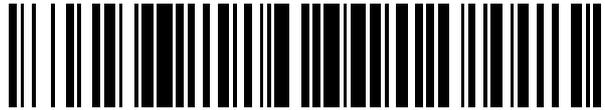


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 891**

51 Int. Cl.:

A61K 47/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2003** **E 03724277 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 1501548**

54 Título: **Carboxipolisacáridos activados químicamente y usos**

30 Prioridad:

30.04.2002 US 135133

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

10.09.2014

73 Titular/es:

FZIOMED, INC. (100.0%)
170A GRANADA DRIVE
SAN LUIS OBISPO, CA 93401, US

72 Inventor/es:

LIU, LIN-SHU y
BERG, RICHARD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 492 891 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

Carboxipolisacáridos activados químicamente y usos

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a carboxipolisacáridos (CPS) derivatizados. Específicamente, esta invención se refiere a CPS derivatizados y a usos en la elaboración de geles y de películas de incorporación de óxido de polietileno (PEO) para la administración de fármacos y para preparaciones antiadhesión. Más específicamente, esta invención se refiere a composiciones antiadhesión y hemostáticas que comprenden composites de CMC activada y PEO.

Antecedentes de la invención

Las hemorragias durante una operación quirúrgica son una preocupación importante. Retrasan el procedimiento quirúrgico y prolongan el tiempo de la operación. Una hemorragia significativa también obstruye la visión del cirujano sobre el campo quirúrgico. Pueden ser necesarias transfusiones sanguíneas o el uso de dispositivos de recuperación de sangre para compensar la pérdida de sangre durante y después de la cirugía.

Es rutinario ligar vasos con grandes hemorragias, presionar hendiduras sangrantes con presión directa, usar electrocauterización o punciones de bloqueo con suturas. Estos métodos son moderadamente exitosos. Más recientemente se han contemplado nuevos métodos y composiciones para detener las hemorragias. Éstos incluyen matrices derivadas de colágeno, materiales derivados de colágeno tales como Angio-Seal® (Kensey Nash Corporation) y VasoSeal® (Datascope, Inc.); Flowseal™ (Fusion Medical) y CoStasis™ (Cohesion Tech., Inc); y la combinación de trombina y colágeno o fibrinógeno.

El colágeno es una importante proteína estructural del cuerpo humano. A través de la interacción de las secuencias peptídicas que comprenden los tres aminoácidos, Arg-Gly-Asp (RDG) de las fibras polipeptídicas triples de colágeno con los receptores superficiales de la membrana de las plaquetas, los reactivos hemostáticos basados en colágeno pueden activar las plaquetas y contribuir a la formación del coágulo de fibrina.

Las matrices derivadas de polietilenglicol (PEG), tales como el PEG funcionalmente activo, incluyendo FocalSeal™ (Focal, Inc.), están diseñadas para formar un hidrogel tridimensional en la zona de la hemorragia, que evita la pérdida de fluido y sella la punción. Las matrices basadas tanto en colágeno como en PEG demostraron ser eficaces en las situaciones de hemorragias de difusión.

La trombina desencadena un conjunto de reacciones químicas en cascada que conducen a la formación de un coágulo sanguíneo. Sin embargo, el uso de trombina sola es de una eficacia limitada en la hemostasia, debido principalmente a la ausencia de un marco al que pueda adherirse el coágulo. Por lo tanto, una combinación de trombina con matrices de colágeno puede acelerar el mecanismo intrínseco de la coagulación mediante una concentración significativa de los factores de coagulación en el sitio de la hemorragia, aumentando así la eficacia en el control de una hemorragia agresiva. Algunos ejemplos de dichos productos son Proceed™ (Fusion Medical Technology) y Gelespuma™ (Pharmacia and Upjohn). Sin embargo, para proporcionar una actividad de coagulación deseable, éstos requieren la mezcla de la trombina con la matriz inmediatamente antes de su uso en el quirófano.

La carboximetil celulosa (CMC) es un polisacárido semisintético biocompatible y biorreabsorbible soluble en agua. La seguridad de la CMC disponible comercialmente con una elevada pureza ha sido identificada y aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para su incorporación en muchos productos. La CMC es capaz de reaccionar con varios polímeros mediante interacción electrostática, iónica, reticulación, puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals e interpenetración física. Debido a la seguridad, la conveniencia y la diversidad de sus propiedades fisicoquímicas, la CMC ha mostrado amplias aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética.

La CMC está en un grupo mayor de polímeros denominado "carboxipolisacáridos" (CPS), que incluyen alginato, ácido hialurónico, carboxietil celulosa, chitina. Los CPA se usan en la elaboración de composiciones útiles para la administración de fármacos y la reducción de las adherencias quirúrgicas. Schwartz (Patente de EE.UU. N° 5.906.997) desvela composiciones y métodos para reducir las adherencias postquirúrgicas mediante el uso de películas de CPA y óxido de polietileno ("PEO"). Schwartz (Patente de EE.UU. N° 6.017.301) desvela hidrogeles de CPA y PEO, sus métodos de elaboración y su uso para reducir la formación de adherencias. Schwartz (Patente de EE.UU. N° 6.034.140) desvela complejos de asociación de CPS y PEO y su uso en la reducción de las adherencias. Schwartz (Patente de EE.UU. N° 6.133.325) desvela membranas antiadhesión hechas de complejos de asociación de CPS y PEO.

Cortese y col., (documento WO 01/82937) describen composiciones antitrombogénicas hemostáticas que pueden ser administradas en un sitio quirúrgico mediante el uso de poliácidos, óxidos de polialquileno y opcionalmente cationes multivalentes.

65

Miller y col., (documento US 6.566.345) desvelan métodos mejorados para la administración de composiciones bioadhesivas, biorreabsorbibles, antiadhesivas hechas de complejos intermacromoleculares de poliéteres y poliácidos de polisacáridos que contienen carboxilo, óxidos de polialquileno, cationes y/o policationes multivalentes.

5 Pennell y col., (documento US 5.156.839) describen la administración en una herida quirúrgica de una composición de implante con hasta aproximadamente un 2,5 % en peso de carboximetil celulosa (CMC) y al menos aproximadamente un 0,5 % en peso de óxido de polietileno (PEO) en una mezcla fisiológicamente aceptable.

10 Miller (Patente de EE.UU. Nº 6.174.999) describió métodos de preparación de derivados insolubles en agua de polisacáridos polianiónicos que requieren uno o más polisacáridos, un nucleófilo y un agente de activación para reticular el polisacárido consigo mismo y el nucleófilo con el polisacárido. La reacción se realiza en presencia de hialuronato o carboximetil celulosa (CMC), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ("EDC") y un nucleófilo. Esta patente no describe ni sugiere un polímero polianiónico derivatizado con una amina primaria como un producto soluble en agua, ni un polisacárido derivatizado con diamina. Los métodos descritos dan como resultado 15 formas insolubles en agua, ya que todos los componentes se mezclan entre sí al mismo tiempo. Por lo tanto, las composiciones desveladas no atraparían los óxidos de polietileno (PEO).

20 Burns (Patente de EE.UU. Nº 6.030.958) describe la reticulación de un polisacárido, y la Patente de EE.UU. Nº 5.527.893 describe la incorporación de un derivado de acil urea del ácido hialurónico (HA).

Goldberg y col (Patente de EE.UU. Nº 6.010.692) describen métodos para reducir las adherencias quirúrgicas mediante los que las superficies tisulares y los artículos quirúrgicos implicados en la cirugía están recubiertos con disoluciones hidrófilas que contienen ácido hialurónico antes de la operación.

25 Bums (Patente de EE.UU. Nº 5.585.361) describe métodos para reducir o inhibir la agregación y la adhesión de las plaquetas mediante la administración de una composición farmacéutica que contiene ácido hialurónico.

Cook (Patentes de EE.UU. Nº 6.172.208 y 6.017.895) describe la conjugación de sacáridos con un oligonucleótido.

30 Greenawalt (Patente de EE.UU. Nº 6.056.970) describe una composición hemostática que consiste en un polímero bioabsorbible y un compuesto hemostático que se prepara en un disolvente no acuoso.

35 Liu (Patentes de EE.UU. Nº 5.972.385 y 5.866.165) desvela métodos de reticulación de polisacáridos mediante su oxidación a aldehídos y haciéndolos reaccionar con proteínas.

Berg (Patentes de EE.UU. Nº 5.470.911, 5.476.666 y 5.510.418) describe métodos de reticulación de glucosaminoglucanos con polímeros hidrófilos activados. Estas patentes también describen la reticulación de ácido hialurónico derivatizado mediante el uso de polímeros hidrófilos activados.

40 Liu (Patente de EE.UU. Nº 6.096.344) describió polisacáridos poliméricos reticulados iónicamente en esferas para la administración de fármacos.

Sumario de la invención

45 Sin embargo, no hay derivados fácilmente fabricados de CPS o CMC que puedan formar enlaces covalentes, iónicos u otros con otras moléculas y sean biocompatibles y/o biorreabsorbibles, y que sean útiles para varios usos terapéuticos.

50 Asimismo, no hay métodos de elaboración de composiciones con CMC u otros CPS derivatizados que sean fáciles de llevar a cabo y den como resultado composiciones biocompatibles y biorreabsorbibles.

Adicionalmente, no hay métodos para el uso de CMC o de otros CPS derivatizados en polímeros útiles para la administración de fármacos, la hemostasia y/o la prevención de la adhesión.

55 Por lo tanto, esta invención incluyen nuevos tipos de derivados de CMC o de CPS que portan grupos funcionales activos, incluyendo aminas primarias, grupos sulfonilo, grupos vinilo, grupos tresilo, en la cadena lateral. Los CPS derivatizados pueden elaborarse mediante el uso de métodos sintéticos adecuados al tipo en particular de derivado deseado. Una vez elaborados, los CPS derivatizados pueden mezclarse con otras moléculas, incluyendo CPS no modificados o polímeros adicionales tales como óxidos de polialquileno (PAO) incluyendo óxido de polietileno (PEO), 60 y/o con agentes farmacéuticos adecuados, para su uso en el tratamiento de trastornos en pacientes. En ciertas formas de realización, el CPS derivatizado puede formar enlaces con los otros componentes poliméricos para formar una estructura reticulada que puede portar fármacos, y/o que puede tener unas semividas biológicas más largas que las estructuras unidas no covalentemente. Las estructuras reticuladas pueden ser incorporadas en materiales que incluyen membranas, geles, fibras, películas no tejidas, esponjas, membranas tejidas, polvos, partículas u otras 65 formas físicas.

Cuando se colocan cerca de un sitio quirúrgico, las estructuras que contienen el CPS derivatizado pueden proporcionar una función de barrera, reduciendo la tendencia a la formación de cicatrices o adherencias en el sitio.

5 Las composiciones de esta invención pueden proporcionarse con uno o más agentes farmacéuticos, tales como fármacos o agentes biológicos. Algunos tipos de agentes incluyen agentes vasoactivos, hormonas, ácidos nucleicos, vectores, agentes antiinflamatorios. En las formas de realización para la administración de fármacos, las composiciones que contienen el CPS derivatizado pueden liberar el fármaco de una forma más sostenida, disminuyendo así los efectos adversos de las alteraciones rápidas en la concentración del fármaco.

10 Las composiciones que contienen el CPS derivatizado pueden usarse como geles, líquidos o secarse como membranas, esponjas o esferas. Tras su aplicación en un tejido húmedo, una preparación en membrana, en esponja o en esfera puede captar agua, gelificando. Mediante el uso de una elevada proporción de la fracción de derivatización se pueden producir estructuras con un mayor grado de reticulación, y mediante el uso de una
15 proporción menor de la fracción de derivatización, se pueden producir estructuras con un menor grado de reticulación. Las composiciones elaboradas con CPS derivatizados pueden tener unas semividas que pueden ser controladas, teniendo las estructuras más reticuladas una semivida más larga, y las estructuras menos reticuladas una semivida más corta. Además, el uso de conectores más largos puede permitir la formación de una composición con unos poros más grandes mediante el uso de conectores más cortos. Seleccionando el tipo de agente de derivatización (por ejemplo, amina, tresilo, etc.), la proporción entre el agente de derivatización y el sitio activo del
20 CPS (por ejemplo, residuos de COOH) y la longitud de los conectores, pueden controlarse las propiedades físicas y biológicas del CPS derivatizado para ajustarse a un fin en particular, ya sea una antiadhesión, una antitrombogénesis y/o una hemostasia. Seleccionando el tipo y el tamaño del PAO, pueden proporcionarse composiciones que tengan una adherencia tisular, una adherencia a las plaquetas y/o un comportamiento de agregación de las plaquetas controlables. Seleccionando un fármaco para su incorporación en una matriz, o añadido a una matriz, se pueden proporcionar medios farmacológicos adicionales que afecten a la formación de la adhesión,
25 el flujo sanguíneo, la hemorragia u otra propiedad.

Las propiedades de las composiciones pueden modificarse mediante la modificación del pH de las composiciones. Muchas preparaciones pueden usarse deseablemente con un pH neutro (es decir, un pH de aproximadamente 7).
30 Sin embargo, si se desea, los pH de las composiciones pueden ser mayores o menores. Adicionalmente, pueden usarse los CPS derivatizados con grupos cargados positivamente para asociarse con componentes cargados negativamente (por ejemplo, fármacos, proteínas cargadas negativamente). De forma análoga, pueden usarse los CPS con cargas negativas para asociarse con componentes cargados positivamente (por ejemplo, fármacos, proteínas cargadas positivamente).
35

Los sitios de administración de los fármacos mediante el uso de las composiciones de esta invención incluyen la piel, heridas, mucosa, órganos internos, endotelio, mesotelio, epitelio. En ciertas formas de realización, pueden usarse aplicaciones bucales, ópticas, nasales, intestinales, anales, vaginales mediante el uso de las composiciones de esta invención. Adicionalmente, las composiciones de esta invención son adecuadas para su colocación entre
40 tejidos adyacentes para reducir la formación de adherencias no deseadas.

También proporcionamos nuevos reactivos hemostáticos que comprenden conjugados de derivados de CPS con grupos amina primaria, por ejemplo, (CMC-N), grupos sulfonilo, otros grupos cargados y PAO. La trombina puede ser precargada en las matrices de CPS-N / PAO. Estas composiciones tienen una actividad hemostática que es
45 mayor que la de las matrices que no tienen trombina o que sólo tienen trombina.

Breve descripción de las figuras

50 La invención se describirá con respecto a las formas de realización en particular de la misma. Otros objetos, características y ventajas de la invención serán apreciables mediante referencia a la memoria descriptiva y los dibujos, en los que:

La Figura 1 representa los espectros de RMN de carboximetil celulosa conjugada con óxido de metoxipoliétileno portadora de grupos amino primarios (CMC-N / PEO). Los picos indicados a - e se refieren a los átomos de hidrógeno indicados en el inserto (a, 3,379 ppm; b, 3,701 ppm; c, 3,52 ppm; d, 3,166ppm; e, 2,862 ppm).
55

La Figura 2 representa unas micrografías electrónicas de barrido de las estructuras externas A, B y C y de las estructuras internas D, E y F de las matrices preparadas en placas de microtitulación. Las matrices mostradas en los paneles A y D están hechas de CMC, las matrices mostradas en los paneles B y E están hechas de CMC-N, y las matrices mostradas en los paneles C y F están hechas de CMC-N / PEO.
60

Aumento, de 40 X (A, B y C); de 200 X (D, E y F).

La Figura 3 representa los resultados de los estudios de la agregación de las plaquetas inducida por los materiales de la matriz (25 µg/ml) en presencia (gráfico superior A) y en ausencia (gráfico inferior B) de trombina (4 U/ml): CMC (●). CMC-N (■), CMC-N / PEO (▲), y control (○). Las matrices se prepararon en placas de microtitulación. Las plaquetas se prepararon a partir de sangre bovina completa tratada con citrato a una
65 concentración de 30 - 35 x 10⁴/µl.

La Figura 4 representa los resultados de los estudios de la activación de las plaquetas adheridas en placas

recubiertas con materiales de matriz, según se indica en los diferentes paneles A, B, C y D. Panel A: CMC, panel B: CMC-N, panel C: CMC-N / PEO, y panel D: control.

Se incuban moldes de placas (diámetro, 18 mm) con cada matriz con 2,0 ml de plasma rico en plaquetas con una concentración de plaquetas de $30 - 35 \times 10^4/\mu\text{l}$ a 37°C durante 20 min.

La Figura 5 es una representación esquemática de un modelo de hemorragia a chorro para el estudio de la hemostasia. El aparato consiste en un depósito conectado a través de un tubo a un receptor sobre el que se ha colocado piel porcina.

La Figura 6 representa un gráfico de los resultados de los estudios de resistencia a la hemorragia a chorro (expresada como mm de Hg) de varias formulaciones de matriz / trombina. Los datos están representados como tres grupos de tres barras cada uno. El grupo de tres barras de la izquierda representa los resultados obtenidos mediante el uso de una matriz de CMC, el grupo del centro representa los resultados obtenidos mediante el uso de una matriz de CMC-N y el grupo de la derecha representa los resultados obtenidos mediante el uso de matrices de CMC-N / PEO. Dentro de cada grupo, las barras de izquierda representan los resultados obtenidos mediante el uso de matrices solas, las barras intermedias representan los resultados obtenidos mediante el uso de matrices con trombina cargada en el sitio, y las barras de la derecha representan los resultados obtenidos mediante el uso de matrices con trombina precargada. La muestra de los materiales de matriz usada en cada prueba era de 100 mg. El contenido en trombina en cada tipo de matriz era de 2 U/mg. Cada prueba se repitió 5 veces, los datos se expresaron como la media \pm la desviación típica. La resistencia expresada mediante el uso de una solución de trombina era de 15 mm de Hg.

Descripción detallada

Esta invención incluye varios CPS derivatizados, incluyendo CMC, que pueden interactuar con sustancias biológicamente activas en condiciones suaves de pH, temperatura corporal o ambiental y/o en disoluciones acuosas. La CMC es un polímero formado por residuos de azúcar unidos entre sí, y cada uno de los cuales puede tener un residuo de carboxilo unido a la fracción de azúcar. Existen tres (3) sitios potenciales para una carboxilación en cada residuo de azúcar de la CMC. Debido a que un residuo de carboxilo puede ser químicamente reactivo, esas ubicaciones de la CMC son potenciales sitios para una derivatización. Controlando el grado de sustitución (GS) de la CMC, puede controlarse el número de grupos activos en la CMC derivatizada. Los CPS y las CMC derivatizados de esta invención pueden usarse para uno o más de los siguientes:

(1) como vehículos de administración para la liberación controlada de sustancias bioactivas, tales como factores de crecimiento, péptidos activos, genes, células, factores de coagulación tales como trombina, y antibióticos, hormonas incluyendo epinefrina, esteroides, agentes antiinflamatorios y similares, y vasoconstrictores tales como norepinefrina;

(2) como vehículos de administración para la liberación localizada de sustancias bioactivas, tales como factores de crecimiento, péptidos activos, genes, células, factores de coagulación tales como trombina, y antibióticos, hormonas incluyendo epinefrina, esteroides, agentes antiinflamatorios, y vasoconstrictores tales como norepinefrina y similares;

(3) como reticuladores para la construcción de matrices extracelulares artificiales (ECM);

(4) como aglutinantes para el acoplamiento de proteínas y la absorción de grasa tanto en el diseño de tejidos como en las industrias alimentarias; y

(5) como aditivos en las industrias alimentarias para producir productos lácteos de valor añadido.

Sin embargo, puede apreciarse fácilmente que los CPS y las CMC derivatizados de esta invención pueden usarse para varios fines en los que se desean una o más propiedades fisicoquímicas. Estas propiedades incluyen bioadhesión, bioresorbabilidad, antiadhesión, viscosidad e interpenetración física.

II Modificación de la cadena lateral de la CMC

A CPS y CMC con aminas primarias

Las aminas primarias pueden ser introducidas en las cadenas laterales de un CPS o de una CMC mediante una modificación covalente de los ácidos carboxílicos del polisacárido con compuestos cortos que contienen aminas primarias en alguno de los extremos (por ejemplo, diaminas, tales como etilendiamina), para formar un enlace amida con el residuo de carboxilo, dejando libre una amina primaria en el otro extremo del conector. La longitud del conector puede ser de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 átomos, teniendo ciertas formas de realización entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8 átomos, en formas de realización alternativas entre aproximadamente 5 y 7 átomos, y en formas de realización alternativas adicionales, aproximadamente 6 átomos. La longitud del conector puede elegirse para proporcionar una estructura "floja", en la que se usan conectores relativamente largos, o como alternativa, una estructura "apretada", en la que se usan conectores relativamente más cortos. Los conectores largos y las estructuras flojas pueden ser deseables si se desea que la viscoelasticidad de la composición sea que relativamente baja, en la que se va a incorporar un agente biológicamente activo (por ejemplo, una proteína o un gen), o en la que se desea que la semivida biológica sea relativamente corta. Alternativamente, los conectores cortos y las estructuras apretadas pueden ser deseables si se desea que la viscoelasticidad sea relativamente alta (por ejemplo, ciertas membranas y otras estructuras sólidas), en las que se desean moléculas biológicamente activas relativamente pequeñas (por ejemplo, un ión, un aminoácido, una vitamina o un agente

farmacéutico), o en las que se desea que la semivida biológica de la estructura sea relativamente larga. Puede apreciarse que los expertos en la técnica pueden realizar estudios para determinar la longitud óptima de un conector para que se ajuste a un fin en particular.

5 Para asegurar que únicamente un extremo del conector se acopla a la hebra de CPS, se puede usar un exceso molar (basado en el grado de sustitución del CPS) del conector. Por ejemplo, se puede usar una proporción molar entre los grupos ácido carboxílico activos y el conector en el intervalo de desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 para proporcionar un elevado grado de CPS o de CMC no reticulados. Alternativamente, mediante el uso de una proporción molar baja, puede conseguirse relativamente más reticulación entre las moléculas de CPS. En las formas de realización en las que se desea un CPS muy reticulado se puede usar una proporción molar relativamente baja (por ejemplo, desde menos de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20) entre los residuos carboxilo y los conectores. Puede apreciarse que mediante el uso de un exceso molar de moléculas conectoras en una solución que contiene moléculas de CPS no restringidas (por ejemplo, una solución relativamente diluida de CPS) se puede promover la derivatización del CPS con poca reticulación. Sin embargo, en las situaciones en las que las moléculas del CPS están restringidas (por ejemplo, elevadas concentraciones de CPS) o fuertemente empaquetadas entre sí, puede haber un aumento en la tendencia a que se formen reticulaciones entre diferentes cadenas de CPS. Puede apreciarse fácilmente que los trabajadores con pericia en la técnica pueden elegir una proporción molar entre los residuos de carboxilo y las moléculas conectoras para producir un grado deseado de CPS reticulados.

20 Pueden formarse enlaces amida mediante el uso de cualquier interacción química deseada, incluyendo un acoplamiento mediado por carbodiimida, intermedios de éster reactivos y el uso de compuestos de carbonilación. Para algunas aplicaciones puede ser deseable el uso de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

25 **B. CPS con aldehídos activos**

Pueden producirse grupos aldehído en una molécula de CPS mediante una oxidación del polisacárido. Puede ser deseable usar un peryodato tal como peryodato sódico. Puede producirse una reacción entre dos residuos de hidroxilo secundarios adyacentes para escindir un enlace carbono-carbono entre ellos y crear dos grupos aldehído terminales. El CPS modificado con aldehídos puede recuperarse entonces mediante una liofilización y almacenarse en un desecador a una temperatura de, por ejemplo, aproximadamente 4 °C, en la oscuridad.

35 **C. CPS con grupos tresilo activos**

Los grupos hidroxilo de los polisacáridos también pueden ser activados por ciertos compuestos para formar derivados reactivos intermedios que contienen grupos salientes adecuados para reacciones de sustitución nucleófila. Sin embargo, los grupos hidroxilo de los polisacáridos sólo son levemente nucleófilos, con una nucleofilia aproximadamente igual a la del agua. Para evitar la hidrólisis de los grupos activos por parte de los reactivos de reticulación, el enlace resultante debería ser deseablemente estable en condiciones acuosas. Los cloruros de sulfonilo, tales como cloruro de trifluoroetansulfonilo (cloruro de tresilo), son adecuados para la modificación de los hidroxilos.

Los derivados resultantes de CPS-cloruro de sulfonilo pueden usarse para reacciones de acoplamiento de proteínas o para reticulación.

45 **D. CPS con grupos vinilsulfona activos**

Puede usarse eficazmente divinil sulfona (DVS) para modificar grupos hidroxilo de la CMC y de otros polisacáridos. Para evitar una desfavorable reticulación intra e intermolecular, la DVS debería usarse en exceso. Al igual que con los conectores de diamina analizados anteriormente, la proporción molar entre los residuos de hidroxilo y el conector debería elegirse para proporcionar un grado deseado de CPS no reticulado, tal como una proporción molar entre la vinil sulfona y el hidroxilo de 30 a 1.

55 **E. Utilidad de la invención**

Los efectos de la modificación de CPS tales como la CMC con PEO o con otro óxido de polialquileño (PAO) sobre la activación de los componentes de la coagulación fueron evaluados mediante la determinación de su efecto sobre la estimulación de la vía intrínseca de la coagulación. Se usó el procedimiento del APTT para evaluar la vía intrínseca de la coagulación porque es una prueba clínicamente relevante para la detección de deficiencias en los factores de la coagulación o de anomalías en la vía intrínseca (Imanishi, Ito y col. 1988). En ciertas formas de realización, la presencia de una matriz de CMC-N sin la modificación de PEO era más activa frente al sistema de coagulación intrínseco, según demostraban los decrecientes valores del APTT. En otras formas de realización, la matriz formada por CMC-N / PEO prolongó el APTT, lo que indicaba que el PEO injertado suprimía la activación de los factores de la coagulación en la vía intrínseca de la coagulación. Estos ejemplos son ilustrativos de los efectos de los CPS y PAO derivatizados. Además de los efectos sobre las plaquetas, las proteínas y la coagulación, los PAO pueden afectar a la adherencia de las composiciones a los tejidos, a las propiedades físicas, incluyendo la rigidez, la

viscosidad, la dureza y la semivida biológica, entre otras. Modificando la composición de los CPS / PAO derivatizados.

Se ha documentado el uso de un recubrimiento de PEO en una superficie para evitar que las proteínas o las células se depositen en la superficie (Gombotz 1992). El mecanismo de repulsión eficaz de proteínas de la superficie de materiales injertados con PEO no se conoce con seguridad, pero de acuerdo con una teoría, se reduce el grado de libertad conformacional de las proteínas cuando están cerca de la capa de PEO, y consecuentemente puede producirse una repulsión entrópica entre el PEO y las proteínas (Karlström 1997). Otras teorías pueden tener en cuenta la observación, y esta invención no pretende estar limitada a ninguna teoría en particular. En ciertas formas de realización, las matrices de CMC modificadas con PEO eran menos activas frente al sistema intrínseco de la coagulación (Tabla 3) y las plaquetas (Figuras 3, 4 y Tabla 3) que las matrices de CMC y CMC-N no modificadas. Las matrices de CMC modificadas con PEO también demostraron preservar mejor la desactivación de la trombina en matrices precargadas durante el proceso de congelación y liofilización (Tabla 4). Aunque los mecanismos no se comprenden bien, de acuerdo con una teoría, el PEO puede preservar la actividad de la trombina, o como alternativa, puede facilitar la liberación de la trombina desde las matrices cuando entran en contacto con un fluido. Debido a la deseable propiedad del PEO sobre la limitación de la interacción de las proteínas, puede considerarse que la CMC-N / PEO es un anticoagulante; sin embargo, la propiedad adicional de administración de trombina, las matrices de CMC-N / PEO con trombina exógena permiten una nueva metodología para el tratamiento de las hemorragias proporcionando composiciones hemostáticas antitrombogénicas.

Pueden elaborarse composiciones que contienen un CPS derivatizado de esta invención que tienen un amplio intervalo de propiedades físicas y químicas. Además de ser capaces de variar la carga, la captación de agua y la asociación farmacológica, pueden formarse composiciones con un CPS reticulado que pueden tener unos tiempos de residencia prolongados en comparación con las composiciones no reticuladas. Las preparaciones reticuladas pueden permitir la elaboración y el uso de las composiciones para una gran diversidad de aplicaciones hemostáticas y de administración de fármacos.

Los resultados de los experimentos actuales reflejan el resumen de los diversos parámetros de la matriz, que incluyen las características de hidratación, la actividad frente a la cascada intrínseca de la coagulación sanguínea, la interacción con la trombina exógena y la fuerza mecánica de unión a las superficies hemorrágicas. Haciendo un equilibrio de todas las consideraciones, el injerto de derivados de CMC cargados con trombina con una amina primaria o con PEO demostró una excelente hemostasia. Además, los resultados sugieren que la administración de trombina parece ser una estrategia eficaz en el desarrollo de la hemostasia.

Los descubrimientos de esta invención serán útiles para la administración de fármacos de forma general. Los CPS a unos pH por encima del pK de disociación del átomo de hidrógeno del hidroxilo proporcionarán unas fracciones que contienen residuos de carboxilo cargados negativamente o cargados parcialmente negativamente (-COO⁻), que pueden formar interacciones electrostáticas con porciones cargadas positivamente de fármacos o de proteínas. Por ejemplo, la proteína hemostática trombina está cargada positivamente y puede formar estructuras asociadas iónicamente con CPS para formar una forma de administración de la proteína. De forma análoga, otras proteínas que contienen aminoácidos cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina) en una porción exterior de la proteína también pueden unirse electrostáticamente a grupos carboxilo. Incluso si un aminoácido cargado positivamente u otra fracción de una proteína no está en la superficie, si hay presente una carga positiva suficiente en la superficie para interactuar con un CPS derivatizado cargado negativamente, dichas moléculas pueden estar asociadas con el CPS. Ciertas proteínas contienen residuos de carbohidratos cargados positivamente, tales como N-acetilglucosamina, la cual, a unos intervalos de pH fisiológicos, puede unirse al ión hidrógeno para producir un grupo amino cargado positivamente. Dichos grupos cargados positivamente puede ser un sitio de asociación con un CPS derivatizado o no derivatizado cargado negativamente.

Por el contrario, los fármacos o las proteínas que comprenden residuos cargados negativamente (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico) pueden resultar atraídos electrostáticamente hacia fracciones cargadas positivamente de CPS derivatizados, incluyendo la CMC. Ciertas proteínas terapéuticamente útiles, tales como la heparina, son glucoproteínas, lo que significa que tienen fracciones de carbohidrato unidas al núcleo de aminoácido de la molécula de la proteína. Muchas de las fracciones de carbohidrato de las glucoproteínas están cargadas negativamente e incluyen ácido siálico, únicamente como ilustración. Además, ciertas glucoproteínas tienen residuos de sulfato (-SO₄), que en muchos intervalos de pH fisiológico están cargados negativamente. Dichas formulaciones de proteína / CPS derivatizado, tanto con como sin PAO añadido, pueden usarse para la inyección directa de la proteína en un sitio deseado.

Los ácidos nucleicos tienen numerosos residuos cargados positivamente en las bases de nucleótidos arginina, timina, guanina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los ADN y los ARN pueden ser administrados mediante el uso de CPS y/o de CPS derivatizados. En ciertas formas de realización, pueden usarse ventajosamente los CPS derivatizados cargados negativamente. A modo de ejemplo únicamente pueden usarse grupos sulfonilo, grupos tresilo y similares. Además, los CPS no derivatizados, a unos pH en los que los grupos carboxilo están al menos parcialmente disociados, tienen unas regiones cargadas negativamente que pueden asociarse con ácidos nucleicos cargados positivamente. Dicha administración de ácidos nucleicos puede ser útil en la terapia génica, en la terapia

con nucleótidos antisentido, en la transfección con vectores y en la transfección vírica de células *in vitro*.

Para la transfección génica, el ácido nucleico puede comprender un vector con una región promotora, una región potenciadora y una región codificante. Muchos de dichos ácidos nucleicos son conocidos en la técnica, y no se describirán adicionalmente en este documento. Los ácidos nucleicos usados para los compuestos terapéuticos antisentido incluyen ADN o ARN con unas secuencias complementarias a las de un ARNm que codifica para una proteína cuya traducción no se desea. Algunos ejemplos incluyen ARN dirigidos contra secuencias génicas víricas o celulares, según se describe en las Patentes de EE.UU. N^o 5.858.998 y 6.291.438. Los nucleótidos antisentido adicionales son conocidos en la técnica y no se analizarán adicionalmente.

Puede apreciarse fácilmente que puede añadirse PAO, incluyendo PEO, a dichos vehículos de administración, y conferir por lo tanto unas propiedades deseables de antitrombogénesis, disminución de la adhesión y la activación de las plaquetas, y otras propiedades de los PAO.

Además, pueden formarse ciertos CPS asociados con fármacos y mezclarse después con CPS derivatizados. Por ejemplo, se puede usar un CPS no derivatizado con fracciones carboxilo cargadas negativamente para que se asocie con un fármaco cargado positivamente para una administración (por ejemplo, de trombina). La adición de este material a una composición que comprende un CPS derivatizado (por ejemplo, CMC-N) puede proporcionar una composición en la que el fármaco para administración está asociado con uno de los CPS, y el otro CPS puede conferir unas propiedades deseables a la mezcla (por ejemplo, una viscosidad aumentada o disminuida), que pueden aumentar la semivida del fármaco administrado. Puede apreciarse fácilmente que la formación de una asociación de un CPS derivatizado con un fármaco, y la posterior adición de un CPS no derivatizado, puede proporcionar una composición que tiene ambas características de unión al fármaco deseables y características fisicoquímicas deseables (por ejemplo, una viscosidad aumentada o disminuida). Adicionalmente pueden usarse diferentes tipos de CPS derivatizados que pueden asociarse con diferentes fármacos para una coadministración. Por ejemplo, puede usarse un CPS derivatizado cargado negativamente para asociarlo con un fármaco cargado positivamente, y puede usarse un CPS derivatizado cargado positivamente para asociarlo con un fármaco cargado negativamente. Al mezclar las dos combinaciones entre sí, pueden crearse composiciones que proporcionan unas propiedades farmacodinámicas (por ejemplo, unos efectos farmacéuticos deseados) así como unas propiedades farmacocinéticas deseables (por ejemplo, una semivida tisular). Por lo tanto, mediante el uso de mezclas de un CPS derivatizado y no derivatizado puede proporcionarse un mayor grado de flexibilidad en la formulación de composiciones de administración de fármacos.

Los tipos de fármacos o de agentes biológicos que pueden ser ventajosamente administrados mediante el uso de las composiciones de esta invención no están limitados. Cualquier agente que pueda usarse para el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad o afección puede ser administrado mediante el uso de las composiciones de la invención, siempre que la eficacia del agente no se reduzca por la asociación con las composiciones hasta el punto de hacerlas inadecuadas para su fin previsto. Por ejemplo, algunos fármacos incluyen agentes vasoactivos que incluyen vasodilatadores y vasoconstrictores, hormonas, agentes quimioterapéuticos, factores de crecimiento, factores de la coagulación, antibióticos, agentes antiinflamatorios.

Las descripciones anteriores pretenden ser representativas de las muchas formas de realización diferentes de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar ciertas formas de realización de esta invención.

Ejemplo 1: preparación de CMC con grupos de amina primaria

Pueden introducirse aminas primarias en las cadenas laterales de la CMC mediante una modificación covalente de los ácidos carboxílicos (cadenas de carboxilato) del polisacárido con compuestos que contienen aminas primarias en cualquier extremo, tales como la etilendiamina (EDA), para formar enlaces amida. Para asegurar que únicamente se acopla un extremo del compuesto a cada carboxilato y no reticula las macromoléculas que se están modificando, la diamina debería usarse en exceso. La formación de enlaces amida puede llevarse a cabo mediante métodos que incluyen un acoplamiento mediado por carbodiimida, intermedios de ésteres activos y el uso de compuestos de carbonilación. En este estudio se usó una carbodiimida soluble en agua, el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). En el párrafo siguiente se describe un protocolo.

Materiales

CMC (grado de sustitución, "GS", 1,19), 3,0 g en 300 ml de solución salina tamponada con MES (pH 4,7), EDA, 30,6 g en 45 ml de MES; y EDC, 2,92 g en 5 ml de MES.

Procedimiento

A la solución de CMC se le añadió la solución de EDC con agitación constante. La solución de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min seguido de la adición de la solución de EDA. Después de una reacción durante 48 h, la solución de reacción se transfirió a un tubo de membrana de diálisis (Spectro/Por®, PMCO, 12 - 14.000) y se dializó frente a 4,0 l de NaCl durante 16 h, después frente a un gran volumen de agua desionizada corriente durante 24 h adicionales. La solución de reacción dializada se liofilizó para obtener materiales secos. El producto seco así formado se almacenó en desecadores al aire a 4 °C para su aplicación adicional.

10 Identificación del polímero

La introducción de una amina primaria en la CMC y la formación del conjugado de CMC-N y PEO se confirmaron mediante RMN mediante el uso de un espectrómetro Varian 400. Las señales fueron referenciadas a tetrametil silano (TMS). La cantidad de grupos funcionales de -COOH y -NH₂ en la CMC, en la CMC-N y en la CMC-N / PEO fue cuantificada mediante métodos colorimétricos mediante el uso de rodamina 6G (Liu, Ito y col. 1991) y de TNBS (Ito, Liu y col. 1991), respectivamente.

La Figura 1 representa el análisis de RMN de una CMC-N modificada de esta invención. El espectro mostrado indica unos picos a, b, c, d, y e, junto con una estructura de CMC derivatizada. Están indicadas las porciones individuales de la CMC derivatizada, correspondientes a los picos del espectro de RMN.

La Tabla 1 muestra las cantidades calculadas y las medidas de varias fracciones en matrices que contienen CMC derivatizada o no derivatizada.

25 Tabla 1
Determinación de los grupos activos en matrices de CMC derivatizada

Muestras	Calculado (µmol/mg)		Determinado (µmol/mg)	
	-COOH	-NH ₂	-COOH	-NH ₂
CMC		4,63 0	4,74 ± 0,14	NE *
CMC-N	4,23	NE	4,55 ± 0,09	
CMC-N / PEO	4,02 **	NE	4,18 ± 0,11	

* No encontrado; ** Calculado según la proporción en masa entre el PEO y la CMC-N. Determinaciones realizadas, n = 3.

Ejemplo 2: viscosidad de los composites de CMC-N y de CMC-N / PEO

30 En primer lugar se caracterizaron los derivados de CMC portadores de aminas primarias (CMC-N) preparados a partir de CMC con varios GS (0,8 y 1,2) y pesos moleculares (700 K y 250 KDalton) para conocer la viscosidad de varias formulaciones: (1) gel de composite con PEO (CMC-N / PEO); (2) en presencia (3) en ausencia de ión calcio; y (4) en forma de un coacervado con CMC. El experimento se realizó a la temperatura ambiente mediante el uso de un viscosímetro Brookfield Digital (Modelo VD-II, Brookfield Engineering Laboratory, Inc.; Stoughton, MA) a la velocidad de cizallamiento de 05 y el eje #29. El pH de estos materiales era de aproximadamente 7. Los resultados se muestran en la Tabla 2, a continuación.

35 Tabla 2
Viscosidad de los composites de PEO / CMC

Composición de la solución (%)			Viscosidad (cps)
CMC	CMC-NH ₂	PEO	
1,0	0	0	0,3 x 10 ³
2,0	0	0	1,1 x 10 ³
a) 2,0	0	0	3,4 x10 ⁴
b) 2,0	0	0	1,6 x 10 ³
0	1,0	0	0,3 x 10 ³
0	a) 1,0	0	1,2 x 10 ³
0	2,0	0	0,7 x 10 ³

1,0	0	1,0	$0,4 \times 10^3$
0	1,0	1,0	$0,7 \times 10^3$
0	^{a)} 1,0	1,0	$1,7 \times 10^3$
1,0	1,0	0	$2,3 \times 10^3$ [*]
^{a)} 1,0	^{a)} 1,0	0	$0,9 \times 10^6$ [*]

Salvo que se indique, la CMC usada para la preparación del derivado es CMC-N y para la prueba de viscosidad es aquella con un GS de 1,19; PM, 250.000.

^{a)} CMC con un GS de 0,8; PM, 700.000.

^{b)} Ca ++ presente.

* La mezcla de CMC / CMC-NH₂ se preparó mezclando volúmenes iguales de disoluciones al 2 % de CMC y de CMC-NH₂. La mezcla se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 5 minutos antes de la prueba.

5 Observamos que las disoluciones de CMC no derivatizada y derivatizada tenían sustancialmente la misma viscosidad. Sin embargo, inesperadamente averiguamos que la adición de PEO a cualquiera de las preparaciones de CMC o de CMC-N tenía diferentes efectos. La adición de PEO a la CMC alteró ligeramente la viscosidad (desde 0,3 hasta $0,4 \times 10^3$ cps), mientras que la adición de PEO a la CMC-N aumentó la viscosidad sustancialmente más (desde 0,3 hasta $0,7 \times 10^3$ cps). Por lo tanto, se puede variar la composición de una matriz para proporcionar una viscosidad deseada dependiendo de las necesidades particulares de administración de fármaco o hemostáticas.

10 Ejemplo 3: adhesividad tisular de los composites de CMC-N / PEO

15 Se determinó la propiedad adhesiva tisular de los geles midiendo la fuerza necesaria para desprender los geles de la membrana mediante el uso de un probador de la pegajosidad de bucle de cinta modificado (Model LT-100; ChemInstruments, Fairfield, OH) equipado con un forcímetro digital (Chatillon Model DFM; Greensboro, NJ). Se usaron membranas de intestino porcino como receptor. Las membranas se montaron en cada superficie tanto del panel de prueba como de la abrazadera de la muestra, que se unió al cabezal de tensión mediante una horquilla y un pasador de liberación. El hueco entre las dos membranas se ajustó a 2 ± 1 mm soltando y apretando el pasador de liberación. Se aplicaron $5,0 \pm 0,1$ ml del gel en la membrana unida al panel de prueba. Todas las mediciones se realizaron con los siguientes ajustes:

20 Velocidad de bajada de la abrazadera de la muestra: 9 mm/s
 Tiempo de contacto: 3 minutos
 Área de contacto: $5,31 \text{ cm}^2$
 Velocidad de retirada de la abrazadera de la muestra: 9 mm/s
 25 Altura de retirada: 4,5 cm

Cada experimento se realizó cinco veces. Se registró la fuerza (N) necesaria para desprender el gel y se representó como el valor medio con la desviación típica. Los resultados se muestran en la Tabla 3, a continuación.

30 **Tabla 3**
Propiedades adhesivas tisulares de los composites de PEO / CMC

Composición de la solución (%)			Pico de la fuerza de desprendimiento (N)
CMC	CMC-NH ₂	PEO	
1,0	0	0	$0,12 \pm 0,01$
2,0	0	0	$0,33 \pm 0,01$
^{a)} 2,0	0	0	$0,65 \pm 0,02$
^{b)} 2,0	0	0	$0,49 \pm 0,01$
0	1,0	0	$0,19 \pm 0,04$
0	^{a)} 1,0	0	$0,19 \pm 0,07$
0	2,0	0	$0,46 \pm 0,13$
1,0	0	1,0	$0,15 \pm 0,03$
0	1,0	1,0	$0,24 \pm 0,04$

0	^{a)} 1,0	1,0	0,37 ± 0,01
1,0	1,0	0	0,76 ± 0,14 *
^{a)} 1,0	^{a)} 1,0	0	1,12 ± 0,09 *

Salvo indicación, la CMC usada para la preparación del derivado de CMC-N y para la prueba de adhesión tisular es aquella con un GS de 1,19; PM, 250.000.

^{a)} CMC con un GS de 0,8; PM, 700.000.

^{b)} Ca⁺⁺ presente.

* La mezcla CMC / CMC-NH₂ se preparó mezclando volúmenes iguales de disoluciones al 2 % de CMC y de CMC-NH₂. La mezcla se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 5 minutos antes de la prueba.

5 Como se muestra en la Tabla 3, estos resultados muestran que la adición de CMC y de CMC-N conjuntamente aumenta la adhesividad tisular más de lo esperado basada en la adhesividad tisular individual. Esto indica unas acciones sinérgicas entre la CMC y la CMC-N. Una posible teoría para esta interacción es que la CMC y la CMC-N forman un coacervado, estabilizando así la composición, y por lo tanto pueden aumentar el tiempo necesario para que la composición se disuelva en los fluidos corporales.

Ejemplo 4: PEO y CMC liberados de los composites de CMC-N / PEO

10 Se realizaron estudios de la liberación de CMC y de PEO desde los geles mediante el uso de PBS como medio de liberación. Se montaron membranas de intestino porcino en el fondo de una placa de petri (g = 50 mm) mediante el uso de cinta adhesiva de doble cara. Se extendió uniformemente una alícuota de 5,0 ml de cada gel en la superficie de la membrana. Se cargó cuidadosamente PBS, 10 ml, en la parte superior de la capa de gel, seguido de una incubación a la temperatura ambiente con agitación suave. En los periodos temporales de 3, 10, 20 min, 1 h y 2 h, la placa se inclinó hacia un lado y se pipetearon 1,0 ml de la solución de incubación desde la solución por encima del gel y se analizó para comprobar la cantidad liberada de PEO y de CMC.

15 El PEO liberado fue cuantificado mediante la medición de la absorbancia de la fracción de fluoresceína unida a la cadena de PEG a 500 nm. La cantidad de CMC en la solución de incubación fue determinada mediante la medición de la absorbancia a 480 nm después de una incubación con fenol y ácido sulfúrico a 30 °C durante 20 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4
Cantidades liberadas en el medio de los componentes del gel

Tiempo de incubación (min)	PEO (mg) liberado desde		CMC (mg) liberada desde	
	CMC / PEO	CMC-N / PEO	CMC / PEO	CMC-N / PEO
3,0	0,22 ± 0,11	0,28 ± 0,15	ND *	ND
10,0	0,30 ± 0,10	0,28 ± 0,17	ND	ND
20,0	1,04 ± 0,18	0,59 ± 0,09	ND	ND
60,0	5,07 ± 0,69	2,24 ± 0,21	4,03 ± 0,21	2,15 ± 0,19

* ND, No detectable.

25

Ejemplo 5: estabilidad de los geles de polielectrolitos de CMC / CMC-N

30 Se preparó un gel coacervado de CMC / CMC-NH₂ mezclando volúmenes iguales de disoluciones al 2 % de CMC y de CMC-NH₂ con agitación vigorosa a la temperatura ambiente. Después de la mezcla se observó un precipitado de color blanco, lo que indicaba la formación de un coacervado. El precipitado se dejó crecer y estabilizar a la temperatura ambiente durante 5 min, seguido de una centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min adicionales. El precipitado así formado se incubó con H₂O D. I., PBS, y medio de cultivo tisular, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical, San Luis) a la temperatura ambiente durante dos semanas. Como control se usó una CMC con un GS diferente y el gel de CMC reticulada con calcio. La estabilidad de cada muestra se juzgó mediante una observación directa y se clasificó subjetivamente en una escala de 1 (se disociaba fácilmente), 2 (parcialmente disociado en dos semanas) y 3 (estable durante dos semanas). Los resultados se muestran en la Tabla 5, a continuación.

35

Tabla 5
Estabilidad de los composites de CMC / CMC-N

Medio	^{a)} CMC / Ca ⁺⁺	^{a)} CMC	^{b)} CMC	^{b)} CMC / CMC-N
H ₂ O D. I.	1	1	1	3
PBS	1	1	1	2
DMEM	1	1	1	2

^{a)} CMC con un GS de 0,8; PM, 700.000.
^{b)} CMC con un GS de 1,19; PM, 250.000.

Ejemplo 6: preparación de membranas de CMC-N reticulada

Se disolvió CMC-N, 3,0 g en 15,0 ml de agua D. I. La solución se vertió en una placa de peri (100 x 15 mm) y se colocó en una campana a la temperatura ambiente durante 2 días para que se secase al aire. La membrana así obtenida se puso en una solución de alcohol isopropílico / H₂O que contenía un 0,5 % de glutaraldehído, se agitó suavemente durante 6 h seguido de un lavado con 3 x 50 ml de agua D. I., después se secó al aire. La membrana de CMC-N reticulada es estable en agua D. I., en PBS, en NaCl 1,0 N y en medio de cultivo tisular.

Ejemplo 7: preparación de una esponja de CMC-N reticulada

Se disolvió CMC-N, 3,0 g en 15,0 ml de agua D. I. La solución se vertió en una placa de peri (100 x 15 mm) y se sometió a una liofilización. El producto seco así obtenido es una matriz porosa de tipo esponjiforme. La matriz se puso en una solución de alcohol isopropílico / H₂O que contenía un 0,5 % de glutaraldehído, se agitó suavemente durante 6 h seguido de un lavado con 3 x 50 ml de agua D. I., después se liofilizó de nuevo. La matriz porosa de CMC-N reticulada es estable en agua D. I., en PBS, en NaCl 1,0 N y en medio de cultivo tisular.

Ejemplo 8: preparación de partículas de CMC-N reticulada

Se disolvió CMC-N, 3,0 g en 15,0 ml de agua D. I. A la solución se añadieron 0,1 g de suberato de disuccinimidilo en 2,0 ml de dimetilsulfóxido (DSS / DMSO) con agitación vigorosa. Los precipitados aparecieron poco después de mezclar. La reacción se realizó con agitación durante 6 h, después se dejó reposar en un banco durante 24 h. El sobrenadante se desechó y el sólido se lavó tres veces con grandes volúmenes de agua D. I. Las partículas de CMC-N reticulada con DSS así formadas son estables en agua, en solución salina y en medio de cultivo tisular.

II. Composites hemostáticos de CMC / PEO derivatizados

Las CMC derivatizadas de esta invención pueden ser muy deseables como agentes hemostáticos. Los composites de CMC / PEO puede ser elaborados como se ha descrito anteriormente y usarse como tales, o pueden tener factores hemostáticos incorporados a los mismos. En ciertas formas de realización, se puede incorporar ventajosamente trombina en los productos hemostáticos para ralentizar una hemorragia agresiva y promover la formación del coágulo.

Ejemplo 9: modificación de CMC con etilendiamina

Materiales:

Se obtuvo carboximetil celulosa (CMC) con un peso molecular medio de 250 kdalton (kdal) y un grado de sustitución de 1,19 en Hercules Inc. (Wilmington, DE). La 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), el diclorhidrato de etilendiamina (EDA), el reactivo del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y la trombina se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El derivado de polietilenglicol, metoxi-PEO-SPA (mPEO-SPA, P. M. de 5 kD) se obtuvo en Shearagaa Polymers (Huntsville, AL). La piel de porcino fresca se adquirió en una tienda local.

Se preparó sangre bovina con citrato mezclando una parte de una solución de citrato sódico con nueve partes de sangre completa de un toro adulto sano (cortesía del Dr. William Plummer del Animal Science Department, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, CA).

Modificación del polímero:

A. Modificación de la CMC con etilendiamina

La introducción de grupos amina primarios en la CMC se realizó de acuerdo con los métodos publicados (Liu, 1991). En resumen, a una solución de CMC, 0,30 ml de una solución tampón MES, pH 4,7, se añadió EDC (0,29 g) en 2,0 ml de MES, con agitación constante. La solución de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de la adición de EDA (3,0 g) en 8,0 ml de tampón MES. Después de 48 horas, la solución de reacción se

transfirió a un tubo de membrana de diálisis (Spectro/Por®, P. M. de corte: 12.000 - 14.000 dalton) y se dializó frente a NaCl 1 N (4,0 l) durante 16 horas, después frente a un gran volumen de agua desionizada (DI) corriente durante 24 horas adicionales. La solución dializada se liofilizó para obtener una preparación seca del derivado de CMC y se procesó para la cuantificación de las aminas primarias introducidas para formar la CMC aminada (CMC-N). El producto seco así formado se almacenó en un desecador a 4 °C para los siguientes experimentos.

Ejemplo 10: conjugación de CMC-N con mPEO-PSA

Se injertó PEO en las cadenas laterales de la CMC-N mediante el método descrito previamente (Rhee W 1997), en el que se mezclaron mPEO-SPA, 0,5 g en 5,0 ml de HCl 30,0 mM, con 100,0 ml de una solución de CMC-N que contenía 1,50 g de CMC-N en NaOH 10,0 mM (proporción molar entre el succinimidilo y la amina primaria: 1,5 / 100) con agitación vigorosa a la temperatura ambiente durante 24 h. La solución de reacción se dializó frente a agua desionizada corriente durante 24 h mediante el uso de un tubo de membrana de diálisis Spectro/Por® (PM de corte, 12 - 14.000), después se liofilizó para producir un conjugado de CMC-N y PEO, CMC-N / PEO.

Ejemplo 11: fabricación de la matriz

Se fabricaron matrices de composites de CMC, de CMC-N y de CMC-N / PEO cargando las disoluciones de los polímeros (1,0 % en peso/volumen en agua DI) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (100 ml/pocillo), y se congelaron a una temperatura de -10 °C.

Para determinar el tiempo de trombina parcial activada (APPT) se prepararon matrices colocando las disoluciones de polímero de los composites de CMC, de CMC-N y de CMC-N / PEO en tubos de vidrio (16 x 125 mm; 4,0 ml por tubo). Los tubos se colocaron en un horno a vacío y se secaron a una temperatura de 37 °C a una presión de 1×10^{-2} Torr durante 72 horas.

Para estudiar la adhesión y la agregación de las plaquetas, los materiales de la matriz se vertieron en microplacas de vidrio recubiertas (Van Waters & Rogers, 18 mm de diámetro, 2,0 ml/cm²) y se secaron al aire. Para evaluar la captación de agua y el potencial para detener una hemorragia a chorro, se prepararon las matrices congelando cada solución de polímero (5,0 ml, 1 % en peso/volumen en agua DI) en un tubo de polipropileno de 15 ml y se liofilizaron.

La trombina se incorporó pipeteando 80 µl de solución de trombina reconstituida (500 U/ml, en tampón Tris-HCl, pH 5,0) en las matrices secas. El proceso se realizó a 4 °C para minimizar la pérdida de actividad de la trombina. Las matrices cargadas con trombina se liofilizaron y se almacenaron desecadas a una temperatura de -4 °C para su posterior aplicación.

Ejemplo 12: evaluación de la estructura de los composites de CMC / PEO

Para evaluar las estructuras de los composites de CMC / PEO de esta invención, se estudiaron las matrices de CMC, de CMC-N y de CMC-N / PEO mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM; modelo S-806, Hitachi Ltd., Tokyo, Japón). Se recubrieron las muestras de matrices secas con una fina capa de platino (Pt; 15 nm) mediante el uso de un recubrimiento iónico (sistema de recubrimiento Polaron SEM, Tousimis Research Corporation, Rockville, MD) con los ajustes como sigue: presión: 0,5 mbar; corriente: 20 mA; periodo de recubrimiento: 60 s. Las muestras recubiertas se examinaron a un voltaje de aceleración de 15 KV.

Para determinar las estructuras internas de las matrices, las matrices secas también se congelaron y se fracturaron a una temperatura de -78 °C, se recubrieron con Pt, después se examinaron mediante SEM como se ha descrito anteriormente.

A pesar de las diferencias en las composiciones químicas y los métodos de fabricación de las matrices, todos los materiales derivados de la CMC tenían una morfología superficial externa e interna general similar. Eran muy porosos, con una estructura de poro abierta. Todos los poros estaban conectados entre sí, dando como resultado una red esponjiforme de senos dentro de las matrices. Las características estructurales se crearon controlando las condiciones de liofilización, ya que las matrices estaban pre-hinchadas en una fase acuosa continua, que se eliminó durante el proceso de liofilización. Aunque había similitudes en la morfología general de las matrices, existen diferencias que pueden justificar las diferentes propiedades de las matrices.

Un ejemplo de una micrografía electrónica de barrido de una matriz recubierta con Pt se muestra en las Figuras 2A - 2F. En la Figura 2A, la superficie de una matriz de CMC tiene numerosos poros (aumento: 400 x). La superficie de una matriz de CMC-N se muestra en la Figura 2B. Por el contrario, la Figura 2C muestra que la superficie de una matriz de CMC-N / PEO tiene grandes poros de forma irregular. Una teoría que puede justificar esta observación es que hay unas interacciones más débiles entre los polímeros de la matriz de CMC-N / PEO en comparación con las interacciones relativamente más fuertes entre los polímeros de CMC y de CMC-N en las matrices sin PEO (por ejemplo, las Figuras 2A y 2B).

En la Figura 2D se muestra la estructura interna de una matriz de CMC, a un aumento de 200 x. La Figura 2E muestra la estructura interna de una matriz de CMC-N, y tiene unos poros internos mayores que los de la

correspondiente matriz de CMC. La Figura 2F muestra la estructura interna de una matriz de CMC-N / PEO, que tiene grandes áreas abiertas de forma irregular.

De particular e inesperado interés fue el hallazgo de que las matrices de CMC pura tenían el menor tamaño de poro global (por ejemplo, véase la Figura 2D), teniendo las matrices de CMC-N un tamaño de poro intermedio (por ejemplo, la Figura 2E), y teniendo la matriz de CMC-N / PEO el mayor tamaño de poro.

Estos resultados indican que las matrices con tamaños de poro más pequeños pueden unirse a materiales dentro de la matriz más fuertemente que las matrices con tamaños de poros más grandes. Debido a que se puede alterar el tamaño de poro seleccionando las condiciones de concentración de polímero, el tipo de polímero, el grado de recirculación y otros factores, se puede seleccionar un tipo de matriz que mejor se ajuste a las necesidades de la aplicación en particular.

Ejemplo 13: captación de agua

Se evaluó el comportamiento de hinchamiento de las matrices de varias composiciones midiendo la velocidad y la cantidad de captación de agua. Las muestras de matrices se sumergieron en agua DI, se registró el tiempo necesario para que el hinchamiento alcanzara un estado estacionario y se midió la captación de agua de cada tipo de muestra de acuerdo con los métodos descritos previamente (Liu 1999). Antes de los experimentos, las muestras de matrices se secaron a 102 °C a una presión de 1×10^{-2} Torr en un horno de vacío durante 72 horas, y se determinó el peso, W_d , mediante el uso de una báscula analítica. Después de una incubación en agua, se eliminó el agua adherente colocando las muestras húmedas en una placa de vidrio, inclinando la placa a un ángulo de 60° durante 2 min, golpeteando las muestras con compresas tisulares (Kimwipes™), y se registró la altura de la matriz húmeda, W_w . El contenido en agua se calculó y se expresó como $(W_w - W_d) / W_w$, y la hinchabilidad, W_s / W_d .

Encontramos diferencias significativas entre las matrices con diferentes composiciones químicas (Tabla 6).

Tabla 6
Hinchabilidad de las matrices de CMC derivatizada

Matrices	Tiempo requerido para el equilibrio (min.)	$(W_w - W_d) / W_w \times 100 \%$	W_w / W_d
CMC	3 - 4	$85,3 \pm 2,6$	7,1
CMC-N	2 - 3	$89,3 \pm 3,7$	9,1
CMC-N / PEO	< 1	$93,4 \pm 4,3$	15,1

Los datos se presentan como el valor medio con la desviación típica (n = 5).

La Tabla 6 muestra que las matrices preparadas a partir de una CMC que contiene una amina primaria (CMC-N) tenían una captación de agua más rápida y mayor en comparación con las matrices preparadas a partir de una CMC no modificada. El aumento en la velocidad de hinchamiento era incluso más pronunciado para los composites de CMC-N / PEO, lo que indica que los composites de CMC-N / PEO se comportan mejor que los otros en términos de grado de captación de fluidos y de velocidad de captación de fluidos.

III. Propiedades hemostáticas de los composites de CMC-N / PEO

Se determinaron las propiedades hemostáticas de los composites de CMC-N / PEO mediante el uso de los métodos descritos a continuación.

Ejemplo 14: tiempo de tromboplastina parcial activada

Se determinaron los efectos de las matrices sobre la coagulación sanguínea intrínseca mediante el uso de la prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), mediante el uso del un reactivo de APTT, Alexin™. Las muestras de plasma bajo en plaquetas tratado con citrato (PPP) (0,5 ml) se colocaron, cada una, en un tubo de vidrio prerrecubierto con un material de matriz, seguido de una incubación a 37 °C durante 3 min. Entonces a las muestras de plasma se añadieron 0,5 ml del reactivo de APTT y la mezcla se incubó durante 3 minutos adicionales. Después se añadieron a la mezcla 0,5 ml de una solución de CaCl_2 20 mM, y se registró el tiempo requerido para que se formara un coágulo. La Tabla 7 muestra los resultados de estos estudios.

Tabla 7
Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT)

Muestras	APTT (s)
CMC	32 ± 4
CMC-N	22 ± 5
CMC-N / PEO	43 ± 2
Vidrio	33 ± 2

Datos presentados como el valor medio con la desviación típica (n = 5).

5 Averiguamos que la CMC-N era más eficaz sobre el sistema de la coagulación intrínseca que la CMC sola o la CMC-N / PEO. Por lo tanto, la incorporación de PEO en una matriz suprimía la activación de la coagulación intrínseca.

10 Una teoría para justificar los resultados es que la trombina se quedaba en las matrices, y por lo tanto no estaba disponible para participar en la coagulación, lo que implica muchos productos químicos y sustratos diferentes en el medio líquido. Al disminuir la disponibilidad de la trombina (una proteína) en el medio líquido fuera de la matriz, pueden ralentizarse las velocidades de las reacciones de coagulación. Las matrices de CMC contienen numerosos residuos de ácido carboxílico que pueden unirse a la trombina. Por lo tanto, de acuerdo con esta teoría, al reducir el número de grupos COOH libres y disponibles en la CMC, bien mediante una derivatización con aminas o bien mediante la formación de complejos que contienen PEO o PEGS, puede producirse una menor unión de la trombina, promoviendo así la liberación de la trombina en el medio líquido, promoviendo así la coagulación.

15 Otra teoría que puede justificar las observaciones es que las matrices de CMC tienen unos poros más pequeños que las matrices de CMC-N o de CMC-N / PEO. Las Figuras 3a - 3f muestran que las matrices que contienen PEO tienen unos poros más grandes que pueden ser menos eficaces para atrapar la trombina u otras moléculas de un tamaño y características físicas similares a las de la trombina.

20 **Ejemplo 15: efectos de los materiales de la matriz sobre la agregación, la adhesión y la activación de las plaquetas**

25 Se determinaron los efectos de los materiales de la matriz sobre la adhesión y la agregación de las plaquetas mediante el uso de un plasma rico en plaquetas (PRP), que se preparó a partir de sangre bovina total tratada con citrato. La sangre con citrato se centrifugó a 800 - 1000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, el sobrenadante se recogió y se centrifugó adicionalmente a 3.000 rpm durante 5 minutos para obtener un agregado de plaquetas y un plasma pobre en plaquetas (PPP). El agregado de plaquetas se dispersó en el PPP para producir una suspensión de plaquetas que contiene plaquetas a una concentración de 30 - 35 x 10⁴/μl.

30 Se determinó la agregación de las plaquetas iniciada por los materiales de la matriz midiendo el transcurso temporal de la densidad óptica del PRP, comenzando en el momento de la adición de las disoluciones de los materiales de matriz. En resumen, se añadieron alícuotas de las disoluciones de CMC, de CMC-N y de CMC-N/PEG que contenían trombina (100 μl; 250 μg; 4U/ml de PBS) a 2,5 ml de PRP en un tubo de espectrofotómetro de UV, y se monitorizó la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 580 nm a la temperatura ambiente con agitación constante mediante el uso de un espectrómetro de UV (modelo 160U, Shimadzu, Japón) equipado con un agitador magnético. En otro experimento se probaron por separado los materiales de la matriz y la trombina para comprobar sus capacidades de iniciar la agregación de las plaquetas.

35 Se determinaron la adhesión de las plaquetas y la activación de las plaquetas adherentes mediante el recuento del número de plaquetas adheridas a la superficie de las matrices y analizando la morfología de las plaquetas adherentes mediante el uso de un SEM. Los vaciados de las placas de cada material de matriz se incubaron con PRP, una pieza por 2,0 ml, en viales de vidrio de borosilicato a una temperatura de 37 °C. Después de 20 minutos, las placas se lavaron con tampón de cacodilato 0,1 M un total de 3 veces, después se fijaron mediante inmersión en una solución tamponada de cacodilato que contenía un 2,0 % de glutaraldehído durante 3 horas. Las placas fijadas se deshidrataron con disoluciones de etanol graduado, se sometieron a un secado de punto crítico mediante el uso de CO₂ líquido como fluido de transición, se recubrieron y después se examinaron mediante SEM para comprobar las cifras de plaquetas adherentes y el grado de activación.

40 Las Figuras 3A y 3B representan los resultados de los estudios de la agregación de las plaquetas inducida por los materiales de la matriz (25 μg/ml) en presencia (gráfico superior A) y ausencia (gráfico inferior B) de trombina (4 U/ml): CMC (●), CMC-N (■), CMC-N / PEO (▲) y control (○). Las matrices se prepararon en placas de microtitulación. Las plaquetas se prepararon a partir de sangre bovina completa con citrato a una concentración de 30 - 35 x 10⁴/μl. El eje vertical representa la turbidez de la solución, medida mediante densidad óptica medida a una longitud de onda de 580 nm. Al agregarse las plaquetas, la densidad óptica disminuye.

Las Figuras 4A - 4D representan los resultados de los estudios de la activación de las plaquetas adheridas sobre placas recubiertas con materiales de matriz según se indica los diferentes paneles A, B, C y D. Panel A: CMC, panel B: CMC-N, panel C: CMC-N / PEO, y panel D: control. Los vaciados de las placas (diámetro, 18 mm) con cada matriz se incubaron con 2,0 ml de plasma rico en plaquetas con una concentración de plaquetas de $30 - 35 \times 10^4/\mu\text{l}$ a 37°C durante 20 min.

Las Figuras 4A - 4D representan microfotografías de plaquetas que se adhieren a superficies que comprenden CMC (Figura 4A), CMC-N (Figura 4B), CMC-N / PEO (Figura 4C) y control (Figura 4D). La Figura 4D es un control y muestra una plaqueta con 4 ó 5 pseudópodos que se extienden desde la plaqueta, lo que indica que la plaqueta se adhiere fuertemente a la superficie. La Figura 4A representa una plaqueta adherida a una matriz de CMC. Como con el control mostrado en la Figura 4D, esta plaqueta tiene entre 4 y 6 pseudópodos. Por el contrario, la plaqueta adherente a CMC-N (Figura 4B) tiene menos pseudópodos (2 ó 3), y aparece más ancha. Finalmente, la plaqueta adherida a la superficie de CMC-N / PEO (Figura 4C) no tiene pseudópodos, lo que indica que esta plaqueta no se adhirió activamente al sustrato. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8
Adhesión y activación de plaquetas en matrices de CMC derivatizada

Muestras	Adhesión de las plaquetas ($\times 10^6/\text{cm}^2$)	Agregación
CMC	$6,3 \pm 0,7$	si
CMC-N	$6,9 \pm 0,7$	si
CMC-N / PEO	$0,26 \pm 0,08$	no
Vidrio	$6,4 \pm 1,7$	si

Datos presentados como el valor medio con la desviación típica (n = 5).

No observamos diferencias significativas en la adhesión ni en la activación de las plaquetas entre las superficies de vidrio y las pretratadas con CMC o CMC-N. Sin embargo, las composiciones de CMC-N / PEO de esta invención mostraron tanto una adhesión como una agregación de las plaquetas sustancialmente disminuidas en comparación con la CMC, la CMC-N y el vidrio solo. Adicionalmente, la formación de pseudópodos por parte de las plaquetas fue inhibida por los composites de CMC-N / PEO.

Ejemplo 16: actividad de la trombina

Se midió la actividad de la trombina tanto en forma de solución como después de cargarla en forma sólida en las matrices. En tubos de vidrio que contienen 1,0 ml de fibrinógeno (3 mg/ml) en PBS, a pH 7,0, añadimos bien 100 μl de trombina reconstituida (40 U) o bien una pieza de matriz precargada con trombina. Los tubos se incubaron a una temperatura de 37°C , y se midió el tiempo necesario para que la fibrina formara un gel de acuerdo con los métodos de Liu (Liu 1999). Las disoluciones de trombina reconstituida se liofilizaron en las mismas condiciones usadas para la preparación de las matrices cargadas con trombina. La trombina así tratada se usó como control. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9
Determinación de la actividad de la trombina en matrices de CMC y de CMC-N

Muestras	Tiempo de coagulación (s)	
	Fibrinógeno / PBS	Sangre completa
Trombina en la forma recibida	36 ± 2	15 ± 6
Trombina después de la liofilización	50 ± 11	23 ± 6
CMC precargada con trombina	201 ± 46	149 ± 32
CMC-N precargada con trombina	$153 \pm 7^*$	113 ± 11
CMC-N / PEO precargada con trombina	110 ± 18	107 ± 9

Datos presentados como el valor medio con la desviación típica (n = 5); $P < 0,05$;
* $P < 0,1$ en comparación con la CMC-N / PEO precargada con trombina.

La Tabla 9 muestra que la liofilización disminuyó la actividad de la trombina ligeramente en solución acuosa, según refleja el aumento del tiempo de coagulación en comparación con la trombina no procesada. La actividad de la trombina disminuye progresivamente cuando estaba en una matriz, con el orden de disminución: CMC-N > CMC-N / PEO > CMC.

Este resultado indica que la trombina es más fácilmente adsorbida sobre matrices de CMC, y que por lo tanto está menos disponible en solución para participar en las reacciones de coagulación sanguínea. La CMC-N no tiene una unión tan grande a la trombina como la CMC, las matrices de CMC-N / PEO se unen a la trombina en menor grado.

Por lo tanto, mediante el uso de las composiciones de esta invención, se puede regular la cantidad de un agente activo (por ejemplo, de trombina o de otro fármaco) liberada en solución libre mediante la selección de las diferentes composiciones de una matriz.

5 **Ejemplo 17: tiempo de coagulación de sangre completa**

Se determinó la actividad hemostática de matrices de CMC derivatizada mediante la medición del tiempo necesario para formar un coágulo sanguíneo (tiempo de trombo) en contacto con sangre bovina completa tratada con citrato. En un tubo de vidrio de borosilicato que contenía 100 μ l de la matriz añadimos 5,0 ml de sangre completa tratada con citrato, lo que fue inmediatamente seguido de la adición de 0,5 ml de una solución de CaCl_2 (0,25 M), y se agitó suavemente mientras se incubaba a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$. Se midió el tiempo necesario para la formación del coágulo, los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 9. Como se muestra en la Tabla 9, el tiempo de coagulación para cada tipo de matriz había aumentado en comparación con la no procesada (según se recibió del proveedor) o después de la liofilización. El orden de los tiempos de coagulación, en tiempos crecientes era: CMC-N > CMC-N / PEO > CMC. Por lo tanto, como con los resultados de los tiempos de trombina mostrados en la Tabla 8, las matrices de CMC y de CMC derivatizada retenían la trombina en comparación con cualquiera de las preparaciones de trombina no unida a una matriz.

20 **Ejemplo 18: coagulación de un modelo de hemorragia a chorro**

Se probaron matrices *in vitro* para comprobar el potencial de detención de una hemorragia agresiva mediante la evaluación de su capacidad para formar redes de matriz / fibrina y su capacidad para resistir el aumento de presión en un modelo de hemorragia a chorro **500** como se muestra en la Figura 5. Se preincubó una solución de fibrinógeno (35 mg/ml, PBS) **506** a 37 ± 2 $^{\circ}\text{C}$, se almacenó en un depósito líquido **504**, que un tubo de PVC (d. i. de 3,5 mm) **508** a través de una llave de paso de tres vías (no mostrada). El otro extremo del tubo está unido a un panel de prueba circular **512** con un agujero (8 mm de diámetro) **516** en el centro. Se montó piel porcina limpia (no mostrada) en el panel circular y se sujetó doblemente mediante bridas de cable (no mostradas). Se creó otro agujero (2 mm de diámetro; no mostrado) en la piel, ubicado a 3 mm del agujero del panel de prueba. La solución de fibrinógeno se liberó para que humedeciera la superficie antes de cada experimento. Se humedecieron esponjas de gel de las matrices que contenían, cada una, CMC, CMC-N, CMC-N / PEO o control, 100 mg/esponja, con 200 μ l de la solución de trombina reconstituida (1.000 U/ml) y se colocaron en la parte superior del agujero y el área circundante. Después de 2 min, se abrió la llave de paso y el depósito de líquido se elevó suavemente. La llave de paso se cambió de nuevo tras la salida del líquido desde el agujero a la piel, se registró la altura (h) desde la salida del panel de prueba hasta el nivel del depósito de líquido y se usó para calcular la presión hidrostática (expresada en mm de Hg) aplicada sobre el gel que cubría el agujero de la piel porcina. En otro experimento se probaron matrices precargadas con trombina con el mismo método al descrito anteriormente.

Todos los experimentos para la determinación de la actividad hemostática de las matrices se realizaron de 3 a 5 veces. Los datos se presentan como el valor medio con la desviación típica.

La Figura 6 muestra los resultados de estos experimentos. La Figura 6 es un gráfico de la presión hidrostática (en mm de Hg) sobre el eje vertical en función del tipo de matriz usada para cubrir el poro de la piel. Se muestran tres conjuntos de tres barras cada uno. Cada conjunto de barras representa los resultados de los estudios mediante el uso de matrices que contienen CMC sola (grupo de barras de la izquierda), N-CMC (CMC-N; grupo de barras del centro) y N-CMC / PEO (CMC-N / PEO; grupo de barras de la derecha). En cada grupo de barras, las barras de la izquierda (barras claras) representan los materiales de la matriz solos (por ejemplo, sin trombina). Las barras sombreadas horizontalmente (la central de cada conjunto) representan los materiales de la matriz que han sido precargados antes de colocar la matriz sobre la piel. Las barras sombreadas diagonalmente (la derecha de cada conjunto) representan las matrices sobre las que se había puesto trombina en el sitio.

En ausencia de cualquier material de la matriz, la solución de trombina sola prevenía la hemorragia hasta un punto (umbral de chorro: de aproximadamente 15 mm de Hg). Las matrices olas (barras claras) mostraron una capacidad algo mayor para prevenir el chorro, con unos umbrales de aproximadamente 45 mm HG (CMC sola), 53 mm de Hg (CMC-N sola) y de aproximadamente 52 mm HG (CMC-N / PEO sola).

Por el contrario, la adición de trombina a cada matriz mejoró la capacidad de esa matriz para inhibir la hemorragia a chorro. La adición de trombina precargada en matrices de CMC aumentó el umbral de chorro en más de un factor de aproximadamente 2 (por ejemplo, hasta aproximadamente 85 mm de Hg), y la adición de la trombina *in situ* aumentó el umbral de hemorragia a chorro en aproximadamente 3 veces (hasta aproximadamente 120 mm de Hg). Los resultados eran sustancialmente mayores para las matrices de CMC-N, aumentando la matriz precargada el umbral hasta aproximadamente 130 mm de Hg, y teniendo la matriz cargada *in situ* un umbral de aproximadamente 200 mm de Hg. La matriz de CMC-N / PEO aumentó el umbral de hemorragia a chorro incluso más, teniendo la matriz precargada un umbral de aproximadamente 170 mm de Hg, y teniendo la matriz cargada *in situ* un umbral de más de 200 mm de Hg.

Estos estudios indicaron que las matrices de CMC, tanto derivatizadas como derivatizadas y conjugadas con PEO, pueden aumentar sustancialmente los efectos hemostáticos de la trombina. Las matrices de esta invención pueden proporcionarse con fármacos y pueden aumentar la eficacia de agentes hemostáticos, tanto cuando están preparados en la matriz, haciendo fácil su elaboración y su uso, como cuando se cargan *in situ* durante la cirugía. La incorporación de PEO en una matriz de CMC puede disminuir la adherencia y la activación de las plaquetas, y puede proporcionar una matriz a partir de la cual pueden liberarse agentes farmacológicamente activos y tener unos efectos locales aumentados.

IV Administración de fármacos mediante el uso de CPS derivatizados

Puede apreciarse fácilmente que puede administrarse cualquier número de fármacos, agentes biológicos y otros agentes químicos mediante el uso de los composites de CPS y PE derivatizados de esta invención. Ciertos agentes pueden usarse ventajosamente para la administración local, proporcionando una concentración deseada en un sitio deseado, pero disminuyendo la vez los efectos sistémicos indeseables. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, proteínas terapéuticas, tales como trombina, para ayudar a alcanzar y mantener la hemostasia, factores de crecimiento para hueso, cartílago, piel y otros tipos de tejidos y células. Algunos de estos factores de crecimiento de péptidos y proteínas incluyen la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la angiotensina y los péptidos relacionados, y los péptidos que contienen RGD.

Adicionalmente, algunos fármacos que actúan localmente incluyen fungicidas, histamina, antihistamínicos, fármacos antiinflamatorios (metotrexato), anestésicos locales, fármacos promotores de la angiogénesis (por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, y fármacos antiangiogénicos (por ejemplo, para el tratamiento de tumores).

Los compuestos terapéuticos basados en ADN, incluyendo ADN antisentido, los compuestos terapéuticos génicos y los compuestos terapéuticos basados en ARN, también son adecuadamente administrados mediante el uso de las composiciones de esta invención. Estos agentes pueden usarse para inhibir o para promover la transcripción de genes endógenos, o como alternativa, pueden proporcionar productos génicos exógenos para promover un tratamiento local.

También pueden administrarse agentes quimioterapéuticos administrados localmente. Éstos incluyen, a modo de ejemplo únicamente, antibióticos para tratar afecciones microbianas, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios, agentes antineoplásicos incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos y similares.

También puede apreciarse que pueden administrarse varias hormonas y esteroides, al igual que otros fármacos de acción sistémica, que pueden ser administrados transmucosalmente o transdérmicamente. Estos incluyen IgG, factores de coagulación y enzimas para el tratamiento de mucopolisacaridosis o de otras afecciones.

Algunos fármacos cardiovasculares incluyen vasodilatadores tales como agonistas de los β -adrenorreceptores incluyendo terbutalina y epinefrina a dosis bajas, antagonistas de los α -adrenorreceptores incluyendo norepinefrina, epinefrina a dosis altas y similares, y vasodilatadores incluyendo nitroprusiato y nitroglicerina.

Las vacunas pueden ser administradas transmucosalmente o transdérmicamente.

Los compuestos terapéuticos unidos a CMC incluyendo proteínas y factores de transcripción), compuestos terapéuticos unidos a CMC-N (ADN, ADNc) y otros materiales susceptibles de ser asociados con CMC y CMC-N y después liberados desde los mismos. Proteínas de uniones a lípidos, proteínas o fármacos encapsulados en lisosomas también pueden ser ventajosamente administrados mediante el uso del CPS derivatizado de esta invención.

Referencias:

Liu LS, Ito Y e Imanishi Y. Synthesis and antithrombogenicity of heparinized polyurethanes with intervening space chains of various kinds. *Biomaterials* 12: 390 - 396, 1991.

Ito Y, Liu LS, Matsuo R e Imanishi Y. Synthesis and nonthrombogenicity of polymer membrane with surface-grafted polymers carrying thrombin inhibitor. *Journal of Biomedical Materials Research* 26: 1065 - 1080, 1992.

Liu LS, Thompson AY, Heidaran MA, Poser JW y Spiro RC. An osteoconductive collagen/hyaluronato matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 20: 1097 - 1108, 1999.

Rhee W, Rosenblatt J, Castro M, Schroeder J, Rao PR, Hamer CH y Berg RA. In vivo stability of poly(ethyleneglicol)-collagen composites. En: Harris JM y Zalipsky S, editores. *Poly(ethyleneglicol) Chemistry and Biological Applications*. Washington, DC: ACS Press: 1997: págs. 420 - 440.

Aplicabilidad industrial

5 Las composiciones y los métodos de esta invención son útiles para la administración controlada de fármacos, para la hemostasia y para minimizar las adherencias quirúrgicas. La derivatización de CMC con aminas primarias y/u otros tipos de fracciones activas puede proporcionar unas características estructurales mejoradas, incluyendo poros intersticiales, que pueden contener materiales biológicamente activos y liberarlos en unas condiciones controladas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

5 un carboxipolisacárido (CPS) derivatizado, en el que dicho CPS derivatizado comprende:

un CPS unido covalentemente a uno o más miembros de los grupos que consisten en aminas primarias, cloruros de sulfonilo, cloruros de tresilo y vinil sulfonas; y un óxido de polietileno (PEO).

10 2. Una composición para la administración de un fármaco a un tejido, que comprende:

un carboxipolisacárido (CPS) derivatizado, en el que dicho CPS derivatizado comprende un CPS unido covalentemente a uno o más miembros de los grupos que consisten en aminas primarias, cloruros de sulfonilo, cloruros de tresilo y vinil sulfonas; un óxido de polietileno (PEO); y un fármaco.

20 3. La composición de las reivindicaciones 1 ó 2 en la que dicho carboxipolisacárido (CPS) derivatizado tiene fracciones reactivas formadas mediante uno o más agentes químicos elegidos de entre el grupo que consiste en carbodiimidas, ésteres activos, aldehídos activos y agentes de carbonilación.

25 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho carboxipolisacárido (CPS) derivatizado es producido mediante el uso de clorhidrato de 1-etil-3-B(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho carboxipolisacárido (CPS) es CMC-N.

30 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el óxido de polietileno (PEO) es un polietilenglicol.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6 que incluye un fármaco y en la que el carboxipolisacárido (CPS) derivatizado es carboximetil celulosa (CMS) derivatizada.

35 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho carboxipolisacárido (CPS) derivatizado está cargado positivamente.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho carboxipolisacárido (CPS) derivatizado está cargado negativamente.

40 10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente un carboxipolisacárido (CPS) no derivatizado.

45 11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho agente de derivatización comprende un conector con una fracción reactiva en un extremo de dicho conector.

12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición se seca para formar una membrana, o es un gel o una esponja.

50 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2 - 12, en la que dicho fármaco se elige de entre el grupo que consiste en hormonas, factores de coagulación, trombina, agentes antiinflamatorios, esteroides, antibióticos, ácidos nucleicos, genes, agentes quimioterapéuticos, hormonas peptídicas, factores de crecimiento, hormonas esteroideas, anestésicos locales, vasodilatadores y vasoconstrictores.

55 14. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la preparación de un medicamento para la prevención de la formación de adherencias no deseadas o de cicatrices de tejido en sitios quirúrgicos.

60 15. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 en la preparación de un medicamento para asegurar la hemostasia.

16. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 en la preparación de un medicamento para la prevención de hemorragias.

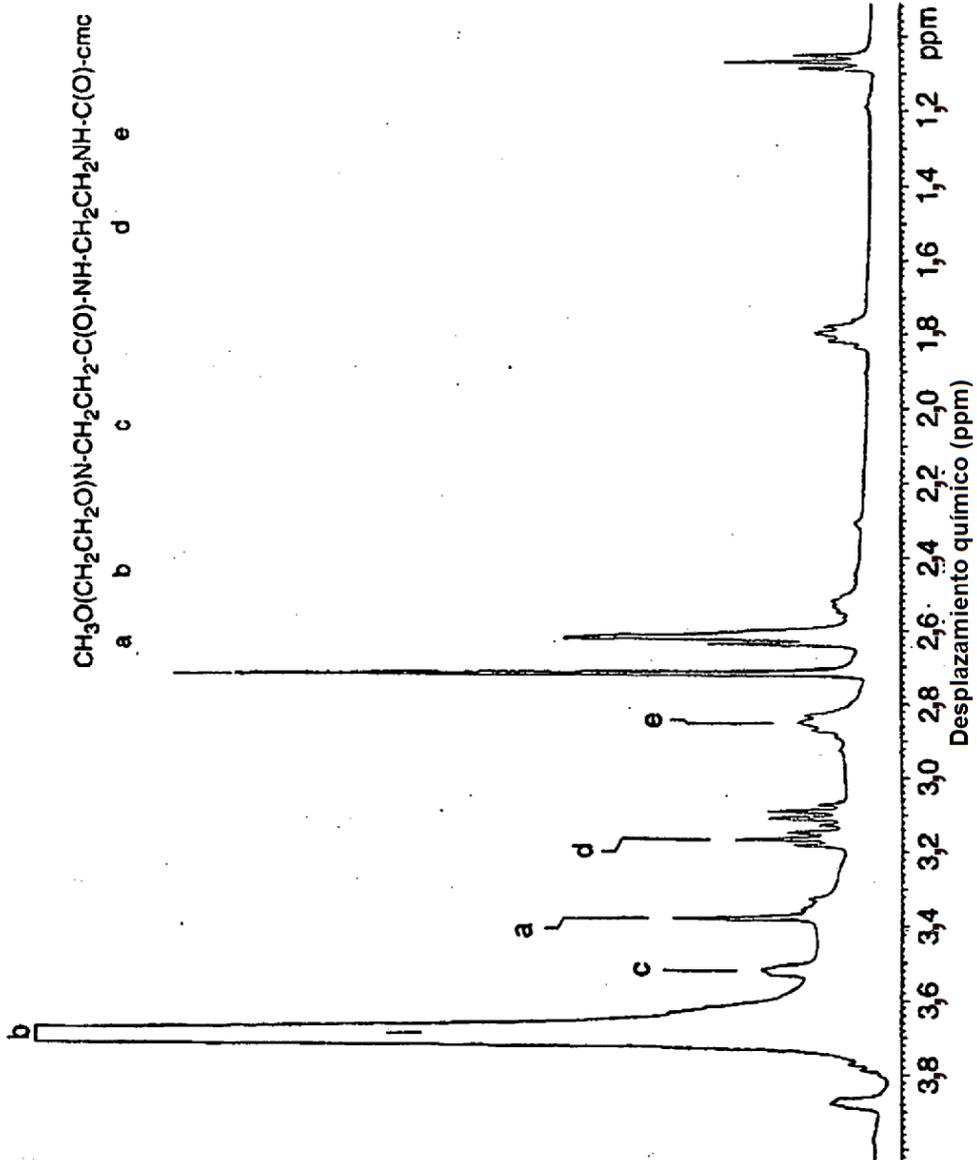


Figura 1

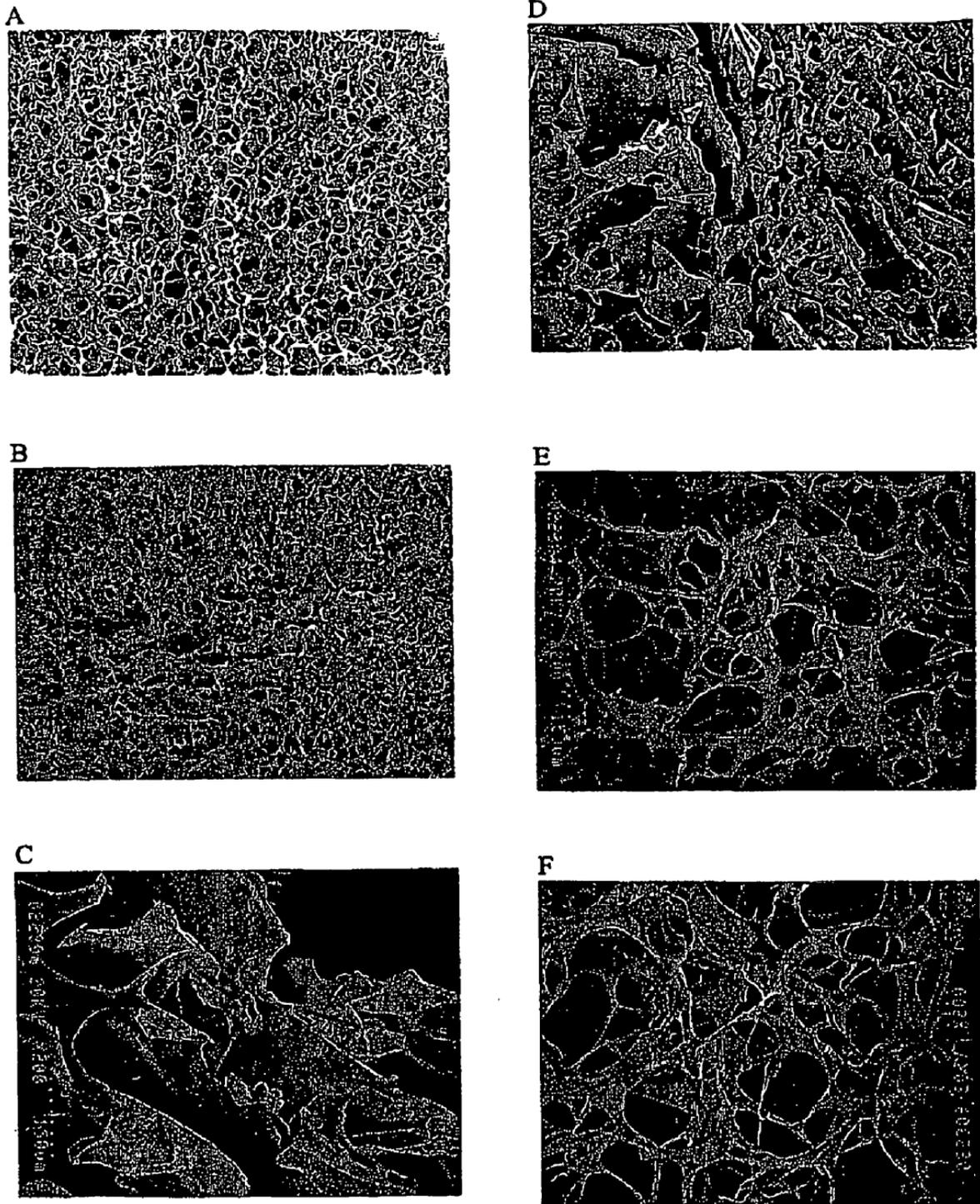


Figura 2

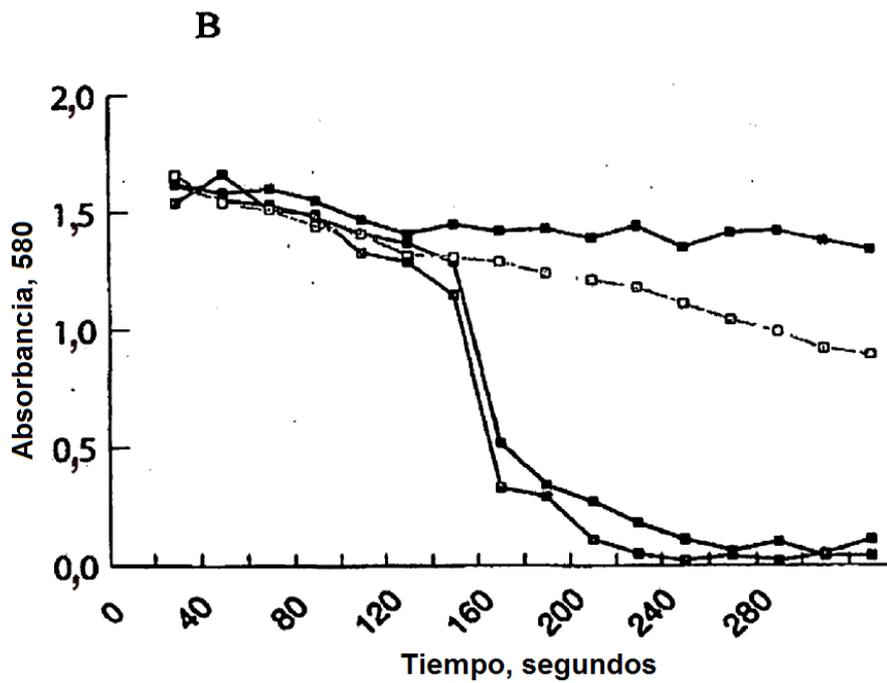
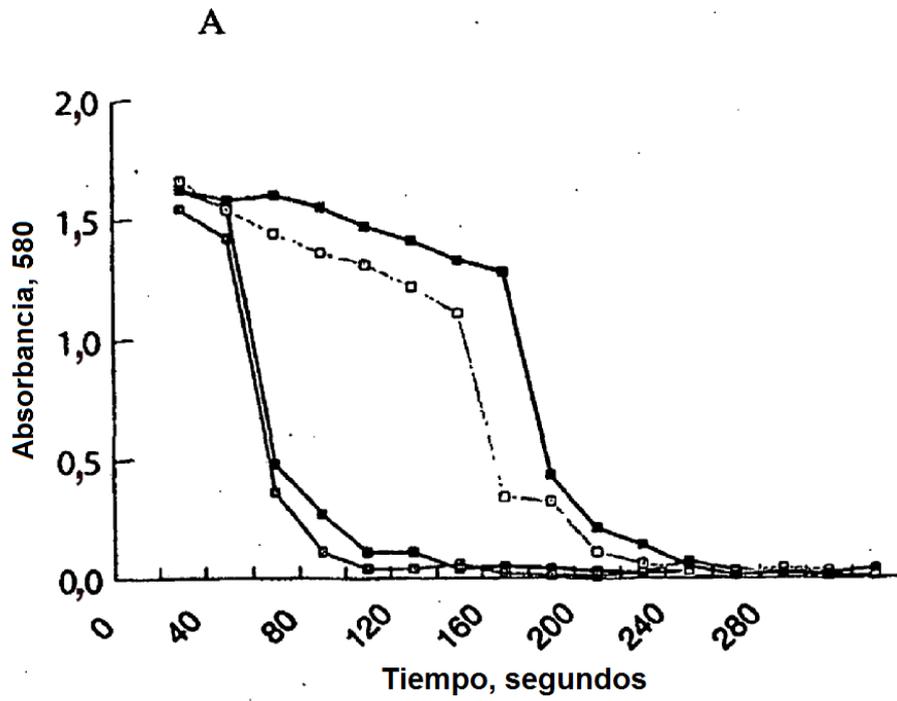


Figura 3

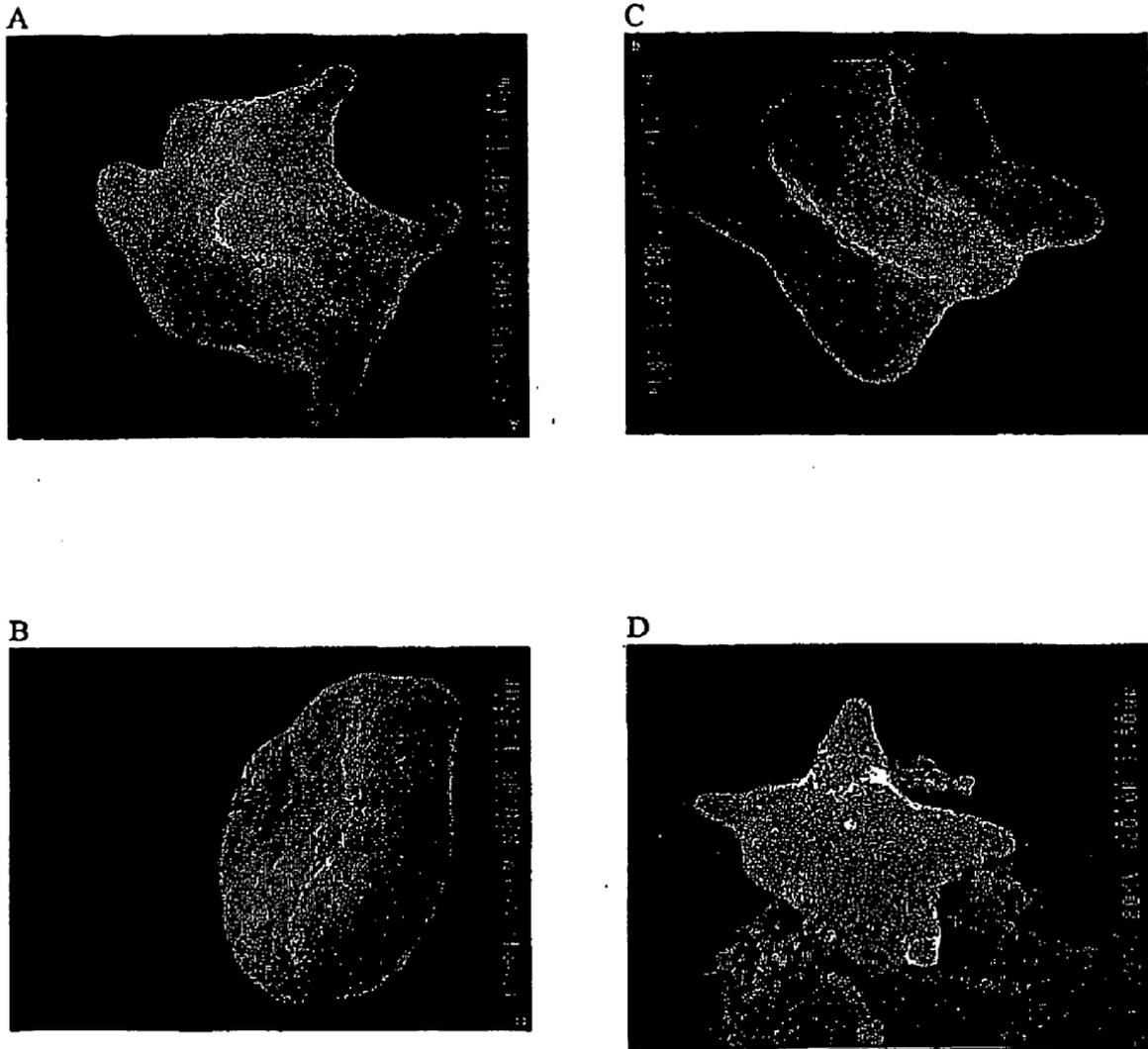


Figura 4

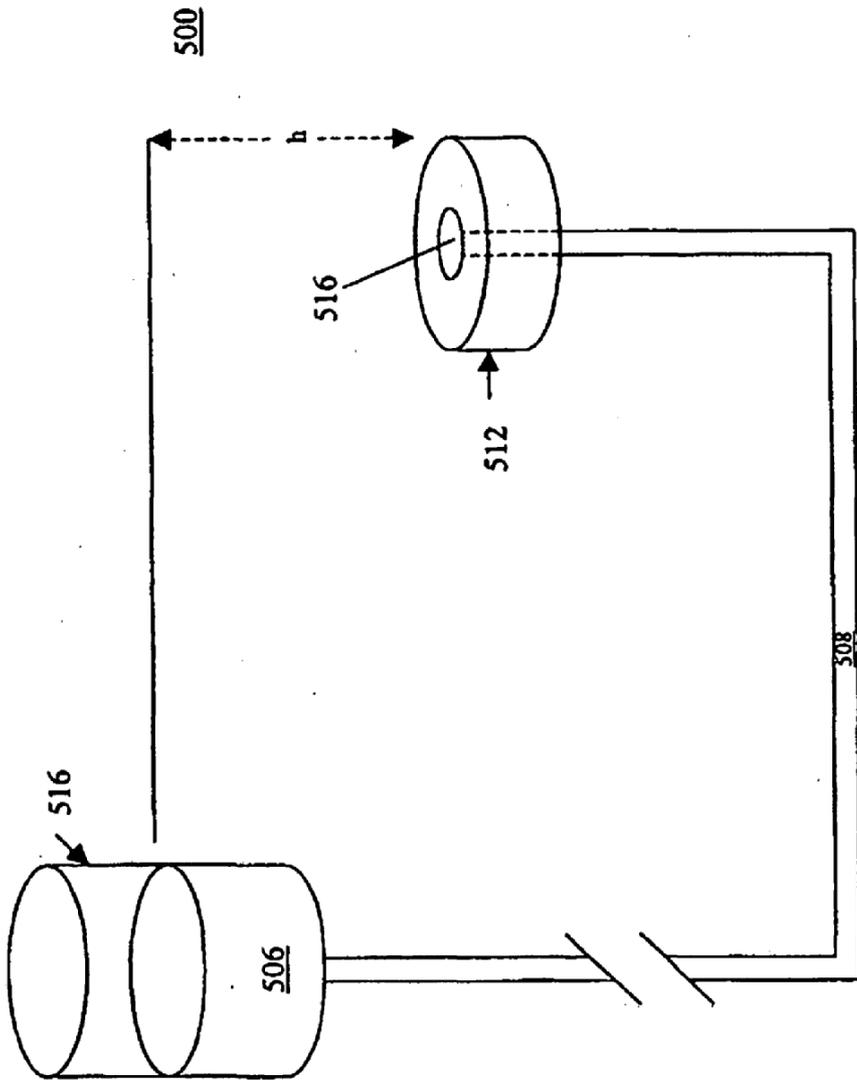


Figura 5

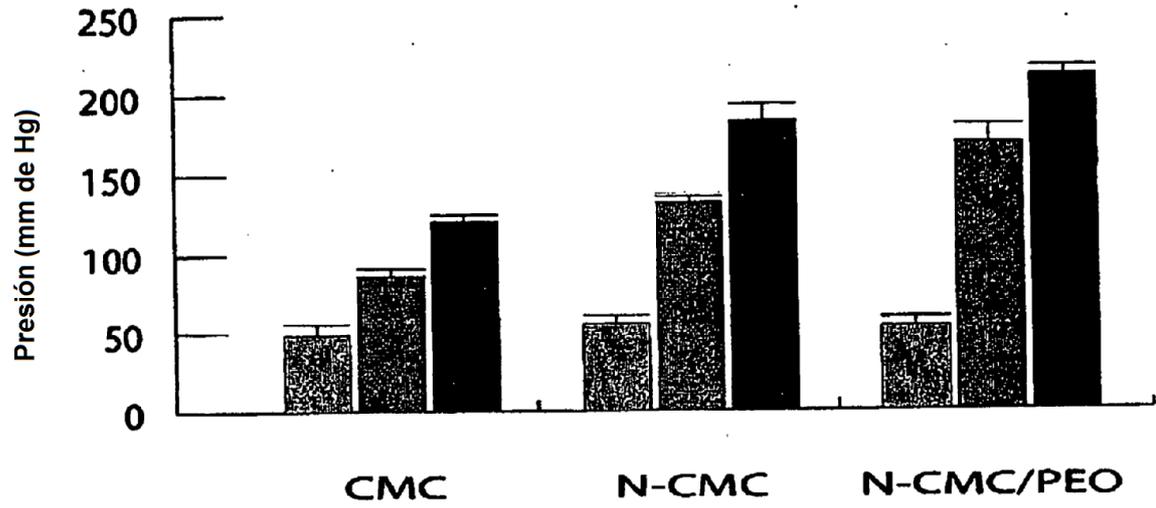


Figura 6