

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 411**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12719158 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2699274**

54 Título: **Composiciones formadoras de gel in situ**

30 Prioridad:

20.04.2011 US 201161477563 P

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

08.06.2015

73 Titular/es:

**CARBYLAN THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
3181 Porter Drive
Palo Alto CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**GRAVETT, DAVID M.;
DANILOFF, GEORGE Y. y
HE, PINGREN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 411 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones formadoras de gel *in situ*

5 **Campo**

La divulgación se refiere de forma general a composiciones formadoras de gel *in situ*, a kits relacionados, y métodos para preparar y usar dichas composiciones, entre otras cosas. Las composiciones formadoras de gel *in situ* se preparan generalmente mezclando una solución acuosa de ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona, un polietilenglicol funcionalizado con tiol, y un tampón, en condiciones adecuadas para formar un gel en un lapso de tiempo desde segundos a una hora de mezcla. Se pueden usar las composiciones biocompatibles resultantes, por ejemplo, como adhesivos biomédicos y sellantes, para la administración localizada de principios activos, como agentes de volumen y cargas, entre otros usos.

15 **Antecedentes**

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado, aniónico, que se produce de manera natural y que se distribuye ampliamente a través de los tejidos conectivos, epiteliales, y neurales. Una persona con un peso promedio de 70 kg (154 lb) posee de forma grosera 15 gramos de ácido hialurónico en su cuerpo, un tercio del cual se repone (degradado y sintetizado) cada día (Stern R. Eur J Cell Biol 83 (7): 317-25, (2004)). Como el ácido hialurónico se encuentra de modo natural en muchos tejidos del cuerpo y es por tanto biocompatible, se cree que es muy adecuado para aplicaciones biomédicas. Desafortunadamente, cuando se administra y se usa ácido hialurónico como agente terapéutico en su forma natural, se aclara normalmente de forma rápida del cuerpo, haciendo que sea necesaria una administración frecuente. De esta manera, son muy deseables formulaciones de ácido hialurónico que mantengan los beneficios del ácido hialurónico sin alterar, tales como una buena biocompatibilidad, pero que superen el problema de un rápido aclaramiento. Dichas formulaciones deben idealmente tener una buena citocompatibilidad, beneficio químico, reología y otras propiedades, y poseen una facilidad de administración.

Se han descrito previamente formas modificadas de ácido hialurónico. Por ejemplo, un ácido hialurónico que tiene un grado bajo de sustitución, así como sus productos reticulados, se describen en la publicación de patente internacional N^o. WO 2011/014432. Los hidrogeles y las composiciones descritas en la anterior poseen propiedades proinflamatorias muy bajas junto con algunas otras características ventajosas, pero no tienden a experimentar una rápida gelificación.

Una rápida gelificación es una característica general de los geles formadores *in situ*. Los hidrogeles formadores *in situ* son composiciones que son líquidas tras la formación y aplicación a un sitio de tratamiento, pero que experimentan una transición de fase para formar un hidrogel posteriormente. Se pueden usar geles biodegradables, formadores *in situ* inyectables que representan una alternativa atractiva a los hidrogeles proporcionados como tales, debido a la facilidad de administración y a la versatilidad en términos de tiempos de gelificación, buena adhesión, y similares.

De esta manera, sería muy ventajoso formar una composición que posea las ventajas de los hidrogeles descritas en la Publicación de Patente Internacional N^o WO 2011/014432, pero con el beneficio añadido y muy deseable de estar en la forma de un gel formador *in situ*.

El documento EP2177236 describe la preparación de un hidrogel de gelificación rápida biocompatible. Los hidrogeles se basan en la mezcla de una macromolécula tiolada (componente A), que puede ser, por ejemplo, ácido hialurónico, con un reticulante que tiene grupos reactivos con tiol (componente B). Los grupos reactivos con tiol incluyen grupos vinilsulfona. Se describe usualmente el componente B como un derivado de PEG.

50 **Sumario**

Se proporcionan en el presente documento materiales para preparar una composición precursora de hidrogel líquido eficaz para formar un hidrogel *in situ*. Los materiales precursores reactivos están suficientemente molidos de tal manera que se puede realizar *in situ* una transición de fase de líquido a sólido, por ejemplo, en contacto directo con un tejido, en ausencia de condiciones o reactivos que podrían ser perjudiciales por otra parte al tejido en el sitio en el que se forma el gel. Los hidrogeles resultantes poseen buena resistencia mecánica y se pueden preparar para tener tiempos de gelificación variables.

En un primer aspecto general, se proporciona en el presente documento un kit que comprende componentes que, tras su mezclado y aplicación a un sitio de tratamiento, da como resultado una formación *in situ* de hidrogel.

En general, el kit comprende (i) un primer recipiente que comprende una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") a una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que VS-HS tiene entre aproximadamente 2% - 70% de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, (ii) un segundo recipiente que comprende un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tiene entre 2 y 8 grupos tioles, y (iii) un tercer

recipiente que comprende una solución tampón 30 -1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 - 12 para proporcionar una solución que tiene una concentración de AH-VS de 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol de 2-8 % (p/v), en el que los componentes, cuando se combinan, son eficaces para formar un gel en segundos (por ejemplo, 5 segundos) a 1 hora de mezcla.

5 En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento una composición líquida resultante de la combinación de (i) una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") a una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que VS-HS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, (ii) un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tiene de 2 a 8 grupos tioles, y (iii) una solución tampón 30 -1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 -12, en el que la concentración del polietilenglicol funcionalizado con tiol en la composición líquida varía entre aproximadamente 4-300 mg/ml, o entre 10-300 mg/ml, son eficaces para formar un gel en segundos (por ejemplo, 5 segundos) a aproximadamente 1 hora de mezcla.

15 En un aspecto adicional más, se proporciona en el presente documento un método para formar una composición líquida capaz de formación de gel *in situ*. El método comprende: (i) añadir un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tiene de 2 a 8 grupos tioles, preferentemente en forma de polvo, a una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") que tiene una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que AH-VS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, para disolver de este modo el polietilenglicol funcionalizado con tiol para formar una solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona, y (ii) combinar la solución de la etapa (i) con una solución tampón 30-1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 - 12, para formar de esta manera una composición líquida que tiene una concentración de AH-VS de 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol de 2-8 % (p/v), donde la composición líquida es eficaz para formar un gel en segundos a aproximadamente 1 hora de combinación.

En un aspecto adicional más, se proporciona en el presente documento un método alternativo para formar una composición líquida capaz de formación de gel *in situ*. El método comprende: (i) añadir una porción pequeña de polietilenglicol funcionalizado con tiol, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso (PEG a AH-VS funcionalizado con tiol en p/p), preferentemente en forma de polvo, a una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") que tiene una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que VS-HS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, para formar de esta manera una solución, (ii) esterilizando opcionalmente la solución de la etapa (i), (iii) añadiendo a la solución de la etapa (i) o la etapa (ii) si se realiza, la cantidad restante de polietilenglicol funcionalizado con tiol, preferentemente en forma de polvo, en el que el polietilenglicol funcionalizado con tiol tiene entre 2 a 8 grupos tioles, y el polietilenglicol funcionalizado con tiol es opcionalmente estéril, para disolver de esta manera la cantidad restante de polvo de polietilenglicol funcionalizado con tiol para formar una solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona, y (iv) mezclar la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona con una solución tampón 30 - 1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 - 12, para formar de esta manera una composición líquida que tiene una concentración de AH-VS de 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol de 2-8 % (p/v), para formar de este modo una composición líquida eficaz para formar un gel en segundos a aproximadamente 1 hora de mezcla.

45 En los aspectos descritos anteriormente y las realizaciones relacionadas, una cualquiera o más de la solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS"), el polietilenglicol funcionalizado con tiol, o la solución tampón, puede ser estéril.

50 Se proporcionan también en el presente documento hidrogeles formados *in situ* resultantes de los kits, la composición líquida, y los métodos anteriormente descritos, los métodos de aplicación a un sitio de tratamiento, los métodos de uso, y similares.

Las realizaciones adicionales de las composiciones, métodos, kits, usos y similares serán evidentes a partir de la siguiente descripción, los ejemplos, y las reivindicaciones. Como se puede apreciar a partir de lo anterior y de la siguiente descripción, todas y cada una de las características descritas en el presente documento, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de dichas características, se incluyen en el alcance de la presente divulgación con la condición de que las características incluidas en dicha combinación no sean mutuamente inconsistentes. Además, se pueden excluir de manera específica cualquier característica o combinación de características de cualquier realización de la presente invención. Otros aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se definen en la siguiente memoria descriptiva, particularmente cuando se consideran junto con los ejemplos y dibujos acompañantes.

Breve descripción de las figuras

65 La **FIG. 1** muestra la reacción del ácido hialurónico con la divinilsulfona en presencia de una base para formar ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (AH-VS).

La **FIG. 2** es un espectro de RMN ^1H del ácido hialurónico modificado con vinilsulfona (AH-VS) preparado como se describe en el Ejemplo 1 (en D_2O). Basándose en la RMN, se determinó que el ácido hialurónico poseía un nivel de sustitución de la vinilsulfona de aproximadamente 11 % por disacárido.

La **FIG. 3** muestra un equipo de presión de rotura utilizado para determinar la presión de rotura como se describe en el Ejemplo 5.

Descripción detallada

Se describirá a partir de ahora la presente invención de manera más completa. La presente invención puede, sin embargo, realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como que está limitada a las realizaciones que se muestran en el presente documento; en su lugar, se proporcionan estas realizaciones de manera que esta divulgación sea extensa y completa, y transmitirán completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia.

Definiciones

Debe destacarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva, las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a un polímero incluye un polímero individual así como dos de los mismos o diferentes polímeros.

A no ser que se indique específicamente otra cosa, las definiciones de los términos usados en el presente documento son definiciones normalizadas utilizadas en las técnicas de la síntesis orgánica, y ciencias de los polímeros y farmacéutica.

Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones descritas a continuación.

Un "polímero biocompatible" es un polímero que tiene productos de degradación que son compatibles con tejido vivo, o que pueden tener propiedades biológicas beneficiosas. El polímero biocompatible puede ser biocompatible por sí mismo y/o puede ser sinérgicamente biocompatible cuando se emplea junto con un principio biológicamente activo.

Se entiende que el término "ácido hialurónico" se refiere a ácido hialurónico no modificado o no derivatizado.

Los términos "derivado de ácido hialurónico" o "ácido hialurónico derivatizado" o "ácido hialurónico modificado" o "ácido hialurónico sustituido" se refieren a ácido hialurónico que se ha derivatizado mediante reacción con, por ejemplo, uno o más restos químicos pequeños tales como divinilsulfona o similares.

El término "reactivo" se refiere a un grupo funcional (por ejemplo, presente en un polímero) que reacciona fácilmente o a una tasa práctica en condiciones convencionales de síntesis orgánica. Esto se diferencia con aquellos grupos que bien no reaccionan o requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción no prácticas para reaccionar (es decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

"Masa molecular" o peso molecular, tal como se usan en el presente documento, en el contexto de un polímero soluble en agua tal como ácido hialurónico, se refiere a una masa molecular promedio nominal de un polímero determinada mediante dispersión de luz multiángulo. Se puede expresar el peso molecular tanto como un peso molecular promedio en número como en un peso molecular promedio en peso. A menos que se indique lo contrario, todas las referencias a pesos moleculares en el presente documento se refieren a un peso molecular promedio en número. En ausencia de un valor de peso molecular, un polímero se puede caracterizar también por su viscosidad intrínseca o inherente, que es un método viscométrico para medir el peso molecular.

El término "hidrogel" se refiere a una red o un gel polimérico hidrófilo tridimensional que contiene agua en el que el agua es la fase continua, por ejemplo, en la que el contenido de agua es mayor que el 50 % (p/p).

Se entiende que el término, "pulverización" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición atomizada.

Por "gelificación" se entiende la formación de un material en un estado gelificado.

Una composición "estéril" es aquella que está exenta de microbios viables tal como se determinó usando el ensayo de esterilidad USP. Véase "The United States Pharmacopeia", 30ª Revisión, The United States Pharmacopeial Convention: 2008.

El término "esponja", tal como se usa en el presente documento significa una estructura de hidrogel poroso.

La expresión "solución acuosa soluble" se refiere a una composición o compuesto que se puede disolver en un tampón acuoso tal como una solución salina tamponada con fosfato a una concentración de al menos 0,1 mg/ml a temperatura ambiente.

- 5 El término "fármaco" o "agente farmacéuticamente activo" o "agente bioactivo" o "agente activo" que se usan indistintamente, significa cualquier compuesto o sustancia orgánica o inorgánica que tiene bioactividad y se adapta o se usa para fines terapéuticos. Proteínas, hormonas, agentes anticancerosos, compuestos químicos de molécula pequeña y miméticos, oligonucleótidos, ADN, ARN y tratamientos génicos se incluyen en la definición más amplia de "fármaco". Tal como se usa en el presente documento, la referencia a un fármaco, así como la referencia a otros
10 compuestos químicos en el presente documento, se entiende que incluye el compuesto en cualquiera de sus formas farmacéuticamente aceptables, que incluyen isómeros tales como diastereómeros y enantiómeros, sales, solvatos, y polimorfos, formas cristalinas particulares, así como mezclas racémicas e isómeros puros de los compuestos descritos en el presente documento, siempre que sea aplicable.
- 15 Un "fármaco insoluble en agua" o un "fármaco que es poco soluble en agua" es aquel que tiene una solubilidad acuosa por debajo de 10 mg/ml.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición (o hidrogel o polímero), tal como se proporciona en el presente documento, se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición que proporciona la respuesta deseada, tal como evitar, disminuir, o eliminar el dolor en un sujeto La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad, y el estado general del sujeto, la gravedad de la dolencia que está siendo tratada, el fármaco o fármacos concretos empleados específicos de la composición, el modo de administración, y similares. Una persona normalmente experta en la materia puede determinar una cantidad "eficaz" adecuada en cualquier individuo usando experimentación rutinaria.
20
25

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia que se describe a continuación puede tener lugar o no, de tal manera que la descripción incluye casos en los que la circunstancia tiene lugar y casos en los que no tiene lugar.
30

El término "sustancialmente" en referencia a determinada característica o entidad significa hasta un grado significativo o casi completamente (es decir, hasta un grado de 85 % o más) en referencia a la característica o entidad.

35 Se entiende que el término "aproximadamente", particularmente en referencia a una cantidad dada, abarca desviaciones de más o menos cinco por ciento.

Se pueden encontrar también definiciones adicionales en las secciones que siguen.

40 Descripción general

La presente solicitud se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de los inventores de una composición formadora de gel *in situ*. Las composiciones precursoras proporcionadas en el presente documento demuestran una rápida gelificación, así como propiedades adhesivas beneficiosas, y buena biocompatibilidad. Empleando reactivos
45 que tienen un grado concreto de modificación polimérica, concentraciones eficaces para favorecer la formación de soluciones homogéneas (es decir, disolución) y rápida gelificación, así como condiciones de pH concretas, los inventores han proporcionado métodos, composiciones líquidas precursoras formadoras de gel, kits, y los hidrogeles resultantes, entre otras cosas, que tienen numerosas características beneficiosas, que se van a describir con más detalle a continuación.
50

Los hidrogeles descritos en el presente documento se forman generalmente mediante reacción del ácido hialurónico que tiene un grado concreto de modificación de la vinilsulfona con un polietilenglicol funcionalizado con tiol. Los hidrogeles resultantes se forman *in situ* en condiciones suaves -sin necesidad de iniciadores o aceleradores u otros aditivos perjudiciales. Las características de la composición, los métodos relacionados, los usos, y los kits, y similares se describirán ahora con más detalle a continuación.
55

Métodos para preparar composiciones precursoras eficaces para formar en geles *in situ*

Reactivos/Componentes

60 Ácido hialurónico modificado con vinilsulfona

En la preparación de los presentes geles formadores *in situ*, uno de los reactivos empleados es el ácido hialurónico modificado mediante reacción con divinilsulfona. Véase, por ejemplo, Fig. 1, que proporciona un esquema de
65 reacción general para preparar ácido hialurónico modificado con vinilsulfona. El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido lineal de origen natural compuesto de unidades de disacáridos alternantes de N-acetil-D-glucosamina y

ácido D-glucurónico unidas mediante enlaces β 1->3 glucuronídicos y β 1->4 glucosaminídicos alternantes, de tal manera que la unidad de repetición es (1->4)- β -D-GlcA-(1->3)- β -D-GlcNAc. El ácido hialurónico para uso en la preparación de una o más composiciones formadoras de hidrogeles *in situ* se derivatiza con vinilsulfona. Véase, por ejemplo, Ejemplos 1, 2, y 3, que describe la preparación de ácido hialurónico modificado con vinilsulfona que tiene niveles variables de sustitución, 11 %, 14 %, y 20 %, respectivamente. Los grupos hidroxilo del ácido hialurónico se transforman en grupos (2-(vinilsulfonil)etoxi) mediante reacción con divinilsulfona en presencia de una base. El ácido hialurónico activado resultante es ácido (2-(vinilsulfonil)etoxi)hialurónico o AH-VS. Por conveniencia, el material se denomina normalmente en el presente documento ácido hialurónico modificado con vinilsulfona o simplemente "AH-VS". Para preparar estas composiciones de gelificación rápida, la extensión de la sustitución de la vinilsulfona en el ácido hialurónico puede variar en cualquier caso de 2 % a 70 %, aunque se prefieren normalmente niveles menores de modificación polimérica en este intervalo. El ácido hialurónico modificado con vinilsulfona ilustrativo poseerá un nivel de sustitución de la vinilsulfona que variará desde 7 % a aproximadamente 35 %, o de forma más preferente de 10 % a 25 %.

Un grado de modificación o sustitución del 2 % significa que un promedio del 2 % de unidades disacáridas del ácido hialurónico contiene un grupo vinilsulfona. Específicamente, en una realización preferida, el ácido hialurónico posee de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 25 % de sus grupos hidroxilo derivatizados mediante una reacción de adición con divinilsulfona. Los grupos hidroxilo del ácido hialurónico se transforman en grupos (2-(vinilsulfonil)etoxi). El ácido hialurónico activado resultante se denomina generalmente en el presente documento ácido (2-(vinilsulfonil)etoxi)hialurónico o AH-VS. En particular, el ácido hialurónico puede poseer un grado de conversión de grupos hidroxilo a grupos 2-vinilsulfonil)etoxi en un intervalo entre dos cualquiera de los anteriores porcentajes: por ejemplo, entre 10 %-35 %, por ejemplo, entre 11 %-35 %, o entre 12-35 %, y así sucesivamente. En particular, el ácido hialurónico puede tener un grado de sustitución de la vinilsulfona seleccionado entre los siguientes porcentajes: 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, y 35 %, junto con los intervalos resultantes de todas y cada una de las combinaciones de enteros proporcionadas, por ejemplo, entre 10-15 %, entre 15-20 %, entre 20-25 %, y así sucesivamente. En una realización más específica, el ácido hialurónico tiene un grado de conversión de grupos hidroxilo a grupos (2-(vinilsulfonil)etoxi) de aproximadamente 10 - 25 % por unidad de repetición de disacárido.

El grado de sustitución/modificación de ácido hialurónico se puede determinar mediante cualquiera de numerosos métodos adecuados, por ejemplo, RMN, UV, o IR, o análisis elemental. Un método preferido para calcular el porcentaje de sustitución de un polímero tal como ácido hialurónico es RMN, por ejemplo, RMN de protones. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 en el que se determinó el grado de modificación del ácido hialurónico basándose en la relación de áreas máximas relativas correspondientes a la vinilsulfona y al grupo acetamida metilo del ácido hialurónico en el espectro de RMN ^1H .

El ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tendrá normalmente un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 10.000 a 2.000.000 daltons. El peso molecular ilustrativo varía entre aproximadamente 15.000 a 1.000.000 daltons, o entre aproximadamente 20.000 a 200.000 daltons. Los intervalos de pesos moleculares adecuados adicionales incluyen de aproximadamente 30.000 daltons a aproximadamente 100.000 daltons, o de aproximadamente 40.000 daltons a 80.000 daltons. Los pesos moleculares de ácido hialurónico son generalmente valores de masa molecular promedio, que se pueden determinar, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por dispersión de luz láser multiángulo (MALLS-SEC). Dependiendo de su fuente, el ácido hialurónico puede tener una polidispersidad (M_w/M_n) de hasta alrededor de 3, o más preferentemente, hasta alrededor de 2. En general, el material de partida del ácido hialurónico tendrá una distribución de pesos moleculares más bien estrecha, con valores menores de aproximadamente 2,5, más preferentemente menores de aproximadamente 2. Las polidispersidades ilustrativas del ácido hialurónico varían de aproximadamente 1,02 a aproximadamente 2,5, en el que el ácido hialurónico de partida puede poseer una polidispersidad de aproximadamente 1,02, 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,3, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 o 2,5, o incluso más.

Como alternativa, un material de partida de ácido hialurónico adecuado para la derivatización puede tener una viscosidad intrínseca, normalmente en centipoise, a una concentración específica en agua, que corresponde a una cualquiera o más de los intervalos de pesos moleculares proporcionados anteriormente.

AH-VS, que tiene cualquier combinación de características descritas anteriormente (extensión de la modificación, peso molecular, etc.), es adecuado para el uso en las composiciones, kits, métodos y usos proporcionados en el presente documento.

60 Polietilenglicol (PEG) funcionalizado con tiol

Los PEG funcionalizados con tiol para uso en la formación del gel *in situ* pueden ser lineales, ramificados (que tienen dos brazos poliméricos), o de brazos múltiples (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más brazos poliméricos que se extiendan desde un núcleo central). Las moléculas del núcleo ilustrativas para PEG de brazos múltiples incluyen eritritol, pentaeritritol, trimetilolpropano, glicerol, dímero de glicerol (3,3'-oxidipropano-1,2-diol), oligómeros de glicerol, sorbitol, hexaglicerol, y similares. PEG-tioles de brazos múltiples como los anteriores poseen brazos de

polietilenglicol que emanan de la molécula del núcleo central y poseen dos o más grupos tiol terminales. Los PEG funcionalizados con tiol se pueden preparar mediante derivatización de material de partida de PEG comercialmente disponible o se puede adquirir directamente de suministradores tales como Pierce (Thermo Fischer Scientific), Laysan Bio, Inc. (Arab, Alabama), SunBio (PEG=SHOP, Corea), y similares.

5 Un PEG funcionalizado con tiol comprende dos o más grupos tiol. Dichos grupos tiol reaccionarán con una vinilsulfona tal como ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona. Los PEG funcionalizados con tiol ilustrativos incluyen PEG-ditiol (HS-PEG-SH o HS-CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)_nSH), PEG-tritiol de 3 brazos (núcleo de glicerina), PEG-tetratiol de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol), o PEG-octatiol de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina). Los anteriores reactivos de PEG de múltiples brazos pueden tener también unos pocos de los brazos funcionalizados con tiol. Los reactivos de tiol adecuados adicionales que tienen PEG como molécula central están disponibles de Laysan Bios (Arab, Alabama) y SunBio (PEG-SHOP, Corea), así como los ditioles aromáticos tales como los disponibles de NanoScience. Los tioles de PEG preferidos poseerán numerosos grupos tiol seleccionados entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8. Son adecuadas también las moléculas de polietilenglicol que tienen 2-8 grupos tiol pendientes sustituidos en la cadena de polietilenglicol lineal.

El peso molecular del PEG tiol es normalmente menor que el del ácido hialurónico modificado con vinilsulfona. En general, el peso molecular del PEG tiol varía desde aproximadamente 200 a aproximadamente 20.000 daltons. El peso molecular ilustrativo adicional varía para el reticulante de PEG tiol está entre aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000 daltons (por ejemplo, que tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kD, 2 kD, 3 kD, 4 kD, 5 kD, 6 kD, 7 kD, 8 kD, 9 kD, o 10 kD, en el que kD es igual a kilodalton) o incluso entre aproximadamente 1.000 a 5.000 daltons. De esta manera, Los PEG tioles que tienen un peso molecular comprendido entre cualquiera de los anteriores pesos moleculares son adecuados para el uso en la formación de los presentes hidrogeles. Por ejemplo, el PEG tiol puede tener un peso molecular entre aproximadamente 500 a 10.000 daltons, o entre aproximadamente 1.000 y 10.000 daltons, o entre aproximadamente 2.000 y 9.000 daltons, o entre aproximadamente 3.000 y 8.000 daltons, y así sucesivamente. Los pesos moleculares ilustrativos para un reticulante tal como PEG ditiol, o cualquiera de los otros reticulantes adecuados descritos anteriormente, incluyen aproximadamente 3350, 3400, y 5000 daltons, entre otros.

Los PEG tioles que tienen cualquier combinación de características tal como se ha descrito anteriormente (arquitectura, por ejemplo, lineal o ramificado, número de grupos tioles, peso molecular, etc., son adecuados para el uso en las composiciones, kits, métodos, y usos proporcionados en el presente documento.

Agentes bioactivos

Los hidrogeles, precursores de hidrogeles, y las composiciones relacionadas y/o los kits proporcionados en el presente documento pueden comprender opcionalmente un agente bioactivo. Los agentes bioactivos incluyen moléculas pequeñas, proteínas, anticuerpos, células, factores de crecimiento, etc., tales como los descritos a continuación.

Los agentes bioactivos que se pueden incluir en los kits, composiciones, y combinaciones proporcionadas en el presente documento incluyen agentes antimicrobianos, antibióticos, analgésicos, antibióticos, agentes antiproliferativos/antimitóticos que incluyen productos naturales tales como alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, y vinorelbina), paclitaxel, epididodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, tenipósido), antibióticos (dactinomicina (actinomycin D) daunorubicina, doxorubicina e idarubicina), antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitranmicina) y mitomicina, enzimas (L-asparaginasa); agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquil sulfonatos-busulfán, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina, trazenos - dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato), análogos de pirimidina (flourouracilo, floxuridina, y citarabina), análogos de purina e inhibidores relacionados (mercaptapurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina [cladribina]); complejos de coordinación del platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas (por ejemplo, estrógeno); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintética y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (tales como activadores del plasminógeno tisular, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigratorios; agentes antisecretorios (tales como brefeldina A); agentes antiinflamatorios tales como esteroides adrenocorticales (hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tiotolol, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, triamcinolona acetona (o cualquier otra sal farmacéuticamente aceptable de triamcinolona), alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluciclonida, fluciclonolona acetónido, halcinonida, betametasona, fosfato sódico de betametasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, y fluocortolona, hidrocortisona-17-butilato, hidrocortisona-17-valerato, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicarboato, clobetasol-17-butilato, clobetasol-17-propionato, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona, y acetato de fluoprenideno. Dipropionato de betametasona monohidratado, flunisolida, fluticasona propionato, furoato de mometasona monohidratado, acetonuro de triamcinolona, fluticasona, furoato, agentes no esteroideos (derivados de ácido salicílico, por ejemplo, aspirina); derivados de para-aminofenol, es decir, acetaminofeno; indol y ácidos

indenoáceticos (indometacina, sulindaco, y etodolac), ácidos heteroaril acéticos (tolmetina, diclofenaco, y ketorolaco), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno y derivados), ácidos antranílicos (ácido mefenámico y ácido meclofenámico), ácidos enólicos (piroxicam, tenoxicam, fenilbutazona, y oxipentatrazona), nabumetona, compuestos de oro (auranofina, aurotioglucosa, tiomalato de oro sodio); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, mofetilo de micofenolato); proteínas de factores de crecimiento mitógenos o morfogénicos, péptidos o miméticos; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la superfamilia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β) que incluyen los TGF- β y las proteínas morfogénicas óseas (BMP) tales como BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; insulina y factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), proteínas hedgehog (SHH e IHH), activinas, inhibinas, factores del hueso desmineralizado (DBM) y factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento hematopoyético (G-CSF, CSF-1, GM-CSF, eritropoyetina, citoquinas y linfoquinas que incluyen la familia de la interleuquinas (IL-1 a 34)), interferones, factores de crecimiento nervioso (NGF), anticuerpos neutralizantes, antagonistas o agonistas, agonistas o antagonistas del receptor del factor de crecimiento, donantes de óxido nítrico; oligonucleótidos de sentido contrario, factores de transcripción, mediadores de la cascada de señalización, y combinaciones de los mismos.

Los antibióticos incluyen antibióticos de la familia de la lincomicina (en referencia a una clase de agentes antibióticos recuperados originalmente de *streptomyces lincolnensis*); Los antibióticos de la familia de la tetraciclina (en referencia a una clase de agentes antibióticos recuperados originalmente de *streptomyces aureofaciens*); antibióticos basados en azufre tales como las sulfonamidas; y así sucesivamente. Los antibióticos ilustrativos de la familia de la lincomicina incluyen la propia lincomicina (6,8-didesoxi-6-[[[1-metil-4-propil-2-pirrolidinil]-carbonil]amino]-1-tio-L-treo-D-galacto-octopiranosido), clindamicina, el derivado 7-desoxi, 7-cloro de lincomicina (por ejemplo, 7-cloro-6,7,8-tridesoxi-6-[[[1-metil-4-propil-2-pirrolidinil]carbonil]amino]-1-tio-L-treo-D-galacto-octopiranosido), y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. Los antibióticos ilustrativos de la familia de la tetraciclina incluyen la propia tetraciclina 4-(dimetilamino)-1,4,4 α ,5,5 α ,6,11,12 α -octahidro-3,6,12,12a-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacencarboxamida), clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, rolitetraciclina, metaciclina y doxiciclina y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables, particularmente las sales de adición tales como la sal de clorhidrato. Los antibióticos basados en azufre ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, las sulfonamidas sulfacetamida, sulfabenzamida, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sulfacetamida de sodio. Los antimicrobianos y/o antibióticos incluyen además compuestos tales como eritromicina, bacitracina, neomicina, penicilina, polimixina B, tetraciclinas, viomicina, cloromicetina y estreptomycinas, cefazolina, ampicilina, tobramicina, tobramicina, clindamicina y gentamicina.

Los analgésicos incluyen compuestos tales como lidocaína, benzocaína, y marcaína.

Un hidrogel que se proporciona en el presente documento puede incluir también células vivas. Las células vivas ilustrativas incluyen citoblastos, citoblastos parenquimales, células derivadas de la sangre, y células de la médula ósea.

Los agentes bioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a aquellos que inhiben uno o una combinación de procesos que incluyen, pero que no se limitan a la división celular, la secreción celular, la migración celular, adhesión celular, producción y/o liberación de citoquinas, quimioquinas (u otro activador inflamatorio), angiogénesis, y/o formación y/o liberación de radicales libres, y/o de la cascada de coagulación. En particular, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden implicar proporcionar la alteración de procesos celulares y/o no celulares implicados en el desarrollo y/o el mantenimiento de adherencias quirúrgicas. De manera adicional, las presentes composiciones pueden proporcionar la alteración farmacológica de procesos celulares y/o no celulares en el desarrollo y/o el mantenimiento de la restenosis. De esta manera, Los agentes bioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a aquellos que inhiben uno o una combinación de procesos que incluyen, pero que no se limitan a la división celular, la secreción celular, la migración celular, adhesión celular, producción y/o liberación de citoquinas, quimioquinas (u otro activador inflamatorio), angiogénesis, y/o la formación y/o liberación de radicales libres. De manera adicional, los agentes bioactivos para uso en el presente documento pueden inhibir o afectar otros procesos implicados en el proceso de cicatrización. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser también eficaces para producir la alteración farmacológica de procesos celulares y/o no celulares que aumentan el desarrollo de la fibrosis. De esta manera, Los agentes bioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a aquellos que aumentan uno o una combinación de procesos que incluyen, pero que no se limitan a la división celular, la secreción celular, la migración celular, adhesión celular, producción y/o liberación de citoquinas, quimioquinas (u otro activador inflamatorio), angiogénesis, y/o la formación y/o liberación de radicales libres. Los agentes bioactivos adicionales pueden aumentar o afectar otros procesos implicados en el proceso de cicatrización de tal manera que las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser agentes hemostáticos y/o agentes de prevención de las adherencias, de tal manera que la adición de un fármaco puede hacer efectivo un aumento o disminución de la fibrosis, y/o dar como resultado un aumento del tejido y/o un aumento o reducción de las adherencias quirúrgicas dependiendo del mecanismo del fármaco. Por ejemplo, un fármaco que disminuye la fibrosis se espera que reduzca las adherencias quirúrgicas. Además, la formulación cargada del fármaco puede aumentar las propiedades sellantes y/o hemostáticas de la formulación, especialmente cuando el agente actúa para aumentar la fibrosis. De manera adicional, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden implicar

proporcionar la alteración farmacológica de procesos celulares y/o no celulares implicados en el desarrollo y/o el mantenimiento de adherencias quirúrgicas o restenosis o en más términos generales uno o más procesos implicados en la fibrosis. De esta manera, Los agentes farmacológicos adicionales incluyen, pero no se limitan a aquellos que inhiben uno o una combinación de procesos que incluyen, pero que no se limitan a la división celular, la secreción celular, la migración celular, adhesión celular, producción de la matriz extracelular, citoquinas (por ejemplo, TNF alfa, IL-1, IL-6), u otro activador inflamatorio, por ejemplo, producción y/o liberación de quimioquinas (por ejemplo, MCP-1 o IL-8)), angiogénesis, y/o la formación y/o liberación de radicales libres. Los agentes que inhiben la fibrosis, la adhesión o la estenosis adecuados se describen detalladamente en, por ejemplo, los documentos WO2004.060346, WO 2005/051452, WO 2006/13547, y en el documento WO 2007/089878, y se determinan también fácilmente basándose en los modelos (animales) in vitro e in vivo tales como se proporcionan en, por ejemplo, el documento WO2004/060346.

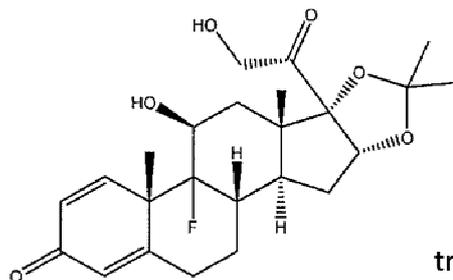
En otras realizaciones, el agente activo puede ser un agente fibrosante, un agente que induce la fibrosis y/o un agente que induce la adhesión, los ejemplos representativos de los cuales se pueden encontrar, sin limitación, en las publicaciones internacionales N^{os} WO 2005/046746, WO 2005/046747, y en el documento WO 2006/124021.

Los fármacos adicionales adecuados para el uso incluyen aquellos que se muestran en detalle en, por ejemplo, el documento WO2004/060346. Por ejemplo, las composiciones ilustrativas pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes: un inhibidor del ciclo celular; paclitaxel; doxorubicina; mitoxantrona; podofilotoxina (por ejemplo, etopósido); un agente inmunomodulador, everolimus; tacrolimus; biolimus; un antagonista de la proteína 90 de choque térmico; geldanamicina; un inhibidor de la HMG-CoA reductasa; simvastatina; un inhibidor de IMPDH; ácido micofenólico; 1-alfa-25 dihidroxi vitamina D3; un agente antimicótico tal como sulconizol; un inhibidor de la quinasa P38 MAP tal como SB220025; un componente de la matriz extracelular tal como fibronectina; colágeno; fibrina; fibrinógeno; polilisinas; quitosán; N-carboxibutilquitosán; una proteína RGD; una citoquina inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en TGFb, PDGF, VEGF, bFGF, TNFa, NGF, GM-CSF, IGF-a, IL-1, IL-8, IL-6, y una hormona del crecimiento; un factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF); una proteína morfogénica ósea (BMP) seleccionada entre BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, o BMP-7; bleomicina; un análogo o derivado de bleomicina; un agente proliferativo que estimula la proliferación celular; dexametasona y sus análogos y derivados; 17- beta -estradiol y sus análogos y derivados; estradiol y sus análogos y derivados; dietilestibesterol y sus análogos y derivados; ciclosporina A y sus análogos y derivados; ácido retinoico todo trans (ATRA) y sus análogos y derivados. Los agentes bioactivos adicionales que se pueden emplear en la presente divulgación se muestran en los documentos WO 2005/046746, WO 2005/046747, WO 2006/124021, WO2004/060346, WO 2005/051452, WO 2006/13547, y en el documento WO 2007/089878.

En particular, el fármaco puede ser una o más proteínas hemostáticas, que incluyen sin limitación, trombina, fibrina, fibrinógeno, factores sanguíneos, factores de coagulación (por ejemplo, Factores VIII y XIII).

En una realización preferida, la composición precursora de hidrogel comprende un corticoesteroide. Los ejemplos de corticoesteroides adecuados incluyen hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tioxortol, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, triamcinolona, sales de triamcinolona tales como triamcinolona acetona, triamcinolona benetonida, triamcinolona furetonida, triamcinolona hexacetona, diacetato de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluciclonida, fluciclonolona acetona, halcinonida, betametasona, fosfato sódico de betametasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, flucortolona, hidrocortisona-17-butilato, hidrocortisona-17-valerato, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicarato, clobetasona-17-butilato, clobetasol-17-propionato, caproato de flucortolona, pivolato de flucortolona, acetato de fluprednido, dipropionato de beclometasona monohidratado, flunisolida, propionato de fluticasona, furoato de mometasona monohidratado, y furoato de fluticasona.

Un compuesto preferido para uso en una formulación de hidrogel que se proporciona en el presente documento es triamcinolona (11β,16α)-9-fluoro-11,16,17,21-tetrahidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona), o una de sus sales, éster, o solvato del mismo. Se muestra a continuación la estructura de triamcinolona acetona.



triamcinolona acetona

El agente bioactivo se premezclará normalmente, se suspenderá en, o se atrapará en una composición formadora de hidrogel *in situ* que se proporciona en el presente documento. Como alternativa, el agente bioactivo puede estar en la forma de un conjugado polimérico, o, se puede unir covalentemente, de una manera liberable, a un componente utilizado para preparar el hidrogel, por ejemplo, el ácido hialurónico modificado o el PEG funcionalizado con tiol.

Método de preparación de los hidrogeles *in situ*

Las composiciones de gelificación rápida proporcionadas en el presente documento se forman normalmente haciendo reaccionar el ácido hialurónico modificado con vinilsulfona y el PEG tiol en condiciones eficaces para formar un gel de formación rápida. En general, las cantidades relativas de reactivos y grupos reactivos, junto con las condiciones de reacción, se ajustan para proporcionar una reacción óptima. La solución precursora de hidrogel se preparó en condiciones suaves y controladas, sin necesidad de fuentes de energía externas. Véanse, por ejemplo, los ejemplos 1-21. Uno o más componentes del kit y/o la composición líquida están preferentemente en forma estéril. En una realización preferida, el AH-VS es estéril. En una realización preferida más adicional, el polietilenglicol funcionalizado con tiol y el tampón son también estériles.

Método 1

Las composiciones precursoras se preparan generalmente como sigue, aunque se apreciará que una persona experta en la materia puede modificar adecuadamente los métodos descritos para llegar a las composiciones, kits, materiales, e hidrogeles proporcionados en el presente documento, basándose en la presente divulgación. En el primer método ilustrativo, el ácido hialurónico modificado con vinilsulfona que se ha descrito anteriormente se disuelve generalmente en un medio acuoso tal como agua, suero salino, o similares. Es decir, se puede usar cualquier AH-VS que tenga las características descritas en el presente documento. Por ejemplo, un ácido hialurónico modificado con vinilsulfona ilustrativo posee un 11 % de sustitución de la vinilsulfona y posee un peso molecular de 100 kilodaltons. El medio acuoso tendrá generalmente un pH que variará entre aproximadamente 5-7, y puede, en determinados casos, ser ligeramente ácido. Idealmente, se proporciona el ácido hialurónico modificado con vinilsulfona como una solución muy concentrada en la extensión posible basándose en su solubilidad acuosa, para permitir una gelificación rápida. Normalmente, el AH-VS se proporciona como una solución a una concentración de aproximadamente 10-300 mg/ml. Los intervalos ilustrativos adicionales de concentraciones adecuadas incluyen los siguiente: entre aproximadamente 15-250 mg/ml, o incluso de forma más preferente entre aproximadamente 20-200 mg/ml. Por ejemplo, el AH-VS puede poseer una concentración seleccionada entre: 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml, 200 mg/ml, 225 mg/ml, 250 mg/ml, o 300 mg/ml. De manera adicional, el AH-VS puede poseer una concentración comprendida en un intervalo derivado de una combinación de dos cualquiera de las concentraciones anteriores, por ejemplo, entre 15 mg/ml y 125 mg/ml, o entre 20 mg/ml y 150 mg/ml, y así sucesivamente. Una concentración elevada es ventajosa con respecto a una formación de gel rápida de la composición precursora resultante tras la mezcla.

Una vez disuelta, la solución acuosa resultante de ácido hialurónico modificado con vinilsulfona se esteriliza a continuación normalmente. Puede realizarse la esterilización de cualquiera de las etapas de esterilización descritas en el presente documento, por ejemplo, tratamiento térmico, esterilización mediante vapor a alta presión (por ejemplo, esterilización mediante autoclave), esterilización mediante óxido de etileno gas (EOG), esterilización supercrítica mediante dióxido de carbono, esterilización por radiación o filtración estéril. Las fuentes de radiación incluyen rayos α , rayos β , rayos γ , haces de neutrones, haces de electrones, y rayos X. En determinadas realizaciones, se emplea la esterilización mediante rayos γ o la esterilización por haces de electrones, en particular para sólidos. En una solución preferida para esterilizar la solución de AH-VS, la esterilización es mediante autoclave. Aunque se puede hacer referencia a uno cualquiera o más componentes del kit o a las composiciones proporcionadas en el presente documento en forma estéril, debe entenderse que dichos componentes pueden ser o no estériles.

A continuación se añade el PEG funcionalizado con tiol a la solución de ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona estéril, preferentemente como un polvo estéril. En general, la cantidad de PEG funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona está en el intervalo de aproximadamente 1:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p). Los componentes se mezclan hasta que se disuelve el PEG tiol. Aunque se puede añadir el PEG funcionalizado con tiol como una solución acuosa, se añade preferentemente como un sólido debido a su elevada solubilidad en un medio acuoso, debido a que la adición en forma sólida evita una dilución adicional de la mezcla de reacción, que puede retrasar los tiempos de gelificación.

La solución de ácido hialurónico-vinilsulfona-PEG funcionalizado con tiol resultante se mezcla a continuación con tampón para formar una composición precursora de gelificación rápida. El tampón está generalmente a un pH entre aproximadamente 7-12. Preferentemente, el tampón está a un pH de entre aproximadamente 7,5 a 11, o incluso de forma más preferente entre aproximadamente 8,0 a 10,5. Los pH ilustrativos de la solución tampón incluyen 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, y 12, o cualquier otro pH en el intervalo anterior. Los tampones adecuados incluyen tampones básicos tales como fosfato de sodio, carbonato de sodio, imidazol, tris, HEPES, ácido bórico, MOPS, y similares. Un tampón preferido es fosfato de sodio. La solución tampón tendrá generalmente una concentración en

un intervalo de entre aproximadamente 30 a 1000 milimolar (mM). Preferentemente, la concentración del tampón es de aproximadamente 35 a 800 mM, o incluso de forma más preferente entre aproximadamente 40-600 mM. El Ejemplo 4 demuestra el efecto del tampón (por ejemplo, pH y concentración) tras la gelificación. Como se puede observar, se prepararon soluciones que experimentaron la gelificación en menos de 2 minutos a partir de la mezcla (los tiempos variaron de instantáneo a 1 minuto 40 segundos).

La concentración del reactivo de PEG-tiol en la composición precursora formadora de hidrogel *in situ* resultante estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 10 a 600 mg/ml. Las concentraciones ilustrativas son entre aproximadamente 15-500 mg/ml o de forma más preferente entre aproximadamente 20 a 400 mg/ml.

La solución precursora resultante forma generalmente un gel en segundos (por ejemplo, 5 segundos) a aproximadamente 1 hora de mezcla. Preferentemente, la solución formará un gel en un lapso de tiempo de aproximadamente 15 minutos (es decir, donde quiera en un lapso de tiempo entre aproximadamente 5 segundos a 15 minutos después de la mezcla, o en un lapso de tiempo de 30 segundos a 15 minutos después de la mezcla), o incluso más preferentemente, en un lapso de tiempo de aproximadamente 10 minutos, o incluso más preferentemente, en un lapso de tiempo de aproximadamente 5 minutos, o incluso más preferentemente, en un lapso de tiempo de aproximadamente 3 minutos de la mezcla.

Se prepararon composiciones de gelificación rápida utilizando PEG-ditiol lineal y PEG tetratiol de 4 brazos como se describe en el Ejemplo 7. Cada una de las composiciones ensayadas gelificó en un lapso de tiempo de un minuto mientras que las presiones de rotura (que indicaban la concentración del gel) variaron de aproximadamente 0,450 a 0,685 PSI (3,1 a 4,72 kPa).

Método 2

En un enfoque ligeramente modificado del método 1, se añadió una pequeña cantidad de PEG-tiol soluble a la solución de ácido hialurónico modificado con vinilsulfona para disminuir el tiempo requerido para la disolución. El PEG-tiol soluble que se añadió es preferentemente estéril.

Como se describe para el método 1 anterior, el ácido hialurónico modificado con vinilsulfona se disolvió generalmente en un medio acuoso tal como agua, suero salino, o similares. El medio acuoso tendrá generalmente un pH que variará entre aproximadamente 5-7, y puede, en determinados casos, ser ligeramente ácido. Idealmente, se proporciona el ácido hialurónico modificado con vinilsulfona como una solución muy concentrada en la extensión posible basándose en su solubilidad acuosa, para permitir una gelificación rápida. Normalmente, el AH-VS se proporciona como una solución a una concentración de aproximadamente 10-300 mg/ml. Los intervalos ilustrativos adicionales de concentraciones adecuadas incluyen los siguiente: entre aproximadamente 15-250 mg/ml, o incluso de forma más preferente entre aproximadamente 20-200 mg/ml. Una concentración elevada es ventajosa con respecto a una formación de gel rápida de la composición precursora resultante tras la mezcla.

Una porción pequeña del PEG funcionalizado con tiol, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso (PEG funcionalizado con tiol en p/p a AH-VS) se añadió a continuación a la solución de ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona, preferentemente como un polvo. Las cantidades ilustrativas adicionales de PEG funcionalizado con tiol que se pueden añadir incluyen entre aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 3,5 % en peso, o de aproximadamente 0,1 % en peso a 2,5 % en peso (PEG a AH-VS funcionalizado con tiol en p/p). Los componentes se mezclaron hasta que se disolvieron.

La solución resultante que contenía ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona y una porción de la cantidad total del PEG funcionalizado con tiol que se va a añadir se esterilizó a continuación normalmente como se ha descrito anteriormente. En una solución preferida, la solución se esterilizó en autoclave.

A la solución resultante, esterilizada normalmente, se añadió a continuación la cantidad restante de PEG funcionalizado con tiol, de nuevo preferentemente como un polvo estéril. Los componentes se mezclaron hasta que se disolvió el PEG tiol. Como en el método 1, aunque se puede añadir el PEG funcionalizado con tiol como una solución acuosa, se añade preferentemente como un sólido debido a su elevada solubilidad en un medio acuoso, debido a que la adición en forma sólida evita una dilución adicional de la mezcla de reacción, que puede retrasar los tiempos de gelificación.

La solución de ácido hialurónico-vinilsulfona-PEG funcionalizado con tiol resultante se mezcló a continuación tal como se ha descrito anteriormente en el método 1 para formar una composición precursora de gelificación rápida.

En ambos métodos, en general, las concentraciones del ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona y del PEG funcionalizado con tiol en la solución precursora de gelificación rápida líquida final, tras un intervalo adicional de tampón, de aproximadamente 2 % a 8 % en peso/volumen. A continuación se pueden seleccionar las concentraciones ilustrativas de cada reactivo entre aproximadamente 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 % y 8 % en peso/volumen, incluyendo todos los intervalos existentes entre los mismos. En una realización preferida, la concentración del ácido hialurónico funcionalizado con vinilsulfona y del PEG funcionalizado con tiol en la solución

precursora de gelificación rápida líquida final, tras la adición de tampón, varía de aproximadamente 2 % a aproximadamente 6 % en peso/volumen.

5 En una o más realizaciones específicas, la composición precursora de gelificación rápida contiene un agente activo que se ha descrito anteriormente. Las clases preferidas de agentes bioactivos incluyen esteroides, factores de crecimiento, agentes antiproliferativos, y antibióticos. Una clase particularmente ventajosa de agentes activos para la incorporación en las presentes composiciones son los corticoesteroides. Los corticoesteroides ilustrativos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: triamcinolona sales de triamcinolona tales como triamcinolona acetona, triamcinolona hexacetona, triamcinolona benetonida, triamcinolona furetonida, y diacetato de triamcinolona y similares, y metilprednidolona. En general, la composición precursora de gelificación rápida contiene entre 10 aproximadamente 0,01 % en peso y aproximadamente 20 % en peso de agente bioactivo, dependiendo de su potencia, basándose en la composición global. Las cantidades ilustrativas de agentes bioactivos contenidas en el hidrogel formador *in situ* están entre aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % en peso, por ejemplo, para un agente bioactivo menos potente, y entre aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, o de 15 aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, o de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3 %, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 % de agente bioactivo, o incluso de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % de agente bioactivo, por ejemplo, para un agente bioactivo más potente tal como triamcinolona acetona.

20 El agente bioactivo puede mezclarse con uno de los reactivos (suponiendo características de no estabilidad o reactividad) del componente del tampón, o alternativamente, añadido en el tiempo de mezcla. Es decir, Puede incorporarse un agente bioactivo en cualquier etapa durante la preparación del precursor en la composición formadora de gel *in situ*.

25 La composición formadora precursora de gel puede contener adicionalmente uno o más aditivos tales como conservantes, desespumantes, agentes formadores de poros, plastificantes, potenciadores de la penetración, colorantes, agentes humectantes, agentes de nivelación, agentes hidratantes, espesantes, cargas, agentes opacificantes, y absorbentes, aunque cualquiera de dichos aditivos debe ser biocompatible y cuando se incluye en la composición precursora, debe ser administrable mediante cualquier medio descrito en el presente documento.

30

Kits

Los componentes anteriores pueden suministrarse en la forma de un kit, por ejemplo, para uso en un escenario clínico. Por ejemplo, de tal manera que un kit puede contener, en un primer recipiente, una solución acuosa estéril o no estéril de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona se puede suministrar como un sólido (por ejemplo, como un polvo), que se disuelve a continuación en un medio acuoso para proporcionar una solución de AH-VS comprendida en los intervalos de concentración que se muestran anteriormente que se podrían proporcionar también generalmente con el kit. En la última realización, se podría proporcionar también un volumen adecuado del medio acuoso para proporcionar una solución de AH-VS comprendida en los intervalos de concentración que se muestran anteriormente con el kit. Comprendido también en el kit en un segundo recipiente está el PEG funcionalizado con tiol, proporcionado preferentemente como un sólido en forma estéril. Se puede proporcionar también el PEG funcionalizado con tiol en el segundo recipiente como una solución acuosa, aunque se ha descrito anteriormente, es preferible la forma sólida de tal manera que no diluye adicionalmente los reactivos tras la mezcla. Se proporciona 45 adicionalmente en un tercer recipiente una solución tampón estéril o no estéril, por ejemplo, que contiene un tampón que se ha descrito anteriormente, por ejemplo, una solución tampón 30-1000 mM a un intervalo de pH que varía entre aproximadamente 7-12.

50 De acuerdo con los métodos anteriormente descritos, en una realización alternativa, el primer recipiente puede contener una solución acuosa estéril o no estéril de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona combinado con una pequeña cantidad de PEG funcionalizado con tiol, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso (PEG a AH-VS funcionalizado con tiol en p/p), o entre aproximadamente 0,1 % en peso a 3,5 % en peso, o entre aproximadamente 0,1 % en peso a 2,5 % en peso (PEG a AH-VS funcionalizado con tiol en p/p).

55 El kit puede comprender además un agente bioactivo que se envasará y se premezclará generalmente por separado con otros componentes de kit inmediatamente antes de su uso. Dicho agente bioactivo se proporciona preferentemente aunque no de forma necesaria como un sólido.

60 Se incluyen también en el kit instrucciones para la mezcla y posterior uso.

Los recipientes que se han descrito anteriormente incluyen cualquier recipiente para envase adecuado, farmacéuticamente aceptable para alojar los componentes anteriores. Por ejemplo, los recipientes adecuados incluyen vidrio, plástico, recipientes formados por hoja y película tales como envases de tipo blíster, frascos, bolsas, 65 ampollas, viales, jeringuillas (simples, dobles y múltiples), pipetas, aplicadores, tubos y similares.

Los componentes anteriores, por ejemplo, pueden cada uno envasarse en una jeringuilla, que generalmente se precinta, por ejemplo, con un tapón venteadado. La jeringuilla puede estar hecha de plástico (por ejemplo, polipropileno, policarbonato, poliestireno) o vidrio o cualquier otro material farmacéuticamente aceptable. El volumen de la jeringuilla puede variar de 0,5 ml a 20 ml, siendo los volúmenes preferibles 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml y 7 ml.

La jeringuilla puede a continuación colocarse en un recipiente, tal como una hoja de tipo bolsa que a continuación se precinta. La bolsa puede precintarse al vacío, precintarse con un gas inerte tal como nitrógeno o argón, o rellenarse tras uno o más ciclos de rellenado contra vacío en el que el gas de rellenado es un gas inerte tal como nitrógeno o argón. Para la bolsa precintada tras uno o más ciclos de rellenado contra vacío, el ciclo puede ajustarse de tal manera que la bolsa se precinta finalmente tanto con vacío como con gas inerte. La bolsa puede contener opcionalmente un desecador y/o un secuestrante de oxígeno.

Método de aplicación

Los componentes descritos en el presente documento pueden aplicarse a cualquiera de numerosos sitios del cuerpo. Los sitios ilustrativos incluyen la piel, membranas mucosas, cavidades del cuerpo, superficies internas de huesos, sitios de tejidos, orificios, arterias, venas, conductos, y similares.

La composición de gelificación rápida proporcionada en el presente documento, o alternativamente, sus componentes, se puede aplicar a un sitio de tratamiento utilizando, por ejemplo, una jeringuilla (con o sin una aguja), un catéter, un trócar, un dispositivo de pulverización ayudado por gas, un aplicador para pulverización anual, un aplicador endoscópico ayudado por gas, o similares. Los dispositivos para pulverización ilustrativos incluyen el Conjunto para Pulverización EASY SPRAY (Baxter AG, EE.UU.), FibriJet (Micromedics Inc. EE.UU.) y así sucesivamente. La serie FibriJet incluye un kit aplicador para atomización normalizado (Aplicador para pulverización manual FibriJet®) así como un kit aplicador para atomización ayudado por gas (Aplicador para pulverización ayudado por gas FibriJet®), ambos adecuados para aplicar a composiciones sujeto de gelificación rápida.

Usos

Las composiciones de gelificación rápida descritas en el presente documento se pueden usar en numerosas aplicaciones, por ejemplo, para el desarrollo embrionario, organización de tejidos, cicatrización de heridas, angiogénesis y tumorigénesis. Véase D. D. Allison y K. J. Grande-Allen, Tissue Engineering, Vol. 12, Número 8, 2131-2140 (2006); G. D. Prestwich et al, Tissue Engineering, Vol. 12, Número 8, 2171-2180 (2006); G. D. Prestwich et al, Tissue Engineering, Vol. 12, Número 12, 3405-3416 (2006).

Por ejemplo, la gelificación rápida, las composiciones pulverizables proporcionadas en el presente documento, que contienen opcionalmente uno o más agentes bioactivos, se pueden usar como composiciones adhesivas, por ejemplo, como adhesivos y precintos de tejidos que se pueden usar para diversas aplicaciones, incluyendo la prevención del sangrado, el cubrimiento de heridas abiertas, y otras aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, las composiciones sujeto se pueden usar para prevenir las adherencias quirúrgicas en las regiones lumbar, dural, nasal, sinusal, abdominal, tendinal, y en las regiones de las articulaciones del cuerpo. Estas composiciones se pueden usar en, por ejemplo, incisiones quirúrgicas para apósitos o tejidos lacerados traumáticamente, retraso del flujo sanguíneo tal como el de las heridas, prevención de la restenosis o de la coagulación sanguínea, administración de fármacos; apósitos para quemaduras, para efectuar la homeostasis, y para añadir reparación y recrecimiento al tejido vivo. Las composiciones se pueden usar para suplementar o inducir y regenerar órganos o tejidos dañados en un sujeto mamífero, tal como un ser humano. La composición se descompone o absorbe, o alternativamente, permanece en el sujeto (por ejemplo, el sujeto mamífero) sin tener influencias adversas sobre el sujeto cuando se incluye o contiene en el anterior. Cuando se emplea como un precinto, la composición de gelificación rápida es útil en las siguientes regiones del cuerpo: vascular, dural, pulmonar, del intestino, de la vejiga, intestino, ocular, y tópica. Por ejemplo, cuando se emplea como precinto vascular, la composición sujeto se puede usar como un precinto vena a vena, un precinto arteria a vena, un precinto vena a arteria, un precinto vena a polímero sintético, un precinto arteria a polímero sintético, un precinto polímero sintético a arteria, y un precinto polímero sintético a vena. Las composiciones pueden usarse también para cirugía artroscópica o para cirugía abierta de articulaciones, por ejemplo, para reparar el tejido de la articulación (es decir, cartílago).

Cuando la meta es que la composición se adhiera a la superficie de un tejido, la composición debe tener suficiente fuerza adhesiva y suficiente fuerza cohesiva de tal manera que se pueda producir la adhesión al tejido sin que la composición se rompa, o rasgue y caiga para fuera del tejido al cual se va a aplicar. La fuerza adhesiva de la composición se refiere a la capacidad de la composición de permanecer unida a la superficie a la cual se va a aplicar, mientras que la fuerza cohesiva de la composición se refiere a la capacidad de la composición de permanecer como una entidad individual cuando se aplican fuerzas externas a la composición. Para medir la combinación de fuerza adhesiva y cohesiva, se puede realizar un ensayo de quemadura (véase, por ejemplo, Ejemplo 5). Si una composición posee una presión de estallido de menos de 0,2 PSI (1,38 kPa), entonces, la composición se caracteriza como que tiene una fuerza cohesiva/adhesiva relativamente débil. Cuanto mayor sea la fuerza de estallido presentada por la composición, mayor será la fuerza adhesiva/cohesiva de la composición. Las

composiciones de hidrogel proporcionadas en el presente documento presentan buena fuerza adhesiva y cohesiva.

Las composiciones de gelificación rápida sujeto pueden usarse también como rellenos de tejidos, rellenos dérmicos, agentes de carga, por ejemplo, como agentes de volumen uretrales o esofágicos, y agentes embólicos así como agentes para reparar defectos/lesiones del cartílago y agentes para potenciar la reparación y/o el crecimiento del hueso.

Las composiciones de gelificación rápida sujetos se pueden usar también como vehículos de administración de fármacos, por ejemplo, para administrar localmente un agente bioactivo por vía tópica, intramuscular, intraarticular, subcutánea, a la región ocular, intradérmica, para tratar defectos en huesos, defectos en cartílagos, orificios en tejidos y para las luces en los cuerpos.

Las composiciones sujeto se pueden usar también en el tratamiento de la osteoartritis o de la artritis reumatoide, o para otros trastornos artríticos inflamatorios tales como gota o enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio (por ejemplo, mediante inyección en el espacio intraarticular de una articulación), o en la reducción o la prevención de adherencias que se pueden formar tras un procedimiento quirúrgico.

Se describirá ahora la presente solicitud junto con determinadas realizaciones. La presente divulgación cubre todas las alternativas, modificaciones, y los equivalentes que se incluyen en el alcance de las reivindicaciones. De esta manera, lo siguiente ilustrará la práctica de la presente solicitud, para los fines de ilustración de determinadas realizaciones y se presenta para proporcionar lo que se cree que es una descripción útil y fácilmente comprensible de sus procedimientos y aspectos conceptuales.

Aspectos y realizaciones ilustrativas

Los siguientes son aspectos y realizaciones ilustrativas de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Aspecto 1. En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende:

- (i) un primer recipiente que comprende una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") a una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que AH-VS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona,
- (ii) un segundo recipiente que comprende un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tiene entre 2 y 8 grupos tioles, y
- (iii) y un tercer recipiente que comprende una solución tampón 30 -1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 -12, en una cantidad eficaz, cuando se mezcla con los contenidos del primer y el segundo recipientes, para proporcionar una solución que tiene una concentración de AH-VS de 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol de 2-8 % (p/v), donde los componentes del primer, segundo y tercer recipientes, cuando se combinan, son eficaces para formar un gel en un lapso de tiempo de aproximadamente 5 segundos a 1 hora de mezcla. (Uno cualquiera o más del AH-VS, el polietilenglicol funcionalizado con tiol, y la solución tampón puede estar en forma estéril).

Aspecto 2. En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición líquida que puede formar un hidrogel tras la mezcla de sus componentes. La formulación líquida se forma a partir de la combinación de (i) una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") a una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que AH-VS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, (ii) un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tiene de 2 a 8 grupos tioles, y (iii) una solución tampón 30 -1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 -12, en el que la concentración del polietilenglicol funcionalizado con tiol en la composición líquida varía entre aproximadamente 4-300 mg/ml, y la composición líquida pulverizable es eficaz para formar un gel en aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 hora de mezcla de componentes (i), (ii) y (iii). (Uno cualquiera o más del AH-VS, el polietilenglicol funcionalizado con tiol, y la solución tampón puede estar en forma estéril).

Aspecto 3. En un tercer aspecto, se proporciona un método para formar una composición líquida pulverizable capaz de formación de gel *in situ*. Comprendiendo el método las etapas de:

- (i) añadir un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tenga entre 2 y 8 grupos tiol a una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") que tiene una concentración de entre aproximadamente 4-300 mg/ml, en el que el AH-VS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, para disolver de este modo el polietilenglicol funcionalizado con tiol para formar una solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona, y (ii) combinar la solución de la etapa (i) con una solución tampón 30-1000 mM a un pH que varía entre aproximadamente 7 - 12, para formar de esta manera una composición líquida que tiene una concentración de AH-VS de 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol de 2-8 % (p/v), donde la composición líquida es eficaz para formar un gel en aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 hora de mezcla.

Aspecto 4. En un cuarto aspecto, se proporciona un método para formar una composición líquida capaz de formación de gel *in situ*, en el que el método comprende las etapas de:

(i) añadir una porción de una cantidad global de polietilenglicol funcionalizado con tiol, preferentemente en forma estéril, a una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") que tiene una concentración de entre aproximadamente 10-300 mg/ml, en el que AH-VS tiene entre aproximadamente 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona, para formar de esta manera una solución,

(ii) esterilizar preferentemente la solución de la etapa (i),

(iii) añadir a la solución de la etapa (i) o la o la etapa (ii) si se realiza, la cantidad restante de polietilenglicol funcionalizado con tiol, en el que el polietilenglicol funcionalizado con tiol tiene entre 2 a 8 grupos tioles, para disolver de esta manera la cantidad restante de polvo de polietilenglicol funcionalizado con tiol para formar una solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona, y

(iv) mezclar la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona con una solución tampón 30 - 1000 mM preferentemente estéril a un pH que varía entre aproximadamente 7 - 12,

para formar de esta manera una composición líquida que tiene una concentración de AH-VS de 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol de 2-8 % (p/v), donde la composición líquida es eficaz para formar un gel en un lapso de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 hora de mezcla.

Realización 1. En una realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona posee entre aproximadamente 7 % - 35 %, o de 10 % a 25 %, de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona.

Realización 2. En una segunda realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con la Realización 1, el polietilenglicol funcionalizado con tiol posee numerosos grupos tiol seleccionados entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8.

Realización 3. En una tercera realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con la realización y/o la Realización 2, el polietilenglicol funcionalizado con tiol posee numerosos grupos tiol seleccionados entre 2, 3, y 4.

Realización 4. En una cuarta realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con uno cualquiera o más de los Aspectos 1-3, El ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tiene un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 10.000 a 2.000.000 daltons, o de aproximadamente 15.000 daltons a 1.000.000 daltons, o de aproximadamente 20.000 daltons a 200.000 daltons.

Realización 5. En una quinta realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con uno cualquiera o más de los Aspectos 1-3, el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 100.000 daltons.

Realización 6. En una sexta realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con uno cualquiera o más de los Aspectos 1-5, el polietilenglicol funcionalizado con tiol es lineal.

Realización 7. En una séptima realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con uno cualquiera o más de los Aspectos 1-6, el polietilenglicol funcionalizado con tiol está ramificado.

Realización 8. En una octava realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-7, el polietilenglicol funcionalizado con tiol tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 daltons.

Realización 9. En una novena realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-8, el peso molecular del polietilenglicol funcionalizado con tiol es menor que el peso molecular del ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona.

Realización 10. En una décima realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-9, la solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") tiene una concentración que varía entre aproximadamente 20-200 mg/ml.

Realización 11. En una undécima realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-10, el polietilenglicol funcionalizado con tiol está en la forma de un polvo.

Realización 12. En una duodécima realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-11, la cantidad de polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona varía desde aproximadamente 1:1 (en p/p) a aproximadamente 0,4:1 (en p/p).

Realización 13. En una decimotercera realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y también combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-12, la solución tampón está a un

pH que varía entre aproximadamente 8,0 a 10,5.

Realización 14. En una decimocuarta realización dirigida al Aspecto 1, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-13, uno del primer, segundo o tercer recipientes comprende además un agente bioactivo.

5 Realización 15. En una decimoquinta realización dirigida al Aspecto 1, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-13, el kit comprende un cuarto recipiente que comprende un agente bioactivo.

Realización 16. En una decimosexta realización dirigida al Aspecto 2, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-13, la composición líquida comprende además un agente bioactivo.

10 Realización 17. En una décima realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 14-16, el agente bioactivo es un corticoesteroide, por ejemplo, triamcinolona o una sal o éster de triamcinolona farmacéuticamente aceptable tal como triamcinolona acetona o triamcinolona hexacetona.

Realización 18. En una decimoctava realización dirigida al Aspecto 1, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-15, 17, el primer recipiente comprende entre aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 3,5 por ciento en peso del polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (en p/p).

15 Realización 19. En una decimonovena realización dirigida a uno cualquiera o más de los Aspectos 1-4, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-18, la concentración del polietilenglicol funcionalizado con tiol en la composición líquida varía entre aproximadamente 10-300 mg/ml, o entre aproximadamente 6-250 mg/ml, o entre aproximadamente 8-200 mg/ml.

20 Realización 20. En una duodécima realización dirigida al Aspecto 3, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-13 y/o 19, se añade un agente bioactivo a la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona de la etapa (i), o a la solución tampón de la etapa (ii) antes de la combinación, o a la composición líquida formada en la etapa (ii).

25 Realización 21. En esta realización dirigida a la Realización 20, el agente bioactivo es un corticoesteroide, por ejemplo, es triamcinolona o una sal o éster de triamcinolona farmacéuticamente aceptable tal como triamcinolona acetona o triamcinolona hexacetona.

30 Realización 22. En esta realización dirigida al Aspecto 4, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-13, la porción de polietilenglicol funcionalizado con tiol de la etapa (i) comprende entre aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 3,5 por ciento en peso de polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (en p/p).

Realización 23. En esta realización dirigida al Aspecto 4, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-13 y/o 22, se añade un agente bioactivo a la solución de la etapa (i), o a la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona de la etapa (iii), o a la solución tampón de la etapa (iv) antes de la mezcla, o a la composición líquida formada en la etapa (iv).

35 Realización 24. En esta realización relacionada con la Realización 23, el agente bioactivo es un corticoesteroide, por ejemplo, es triamcinolona o una sal o éster de triamcinolona farmacéuticamente aceptable tal como triamcinolona acetona o triamcinolona hexacetona.

40 Realización 25. En esta realización, se proporciona en el presente documento un kit o composición líquida pulverizable de acuerdo con las Aspectos 1 y/o 2, y combinable con una cualquiera o más de las Realizaciones 1-19, para uso en la aplicación a un sitio del cuerpo.

45 Realización 26. En esta realización relacionada con la Realización 25, el kit o composición líquida pulverizable se puede usar para el desarrollo embrionario, la organización de tejidos, aplicaciones de precintado de tejidos, cicatrización de heridas, angiogénesis, tumorigénesis, para la prevención de adherencias quirúrgicas, o el tratamiento de la osteoartritis o la artritis reumatoide, para artroscopias o cirugía abierta de articulaciones para reparar el tejido de la articulación (es decir, cartílago), y para efectuar la homeostasia.

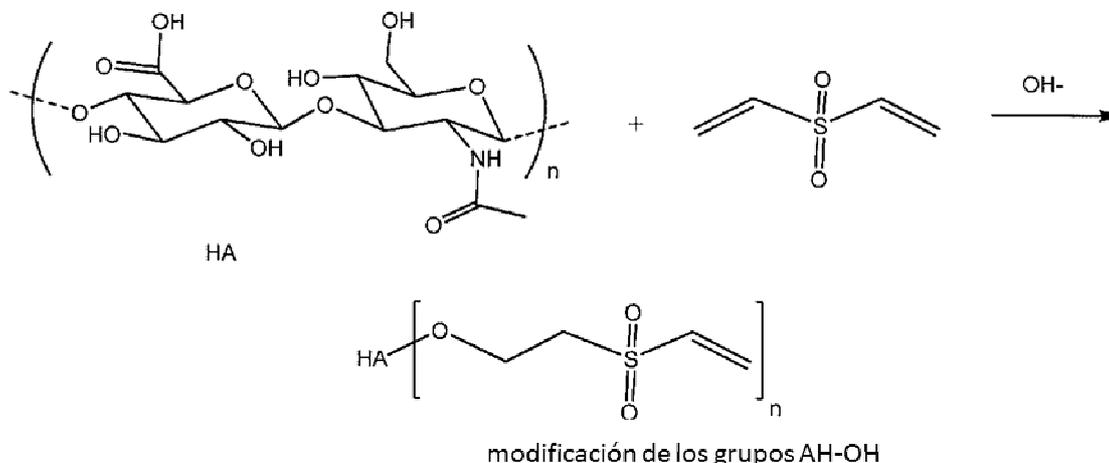
Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a las personas normalmente expertas en la materia una completa divulgación y descripción de cómo los compuestos, composiciones, y métodos proporcionados en el presente documento se realizan y evalúan, y está previsto que sean meramente ilustrativos. Son numerosas las variaciones y las combinaciones de las condiciones de reacción, por ejemplo, concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones, y otros parámetros y condiciones de

55 reacción que se pueden emplear para optimizar características del producto tales como la pureza, rendimiento, y similares.

Materiales

60 Espectrómetro de RMN ¹H: 400 MHz
 Polietilenglicol ditiol, HS-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂SH, "PEG-(SH)₂", PM=3350
 PEG(SH)₄= C((CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂SH)₄, PM=10.000, núcleo de pentaeritritol (Sunbio PEG-SHOP)

Ejemplo 1**Síntesis de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (HA-VS) (Pm = 100 K)**

5

Se pesaron 5 g de ácido hialurónico (AH) [Pm= 100 K, Shesiedo] en un matraz de 1 l. se añadieron 500 ml de agua estéril filtrada al AH. Un agitador vertical con una paleta en forma de ancla se usó para agitar la mezcla durante 16,5 h, momento en el que se disolvió el AH. Se añadieron 333 ml de una solución 0,25 N de NaOH (13,9 ml de NaOH 6 N añadidos a 319 ml de agua desionizada) a la solución AH de agitación. Después de aproximadamente 1 min, se añadieron rápidamente 150 ml de solución de divinilsulfona (18 ml de divinilsulfona disueltos en 132 ml de agua desionizada) a la solución de agitación. Después de 2 minutos (medidos desde la finalización de la adición de la solución de la divinilsulfona), se ajustó el pH de la solución a entre 5 y 6 añadiendo rápidamente 13,7 ml de HCl 6 N. A continuación se dializó la solución de reacción usando un sistema de filtración en flujo tangencial (sistema espectrapor, cartucho P/N M6-100S-301-01P). El volumen total fue de 11 veces el volumen de la solución original. Una vez que se completó la etapa de purificación, se concentró la solución hasta aproximadamente 400 ml. El AH funcionalizado con vinilsulfona (AH-VS) se eliminó del sistema TFF y se colocó un recipiente de vidrio que se congeló a continuación congelado utilizando hielo seco/acetona. A continuación se liofilizó el material. Una vez seco, el material se colocó (4,6 g) en bolsa de aluminio y se precintó térmicamente. Una muestra de AH modificado se envió para su análisis mediante RMN ¹H.

Ejemplo 2**Síntesis de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (HA-VS): iv = 1. 3 m³/kg**

Se pesaron 20 g de ácido hialurónico (AH) [viscosidad intrínseca (VI) 1,3 m³/kg, Shesiedo] en un matraz de 4 l. Se añadieron 2000 ml de agua estéril filtrada al AH. Un agitador vertical con una paleta en forma de ancla se usó para agitar la mezcla durante 16,5 h, momento en el que se disolvió el AH. Se añadieron 1335 ml de una solución 0,25 N de NaOH (55,6 ml de NaOH 6 N añadidos a 1280 ml de agua desionizada) a la solución AH de agitación. Después de aproximadamente 1 min, se añadió rápidamente una solución de divinilsulfona (72 ml de divinilsulfona disueltos en 530 ml de agua desionizada) a la solución de agitación. Después de 2 minutos (medidos desde la finalización de la adición de la solución de la divinilsulfona), se ajustó el pH de la solución a entre 5 y 6 añadiendo rápidamente 55 ml de HCl 6 N. A continuación se dializó la solución de reacción usando un sistema de filtración en flujo tangencial (sistema espectrapor, cartucho P/N M6-100S-301-01P). El volumen total fue de 11 veces el volumen de la solución original. Una vez que se completó la etapa de purificación, se concentró la solución hasta aproximadamente 2600 ml. El AH funcionalizado con vinilsulfona (AH-VS) se eliminó del sistema TFF y se colocó en una bandeja de acero inoxidable. A continuación se liofilizó el material utilizando un liofilizador Millrock. Una vez seco, se colocó el material (20,15 g) se colocó en bolsas de aluminio que se precintaron térmicamente. Una muestra de AH modificado se envió para su análisis mediante RMN ¹H.

45

El espectro RMN ¹H mostró que la AH tenía un nivel de sustitución de vinilsulfona de aproximadamente 14 %.

Ejemplo 3**Síntesis de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (ha-vs)**

- 5 Se pesaron 20 g de ácido hialurónico (AH) [Pm = 900 K, Novozymes] en un matraz de 4 l. Se añadieron 2000 ml de agua estéril filtrada al AH. Un agitador vertical con una paleta en forma de ancla se usó para agitar la mezcla durante 16,5 h, momento en el que se disolvió el AH. Se añadieron 1335 ml de una solución 0,25 N de NaOH (55,6 ml de NaOH 6 N añadidos a 1280 ml de agua desionizada) a la solución AH de agitación. Después de aproximadamente 1 min, se añadió rápidamente una solución de divinilsulfona (72 ml de divinilsulfona disueltos en 528 ml de agua desionizada) a la solución de agitación. Después de 2 minutos (medidos desde la finalización de la adición de la solución de la divinilsulfona), se ajustó el pH de la solución a entre 5 y 6 añadiendo rápidamente 56 ml de HCl 6 N. A continuación se dializó la solución de reacción usando un sistema de filtración en flujo tangencial (sistema espectrapor, cartucho P/N M6-100S-301-01P). El volumen total fue de 11 veces el volumen de la solución original. Una vez que se completó la etapa de purificación, se concentró la solución hasta aproximadamente 2500 ml. El AH funcionalizado con vinilsulfona (AH-VS) se eliminó del sistema TFF y se colocó en una bandeja de acero inoxidable. A continuación se liofilizó el material utilizando un liofilizador Millrock. Una vez seco, se colocó el material (17,5 g) se colocó en bolsas de aluminio que se precintaron térmicamente. Una muestra de AH modificado se envió para su análisis mediante RMN ¹H.
- 20 El espectro RMN ¹H mostró que la AH tenía un nivel de sustitución de vinilsulfona de aproximadamente 20 %.

Ejemplo 4**Formación del gel - efectos del tampón**

- 25 El pH de 1 ml de 25 mg/ml de AH-VS (Ejemplo 3) se ajustó de pH 6,5 a pH 9,5 con diversas cantidades de tampón fosfato de sodio pH 8 o tampón fosfato de sodio pH 9,5 en un tubo de muestras. Se añadió (polvo) seco PEG(SH)₂ a la solución de AH-VS. Se mezclaron las soluciones y se midió el tiempo de formación del gel mediante la carencia visual del flujo de solución. La tabla siguiente resume las muestras ensayadas.
- 30

Tabla 1.

Nº	PH DEL TAMPÓN	CONC. DEL TAMPÓN (mm.)	PEG(SH) ₂ (MG)	GELIFICACIÓN (MIN:SEG)
1	8	38	22,0	1:40
2	8	38	26,4	1:15
3	8	91	22,0	0:36
4	8	91	26,4	0:40
5	8,5	91	26,4	0:21
6	9,5	91	26,4	instantáneo

Ejemplo 5**Ensayo de la presión de estallido**

Se realizaron los ensayos de la presión de estallido usando la configuración que se muestra en la Fig. 3.

- 40 Para simular el tejido, se usó colágeno para vainas de salchichas. La vaina de salchichas se colocó sobre la parte superior del equipo de la presión de estallido y se mantuvo en su lugar utilizando un anillo de tipo O de caucho. Se realizó un orificio en la vaina de salchichas utilizando una aguja de calibre 18. El material de gelificación *in situ* se colocó en la parte superior de la vaina de tal manera que el orificio (realizado con la aguja de calibre 18) se cubrió con material. Transcurridos 5 minutos, el calibre (Modelo Omega: DPG5500B-05G) se puso a cero y se encendió la bomba a un caudal de 100 ml/min. Se midió la presión de estallido como la presión máxima sobre la manométrica exactamente antes de que el agua fluya rápidamente a través del gel formado.
- 45

Ejemplo 6**Gelificación de AH frente a IHS PEG SE (AH frente a una sustitución del 14 %)**

- 50 Se pesaron 125 mg de AH-VS (Ejemplo 2) en una jeringuilla de 10 ml. El HA-VS se disolvió añadiendo 5 ml de H₂O en la jeringuilla y se mezclaron durante la noche en una placa giratoria. Se transfirieron 2,5 ml de AH-VS a una nueva jeringuilla de 10 ml. A continuación se esterilizó en autoclave esta jeringuilla de 10 ml a 250 °F (121,1 °C) durante 15 min. Se pesaron 40 mg de PEG(SH)₂ en una jeringuilla de 10 ml. Se pesó una segunda alícuota de 40 mg de PEG(SH)₂ en una segunda jeringuilla de 10 ml. Se realizó la gelificación con 1,5 ml de AH-VS sin
- 55

esterilización en autoclave y con esterilización en autoclave utilizando el siguiente procedimiento. La jeringuilla que contenía el AH-VS se conectó a la jeringuilla que contenía el PEG(SH)₂ utilizando un conector luer. Se transfirió el AH-VS a la jeringuilla de PEG(SH)₂ empujando el émbolo. Los contenidos de las jeringuillas se movieron hacia delante y hacia atrás varias veces hasta que se disolvió el PEG(SH)₂. Se añadieron a la mezcla 100 µl de tampón fosfato de sodio 1 M, pH 8,5. El tiempo de gelificación para ambas condiciones fue de aproximadamente 30 segundos.

Ejemplo 7

10 Gelificación utilizando PEG di y tetrafuncionalizados

Se pesaron 150 mg de AH-VS (Ejemplo 2) en una jeringuilla de 10 ml. El HA-VS se disolvió añadiendo 6 ml de H₂O en la jeringuilla y se mezclaron durante la noche en una placa giratoria. Se realizó la gelificación con 1,5 ml de AH-VS y cualquiera de 40 mg de PEG(SH)₂, o 40 mg de PEG(SH)₄. Se añadieron 100 µl de un tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8,5 a cada muestra para completar la gelificación. Se aplicó cada solución a la vaina de salchicha para ensayar la presión de estallido (Ejemplo 5). Cada producto había gelificado en 1 minuto. Se midió la fuerza de estallido.

Tabla 2.

PEG UTILIZADO	PRESIÓN DE ESTALLIDO kPa (PSI)
PEG(SH) ₂	3,937 (0,571)
PEG(SH) ₂	3,206 (0,465)
PEG(SH) ₂	4,723 (0,685)
PEG(SH) ₄	3,379 (0,490)
PEG(SH) ₄	3,103 (0,450)
PEG(SH) ₄	4,158 (0,603)

20

Ejemplo 8

Gelificación de AH-VS esterilizado con un haz de e electrones

25 Se disolvieron 0,4 g de ácido ascórbico y 0,4 g de PEG 4000 en 50 ml de H₂O. Se ajustó la solución a pH 6,14 utilizando NaOH 6 N seguido por la transferencia de la solución a 1,25 g de AH-VS liofilizado (Ejemplo 2). Tras mezclar vigorosamente, se transfirieron alícuotas de 3 ml a un molde de esponja de Teflón, y se liofilizaron para formar esponjas. Las esponjas se colocaron en jeringuillas de 5 ml y se enviaron para la esterilización mediante haces de e a 46 kGy. Se realizó la gelificación disolviendo 1/2 de la esponja esterilizada en una solución de PEG(SH)₂ (40 mg en 750 µl de H₂O). 750 µl de fosfato de sodio 150 mM, pH 8,4, se añadieron a la solución de HA-VS/PEG(SH)₂. La concentración de AH-VS resultante fue de 25 mg/ml. A continuación se midió el tiempo hasta la gelificación. El tiempo de gelificación para una esponja sin haces de electrones fue de 52 segundos, y de 4 minutos a 50 segundos para una esponja con haces de electrones. El tiempo de gelificación disminuyó desde 4 minutos a 50 segundos cuando una concentración de AHS con haces de electrones aumentó a 60 mg/ml.

35

Ejemplo 9

Gelificación 1

40 Se pesó AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 10 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 41 mg/ml. Se añadieron 40 mg de PEG(SH)₂ a 1,5 ml de la solución de HA-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se hubo disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 100 µl of de fosfato de sodio 1 M, pH 8,5, y se mezclaron en la mezcla. Se formó un gel transparente en un lapso de tiempo de 5 minutos.

45 Ejemplo 10

Gelificación 2

50 Se pesó AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 1 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 60 mg/ml. Se añadieron 10 mg de PEG(SH)₂ a 0,2 ml de la solución de HA-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se hubo disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 15 µl of de fosfato de sodio 1 M, pH 8,5. Se añadieron y se mezclaron en la mezcla. La mezcla se gelificó en 40 segundos.

Ejemplo 11**Gelificación 3**

5 Se pesó el AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 1 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 60 mg/ml. Se añadieron 10 mg de PEG(SH)₂ a 0,4 ml de la solución de HA-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se hubo disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 26,7 ul of de fosfato de sodio 1 M, pH 8,5. Se añadieron y se mezclaron en la mezcla. La mezcla gelificó en 1 minuto 30 segundos.

10 Ejemplo 12**Gelificación 4**

15 Se pesó AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 3 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 60 mg/ml. Se añadieron 75 mg de PEG(SH)₂ a 1,5 ml de la solución de HA-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se hubo disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 115 ul of de fosfato de sodio 1 M, pH 8,5. Se añadieron y se mezclaron en la mezcla. A continuación se extruyó en la vaina de salchichas (Ejemplo 5). La mezcla gelificó en un lapso de tiempo de 2 minutos y se midió la presión de estallido (ejemplo 5) como 1,24 PSI (8,55 kPa).

20 Ejemplo 13**Gelificación 5**

25 Se pesó AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 3 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 120 mg/ml. Se añadieron 75 mg de PEG(SH)₂ a 0,75 ml de la solución de HA-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se había disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 750 ul of de fosfato de sodio 150 mM, pH 8,8, y se mezclaron en la mezcla. La mezcla gelificó en 1 minuto 40 segundos.

30 Ejemplo 14**Gelificación 6**

35 Se pesó el AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 3 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 120 mg/ml. Se añadieron 75 mg de PEG(SH)₂ a 0,75 ml de la solución de HA-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se había disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 750 ul of de fosfato de sodio 300 mM, pH 8,8 y se mezclaron en la mezcla. La mezcla se gelificó en 40 segundos. El peso molecular del AH-VS se midió a 100 kDa mediante GPC.

Tabla 3.

EJEMPLO	AH-VS, % SUSTITUCIÓN,	AH FRENTE A	AMT AH-VS UTILIZADO EN RXN	PEG-SH ₂ MG	TAMPÓN PH	TIEMPO DE GELIFICACIÓN
9	11 %	41 mg/ml	1,5 ml o 61,5 mg de AH-VS	40 mg	100 μmol de fosfato de sodio, 8,5	5 minutos
10	11 %	60 mg/ml	0,20 ml o 12 mg de AH-VS	10 mg	15 μmol de fosfato de sodio, 8,5	40 segundos
11	11 %	60 mg/ml	0,40 ml o 24 mg de AH-VS	10 mg	26,7 μmol de fosfato de sodio, 8,5	1 min 30 segundos
12	11 %	60 mg/ml	1,5 ml o 90 mg de AH-VS	75 mg	115 μmol de fosfato de sodio, 8,5	2 minutos
13	11 %	120 mg/ml	0,75 ml o 90 mg de AH-VS	75 mg	112,5 μmol de fosfato de sodio, 8,8	1 minuto 40 segundos
14	11 %	120 mg/ml	0,75 ml o 90 mg de AH-VS	75 mg	225 μmol de fosfato de sodio, 8,8	40 segundos

40 Ejemplo 15**Gelificación 7 AH-VS esterilizado en autoclave**

45 Se pesó el AH-VS (Ejemplo 1) en una jeringuilla de 3 ml y se disolvió en H₂O para formar una solución de 120 mg/ml. A continuación se esterilizó en autoclave la solución a 250 °F (121,1 °C) durante 15 min. Una vez

enfriado a temperatura ambiente, se añadieron 75 mg de PEG(SH)₂ a 0,75 ml de la solución de AH-VS. Se mezclaron el AH-VS y el PEG(SH)₂. Una vez que se había disuelto el PEG(SH)₂, se añadieron 750 ul of de fosfato de sodio 300 mM, pH 8,8 y se mezclaron en la mezcla. La mezcla se gelificó en 60 segundos.

5 Tras el esterilizado en autoclave, se midió el peso molecular del AH-VS a 76 kDa mediante GPC.

Ejemplo 16

Adición de PEG(SH)₂ a AH-VS antes de esterilizar en autoclave

10 Se añadió el PEG(SH)₂ a AH-VS (120 mg/ml) (Ejemplo 1) a 0, 0,02, 0,2, 0,4, 0,7, 1,0, 1,3, 2,0, 5,0, y 10 mg por ml de AH-VS. Tras mezclar vigorosamente, se esterilizó en autoclave el AH-VS/PEG durante 15 min a 250 °F (121,1 °C). A continuación se realizó la gelificación con 107 mg de PEG(SH)₂ por ml de AH-VS utilizando fosfato de sodio 0,3 M, pH 8,8, y carbonato de sodio 0,15 M, pH 9,25. Los materiales gelificaron en 2 minutos. Los geles se sometieron a
15 ensayos de la fuerza de estallido

Tabla 4.

Nº	AUTOCLAVE	PEG(SH) ₂ (MG)	GELIFICACIÓN DESPUÉS AUTOCLAVE	PM	PRESIÓN DE ESTALLIDO kPA (PSI)	PRESIÓN DE ESTALLIDO kPA (PSI)
Ciclo					1	2
Tampón					Fos, pH 8,8	Carb 0,15 M, pH 9,25
1	-	0	-	100	9,308 (1,35)	
2	+	0	-	76	6,861 (0,995)	
3	+	0,02	-	76	5,861 (0,85)	
4	+	0,2	-	86	7,102 (1,03)	11,997 (1,74)
5	+	0,4	-	87	13,032 (1,89)	16,479 (2,39)
6	+	0,7	-	103	13,238 (1,92)	12,480 (1,81)
7	+	1,0	-	139	17,238 (2,5)	7,102 (1,03)
8	+	1,3	-	121	-	-
9	+	2,0	+	414	-	-
10	+	5,0	+	Nd	-	-
11	+	10	+	Nd		

Ejemplo 17

20 **Gelificación 8 efecto del tampón**
Se esterilizaron en autoclave 120 mg/ml de AH-VS (Ejemplo 1) a 250 °F (121 °C) durante 15 minutos. Se realizaron las gelificaciones utilizando relaciones 0,9/1 (g/g) de HA-VS/PEG(SH)₂ con los siguientes tampones: (1) fosfato de sodio 0,3 M, pH 8,8, (2) carbonato de sodio 0,2 M, pH 9,25, y (3) carbonato de sodio 0,3 M, pH 9,4. Las soluciones
25 gelificaron en un lapso de tiempo de 3 minutos y se midió la presión de estallido (Ejemplo 5).

Tabla 5.

CICLO	Tampón	PRESIÓN DE ESTALLIDO kPA (PSI)
1	Phos 0,3 M, pH 8,8	8,964 (1,30)
2	Carb 0,2 M, pH 9,3	13,101 (1,90)
3	Carb 0,3 M, pH 9,4	15,583 (2,26)

30 Ejemplo 18

Gelificación 9 - Efecto del tampón

35 Se disolvieron tres gramos de AH-VS (Ejemplo 1) en 25 ml de H₂O para formar 120 mg/ml de una solución de AH-VS. Se añadieron 60 µl de 100 mg/ml de PEG(SH)₂ a 6 ml de 120 mg/ml de AH-VS a 1 mg de PEG por 120 mg de una relación de AH-VS ratio. Se esterilizaron en autoclave 120 mg/ml de AH-VS con y sin PEG(SH)₂. Se realizó la gelificación de ambos geles utilizando 108 mg de PEG(SH)₂ con fosfato de sodio 0,3 M, pH 8,8, y carbonato de

sodio 0,15 M, pH 9,25, y carbonato de sodio 0,3 M, pH 9,4.

Tabla 6

CICLO	AUTOCLAVE	% de PEG (GIL)	TAMPÓN	TIEMPO DE GELIFICACIÓN (SEG)
1	+	0	Carb 0,15 M, pH 9,3	18
2	+	0	Carb 0,3 M, pH 9,4	9
3	+	0,1	Phos 0,3 M, pH 8,8	50
4	+	0,1	Carb 15 M, pH 9,3	14
5	+	0,1	Carb 3 M, pH 9,4	Instantáneo

5 **Ejemplo 19**

Gelificación 10 - Pulverización asistida por gas

10 Se esterilizaron en autoclave 120 mg/ml de AH-VS (Ejemplo 1) con una relación de PEG/HA-VS de 1 mg/120 mg. Se distribuyó en alícuotas AH-VS en una jeringuilla de 3 ml y se mezcló con PEG(SH)₂ como se ha detallado en la siguiente tabla. A continuación se distribuyó en alícuotas una solución tampón en una segunda jeringuilla de 3 ml como se ha definido en la siguiente tabla. La jeringuilla de AH-VS/PEG(SH)₂ y la jeringuilla con el tampón correspondiente se unieron a un dispositivo de pulverización asistido por gas (Fibrijet Part nº SA-3652, Micromedics). El puerto de gas del dispositivo de pulverización asistido por gas se conectó a un tanque de CO₂ mediante un regulador (Tissomat, Baxter). La presión de salida del regulador se configuró a 20 PSI(137,9 kPa) A continuación se pulverizaron las soluciones en una vaina de salchichas activando el suministro de gas y deprimiendo los émbolos de la jeringuilla AH-VS/PEG(SH)₂ y simultáneamente la jeringuilla del tampón correspondiente. Los materiales gelificaron en la vaina de salchichas en un lapso de tiempo de 1 minuto. Se evaluó la adhesividad de cada película a la vaina de salchichas tocando físicamente la película y la adhesividad de las películas se clasificó entre sí siendo el número 1 más débil y siendo el número 4 más fuerte.

Tabla 7

CICLO	AH VS (ML)	PEG(SH) ₂ (MG)	TAMPÓN (ML)	TAMPÓN (M)	PH DEL TAMPÓN	PELÍCULA UNIFORME	CLASIFICACIÓN DE ADHERENCIAS
1	1,5	160	1,5	0,15	9,25	Sí	3
2	1	107	1	0,3	8,8	Sí	1
3	0,8	85,6	0,8	0,075	9,25	Sí	2
4	0,8	85,6	0,8	0,3	9,4	sí	4

25 **Ejemplo 20**

Efecto de la sustitución de AH-VS

30 Se realizaron la gelificación y fuerza de estallido de AH-VS (Pm aprox. 600 kD) con una sustitución del 2 %, 6 %, 14 % (Ejemplo 2), y 20 % (Ejemplo 3) respectivamente. Se disolvió el AH-VS durante la noche a 25 mg/ml en H₂O desionizada en una jeringuilla de 3 ml, y a continuación se esterilizó en autoclave (250 °F (121,1 °C) 15 minutos): 2 ml de cada solución de AH-VS se mezclaron con 53 mg de PEG(SH)₂ seco, y a continuación se mezcló con 133 µl de carbonato de sodio 0,3 M, pH 9,4. El material mezclado se extruyó en una vaina de salchichas (Ejemplo 5). Transcurridos 5 minutos, los materiales que utilizaban el AH-VS sustituido al 2 % y el AH-VS sustituido al 6 % no gelificaron completamente en este punto temporal. Los materiales que utilizaban el AH-VS sustituido al 14 % y el AH-VS sustituido al 20 % habían gelificado en un lapso de tiempo de 5 minutos (los materiales habían gelificado en un lapso de tiempo de 1 minuto). Se midió la fuerza de estallido de las muestras gelificadas.

Tabla 8

% de SUB AH-VS	CICLO	PRESIÓN DE ESTALLIDO		PROMEDIO (PSI)
		(PSI)	(kPA)	
2	1	Sin gel		No se puede medir
	2	Sin gel		
6	1	Sin gel		No se puede medir
	2	Sin gel		

14	1	3,017	20,802	2,263
	2	1,681	11,590	
	3	2,091	14,417	
20	1	2,349	16,196	1,679
	2	1,359	9,370	
	3	1,328	9,157	

Ejemplo 21

Pulverización asistida por gas

5 Se esterilizaron en autoclave 50 mg/ml de AH-VS sustituido al 14 % (Ejemplo 2) y AH-VS sustituido al 20 % (Ejemplo 3) (250 F, (121,1 °C, 15 minutos) respectivamente. A continuación se preparó cada muestra para la pulverización asistida por gas como sigue: Se distribuyó en alícuotas el AH-VS en una jeringuilla de 3 ml y a continuación se mezcló con PEG(SH)₂ como se ha detallado en la siguiente tabla. A continuación se distribuyó en alícuotas una solución tampón en una segunda jeringuilla de 3 ml como se ha definido en la siguiente tabla. La jeringuilla de AH-VS/PEG(SH)₂ y la jeringuilla con el tampón correspondiente se unieron a un dispositivo de pulverización asistido por gas (Fibrijet Part n° SA-3652, Micromedics). El puerto de gas del dispositivo de pulverización asistido por gas se conectó a un tanque de CO₂ mediante un regulador (Tissomat, Baxter). La presión de salida del regulador se configuró a 20 PSI (137,9 kPa). A continuación se pulverizaron las soluciones en una vaina de salchichas activando el suministro de gas y deprimiendo los émbolos de la jeringuilla AH-VS/PEG(SH)₂ y simultáneamente la jeringuilla del tampón correspondiente. Los materiales gelificaron en la vaina de salchichas en un lapso de tiempo de 1 minuto. Se evaluó la adhesividad de cada película a la vaina de salchichas tocando físicamente la película y la adhesividad de las películas se clasificó entre sí siendo el número 1 más débil y siendo el número 2 más fuerte.

Tabla 9.

CICLO	% de AH VS SUB	PEG(SH) ₂ (MG)	TAMPÓN (M)	PH DEL TAMPÓN	PELÍCULA UNIFORME	CLASIFICACIÓN DE ADHERENCIAS
1	14	53	0,3	9,4	Sí	2
2	20	53	0,3	8,4	Sí	1

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:
 - 5 (i) un primer recipiente que comprende una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") a una concentración de 10 - 300 mg/ml, en el que AH-VS es ácido (2-(vinilsulfonil)etoxi)hialurónico, y el AH-VS tiene entre el 2 % - 70 % de sus grupos hidroxilo transformados en grupos 2-(vinilsulfonil)etoxi,
 - (ii) un segundo recipiente que comprende un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tiene de 2 a 8 grupos tiol, y
 - 10 (iii) un tercer recipiente que comprende una solución tampón 30 -1000 mM a un pH que varía entre 7 - 12, en una cantidad eficaz, cuando se mezcla con los contenidos del primer y el segundo recipientes, para proporcionar una solución que tiene una concentración de AH-VS del 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol del 2 - 8 % (p/v),
 - 15 donde los componentes del primer, segundo y tercer recipientes, cuando se combinan, son eficaces para formar un gel en un lapso de tiempo de aproximadamente 5 segundos a 1 hora de mezcla.
2. El kit de reivindicación 1, en el que el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tiene entre el 7 % - 35 %, o del 10 % al 25 %, de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona.
- 20 3. El kit de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el polietilenglicol funcionalizado con tiol tiene un número de grupos tiol seleccionado entre el grupo que consiste en 2, 3 y 4.
4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tiene un peso molecular promedio que varía de 15.000 a 1.000.000 daltons o de 20.000 a 200.000 daltons.
- 25 5. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polietilenglicol funcionalizado es lineal o ramificado.
6. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polietilenglicol funcionalizado con tiol tiene un peso molecular promedio de 1.000 a 10.000 daltons.
- 30 7. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el peso molecular del polietilenglicol funcionalizado con tiol es menor que el peso molecular del ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona.
- 35 8. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") tiene una concentración que varía entre 20 - 200 mg/ml.
9. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polietilenglicol funcionalizado con tiol está en la forma de un polvo.
- 40 10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la cantidad de polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona varía desde aproximadamente 1:1 (en p/p) a aproximadamente 0,4:1 (en p/p).
- 45 11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que cualquiera del primero, segundo o tercer recipientes comprende además un agente bioactivo, o el kit comprende además un cuarto recipiente que comprende un agente bioactivo.
- 50 12. El kit de la reivindicación 11, en el que el agente bioactivo es un corticoesteroide seleccionado entre triamcinolona, triamcinolona acetonida y triamcinolona hexacetona.
13. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el primer recipiente comprende además del 0,1 % en peso al 3,5 por ciento en peso del polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (en p/p).
- 55 14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que uno o más de los componentes del kit son estériles.
- 60 15. Una composición líquida formada a partir de la combinación de (i) una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS"), (ii) un polietilenglicol funcionalizado con tiol y (iii) una solución tampón 30 - 1000 mM, en donde la solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS"), el polietilenglicol funcionalizado con tiol y la solución tampón son como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10
- 65 en donde la concentración del polietilenglicol funcionalizado con tiol en la composición líquida varía entre 4- 300 mg/ml, la composición líquida comprende opcionalmente además un agente bioactivo, y

la composición líquida es eficaz para formar un gel en un lapso de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 hora del mezclado de componentes (i), (ii) y (iii).

5 16. La composición líquida de la reivindicación 15, en la que el agente bioactivo es un corticoesteroide seleccionado entre triamcinolona, triamcinolona acetonida y triamcinolona hexacetonida.

17. La composición líquida de la reivindicación 15 o de la reivindicación 16, en la que uno o más de los componentes de la composición son estériles.

10 18. Un hidrogel formado a partir de la composición líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

19. Un método para formar una composición líquida capaz de formación de gel *in situ*, que comprende:

15 (i) añadir un polietilenglicol funcionalizado con tiol que tenga entre 2 y 8 grupos tiol a una solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") que tiene una concentración de entre 4 - 300 mg/ml, en donde AH-VS es ácido (2-(vinilsulfonil)etoxi)hialurónico, y el AH-VS tiene del 2 % al 70 % de sus grupos hidroxilo transformados en grupos 2-(vinilsulfonil)etoxi, para disolver de este modo el polietilenglicol funcionalizado con tiol para formar una solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona, y

20 (ii) combinar la solución de la etapa (i) con una solución tampón 30 - 1000 mM a un pH que varía entre 7 - 12, para formar de esta manera una composición líquida que tiene una concentración de AH-VS del 2-8 % (p/v) y una concentración de polietilenglicol funcionalizado con tiol del 2-8 % (p/v), en donde la composición líquida es eficaz para formar un gel en un lapso de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 1 hora de combinación.

25 20. El método de la reivindicación 19, en el que:

(i) el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tiene del 7 % al 35 % o del 10 % al 25 % de sus grupos hidroxilo sustituidos con vinilsulfona; y/o

30 (ii) el ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona tiene un peso molecular promedio que varía de 10.000 a 2.000.000 daltons; o de 15.000 a 1.000.000 daltons, o de 20.000 a 200.000 daltons; o tiene un peso molecular promedio de 100.000 daltons, y/o

(iii) la solución acuosa de ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") tiene una concentración que varía entre aproximadamente 20-200 mg/ml; y/o

35 (iv) el peso molecular del polietilenglicol funcionalizado con tiol es menor que el peso molecular del ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona; y/o

(v) la cantidad de polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona varía de 1:1 (en p/p) a 0,4:1 (en p/p), y/o

(vi) la solución tampón tiene un pH que varía de 8,0 a 10,5.

40 21. El método de cualquiera de la reivindicación 19 o de la reivindicación 20, que comprende además añadir un agente bioactivo a la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona de la etapa (i), o a la solución tampón de la etapa (ii) antes de la combinación, o a la composición líquida formada en la etapa (ii).

45 22. El método de la reivindicación 20, que comprende:

(a) añadir una porción de una cantidad total del polietilenglicol funcionalizado con tiol a una solución acuosa del ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona ("AH-VS") que tiene una concentración de entre 10 - 300 mg/ml, para formar de esta manera una solución,

(b) esterilizar opcionalmente la solución de la etapa (a),

(c) añadir a la solución de la etapa (a) o de la etapa (b) si se realiza, la cantidad restante de polietilenglicol funcionalizado con tiol, para disolver de esta manera la cantidad restante de polietilenglicol funcionalizado con tiol para formar la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona, y

55 (d) mezclar la solución que contiene polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona con la solución tampón 30 - 1000 mM a un pH que varía entre 7 - 12, para formar de esta manera la composición líquida.

60 23. El método de la reivindicación 22, en el que la porción de polietilenglicol funcionalizado con tiol de la etapa (a) comprende del 0,1 % en peso a aproximadamente el 3,5 por ciento en peso de polietilenglicol funcionalizado con tiol con respecto al ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona (en p/p).

65 24. El método de la reivindicación 22 o de la reivindicación 23, que comprende (b) esterilizar la solución de la etapa (a) y/o en el que uno o ambos del polietilenglicol funcionalizado con tiol de la etapa (c) y la solución tampón son estériles.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, que comprende además añadir un agente bioactivo a la solución de la etapa (a), o a la solución que contiene el polietilenglicol funcionalizado con tiol-ácido hialurónico derivatizado con vinilsulfona de la etapa (c), o a la solución tampón de la etapa (d) antes de la mezcla, o a la composición líquida formada en la etapa (d).
- 5
26. El método de reivindicación 21 o de la reivindicación 25, en el que el agente bioactivo es un corticoesteroide seleccionado entre triamcinolona, triamcinolona acetonida y triamcinolona hexacetonida.
- 10
27. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la composición líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, para uso en la aplicación a un sitio del cuerpo.
- 15
28. El kit o la composición líquida para el uso de la reivindicación 27, para uso en desarrollo embrionario, organización de tejidos, cicatrización de heridas, angiogénesis, tumorigénesis, prevención de adherencias quirúrgicas o tratamiento de osteoartritis o de artritis reumatoide.
29. El kit o la composición líquida para el uso de la reivindicación 27, para su uso en cirugía artroscópica o en cirugía abierta de articulaciones para reparar el tejido de la articulación (es decir, cartílago), para uso en aplicaciones de precintado de tejidos o para uso para efectuar hemostasia.

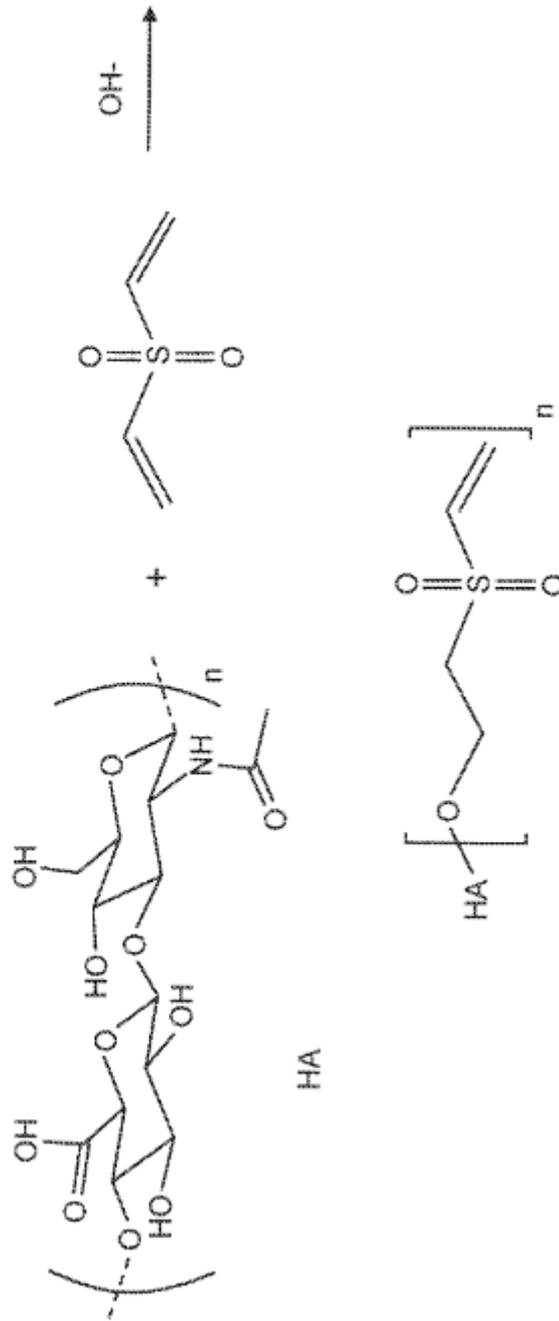


FIG. 1

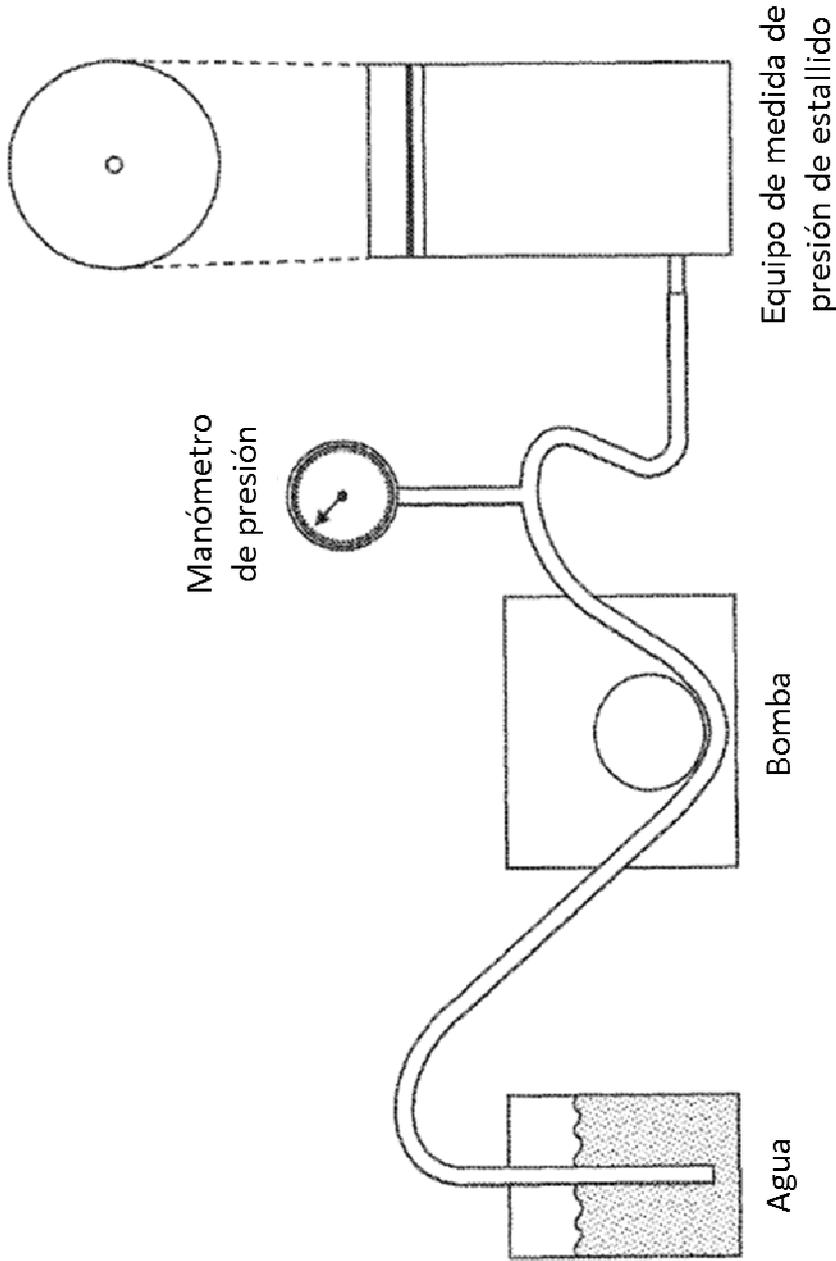


FIG. 3