DTBH, se formó un menor número de enlaces disulfuro debido a la oxidación del aire, porque el tiol era menos reactivo (el valor fue de 0,125 mmol/g); sin embargo, este podría haber aumentado de manera significativa hasta 0,25 mmol/g mediante la oxidación con H₂O₂. No obstante, siguiendo el procedimiento de oxidación con H₂O₂, no se detectan grupos tiol adicionales en las películas de HA-DTPH ni de HA-DTBH, y solo aprox. del 30 al 40 % de los tioles disponibles formaron enlaces disulfuro. Esto sugiere que la oxidación con H₂O₂ de los grupos tiol no solo creó nuevos puentes disulfuro, sino que condujo a la producción de ácidos sulfénicos o sulfónicos oxidados con S que no se hubieran detectado usando NTSB y DTNB (Capozzi, G.; Modena, G. en "The Chemistry of the Thiol Group Part II"; Patai, S., Ed.; Wiley: Nueva York, 1974; pág. 785-839).

35 **Estudios de liberación de azul de dextrano.** Se sumergieron discos de 6 mm cargados con fármaco de películas de HA-DTBH y HA-DTPH en botellas de vidrio que contenían 2 ml de medios de liberación, y se colocaron en una incubadora a 37 °C, a 300 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados, se eliminó 1 ml de solución sobrenadante, y se determinó el contenido de azul de dextrano mediante absorción UV-Vis a 625 nm. A continuación, se volvió a añadir 1 ml de medio de liberación en blanco para mantener el volumen constante. Medios de liberación: PBS que contenía DTT 0, 10 y 50 mM (el pH del medio se ajustó a pH 7,4 mediante la adición de NaOH 1,0 N) o PBS que contenía hialuronidasa (HAsa, 100 U/ml).

40 Para una mayor confirmación, se reticularon las películas de HA-DTPH y HA-DTBH mediante enlaces disulfuro reversibles, se incubaron las películas de hidrogel en PBS que contenía diferentes concentraciones de DTT a pH 7,4 (datos no mostrados). Incluso a una concentración de DTT tan baja como 10 mM, las películas generadas tanto a partir de la oxidación con aire como con H₂O₂ se hincharon considerablemente y se disolvieron poco a poco debido a la reducción del disulfuro por DTT. Cuando se disolvieron los geles, se liberó un fármaco modelo (azul de dextrano de PM_p 200.000) que había sido atrapado de manera no covalente en las películas de hidrogel. Por lo tanto, en 100 min, ambas películas de HA-DTPH que habían sido oxidadas adicionalmente con H₂O₂ se disolvieron y, en consecuencia, el fármaco modelo azul de dextrano fue liberado completamente en presencia de la concentración de DTT de 10 mM y 50 mM. La liberación del azul de dextrano ocurrida en ausencia de DTT (Figura 5) fue insignificante.

65

Además, la enzima HASa también aceleró la liberación del fármaco modelo (azul de dextrano) de las películas. Por ejemplo, en 48 h el porcentaje de liberación del azul de dextrano de la película de HA-DTPH oxidada con aire en PBS a 37 °C a 300 rpm fue inferior al 7 %, mientras que en las mismas condiciones en PBS con 100 U/ml de HASa, se liberó un 30 % del azul de dextrano con una degradación parcial concomitante de la película. Tras 48 h, aproximadamente el 36 % de la película se había perdido debido a la digestión enzimática, según lo determinado gravimétricamente.

Encapsulación de células *in situ*. Se disolvió HA-DTPH (PM_p 136 kDa, PM_n = 61 kDa, índice de polidispersidad 2,23, GS = 58 %) en medio DMEM/F-12 (Gibco, Rockville, Maryland) para dar una solución al 3,0 % (p/v) en atmósfera de N₂, y se ajustó el pH de la solución a 7,4 mediante la adición de NaOH 1,0 N. A continuación, se esterilizó la solución bajo luz UV durante 25 min en atmósfera de N₂. Se cultivaron fibroblastos murinos (L-929, ATCC, Manassas, VA) en un matraz triple (Fisher, Springfield, NJ) hasta obtenerse un 90 % de confluencia, y luego se tripsinizaron y se mezclaron con solución de HA-DTPH a una concentración final de 2 x 10⁶/ml. A continuación, se añadieron 0,5 ml de la solución de HA-DTPH a cada pocillo de una placa de 12 pocillos. Se incubaron las placas cargadas de células (37 °C, CO₂ al 5 %, 4 h) hasta que se formó un hidrogel sólido y, a continuación, se añadieron 2 ml de medio de DMEM/F-12 con suero de ternero recién nacido al 10 % (Gibco, Rockville, MD) a cada pocillo. Se transfirieron las placas a una incubadora (37 °C, CO₂ al 5 %, tres días) sin cambiar el medio.

Viabilidad y proliferación celular. Se determinó la viabilidad de fibroblastos L-929 murinos en el hidrogel mediante un procedimiento de doble tinción usando diacetato de fluoresceína (F-DA) y yoduro de propidio (PI) (Kortemme, T.; Creighton, T. E., *J Mol. Biol.* **1995**, 253, 799-812). F-DA (Molecular Probes, Eugene, OR), un derivado de fluoresceína no fluorescente, se difunde a través de la membrana de las células vivas y es hidrolizado por la esterasa intracelular para producir una fluorescencia verde. PI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), que es excluido por las membranas celulares intactas, pero que fue capaz de difundirse a través de una membrana celular dañada, se une a los ácidos nucleicos para producir una fluorescencia de color rojo brillante. En síntesis, se diluyó una solución de 5 mg/ml de F-DA en acetona hasta 20 µg/ml en PBS que contenía 0,2 µg/ml de PI. Tras 1 y 3 días de cultivo con células encapsuladas *in vitro*, se lavaron los hidrogeles dos veces con PBS, se sumergieron en la solución de F-DA/PI diluida durante 10 min a temperatura ambiente y después se lavaron con PBS durante 5 min. A continuación, se observaron células vivas y muertas en un microscopio TS 100 Nikon (Nikon, Melville, NY) con triple filtro (DAPI/FITC/CY3).

Tras diferentes tiempos de cultivo, se determinó el número de células viables de cada hidrogel usando un ensayo bioquímico (Kit de proliferación Cell-Titer 96, Promega, Madison, WI) como se ha descrito previamente (Lutolf, M. P.; Tirelli, N.; Cerritelli, S.; Cavalli, L.; Hubbell, J. A. *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 1051-1056). En este método, una sal de tetrazolio (MTS) es reducida por las mitocondrias de las células vivas en un producto de formazano coloreado cuya presencia se puede detectar espectrofotométricamente.

Los hidrogeles en placas de 12 pocillos se lavaron dos veces con tampón PBS, a continuación, se añadieron 900 µl de medio DMEM/F-12 con suero de ternero recién nacido al 5 % y 180 µl de solución de Kit de proliferación Cell-Titer 96 a cada pocillo. Tras 2 h de incubación con agitación suave (37 °C, CO₂ al 5 %), se transfirió una alícuota de 125 µl de cada una de las soluciones de forma individual a una placa de 96 pocillos y se leyó a 550 nm con un lector de microplacas OPTI Max (Molecular Devices). Se convirtió la lectura de absorbancia a un número de células basándose en las curvas de calibración generadas a partir del ensayo de números conocidos de células. Los conjuntos de datos se compararon usando pruebas t desapareadas de dos colas. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron relevantes.

La rápida gelificación de la solución de HA-DTPH en condiciones fisiológicas presenta una posible utilidad para muchas aplicaciones biomédicas, por ejemplo, cicatrización de heridas, relleno de defectos, prevención de las adherencias post-quirúrgicas y encapsulación de células para la reparación de tejidos. Se atraparon fibroblastos murinos en un hidrogel de HA-DTPH de reticulación, y se examinaron las células encapsuladas tras 24 h y 96 h de cultivo. Las células viables, indicadas por fluorescencia verde sobre tinción con F-DA, fueron evidentes tras 96 h de cultivo. Se observó menos del 5 % de células muertas en forma de fluorescencia roja de la tinción con PI (datos no mostrados). A diferencia del cultivo bidimensional de los matraces, los fibroblastos del hidrogel mantuvieron una forma redonda. Además, se observaron grupos de células, así como células individuales, en el hidrogel.

Tras el cultivo *in vitro* durante 1, 2 y 3 días, se determinó el número de células viables que residían en el hidrogel mediante el ensayo de MTS (Kit de proliferación Cell-Titer 96, Promega, Madison, WI). Los resultados indicaron que las células proliferaron en hidrogel tras un cultivo de 2 y 3 días, y el número de células aumento aprox. un 15 % al tercer día, siendo significativo con $p < 0,05$ (Figura 6).

III. Hidrogeles de hialuronano reticulado con disulfuro-gelatina

Síntesis de HA tiolado y gelatina. Se preparó HA de bajo peso molecular (BPM) (PM_p 246 kDa, PM_n 120 kDa, índice de polidispersidad 1,97) mediante la degradación HA de alto peso molecular (1,5 MDa) en HCl diluido (pH aprox. 0,5) durante 24 h a 37 °C y 150 rpm. Se sintetizaron HA tiolado y gelatina por separado siguiendo un protocolo general descrito anteriormente para la modificación de HA y sulfato de condroitina (CS) (Figura 7). Por lo

tanto, se disolvieron 20 g de HA de BPM (50 mmol) o 20 g de gelatina en 2,0 l de agua, y luego se añadió DTP (11,9 g, 50 mmol para HA; 20 g de gelatina) mientras se agitaba. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 4,75 mediante la adición de HCl 1,0 N. A continuación, se añadió EDCI (4,8 g, 25 mmol para HA; 10 g de gelatina) en forma sólida. Se mantuvo el pH de cada mezcla de reacción a 4,75 mediante la adición de alícuotas de HCl 1,0 N. Se detuvo la reacción mediante la adición de NaOH 1,0 N para aumentar el pH a 7,0. Después, se añadieron 100 g de DTT (aprox. 650 mmol) en forma sólida y se aumentó el pH de la solución aún más hasta 8,5 mediante la adición de NaOH 1,0 N. Tras agitar durante 24 h a temperatura ambiente, se ajustó el pH de la mezcla de reacción a pH 3,5 mediante la adición de HCl 1,0 N. Se transfirió la solución acidificada a un tubo de diálisis (MWCO 3.500) y se sometió a diálisis exhaustivamente frente a una solución de HCl aprox. 0,3 mM (pH 3,5) que contenía NaCl 100 mM, seguido de la diálisis frente a HCl 0,3 mM (sin sal) a un pH de 3,5. Después, se aclaró la solución por centrifugación, y se liofilizó el sobrenadante. Se midieron la pureza del HA tiolado (HA-DTPH) y de la gelatina tiolada (gelatina-DTPH) mediante CPG y RMN de ^1H , y se determinaron el grado de sustitución (GS) y los tioles libres de la cadena lateral de HA-DTPH y gelatina-DTPH mediante RMN de ^1H y un método de Ellman modificado (Butterworth PHW, Baum H. y Porter J. W. "A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups". *Arch Biochem Biophys* 1967; 118: 716-723).

Determinación de pK_a . Se determinó el pK_a de los tioles en HA-DTPH y gelatina-DTPH espectrofotométricamente basándose en la absorción UV de los tiolatos según (Benesch R. y Benesch R. E., "Thiolation of protein", *Proc Nat Acad Sci*, EE.UU., 1958; 44:848-853; Lutolf M. P., Tirelli N., Cerritelli S., Cavalli L. y Hubbell J. A. "Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino acids". *Bioconjugate Chem* 2001; 12:1051-1056)). Se disolvieron soluciones de HA-DTPH y gelatina-DTPH (aprox. 5 mg de cada) en 100 ml de HCl 0,001 N que contenían NaCl 0,1 N (fuerza iónica estable). Se registraron exploraciones UV a 190-300 nm para soluciones recién preparadas.

Valoración turbidimétrica. Se examinaron las interacciones electrostáticas de HA-DTPH y gelatina-DTPH por valoración turbidimétrica (Shu X. Z., Zhu K. J., y Song W. "Novel pH-sensitive citrate crosslinked chitosan film for drug controlled release". *Int J Pharm* 2001; 212:19-28; Park J. M., Muhoberac B. B., Dubin P. L. y Xia J. "Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation". *Macromolecules* 1992; 25:290-295). Se preparó una solución de 1,0 mg/ml bien de HA-DTPH o de HA de BPM y 1,0 mg/ml bien de gelatina-DTPH o gelatina no modificada a pH 1,5, y se añadieron alícuotas de una solución madre de NaCl para ajustar la fuerza iónica. Se administró titrante (NaOH 0,01-0,2 N) usando un microbureta a la solución con agitación suave a 30 más/menos 0,5 °C, y se controló el pH mediante un medidor digital de pH con una precisión de más/menos 0,01. Se monitorizaron los cambios de turbidez a 420 nm con un espectrofotómetro UV-Vis y se presentaron como % de (100-T), que es linealmente proporcional a las mediciones de turbidez verdaderas cuando $T > 0,9$. El intervalo de tiempo entre las mediciones de turbidez fue de aprox. 4 min.

A continuación, se disolvieron HA-DTPH y gelatina-DTPH en PBS 0,02 M (pH 6,5), dando soluciones al 3,0 % (p/v). Se ajustó el pH de cada solución a 7,4 mediante la adición de NaOH 1,0 N, y luego se mezclaron las soluciones de acuerdo con la proporción en volumen de HA-DTPH:gelatina-DTPH de 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100. En diferentes momentos, se monitorizó la transmitancia de las soluciones a 550 nm.

La valoración turbidimétrica reveló que hubo interacción iónica entre el HA de BPM y la gelatina, con la formación de un complejo de polielectrolito en el intervalo de pH 2,3-5,0, donde el HA se cargó negativamente, mientras que la gelatina (tipo B, $\text{pI} = 4,9$) se cargó positivamente (datos no mostrados). Se evaluó este fenómeno para los derivados tiolados de HA y gelatina, que todavía tenían numerosos carboxilatos sin modificar (1,58 mmol/g para HA-DTPH, 0,65 mmol/g de gelatina-DTPH) y grupos de amina (0,35 mmol/g para gelatina-DTPH). La valoración turbidimétrica indicó que se produjeron interacciones electrostáticas similares en las soluciones mixtas de HA-DTPH y gelatina-DTPH, pero en una región de pH más amplia debido al cambio a mayor pI para gelatina-DTPH, que produjo una conversión del > 40 % de los carboxilatos a tioles.

Se disolvieron HA-DTPH y gelatina-DTPH en PBS 0,02 M, y se ajustó el pH a 7,4, dando soluciones transparentes. Cuando se mezclaron, las soluciones que contenían diversas proporciones de HA-DTPH y gelatina-DTPH se volvieron translúcidas, e inmediatamente se produjo una separación de fases debido a sus interacciones electrostáticas (Figura 8). Este efecto impidió la fabricación de películas de hidrogel transparentes, homogéneas, a partir de mezclas de HA-DTPH y gelatina-DTPH. Para superar la formación de complejos de polielectrolito, se aumentó la fuerza iónica de las soluciones para enmascarar la unión electrostática. De hecho, la valoración turbidimétrica reveló que esta unión fue completamente impedida por NaCl al 3,0 % (p/v) (datos no mostrados). Sin embargo, esta alta concentración de sal alteró la formación de la película y dio lugar a una película inaceptablemente frágil. Por lo tanto, se añadió NaCl al 1,0 % (p/v) a la solución de HA-DTPH y gelatina-DTPH para permitir la formación de soluciones transparentes a proporciones de HA-DTPH con respecto a gelatina-DTPH de 80:20, 60:40, 40:60 y 20:80. Sin se produjo una separación de fases en 2 h (Figura 8), aunque tras 24 h, estas soluciones mezcladas también se volvieron opacas, indicando la persistencia de las interacciones electrostáticas entre estos dos macromonómeros.

Preparación de películas de hidrogel de HA-gelatina reticuladas mediante un puente disulfuro. Se disolvieron por separado HA-DTPH y gelatina-DTPH (3,0 g de cada) en 100 ml de tampón de PBS 20 mM (pH 6,5) que contenía

NaCl al 1,0 % (p/v), y después se ajustó el pH de cada solución a 7,4 mediante la adición de NaOH 1,0 N. Entonces, se combinaron las soluciones de HA-DTPH y gelatina-DTPH en proporciones en volumen de 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100, y se mezclan bien mediante agitación suave. Se vertieron las soluciones mixtas (30 ml) en placas de Petri de 9 cm y se dejaron reticular en aire y secar a temperatura ambiente. Tras 3 días, se obtuvieron películas reticuladas en aire y se cortaron en discos de diámetro 6, 8 o 1,6 mm. A continuación, se oxidaron adicionalmente los discos de película por inmersión en 1 h. Luego se enjuagaron los discos de película con agua destilada, y se secaron a presión y temperatura ambiente durante un día, y después a 0,13 kPa durante una semana.

Basándose en los resultados anteriores, se usó NaCl al 1,0 % para proteger la interacción electrostática entre HA-DTPH y gelatina-DTPH durante la formación de las películas y la reticulación. Las películas de hidrogel mezcladas se obtuvieron mediante el vertido de 30 ml de soluciones mixtas de HA-DTPH y gelatina-DTPH que contenían NaCl al 1,0 % (p/v) en placas petri de 9 cm. La oxidación en aire y el secado a temperatura ambiente produjeron películas reticuladas por disulfuro. La densidad de reticulación en estas películas se aumentó por la oxidación adicional con H₂O₂ al 1,0 % (p/v); las películas se enjuagaron y se secaron al vacío.

Se determinó el contenido de disulfuro de las películas de hidrogel de HA-gelatina mediante NTSB tras la hidrólisis ácida exhaustiva (Figura 9). De acuerdo con los resultados anteriores (Nicolas F. L. y Gagnieu C. H. "Denatured thiolated collagen II. Crosslinking by oxidation". *Biomaterials* 1997; 18:815-821), solo se oxidó el 25-50 % de los tioles en disulfuros. Dado que no se detectaron tioles libres mediante DTNB (Ellman G. L. "A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans". *Arch Biochem Biophys* 1958; 74:443-450), esto indicó que los otros tioles se oxidaron por H₂O₂ en ácidos sulfínico, sulfénico o sulfónico oxidados por S que no serían detectados usando NTSB y DTNB (Capozzi G. y Modena G. "Oxidation of thiol" en: Patai S., editor. "The Chemistry of the Thiol Group Part II". Nueva York: Wiley, 1974, pág. 785-839). Sin embargo, en contraste con solo el HA tiolado, se observó una alta proporción de reticulación por disulfuro en la película de gelatina-DTPH, a pesar de la acidez inferior de los tioles. Claramente, los factores adicionales, tales como la conformación más flexible de la gelatina modificada y la cadena lateral que contiene tiol más larga y más móvil, podrían facilitar la formación de disulfuro. Para el HA de polisacárido lineal más rígido, se formó aprox. un 25 % de los enlaces disulfuro teóricos en la película de hidrogel de HA-DTPH; sin embargo, se formó más del 50 % de los enlaces disulfuro teóricos en la película de hidrogel de gelatina-DTPH. Por lo tanto, a pesar de que la concentración de tiol en HA-DTPH (0,768 mmol/g) es superior a la de gelatina-DTPH (0,512 mmol/g), se encontró un contenido de disulfuro significativamente mayor para la película de gelatina-DTPH (0,123 mmol/g) con respecto a la película de HA-DTPH (0,100 mmol) ($p < 0,02$). La atracción electrostática entre HA-DTPH y gelatina-DTPH también facilitó la formación de disulfuro; las películas mezcladas tuvieron más enlaces disulfuro que la película de HA-DTPH ($p < 0,01$, a excepción de HA-DTPH:gelatina DTPH de 80:20). La densidad de disulfuros de las películas con una proporción de HA-DTPH:gelatina-DTPH de 40:60 (0,136 mmol/g.) y 20:80 (0,145 mmol/g) fue incluso superior a la de película de gelatina-DTPH (0,123 mmol/g) ($p < 0,01$).

Determinación del hinchamiento. Se pesaron discos de película con un diámetro de 6 mm (Pd), se sumergieron en viales de vidrio que contenían 10 ml de PBS (pH 7,4) y se introdujeron en una incubadora a 37 °C, 300 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados, se pesaron las películas húmedas (Pt) inmediatamente después de eliminar el agua superficial mediante transferencia brevemente entre dos piezas de papel de filtro. La proporción de hinchamiento (R) se definió como Pt/Pd.

En la Figura 10, se muestra la proporción de hinchamiento en equilibrio de las películas de hidrogel en PBS. Con el aumento de los porcentajes de gelatina-DTPH, la proporción de hinchamiento disminuyó de 3,27 a 2,33. Esta proporción se determina solo por la densidad de reticulación, pero también está relacionada con las propiedades de volumen de las películas.

Una de las desventajas de muchos biomateriales a base de HA y gelatina es la rápida degradación *in vivo*. Por lo tanto, se buscó la optimización de las propiedades mecánicas y de la velocidad de degradación por la correticulación del HA y de la gelatina. Esta estrategia resultó ser eficaz. Las pruebas preliminares demostraron que los hidrogeles de HA-DTPH-disulfuro reticulado se degradan lentamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que se podía controlar la velocidad de degradación modificando la densidad de reticulación de disulfuro. Por lo tanto, se encontró una pérdida de peso del aproximadamente 30 % de la película de hidrogel de HA-DTPH tras 42 días de la implantación *in vivo* en ratones (datos no presentados). Con una concentración muy alta de HAsa (300 U/ml) *in vitro*, solo se observó una pérdida de peso del aprox. 8 % de la película de hidrogel de HA-DTPH en 48 h (datos no mostrados). Por otra parte, con la misma concentración de enzima (300 U/ml de colagenasa), en 48 h, se digirió aprox. un 62 % de película de hidrogel de gelatina-DTPH (datos no mostrados). La rápida degradación de los biomateriales a base de gelatina podría limitar su uso en muchas aplicaciones biomédicas (Nicolas F. L. y Gagnieu C. H., "Denatured thiolated collagen II. Crosslinking by oxidation". *Biomaterials* 1997; 18:815-821).

Determinación del contenido de disulfuro. Se degradaron discos de película con un diámetro de 6 mm por hidrólisis ácida (HCl 0,1 N, 37 °C, 150 rpm durante 10 días). Se midió el contenido de azufre total (S-S + SH) usando 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB) (Thannhauser T. W., Konishi Y. y Scheraga de H. A. "Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins". *Methods In Enzymology* 1987;143: 115-119), y se midió el contenido de tiol libre mediante

el método de Ellman (Ellman G. L. "A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans". *Arch Biochem Biophys* 1958; 74:443-450). El contenido de disulfuro, equivalente a la densidad de reticulación, se calculó como la diferencia entre el contenido de azufre total y el contenido de tiol libre.

5 **Degradación *in vitro* de la película de hidrogel de HA-gelatina.** Se realizó la degradación de las películas de HA-gelatina reticuladas con disulfuro usando colagenasa y HASa. Se incubaron discos de película con un diámetro de 8 mm en una botella de vidrio que contenía 3 ml de medio con 300 U/ml de colagenasa o HASa, y se colocaron en una incubadora a 37 °C, 150 rpm. El medio se cambió cada dos días. A intervalos predeterminados, se lavaron las películas cinco veces con agua destilada y se secaron al vacío. El tampón usado para la colagenasa fue tampón
10 Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) que contenía CaCl₂ 5 mM y 0,05 mg/ml de azida de sodio (Choi Y. S., Hong S. R., Lee Y. M., Song K. W., Park M. H. y Nam Y. S., "Studies on gelatin-containing artificial skin:II preparation and characterization of crosslinked gelatin-hyaluronate sponge". *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1999; 48:631-639). Las digestiones con HASa se realizaron en ácido cítrico 30 mM, Na₂HPO₄ 150 mM, NaCl 150 mM (pH 6,3) (Bulpitt P y Aeschlimann D. "New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels". *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 152-169).
15 Para la digestión simultánea con colagenasa y HASa, el tampón usado fue Tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) que contenía CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM y 0,05 mg/ml de azida de sodio. La fracción de pérdida de peso se determinó como (1-Pt/P0), donde Wt es el peso de la película seca en el punto temporal t y P0 es el peso original de la película seca.

20 La mezcla de HA-DTPH con la gelatina-DTPH en películas disminuyó significativamente la digestión por la colagenasa. Por lo tanto, con 300 U/ml de colagenasa, películas de HA-gelatina (gelatina al 80 % o 60 %), la pérdida de peso en dos días fue solo del 15 % y 2 %, respectivamente (Figura 11a y 11b). Estas películas también resultaron ser más resistentes a la digestión por HASa que las películas de HA-DTPH, con una pérdida de peso inferior al 5 %
25 en 300 U/ml de HASa durante dos días (Figura 11a y 11b). Con tanto HASa como colagenasa presentes, se aceleró la degradación de la película de HA-gelatina. Por ejemplo, la pérdida de peso tras 7 días para una película de HA-gelatina (gelatina al 60 %) fue del 18 % con 300 U/ml de colagenasa y del 5 % con HASa; con ambas enzimas combinadas, la pérdida de peso fue tan alta como del 50 % (Figura 11b).

30 **Crecimiento celular en la superficie de las películas de hidrogel.** Se evaluó el crecimiento de fibroblastos 3T3 murinos de Balb/c (ATCC) sobre la película de hidrogel HA/gelatina reticulada con disulfuro. Se cultivaron las células en medio Eagle modificado (DMEM, GIBCO) suplementado con suero de ternero recién nacido al 10 % (GIBCO), Pen-Strep, L-glutamina y bicarbonato de sodio. Se trataron los fibroblastos con tripsina en el estado de crecimiento logarítmico y se sembraron de manera uniforme sobre las superficies de hidrogel a aprox. 5000 o 25.000
35 células/cm².

Viabilidad celular. Se realizó un ensayo de viabilidad de fluorescencia *in situ* con diacetato de fluoresceína (F-DA, Molecular Probes, Eugene, OR) para evaluar la viabilidad de las células sobre la superficie del hidrogel. Se preparó una solución de 5 mg/ml de F-DA en acetona y se diluyó a 0,02 mg/ml en PBS. Tras 24 h de cultivo *in vitro* en una
40 incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C (se sembraron inicialmente 25.000 células/cm²), se lavaron las películas de hidrogel con PBS dos veces para eliminar las células no unidas y, a continuación, se sumergieron en solución de F-DA diluida durante 3 min a temperatura ambiente, para lavar después en PBS durante 5 min. Se observó fluorescencia en las células vivas con un microscopio Nikon TS 100 (Nikon, Melville, NY) con filtro DAPI, y se registraron fotomicrografías de la unión y la difusión de las células.

45 Se sembraron fibroblastos 3T3 de Balb/c en la superficie de las películas de HA-gelatina de diferentes composiciones y se cultivaron *in vitro* durante 24 h y, a continuación, se tiñeron las células vivas con F-DA para dar fluorescencia verde. Un estudio morfológico reveló que solo un número muy pequeño de células con forma esférica se había unido a la superficie de la película de hidrogel de HA-DTPH que carecía de un componente proteico (Figura 12a). La adición de gelatina-DTPH mejoró significativamente la unión de las células (Figura 12b-12d), incluso en un 20 % (p/v). A concentraciones de gelatina del 40 % y superiores, la mayoría de las células adoptó una morfología en forma de huso y se extendió uniformemente sobre la superficie del hidrogel (Figura 12b-12d).

Proliferación celular. Se sembraron las superficies de los discos de película de 2 cm² con 5.000 células/cm². Tras 24 y 72 h de incubación sin cambiar el medio de cultivo celular, se evaluó el número de células mediante la reducción metabólica de MTT en un colorante de formazano de color por las células viables. Por lo tanto, se añadieron partes alícuotas estériles de una solución madre de 5 mg/ml de MTT en PBS a una proporción de 60 l por
50 cada 500 l de medio a cada disco de película (2 cm²) y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Entonces, se desechó el medio, y se incubó cada disco de película en 1,0 ml de DMSO para lisar las células y disolver los colorantes. Se usaron discos de película libres de células como blanco. A continuación, se transfirieron 200 µl de cada solución de DMSO a una placa de 96 pocillos y se registró la absorción a 550 nm en un lector de microplacas OPTI Max.

60 Usando poliestireno de calidad de cultivo celular como control, se evaluó la proliferación de fibroblastos 3T3 Balb/c sobre la superficie del hidrogel. Se sembraron las células inicialmente a una densidad de 5.000 células/cm², y se cultivaron *in vitro* durante uno y tres días, y luego se determinó el número de células mediante el ensayo de MTT. El número de células en el poliestireno de cultivo celular tras un día de cultivo se definió como 1,0, y calculó la
65

densidad celular relativa. La Figura 13 muestra que mientras que las células en la superficie de hidrogel de HA-DTPH no proliferaron, al aumentar el porcentaje de gelatina en las películas, se generó una aceleración de la proliferación celular. Tras tres días de cultivo *in vitro*, el número de células en la superficie del hidrogel con un porcentaje de gelatina superior al 60 % (p/v) fue superior a un 50 % del control de poliestireno, mientras que el número de células en la superficie del hidrogel de gelatina-DTPH fue de un 85 % del control.

Análisis estadístico. Los conjuntos de datos se compararon mediante pruebas t desapareadas de dos colas; los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

10 IV. Preparación de hidrogeles a través de la adición de Michael

Síntesis de HA tiolado y gelatina tiolada. Se usó HA de bajo peso molecular (BPM) (PM_p 246 kDa, PM_n 120 kDa, índice de polidispersidad 1,97) tras la degradación HA de alto peso molecular (1,5 MDa) en HCl diluido (pH 0,5) durante 24 h a 37 °C y 150 rpm. Se sintetizaron HA tiolado (HA-DTPH y HA-DTBH) y gelatina tiolada (gelatina-DTPH y gelatina-DTBH) como se ha descrito anteriormente. El grado de sustitución (GS), es decir, la fracción de carboxilatos modificados, se calculó a partir del espectro de RMN de 1H integrado.

Síntesis de electrófilos de PEG homobifuncionales

20 Se sintetizaron diacrilato de PEG (PEGDA), dimetacrilato de PEG (PEGDM), diacrilamida de PEG (PEGDAA) y dimetacrilamida de PEG (PEGDMA) a partir de PEG (PM_p 3.400 KDa, Aldrich) o diamina de PEG (PM_p 3.400, Shearwater Polymers) como se ha descrito con modificaciones menores. En síntesis: se sometió PEG (o diamina de PEG) de peso molecular 3.400 (10 g, 5,88 mmol de grupo funcional) a destilación azeotrópica con 400 ml de tolueno en atmósfera de argón, eliminando aprox. 100 ml de tolueno. Se enfrió la solución anhidra hasta la temperatura ambiente en atmósfera de argón y después se enfrió en un baño de hielo. Se añadió diclorometano anhidro (Aldrich) (aprox. 50 ml) hasta que la solución se volvió transparente. Se añadió trietilamina (1,23 ml, 8,82 mmol, Aldrich) gota a gota con agitación, seguida de la adición gota a gota de 0,72 ml de cloruro de acrilato (8,82 mmol, Aldrich) o 0,85 ml de cloruro de metacrilato (8,82 mmol, Aldrich). Se agitó la reacción a oscuras, durante una noche en atmósfera de argón. A continuación, se filtraron las soluciones al vacío hasta que se volvieron transparentes, y se hizo precipitar el producto en éter dietílico, se recogió por filtración y se secó al vacío. A continuación, se disolvieron 10 g del producto en 10 ml de agua destilada, añadiendo 5 g de NaCl (el pH se ajustó a 6). Luego se extrajeron los derivados 3 veces con diclorometano, y se hicieron precipitar en éter dietílico, se recogieron por filtración y se secaron al vacío. Diacrilato de PEG: rendimiento del 75 %. RMN de 1H ($DCCl_3$): 3,6 ppm (303,5 H, PEG), 4,3 ppm (t, 4 H, $-CH_2-CH_2-O-CO-CH=CH_2$), 5,8 ppm (dd, 2H, $CH_2=CH-COO$), 6,1 ppm, 6,4 ppm (dd, 4 H, $CH_2=CH-COO$). Grado de sustitución del 95 %. Dimetacrilato de PEG: rendimiento del 60 %. RMN de 1H ($DCCl_3$): 2,3 ppm (s, 6 H, $CH_2=C(CH_3)-COO$), 3,6 ppm (303,5 H, PEG), 4,3 ppm (t, 4H, $-CH_2-CH_2-O-CO-C(CH_3)=CH_2$), 5,8 ppm, 6,1 ppm (d, 4 H, $CH_2=C(CH_3)-COO$). Grado de sustitución del 91 %. Diacrilamida de PEG: rendimiento del 75 %. RMN de 1H ($DCCl_3$): 3,6 ppm (304,4 H, PEG), 5,6 ppm (dd, 2 H, $CH_2=CH-CON$), 6,1 ppm y 6,3 ppm (dd, 4 H, $CH_2=CH-COO$). Grado de sustitución del 100 %. Dimetacrilamida de PEG: rendimiento del 71 %. RMN de 1H ($DCCl_3$): 2 ppm (s, 6 H, $CH_2=C(CH_3)-CON$), 3,6 ppm (304,4 H, PEG), 5,3 ppm, 5,8 ppm (d, 4 H, $CH_2=C(CH_3)-CON$). Grado de sustitución del 100 %.

Adición conjugada. Primero se evaluó la reactividad relativa de la adición conjugada de ésteres α,β -insaturados y amidas de poli(etilenglicol) a tioles usando cisteína como modelo. La adición conjugada de cisteína a cada una de las cuatro especies de electrófilos se muestra en la Figura 15. Se disolvieron cisteína (2,5 mg) y diacrilato de PEG (PEGDA), dimetacrilato de PEG (Pedma), diacrilamida de PEG (PEGDAA) o dimetacrilamida de PEG (PEGDMA) en 5 ml de PBS 0,1 N, pH 7,4 (proporción de doble enlace/SH 2/1). Luego, se monitorizó el consumo de tioles por DTNB (Ellman) o NTSB (Thannhauser). A continuación, se evaluó la adición conjugada de tioles con diferente reactividad (es decir, diferentes valores de pKa) usando el acrilato de PEG monofuncional de PM_p 375 como compuesto modelo. Se disolvieron HA-DTPH o HA-DTBH (10 mg) en 5 ml de PBS 0,1 N, pH 7,4, y luego se añadió acrilato de PEG (doble enlace:tiol = 10: 1). Se monitorizó el consumo de tioles libres usando DTNB (Ellman, Thannhauser).

Preparación de hidrogel. Se disolvieron HA tiolado y/o gelatina tiolada en medio de cultivo celular, dando solución al 1,25 % (p/v), y se ajustó el pH a 7,4. Se sintetizaron dos derivados de éster α,β -insaturados y dos derivados de amida α,β -insaturados de PEG, y se usaron para reticular HA tiolado y gelatina (Figura 14). Se disolvió cada uno de los cuatro derivados de PEG (PEGDA, PEGDM, PEGDAA y PEGDMA) en PBS, dando solución madre al 4,5 % (p/v). Entonces, se añadió 1 ml de la solución madre de PEG reactiva en una porción a 4 ml del HA tiolado, solución de gelatina tiolada o una mezcla de los dos componentes, y se mezcló durante 30 segundos. La formación del gel se produjo en un período de 10 min (PEGDA) a varios días (PEGDMA), dependiendo el tiempo en la estructura del derivado de PEG reactivo. La adición conjugada de HA-DTPH a un monoacrilato de PEG de bajo peso molecular fue ligeramente más rápida que con el HA-DTBH menos reactivo (Figura 16).

Determinación de la eficacia de reticulación

Se evaluó en detalle la reticulación para ambos derivados de HA tiolados con PEGDA como agente de reticulación homobifuncional. Tras 1 h, se habían gelificado por completo una mezcla de cada HA tiolado (HA-DTPH y HA-DTBH) y PEGDA. A continuación, se incubaron los hidrogeles resultantes en medio (pH 4,5 o 1,0) para inactivar la adición de reticulación, y se determinó la eficacia de reticulación midiendo el electrófilo de PEG libre restante y los tioles libres restantes, y realizando los cálculos indicados más adelante.

En primer lugar, se determinó la cantidad de PEGDA libre del hidrogel mediante CPG con una monitorización del eluyente a 233 nm. En síntesis, se trituró el hidrogel (0,1 ml) en pequeñas partículas y se suspendió en 2 ml de tampón de acetato 0,1 M (pH 4,5). Tras agitar durante 4 h a temperatura ambiente, se determinó la cantidad de derivados de PEG residual usando una curva de calibración estándar. No se detectó HA tiolado libre por CPG a 210 nm.

A continuación, se determinaron los tioles libres del hidrogel usando el ensayo bien de DTNB o de NTSB. En síntesis, se suspendió un fragmento de 0,05 ml de hidrogel en 0,5 ml de solución de HCl 0,1 N. Tras 48 h a temperatura ambiente con agitación a 150 rpm, el hidrogel se había dissociado. A continuación, se añadieron 2,0 ml de reactivo bien de NTSB o de DTNB a cada gel, y se determinó el número de tioles libres del hidrogel espectrofotométricamente a 412 nm. Se usaron soluciones de HA tiolado solo como materiales de referencia, siendo insignificante la formación de disulfuro durante la preparación del hidrogel (1 h) en atmósfera de nitrógeno.

El grado de reticulación eficaz (es decir, de anclaje de dos extremos), los grupos de doble enlace colgantes sin reaccionar durante la reacción de acoplamiento (es decir, anclaje de un solo extremo), se calculó a partir del PEGDA total usado (A), el PEGDA sin reaccionar (B), los tioles totales (C) y los tioles libres del hidrogel (D). El anclaje de un solo extremo es igual a los tioles teóricos consumidos (2(A-B)) menos los tioles realmente consumidos (C-D). La resta del anclaje de un solo extremo a los tioles consumidos medidos experimentalmente (C-D) revela el grado de anclaje de dos extremos. La Tabla 3 muestra las eficacias de reticulación, y la Tabla 4 muestra las densidades de reticulación, las proporciones de hinchamiento de equilibrio y los tiempos de gelificación para los geles obtenidos mediante la reacción de HA-DTPH y HA-DTBH.

Tabla 3. Eficacia de reticulación de PEGDA a HA-DTPH y HA-DTBH

	Proporción molar de tioles con respecto a dobles enlaces	Eficacia de reticulación (%) de PEGDA		
		Anclaje de dos extremos	Anclaje de un solo extremo	Sin reaccionar
HA-DTPH:PEGDA	1:1	76,2	9,7	14,1
	2:1	93,7	6,3	0
	3:1	100,0	0	0
HA-DTBH:PEGDA	1:1	48,3	19,3	32,4
	2:1	60,0	12,7	27,3
	3:1	73,8	8,3	17,9

Tabla 4. Densidad de reticulación, proporción de hinchamiento de equilibrio (Q) y tiempo de gelificación para los geles preparados usando PEGDA (PM_w 3.400) con HA-DTPH y HA-DTBH

	Proporción molar de tioles con respecto a dobles enlaces	Densidad de reticulación (mmol/ml)*	Proporción de hinchamiento (Q)	Tiempo de gelificación (min)
HA-DTPH:PEGDA	1:1	8,1	39,41 ± 0,34	5
	2:1	5,0	46,15 ± 0,38	9
	3:1	3,5	61,06 ± 0,89	19
HA-DTBH:PEGDA	1:1	5,1	58,14 ± 0,94	11
	2:1	3,2	69,33 ± 2,94	19
	3:1	2,6	84,62 ± 1,98	31

*La densidad de reticulación se definió como el número de sitios de reticulación eficaz en 1 ml de hidrogel

Determinación del hinchamiento

Se introdujeron los hidrogeles en tampón de PBS a 37 °C durante 48 h y se cambió el medio con frecuencia. La proporción de hinchamiento (Q) se definió como una proporción del peso del gel hinchado con respecto al peso del gel seco. El peso de los geles secos se determinó lavando el hidrogel con agua destilada 5 veces y luego secando el gel al vacío (0,13 kPa) a temperatura ambiente durante 3 días.

Degradación del hidrogel. Se prepararon discos de hidrogel (0,5 ml) a partir de HA-DTPH y PEGDA como se ha descrito anteriormente mediante la reticulación en el fondo de un vial de 6 mm de diámetro. Se prepararon soluciones de hialuronidasa (HAsa) (0, 50, 150 y 250 U/ml) en ácido cítrico 30 mM, Na₂HPO₄ 150 mM, NaCl 150 mM (pH 6,3); se añadieron 5 ml de solución de enzima a cada vial que contenía el hidrogel, y se incubaron los viales a 37 °C con agitación orbital a 150 rpm. La degradación del gel determinó a partir de la liberación de ácido glucurónico en el sobrenadante medida mediante el ensayo de carbazol (Bitter T. y Muir H. "A modified uronic acid carbazole reaction". *Anal. Biochem.* 1962; 4:330-334). La Figura 17 muestra la digestión de un hidrogel de HA-DTPH/-PEGDA por HAsa, mostrando que a concentraciones más bajas de enzima, el gel permanece en gran parte intacto durante varios días *in vitro*.

Cultivos celulares *in vitro*

Preparación de materiales compuestos de fibroblastos T31 e hidrogel de HA-DTPH/diacrilato de PEG. Se preparó solución de HA-DTPH (1,25 % (p/v)) disolviendo HA-DTPH liofilizado (GS = 42 %) en medio de DMEM/F-12 completo, se ajustó el pH = 7,4~7,5 con NaOH 1,0 N, y se esterilizó por filtración con filtro de jeringa de 0,45 µm. A continuación, se preparó una solución de PEGDA al 4,5 % disolviendo PEGDA en tampón de PBS y se esterilizó por filtración con filtro de jeringa de 0,45 µm. Entonces, se suspendieron fibroblastos faríngeos humanos T31, que habían sido cultivados en matraces triples (175 cm²) y digeridos con tripsina usando tripsina estéril al 0,25 % en EDTA al 0,05 %, en solución recién preparada de HA-DTPH a una concentración de 10⁶ células/ml. A cuatro volúmenes de la suspensión celular, se añadió un volumen de la solución madre de PEGDA, y se agitó la mezcla con suavemente con movimientos vorticiales. A continuación, se vertieron 300 µl de la mezcla de la mezcla de HA-DTPH-PEGDA sembrados con fibroblastos en cada pocillo de una placa de 12 pocillos y se dejó que se gelificara (1 h). Finalmente, se añadió medio de DMEM/F-12 completo a cada pocillo y se incubó la placa durante a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada tres días sin dañar el gel. Los hidrogeles sembrados se usaron para determinar la viabilidad y la proliferación celular *in vitro* y para el trasplante *in vivo* en ratones atímicos para la generación de tejido fibroso.

Viabilidad y proliferación celular. La viabilidad se determinó con métodos de tinción vivo-muerto en el día 6 y el día 28 del cultivo *in vitro*. En cada punto temporal, se enjuagaron dos veces cuatro hidrogeles de HA-DTPH-PEGDA sembrados con fibroblastos con tampón de PBS, se tiñeron durante 3 min con diacetato de fluoresceína (F-DA, 0,02 mg/ml) y yoduro de propidio (PI, 0,2 µg/ml) a temperatura ambiente, se enjuagaron dos veces con tampón de PBS, se almacenaron en hielo y se observaron usando un microscopio confocal. La densidad de células vivas en el gel se demostró mediante tinción de fluorescencia *in situ*, y aumentó en gran medida tras 28 días de cultivo *in vitro* en comparación con el de 6 días. No se encontraron células muertas como se demuestra por la ausencia de tinción con PI. La Figura 18 muestra la viabilidad tras 28 días de cultivo *in vitro*.

La proliferación celular se determinó en el día 0, 3, 6, 14 y 28. En cada punto temporal, se transfirieron cuatro hidrogeles de HA-DTPH-PEGDA sembrados con fibroblastos a cada pocillo de una placa de 12 pocillos, y se enjuagaron dos veces con tampón de PBS. A continuación, se añadieron 900 µl de medio de DMEM/F-12 con suero de ternero recién nacido al 5 % y 180 µl de Kit de Proliferación CellTiter 96 (Promega, Madison, WI) a cada pocillo de una placa de 12 pocillos. Tras 2 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 % en un agitador orbital, se transfirieron 125 µl de la solución a cada uno de seis pocillos de una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia (λ = 550 nm) usando un lector de microplacas OPTI Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se convirtió en el número de células basándose en una curva estándar. El número de fibroblastos del hidrogel de HA-DTPH-PEGDA aumentó casi diez veces tras 28 días de cultivo *in vitro* (Figura 19).

Tipificación del colágeno

En cada punto temporal (días 0, 3, 6, 14 y 28), se picaron cuatro hidrogeles de HA-DTPH-PEGDA sembrados con fibroblastos con agujas de calibre 22, se digirieron en bromuro de cianógeno al 5 % (CNBr, Sigma) en ácido fórmico al 70 % (Sigma) durante 8 horas a 35 °C, se diluyeron con el mismo volumen de agua destilada y se liofilizaron durante una noche. Se disolvieron las muestras liofilizadas en tampón de PBS y se leyeron con un espectrofotómetro Cary 3E (Varian, Inc., Walnut Creek, CA) a 280 nm para determinar la concentración de proteína. Se añadió tampón de muestra que contenía β-mercaptoetanol (50 µg de muestra por cada 20 µl de tampón de muestra) y se separaron alícuotas en un PAGE/SDS al 10 % a 80 V durante 8 h más 300 v durante 3 h. Se tiñó el gel con plata y se analizaron los fragmentos de péptidos de colágeno en comparación con los fragmentos de colágeno de tipo I estándar. La tipificación del colágeno de estos cultivos de fibroblastos mostró que, incluso tras 28 días de cultivo *in vitro*, las células retuvieron el mismo fenotipo que se caracteriza por la producción de colágeno de tipo I.

Implantación *in vivo* de hidrogeles sembrados con fibroblastos. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se criaron ratones atímicos macho (n = 12) (Simonsen Laboratories Inc., Gilroy, CA), 4-6 semanas de vida, en el Centro de Recursos Animales de la Universidad de Utah. Bajo anestesia, se implantaron cuatro hidrogeles de HA-DTPH-PEGDA sembrados con fibroblastos bilateralmente en bolsas subcutáneas preparadas quirúrgicamente en la espalda de

ratones atímicos. Estos sirvieron como grupo experimental, incluyendo 24 implantes en 6 ratones atímicos, siguiendo un protocolo aprobado por el Comité IACUC. Seis ratones atímicos más recibieron 24 hidrogeles de HA-DTPH-PEGDA no cargados con células como grupo de control. En cada punto temporal (2, 4 y 8 semanas después de la implantación), se sacrificaron cuatro ratones atímicos (dos experimentales y dos controles), y se diseccionaron las muestras para realizar una evaluación macrográfica e inmunohistoquímica (anti-fibronectina).

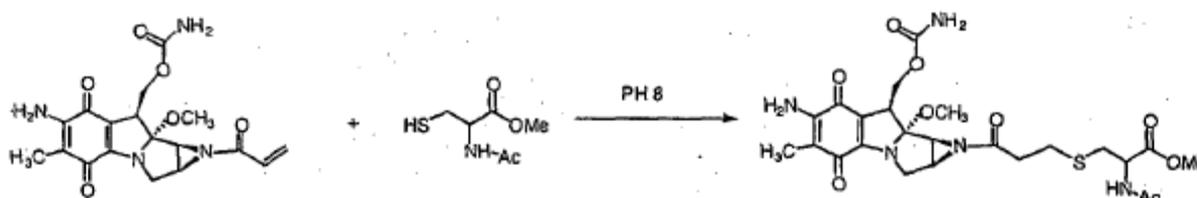
Tras la eliminación de los ratones, los explantes aparecieron más opalescentes y elásticos con el aumento del tiempo de implantación, lo que sugirió un aumento de la densidad celular (Figura 20). Se confirmó el examen macroscópico por histología (Figura 21), mediante la tinción para la producción de fibronectina. En los controles, tras 8 semanas de la implantación en ratones atímicos, no se formó nuevo tejido fibroso. En los experimentos, se observó poco nuevo tejido fibroso, probablemente debido a que la densidad celular para la siembra inicial era demasiado baja, y se añadieron factores de unión y proliferación celular al gel implantado. Burdick y Anseth (Burdick J. A. y Anseth K. S. "Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogel for bone tissue engineering." *Biomaterials* 2002; 23:4315-4323) fotoencapsularon osteoblastos en un hidrogel de PEG modificado con RGD inyectable para ingeniería de tejido óseo. Sin embargo, el número de células disminuyó tras dos semanas de cultivo *in vitro*. En el presente caso, los fibroblastos T31 aumentaron diez veces tras 28 días en cultivo *in vitro*, lo que indicó que el hidrogel inyectable descrito en el presente documento era un excelente candidato para la regeneración de tejidos.

V. Preparación de películas de hidrogel de mitomicina C

Síntesis de acrilato de MMC. Se disolvió mitomicina C (2 mg) en 10 ml de cloruro de metileno seco, y se añadieron 1,7 μ l de TEA y 1 μ l de cloruro de acrilóilo destilado consecutivamente (Figura 22). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas, después se concentró y se purificó mediante una columna de sílice (cloruro de metileno:metanol = 20:1). El rendimiento fue de 1,78 mg. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD- d_3): δ 6,31 (dd, J = 2, J = 10, 2'-H), 5,82 (dd, J = 10, J = 2,4, 1H, 3'-H), 5,48 (d, J = 0,8, 1H, 3'-H), 4,81 (dd, oscurecido por MeOH, 1H, 10-H), 4,49 (d, J = 13, 1H, 3-H), 3,93 (t, J = 11, 1H, 3-H), 3,67 (d, J = 4,4, 1H, 10-H), 3,64 (d, J = 4,8, 1H, 9-H), 3,51 (d, J = 12, 1H, 1-H), 3,48 (dd, J = 1,2, J = 4,8, 1H, 2-H), 3,24 (s, 3H, 9a-OCH $_3$), 1,75 (s, 3H, 6-CH $_3$). RMN de ^{13}C (400 MHz, MeOD- d_3): δ 177,7 (C-1'), 176,1 (C-5), 176,0 (C-8), 158,4 (CONH $_2$), 155,4 (C-4a), 149,7 (C-7), 130,4 (C-2'), 129,4 (C-3'), 109,9 (C-8a), 106,0 (C-9a), 103,8 (C-6), 61,5 (C-10), 53,6 (C-9), 49,0 (9a-OCH $_3$), 48,9 (C-3), 42,3 (C-1), 40,9 (C-2), 6,9 (6-CH $_3$).

Preparación de MMC-HA

Modelo de la reacción de acrilato de MMC con el grupo tiol:



El tiempo de reacción del conjugado de acrilato de MMC en HA modificado con tiol se derivó de un modelo de reacción. Se usó cisteína protegida doble como reactivo modelo para reaccionar con acrilóilo de MMC. La concentración del grupo tiol se midió usando 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB) o reactivo de Ellman. La reacción se realizó en tampón de PBS (pH 8,0) con una concentración de acrilato de MMC de 0,3 mg/ml y una proporción inicial de 2 acrilatos con respecto a 1 tiol.

Preparación de conjugado de HA-MMC

Se preparó HA modificado con tiol usando la tecnología de hidrazida descrita anteriormente. En síntesis, se hizo reaccionar HA de bajo peso molecular (200k Da) con hidrazida 3,3'-ditiobis-propanoica (DTPH) a pH 4,75 mediante la reacción catalizada por carbodiimida. El producto similar a un gel se redujo mediante DTT en forma sólida, tras la diálisis, se prepararon los derivados de HA tiolado con diferentes cargas. Se disolvió HA-DTPH en tampón de PBS a la concentración del 1,25 % (p/v). Se disolvió MMC modificada en etanol mínimo y se añadió a la solución de HA-DTPH. La carga teórica de MMC con respecto a los disacáridos fue del 0,5 %, 1 % y 2 % respectivamente. El procedimiento se llevó a cabo en atmósfera de N $_2$ y el pH final de la mezcla se ajustó a 8,0. La reacción se procesó durante tres horas con agitación. La Figura 22 representa la secuencia de reacción.

Preparación de películas de hidrogel de HA-MMC-PEG

Se ajustó la solución de HA-MMC a pH 7,4 tras la reacción de acoplamiento. Se disolvió diacrilato de PEG en tampón de PBS hasta una concentración del 4,5 % (p/v). Se mezclaron las dos soluciones y se agitaron en

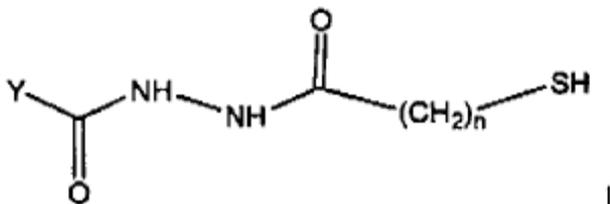
movimientos vorticiales durante un minuto. Se retiró la mezcla de reacción con Eppendorf® Combitips y se añadió a placas de 2 cm x 2 cm, 2 ml/placa. Los hidrogeles se forman en aproximadamente media hora y se evaporaron a sequedad al aire durante varios días para formar las películas. La Figura 23 representa la secuencia de reacción.

- 5 **Experimento de liberación de MMC.** Se cortaron películas de hidrogel secas en cuadrados de 2 cm. Se pesaron la película de gel cuadrada y el margen de corte por separado, y se calculó la MMC contenida en cada película cuadrada. Se sumergió cada película en 5 ml de tampón de PBS 100 mM y se agitó suavemente a 37 °C. En cada punto temporal, se retiraron 0,5 ml de solución y se añadieron 0,5 ml de tampón de PBS fresco. La solución que contenía MMC liberada se detectó a una longitud de onda de 358 nm. La concentración acumulada de MMC liberada se representó gráficamente en función del tiempo.

15 Las Figuras 25a y b muestran los resultados de la liberación de MMC *in vitro*. La Figura 25a muestra la concentración liberada absoluta. La MMC liberada es proporcional a la MMC contenida en el hidrogel. El patrón de liberación relativa se muestra en la Figura 25b tras volver a representar los datos. Las películas de HA con cargas de MMC del 1 % y 2 % tienen perfiles de liberación similares. En la primera media hora, se liberó aproximadamente el 13 % de MMC del hidrogel, que podía proceder de dos fuentes: una era la MMC no acoplada y la otra, la MMC hidrolizada. A continuación, se observó un patrón de liberación lenta con una semivida de aproximadamente 48 horas. La liberación de MMC continuó durante 5 días hasta estabilizarse. Todavía había una cantidad considerable de MMC embebida en la película tras 8 días. Estos resultados indican que el hidrogel de HA-MMC-PEG recién sintetizado tiene cinéticas de hidrólisis similares a las del conjugado de MMC-TA descrito.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula I:



5

en la que:

Y-C(O) es un resto de una macromolécula, que es un polipéptido, una glucoproteína, un polisacárido, una proteína o un polímero sintético; y
n = 2 o 3,

10

en la que Y-C(O) es un resto de una macromolécula distinta al hialuronano.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la macromolécula es un glucosaminoglucano sulfatado.

15

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la macromolécula es un polisacárido seleccionado de entre sulfato de condroitina, dermatano, heparano, heparina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, ácido algínico, pectina o carboximetilcelulosa.

20

4. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el glucosaminoglucano sulfatado es sulfato de condroitina o heparina.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la macromolécula es un polímero sintético seleccionado de entre ácido glucurónico, ácido poliacrílico, ácido poliaspártico, ácido politartárico, ácido poliglutámico o ácido polifumárico.

25

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la macromolécula es una proteína que aparece de modo natural o una proteína recombinante.

30

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la macromolécula es una proteína de la matriz extracelular, una proteína de la matriz extracelular modificada químicamente o un derivado parcialmente hidrolizado de una proteína de la matriz extracelular.

8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que la proteína es colágeno, elastina, gelatina, decorina, laminina o fibronectina.

35

9. El compuesto de la reivindicación 1, donde n es igual a 3.

10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es igual a 2.

40

11. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y-C(O) es un resto de una proteína o polisacárido.

12. Un método para acoplar dos o más compuestos que comprende hacer reaccionar un grupo tiol de un primer compuesto según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con un grupo reactivo con tiol de al menos un segundo compuesto que comprende el grupo funcional reactivo con tiol, formándose así un compuesto acoplado en el que cuando el grupo funcional reactivo con tiol es un tiol, la reacción se produce en presencia de un oxidante.

45

13. El método de la reivindicación 12 en el que el grupo funcional reactivo con tiol es un tiol, y el primer y el segundo compuestos son iguales o diferentes.

50

14. El método de la reivindicación 12, en el que el segundo compuesto comprende un grupo funcional electrófilo reactivo con tiol seleccionado de entre maleimida, vinilsulfona, acrilonitrilo, α -metilenoéster, metiluro de quinona, éster de acrilóilo, amida de acrilóilo, α -halo-éster y α -haloamida.

55

15. El método de la reivindicación 12, en el que el segundo compuesto es un agente de reticulación que tiene dos grupos vinilo deficientes en electrones que son iguales.

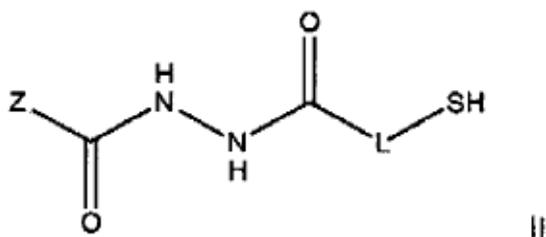
16. El método de la reivindicación 15, en el que el agente de reticulación está seleccionado de entre un diacrilato, un dimetacrilato, una diacrilamida y una dimetilacrilamida.

5 17. El método de la reivindicación 16, en el que el agente de reticulación homobifuncional es un éster o una amida α,β -insaturados de poli(etilenglicol).

18. El método de la reivindicación 13, en el que el segundo compuesto es una macromolécula seleccionada de entre un polipéptido, una glucoproteína, un polisacárido o un compuesto farmacéuticamente aceptable.

10 19. El método de la reivindicación 13, en el que el segundo compuesto es un compuesto tiolado que tiene al menos un grupo SH y es un polisacárido según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, ácido hialurónico o una proteína.

20. El método de la reivindicación 13, en el que el segundo compuesto tiolado tiene la fórmula II



15 en la que

Z-C(O) es un resto de una macromolécula; y

20 L es un grupo polialquileo, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliimino, un grupo arilo, un poliéster o un grupo politioéter.

21. El método de la reivindicación 20, en el que la macromolécula, Z, es un polipéptido o una glucoproteína según lo definido en la reivindicación 1.

25 22. El método de la reivindicación 20, en el que la macromolécula, Z, es un polisacárido, una proteína o un polímero sintético según lo definido en la reivindicación 1.

23. El método de la reivindicación 20, en el que Z-C(O) es un resto de hialuronano y L es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂.

30 24. El método de la reivindicación 20, en el que Z-C(O) es un resto de gelatina y L es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂.

25. El método de la reivindicación 13, en el que el oxidante comprende un gas que comprende gas de oxígeno.

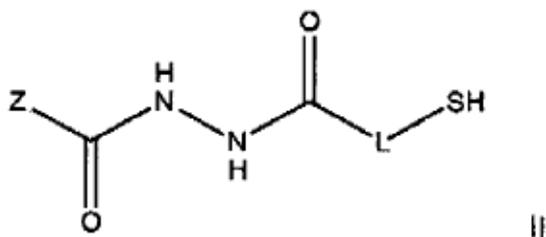
26. El método de la reivindicación 25, en el que el oxidante comprende además peróxido de hidrógeno.

35 27. El método de la reivindicación 12, en el que:

(a) el primer compuesto es una proteína; y

40 (b) el segundo compuesto es un polisacárido o un polímero sintético que tiene al menos un grupo SH.

28. El método de la reivindicación 27, en el que el segundo compuesto corresponde a la fórmula II:



en la que

45 Z-C(O) es un resto de un polisacárido o un polímero sintético que comprende un grupo carboxilo; y

L es un grupo polialquileno, un grupo poliéter, un grupo poliamida, un grupo poliéster, un grupo poliimino, un grupo arilo o un grupo politioéter.

- 5 29. El método de la reivindicación 28, en el que L es CH₂CH₂ o CH₂CH₂CH₂.
30. El método de la reivindicación 28, en el que Z-C(O) es un resto de hialuronano.
- 10 31. El método según lo reivindicado en la reivindicación 13, en el que el segundo compuesto comprende al menos dos grupos reactivos con tiol.
32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 31, que comprende además combinar un fármaco terapéutico con un compuesto acoplado.
- 15 33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 31, que comprende además combinar *in vitro* células vivas con el compuesto acoplado.
34. Una composición que comprende el compuesto acoplado obtenible de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 31.
- 20 35. La composición de la reivindicación 34 que comprende además un fármaco terapéutico o células vivas.
36. La composición de la reivindicación 35, en la que la composición comprende células vivas seleccionadas de entre fibroblastos, hepatocitos, condrocitos, células madre, médula ósea, células musculares, miocitos cardíacos, células neuronales y células de los islotes pancreáticos, en la que las células madre no son células madre embrionarias humanas.
- 25 37. Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 34-36 para la fabricación de un medicamento para la administración de un factor de crecimiento, un agente antiinflamatorio, un agente contra el cáncer, un analgésico, un agente antiinfeccioso, un agente contra la unión a células, células vivas o para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto.
- 30 38. La composición de la reivindicación 34, que es un hidrogel reticulable *in situ*.
39. Uso de una composición de la reivindicación 35 o de la reivindicación 36 para la fabricación de un medicamento para liberación de células vivas, migración celular, mejora del crecimiento celular o regeneración tisular en un sujeto.
- 35 40. El uso de la reivindicación 37, en el que el medicamento está en una forma adecuada para la inyección.
- 40 41. El uso de la reivindicación 37, para la fabricación de un medicamento para tratar adherencias postquirúrgicas, potenciar el crecimiento cutáneo, prevenir la formación de cicatrices, curar heridas, viscoscirugía, viscosuplementación e ingeniería de tejidos.
- 45 42. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 34-36 para su uso en un método para la administración de un factor de crecimiento, un agente antiinflamatorio, un agente contra el cáncer, un analgésico, un agente antiinfeccioso, un agente contra la unión a células, células vivas o para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto.
- 50 43. Una composición de la reivindicación 35 o de la reivindicación 36 para su uso en un método para administración de células vivas, migración celular, potenciación del crecimiento celular o regeneración tisular en un sujeto.

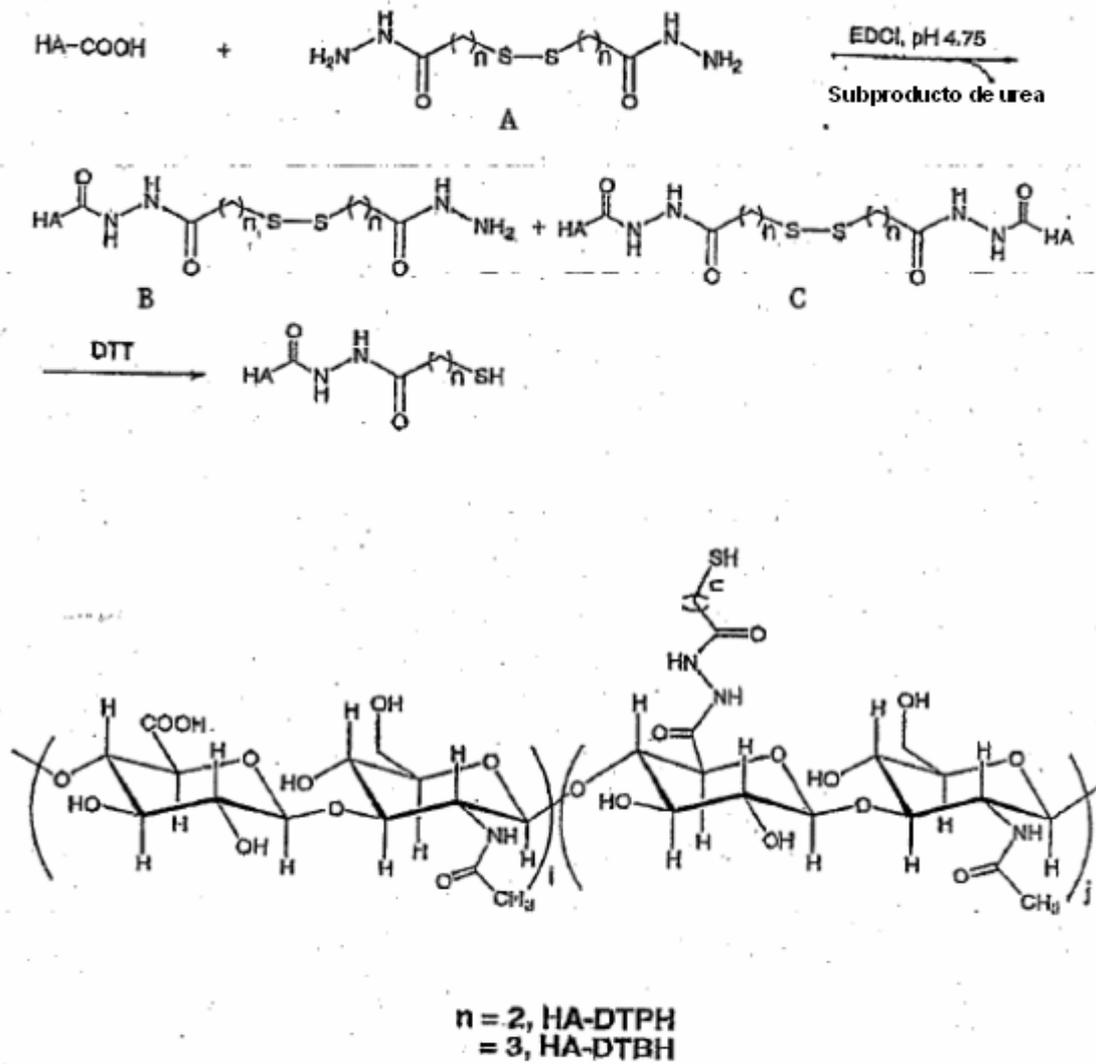
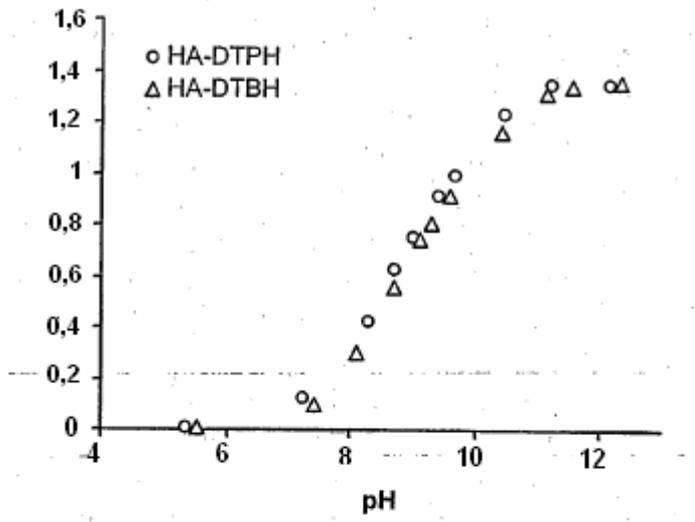
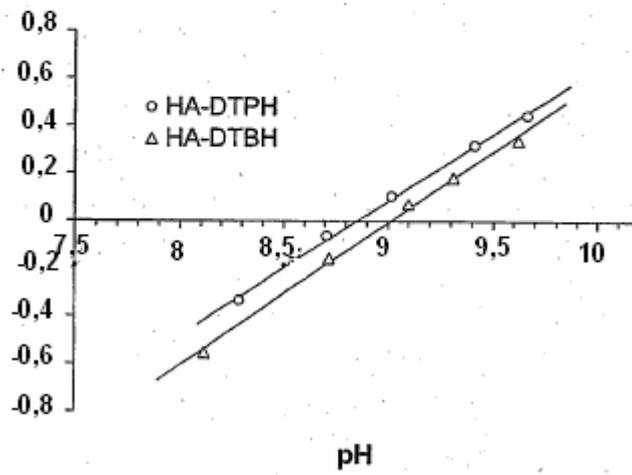


FIG. 1



(a)



pH

(b)

FIG. 2

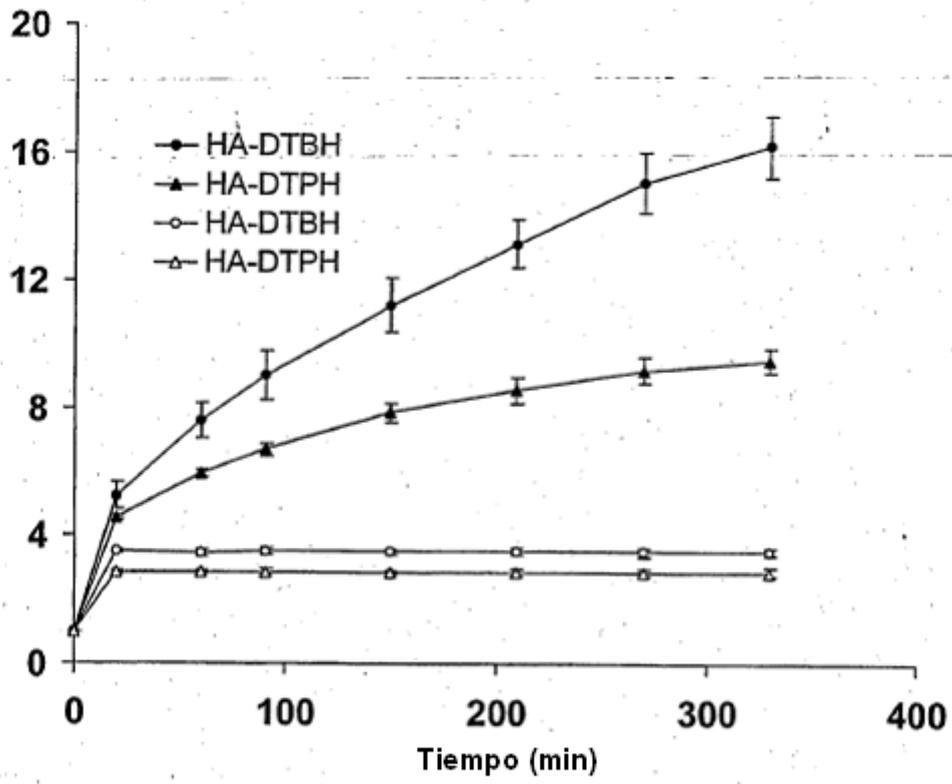


FIG. 3

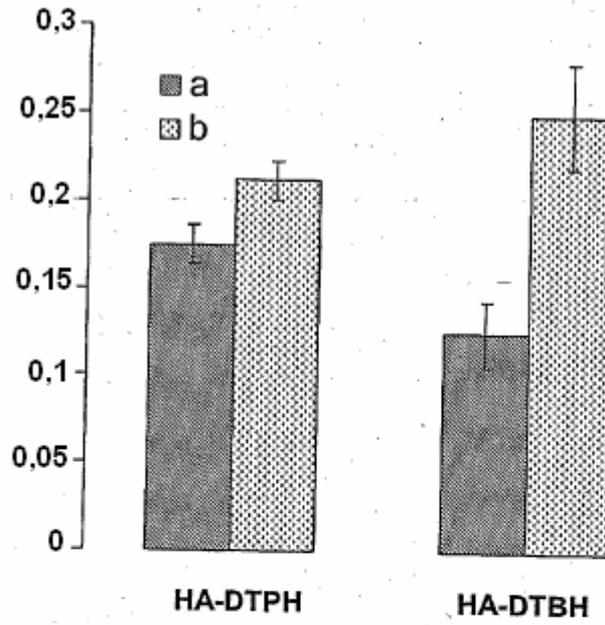


FIG. 4

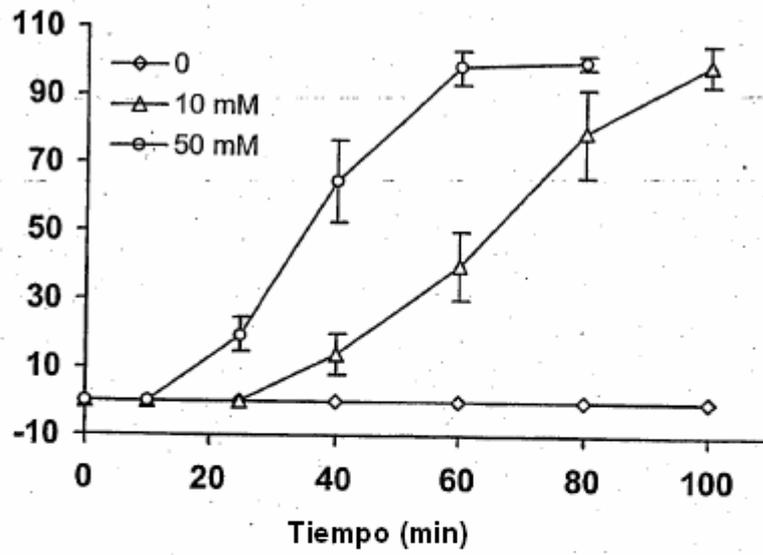


FIG. 5

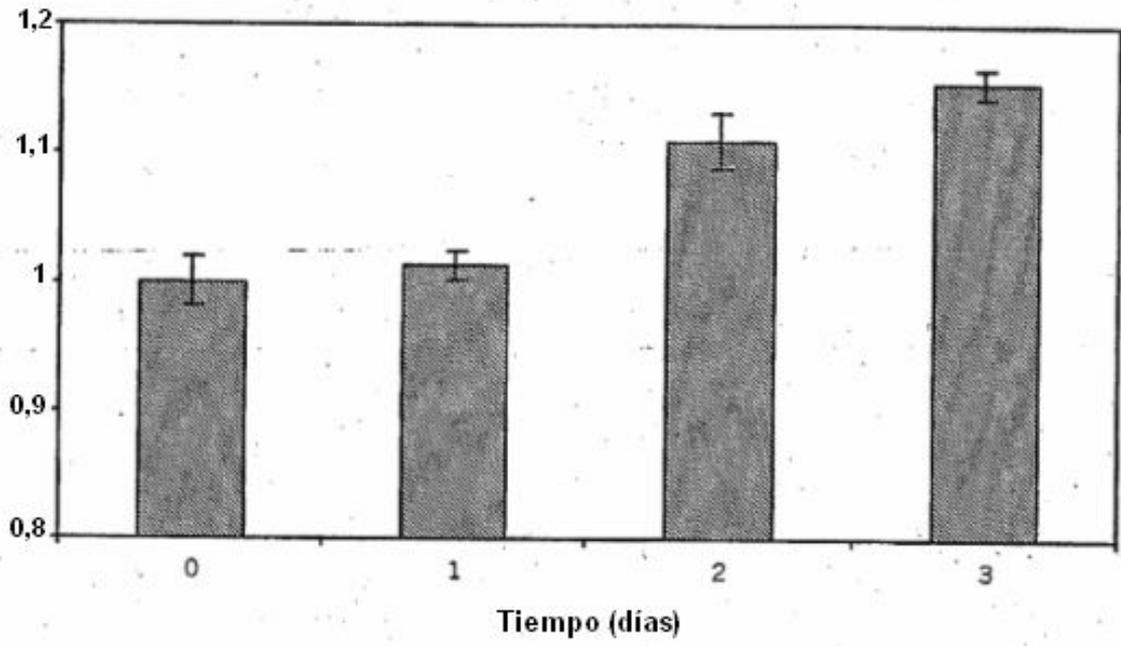


FIG. 6

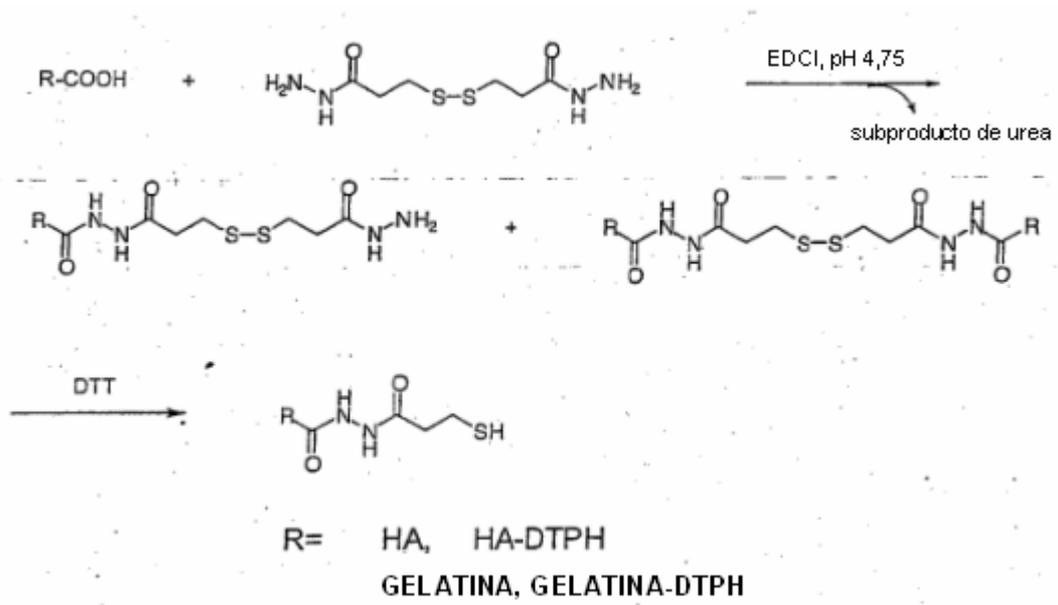


FIG. 7

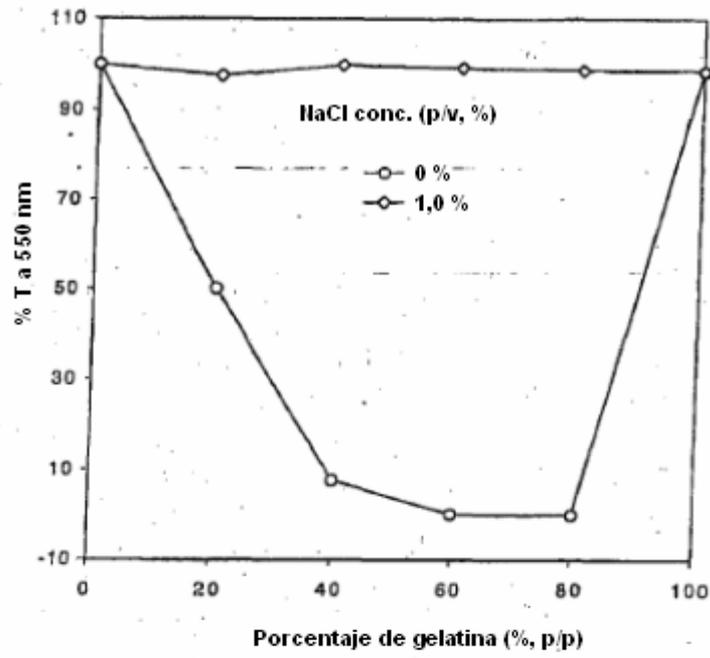


FIG. 8

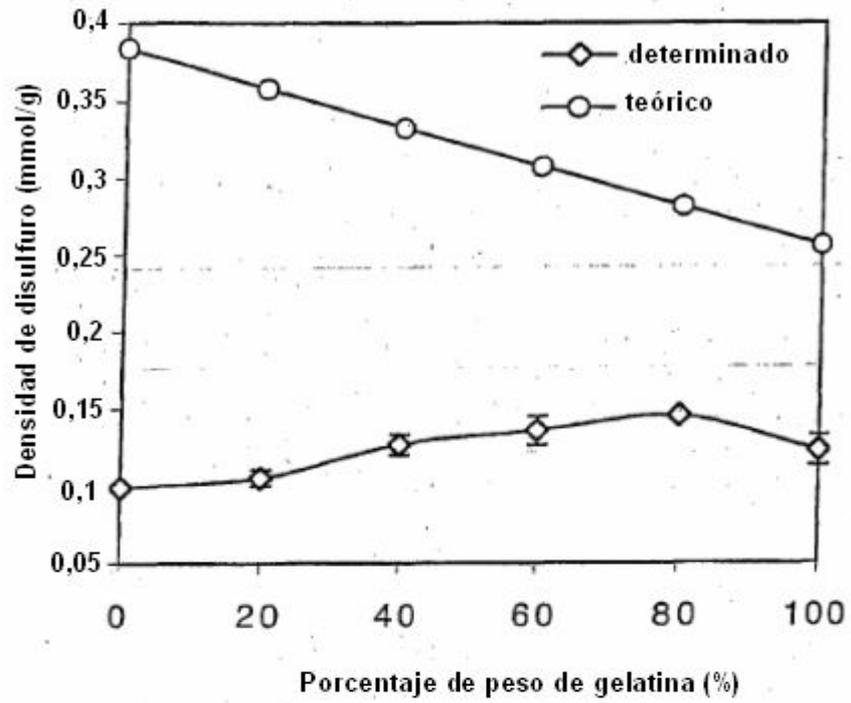


FIG. 9

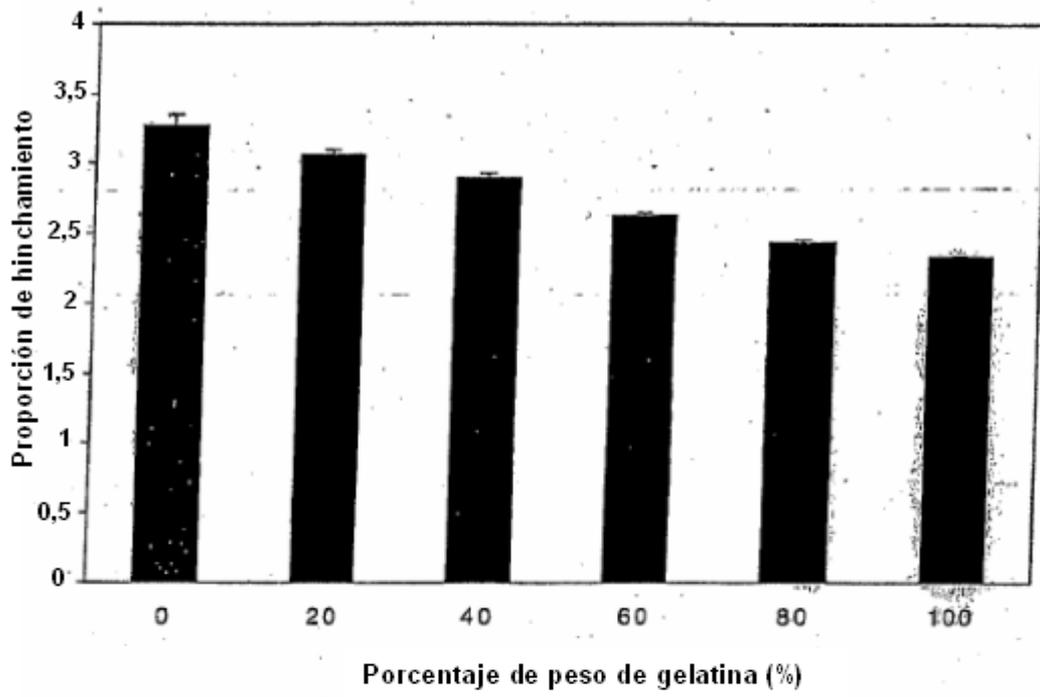


FIG. 10

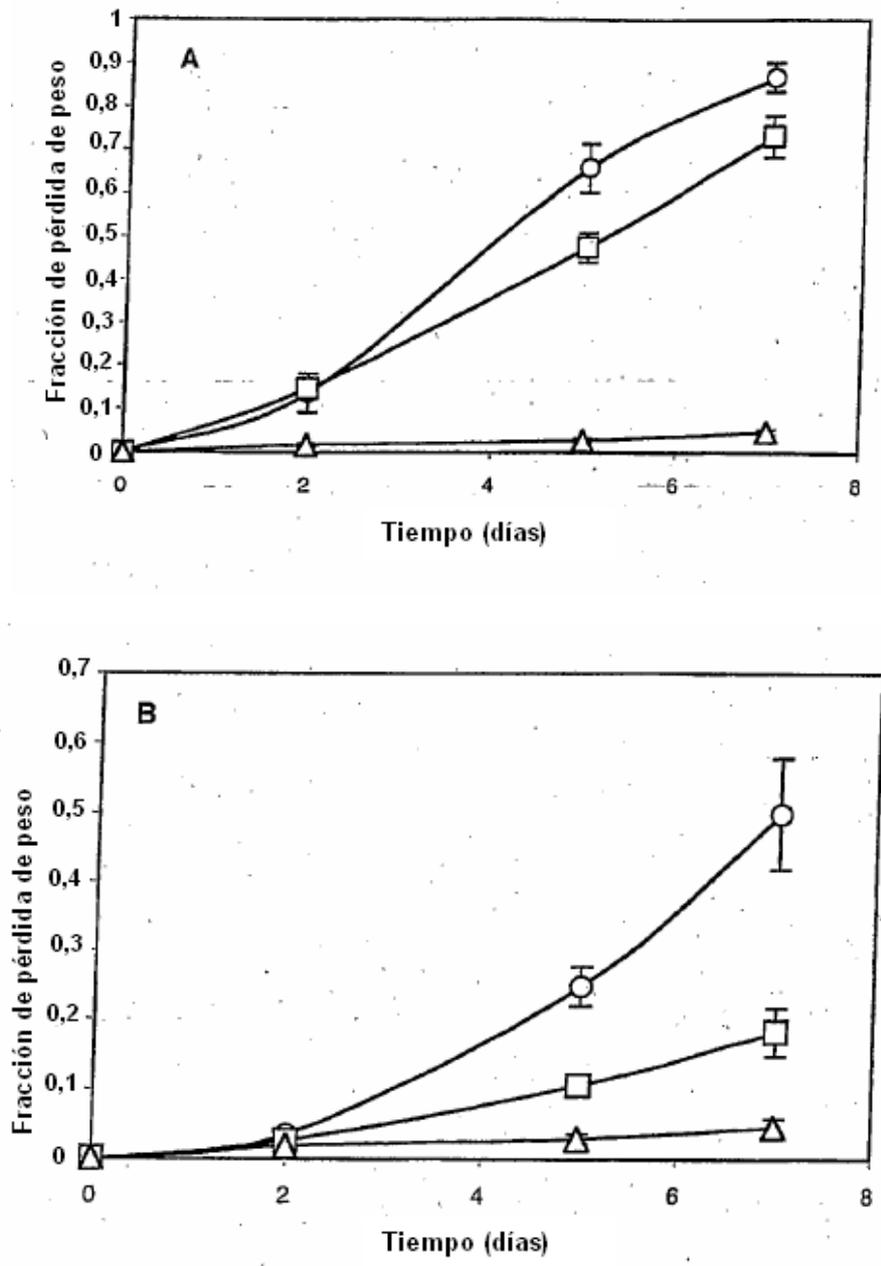
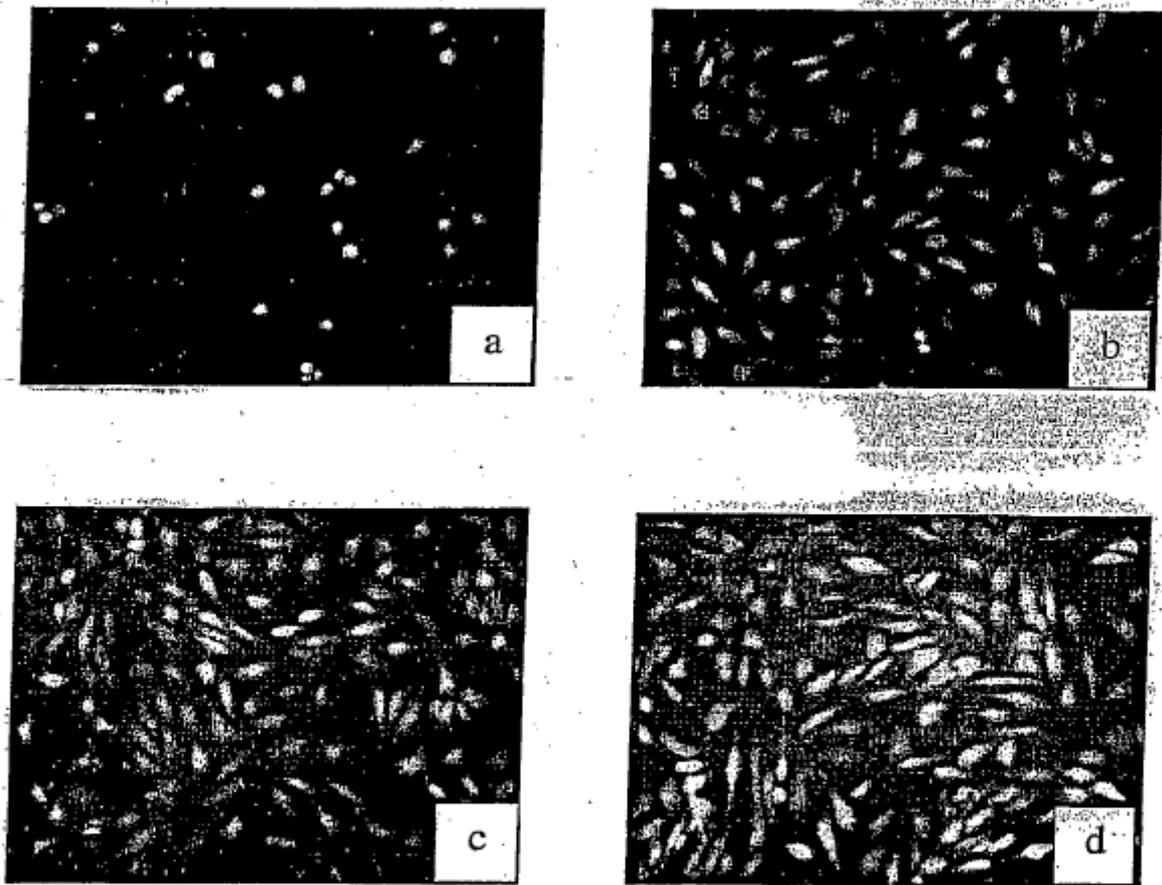


FIG. 11



10 μm



FIG. 12

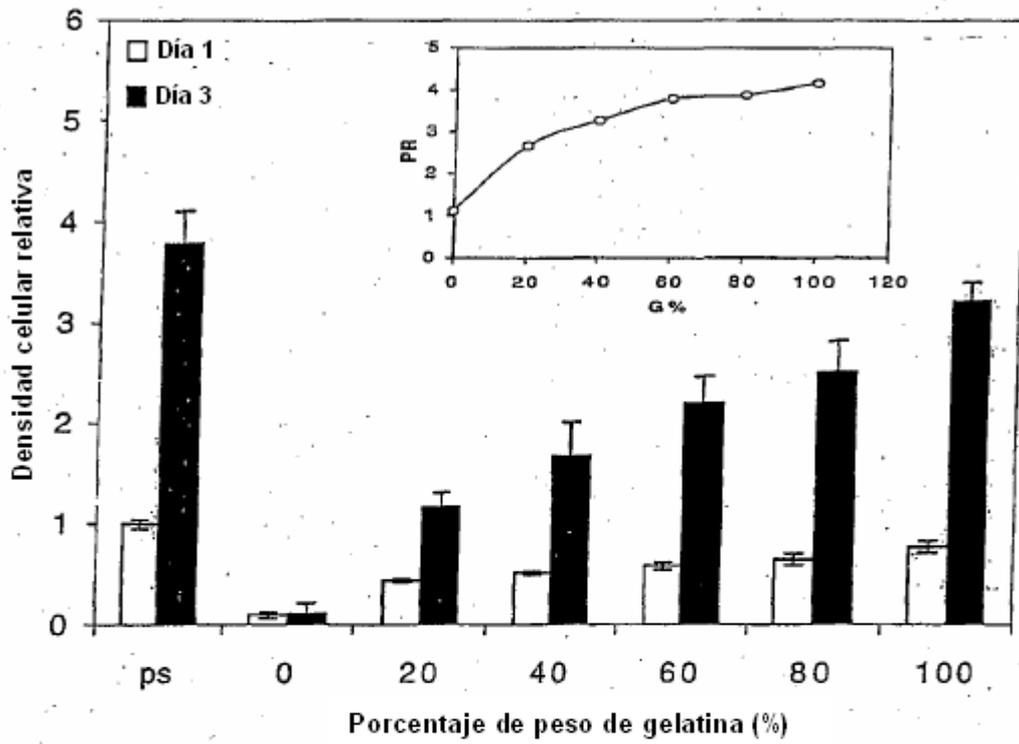


FIG. 13

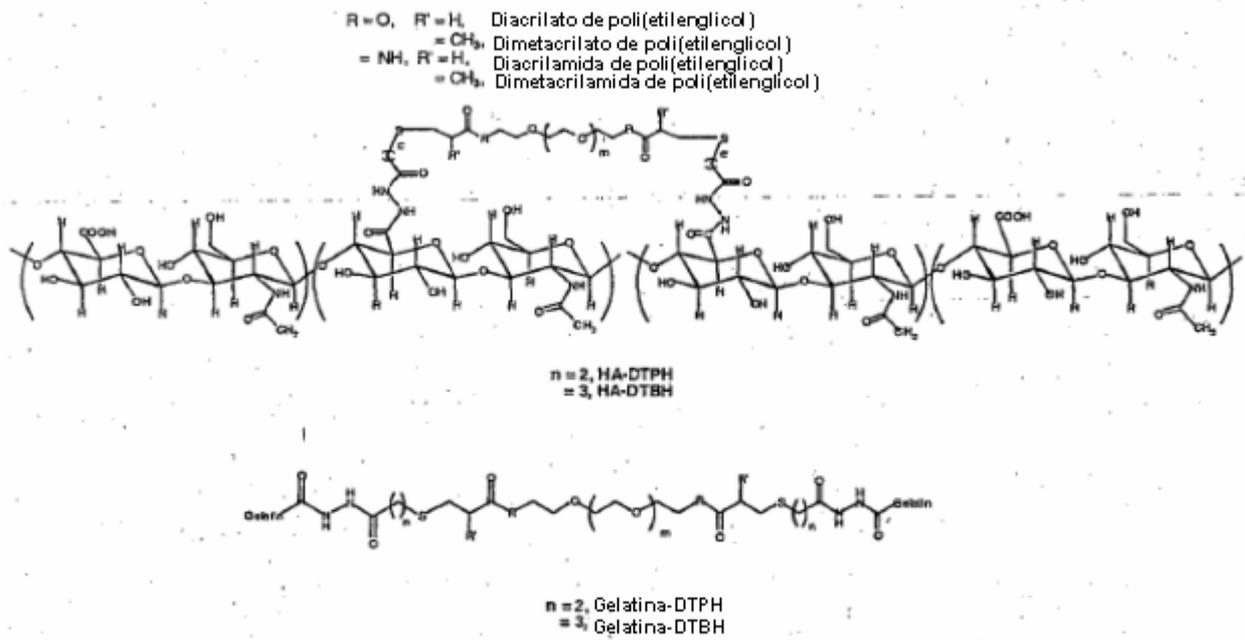


FIG. 14

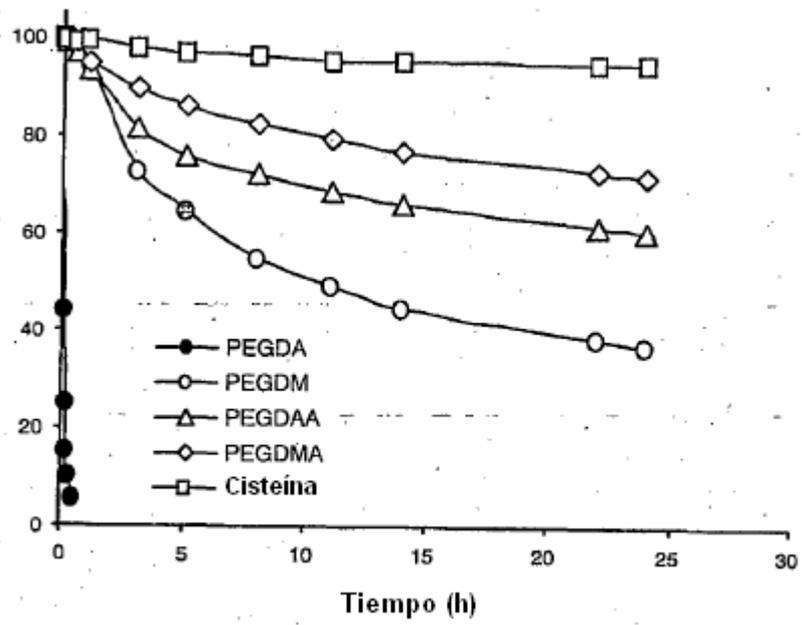


FIG. 15

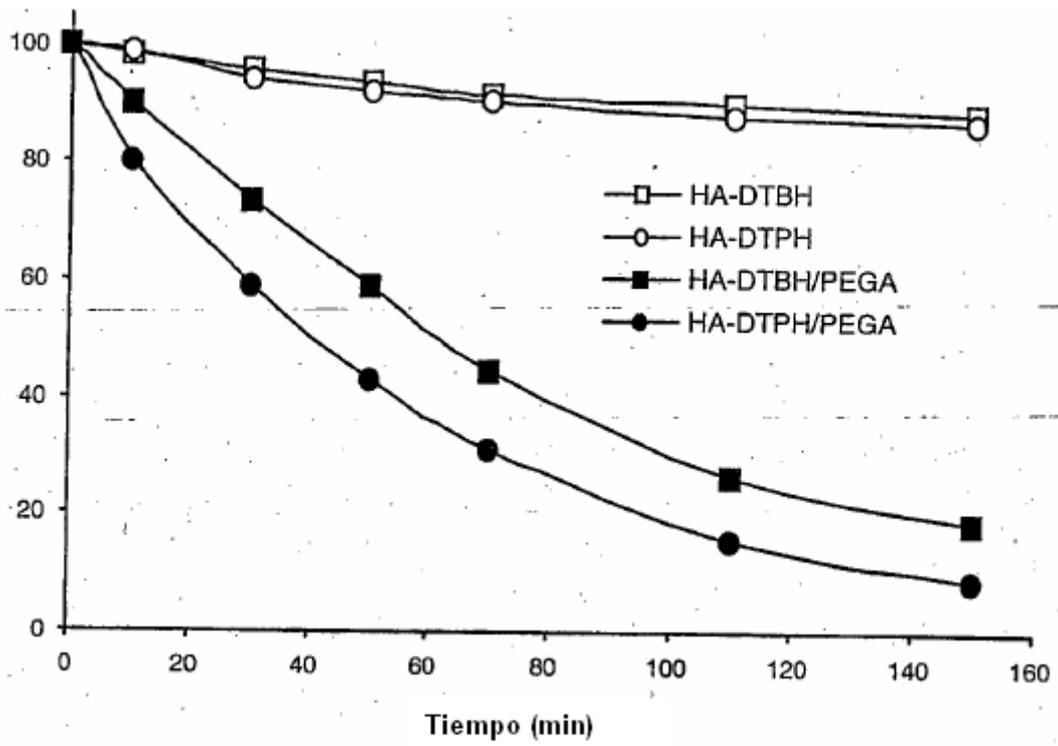


FIG. 16

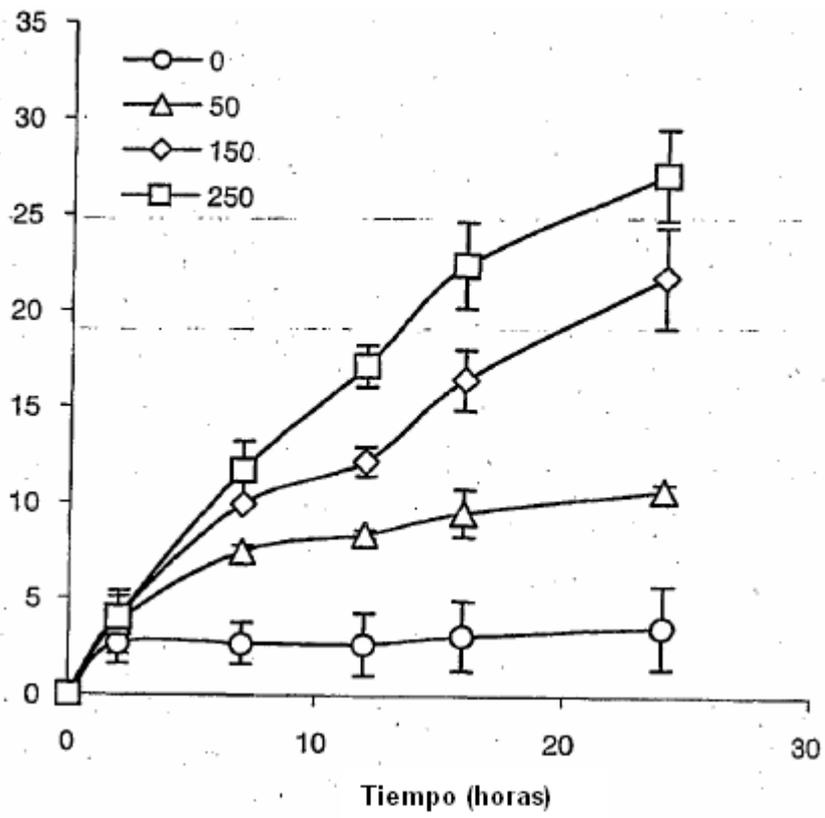


FIG. 17

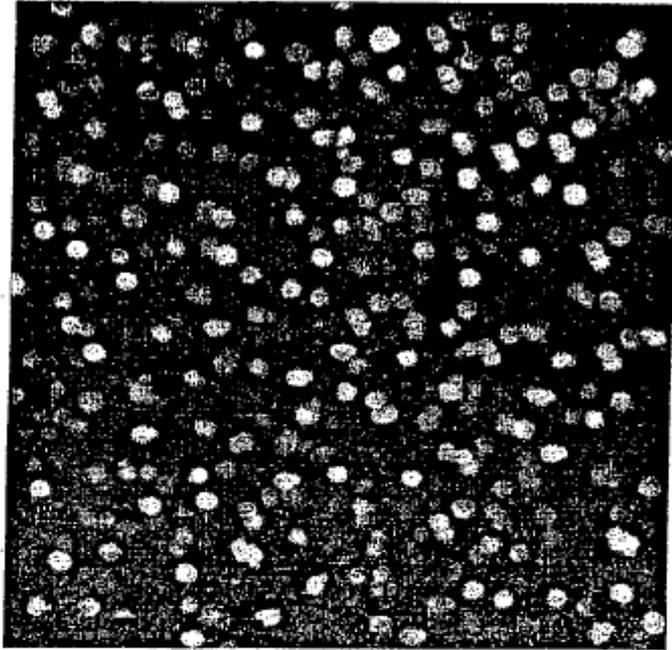


FIG. 18

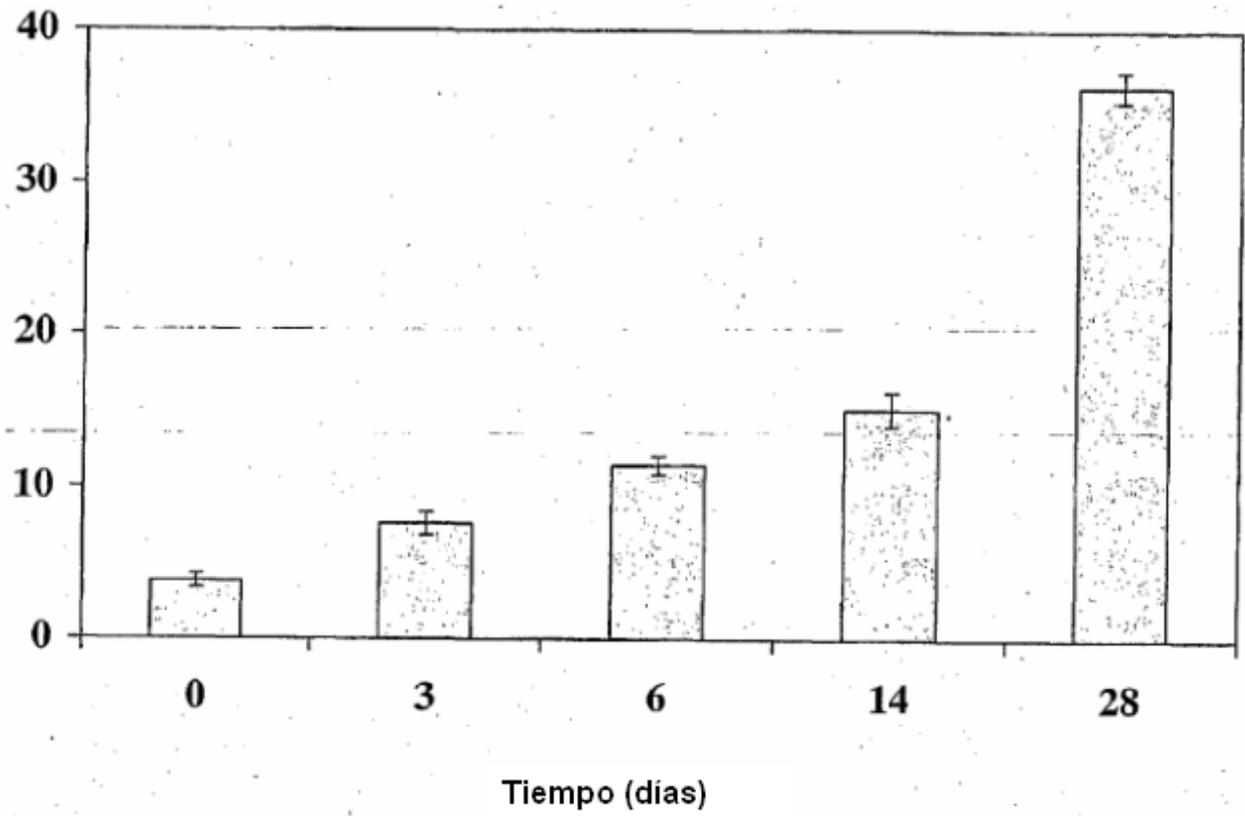


FIG. 19

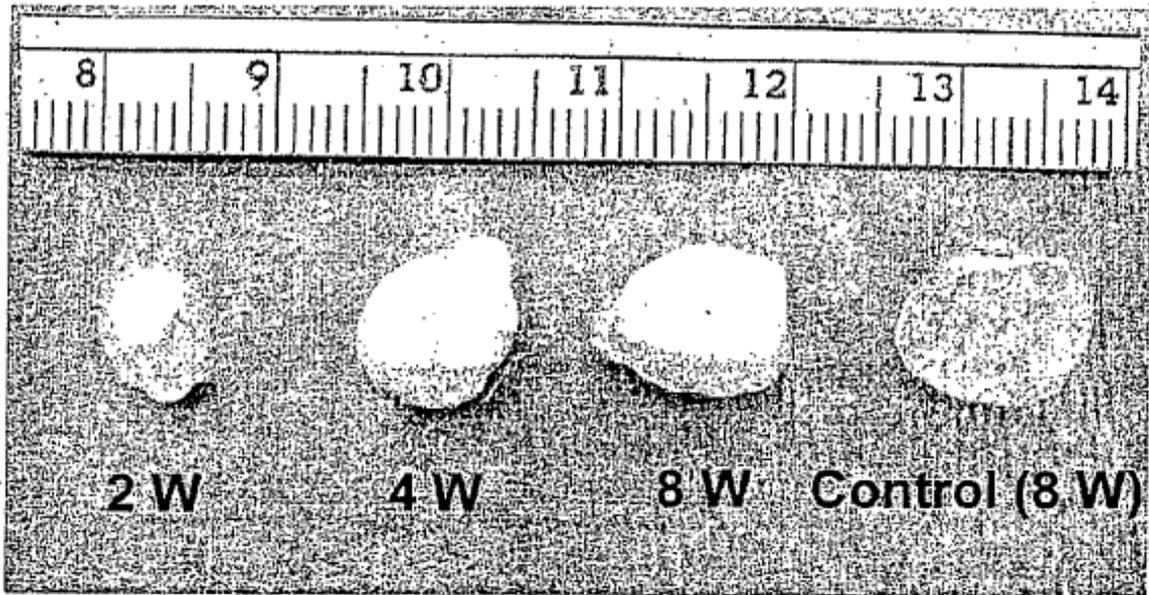
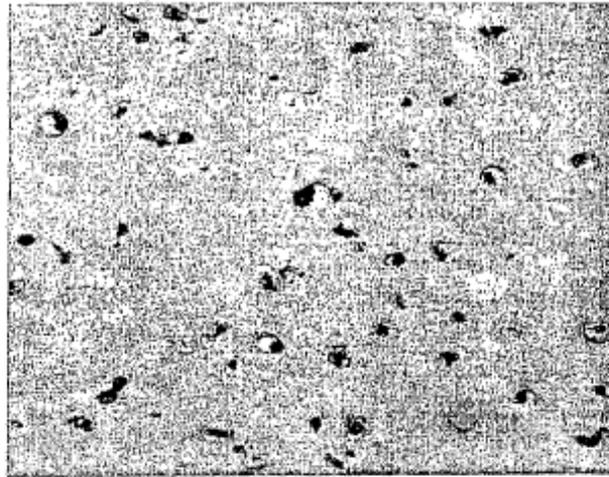
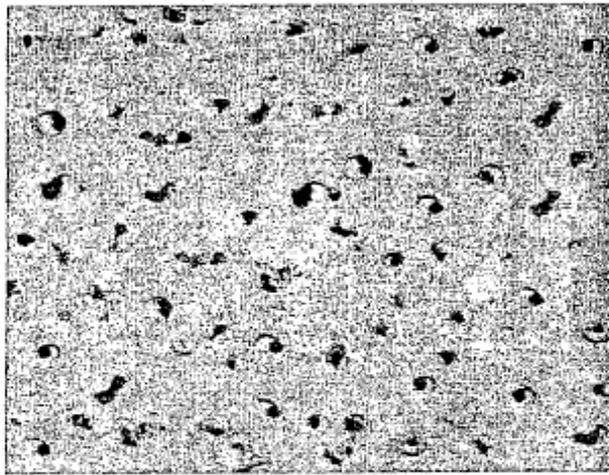


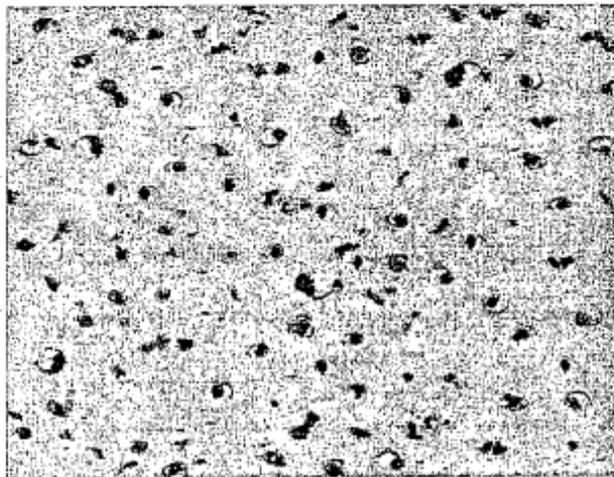
FIG. 20



A



B



C

FIG. 21

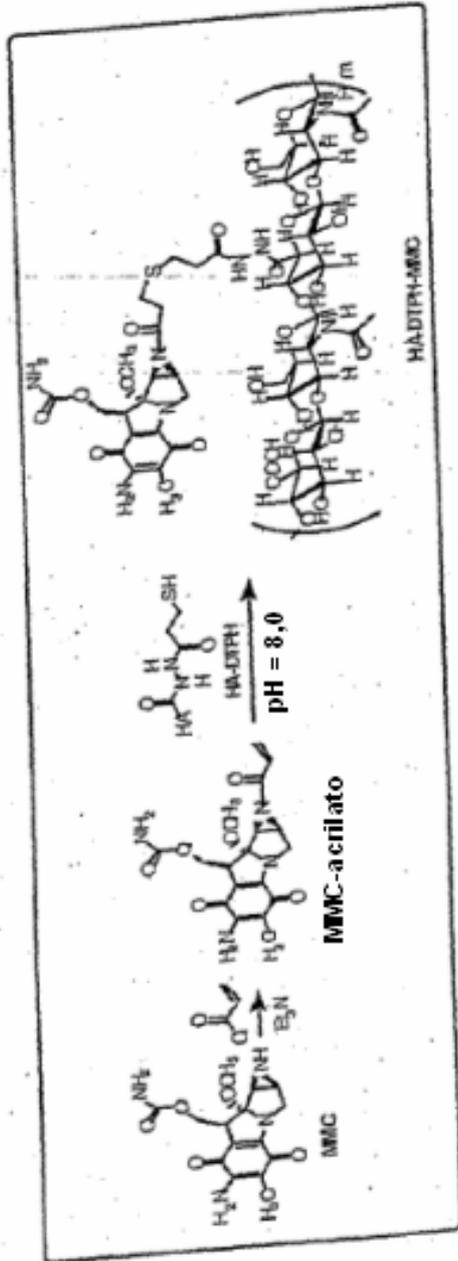


FIG. 22

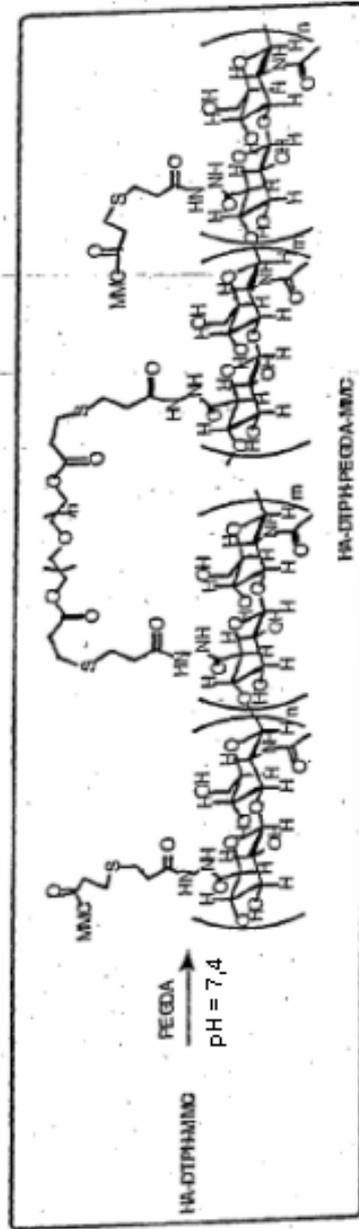


FIG. 23

FIG. 24a

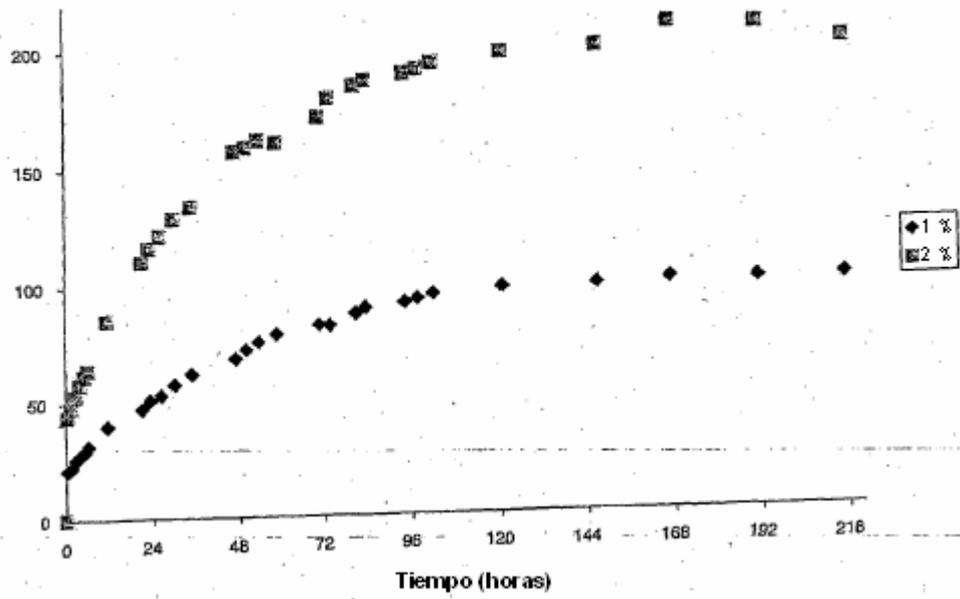


FIG. 24b

