

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 763**

51 Int. Cl.:

C08F 283/06 (2006.01)

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09795470 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2358774**

54 Título: **Materiales en forma de redes poliméricas interpenetrantes que combinan un gel de fibrina y una red de polietilenglicol**

30 Prioridad:

20.11.2008 FR 0806514

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

03.09.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE CERGY-PONTOISE (100.0%)

33 Boulevard du Port

95011 Cergy-Pontoise Cedex, FR

72 Inventor/es:

LARRETA-GARDE, VÉRONIQUE;

FICHET, ODILE y

AKPALO, AMIVI EDÉFIA

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 544 763 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

Materiales en forma de redes poliméricas interpenetrantes que combinan un gel de fibrina y una red de polietilenglicol.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol (PEG).

10

También se refiere a materiales que pueden obtenerse por este procedimiento, así como su uso como apósito para heridas, apósito quirúrgico, como un dispositivo para administrar agentes terapéuticos, como revestimiento para dispositivos médicos como por ejemplo endoprótesis vasculares, válvulas cardíacas, catéteres, filtros protésicos vasculares, etc. Dichos materiales pueden usarse además para cultivos de células eucariotas, o incluso como soporte de moléculas activas como agentes de cicatrización, factores de crecimiento, antibióticos, bactericidas, bacterioestáticos o enzimas.

15

En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes [] remiten a la lista de referencias al final del texto.

20 Estado de la técnica

La obtención de un material que se presente bajo la forma de un gel sigue siendo una necesidad real, particularmente en el campo médico. Los geles tienen la propiedad de ser sólidos elásticos muy ricos en disolvente. En particular, para los biogeles o geles obtenidos a partir de moléculas de origen biológico, el disolvente es agua. Su volumen y su forma pueden variar de manera reversible en función de estímulos ambientales como el pH, la temperatura, la composición del disolvente, la fuerza iónica, los campos eléctricos y magnéticos. Estos biogeles son redes hidrófilas que retienen grandes cantidades de agua sin disolverse y tienen características físicas similares a las de los tejidos biológicos blandos [1].

25

La importancia de los hidrogeles (polímeros reticulados o biogeles) en el campo de los biomateriales se justifica por la naturaleza suave y elastómera de los hidrogeles que minimizan la irritación mecánica y la fricción con los tejidos, por lo tanto, los procesos inflamatorios. Los hidrogeles tienen una gran permeabilidad al oxígeno, a los nutrientes y a otros metabolitos hidrosolubles que favorecen el crecimiento de estructuras tisulares más gruesas [2]. Los hidrogeles son atractivos para la dispensación de medicamentos debido a su buena compatibilidad con compuestos macromoleculares hidrófilos (proteínas, polisacáridos, oligonucleótidos), su biocompatibilidad y la facilidad para regular la difusión de los medicamentos controlando su inflamación, su densidad de reticulación y su degradación. Estos materiales son interesantes para una difusión localizada ya que pueden formarse in situ y así adherirse y ajustarse a los tejidos diana. Este uso para una administración local de principios activos parece actuar en sinergia con el efecto de barrera de los hidrogeles [3]. Los hidrogeles se han estudiado como materiales potenciales para la regeneración de hueso, tendón, nervios y esencialmente cartílago.

30

35

40

Sin embargo, los geles formados a partir de moléculas biológicas son materiales blandos, también sus principales desventajas son que presenta baja resistencia mecánica, son muy deformable y difíciles de manipular.

Por lo tanto, existe una necesidad real de poder preparar un material que sea manipulable, que tenga las propiedades de un gel de dimensiones estables y una mejor resistencia a la degradación, por ejemplo, por la acción del calor o enzimas, etc.

45

En el contexto de la presente invención, una "red" es una asociación de polímeros. Esta asociación entre los polímeros puede garantizarse por interacciones fuertes o débiles (enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, Van der Waals, etc.). En el caso de enlaces covalentes, la asociación es una reticulación y el polímero se dice que está "reticulado".

50

La definición de un gel incluye tres criterios [4]:

55

- Los geles se componen de al menos dos componentes: uno muy mayoritario es el solvente y la otra minoría, se denomina sólido.
- Los dos componentes son continuos a través de todo el medio. La denominada fase sólida es una red que atrapa la denominada fase líquida, correspondiente al disolvente, y evita que se escurra.

- Todo el medio se comporta como un sólido fácil de deformar.

Los geles pueden clasificarse según el tipo de enlaces que forman la red. Por lo tanto, se distinguen dos importantes mecanismos de gelificación que conducen a geles "físicos" o a geles "químicos".

5

Un gel de físico es una estructura supramolecular constituido por moléculas ligadas entre sí por enlaces de baja energía (Van der Waals, enlaces de hidrógeno, polares, etc.). La estabilidad de esta estructura se asocia a una gama particular de condiciones fisicoquímicas (pH, concentración en moléculas, temperatura, calidad del disolvente, fuerza iónica, etc.). Fuera de esta gama, la mezcla es líquida. Por lo tanto, la transición sol/gel es reversible para los

10 geles físicos. Por lo tanto, una modificación de los parámetros del medio ambiente puede conducir a la destrucción de la estructura e inducir una transición gel-sol. Se conocen bien a partir de la técnica anterior composiciones para obtener geles "físicos". Los biogeles se obtienen básicamente a partir macromoléculas o polímeros de origen natural: proteínas o polisacáridos. Se pueden citar, a modo de ejemplo de proteínas que pueden gelificarse, gelatina, fibrina, colágeno, actina, mioglobina, proteínas de suero, particularmente caseínas y lactoglobulina, proteínas de soja, de

15 trigo y particularmente gliadina y glutenina, la clara del huevo y particularmente la ovalbúmina. Se pueden citar, a modo de ejemplo polisacáridos que pueden gelificarse carragenanos, alginatos, pectinas, quitosano, celulosa, quitina, glicógeno o incluso almidón.

Se conocen igualmente en la técnica anterior geles calificados de "químicos". Un gel químico corresponde igualmente a una estructura macromolecular cuyos monómeros están asociados mediante enlaces de elevada energía (covalentes). Por tanto, la estabilidad de este conjunto es muy elevada. Además, si estos geles químicos presentan una estabilidad mejorada, el único medio de efectuar una transición gel/solución consiste en destruir los enlaces covalentes del polímero. Este es el motivo por el que la transición solución/gel de geles químicos se dice que es irreversible.

25

Una familia de geles químicos corresponde a los geles enzimáticamente catalizados. Este modo de gelificación se observa sobre todo en los grandes procedimientos biológicos. La coagulación sanguínea, cicatrización, la formación de la piel, la agrupación de matrices extracelulares son procedimientos biológicos en los que el paso de las proteínas solubles al estado de gel es indispensable. *In vivo*, un número limitado de enzimas, por ejemplo, las lisiloxidasas, las transglutaminasas, catalizan estas reacciones. *In vitro*, la más usada es la transglutaminasa que crea puentes covalentes entre las cadenas laterales de los restos lisina y glutamina de las proteínas [5].

30

Las propiedades estructurales y bioquímicas de la fibrina la convierten en un candidato prometedor en ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa. La modificación y la funcionalización del gel de fibrina se han usado para la liberación controlada de genes y factores de crecimiento. Además, la fibrina posee naturalmente sitios de enlace a células y, por lo tanto, también se ha estudiado la adherencia, la dispersión, la migración y proliferación celular. A causa de los efectos demostrados sobre varios tipos celulares, la fibrina es de particular interés como soporte en ingeniería tisular vascular [6].

35

La fibrina se obtiene a partir de fibrinógeno, glicoproteína de 340 kDa de origen hepático. El fibrinógeno es un polielectrolito aniónico en condiciones fisiológicas y, por lo tanto, no puede combinarse o agregarse. La hidrólisis del fibrinógeno por la trombina, proteasa de origen sérico, condujo a la liberación de pequeños fragmentos peptídicos y a la obtención de fibrina. Las interacciones intermoleculares se hacen posibles, autocombinándose las moléculas, a través de enlaces de baja energía, creando así una red de gel físico de fibrina.

40

En los procesos de coagulación o de cicatrización, la estabilización del gel físico se obtiene gracias a una transglutaminasa sérica (factor 13) creando enlaces isopeptídicos covalentes entre las cadenas de fibrina que conducen a la formación de una red química de fibrina insoluble.

50 Sin embargo, los geles químicos de fibrina son materiales blandos, también sus principales desventajas son que presentan baja resistencia mecánica, son muy deformable y difíciles de manipular.

Como se ha indicado previamente, existe la necesidad de un material en forma de gel denominado "físico", que sea estable y que mantenga su integridad estructural y, por lo tanto, sus propiedades durante toda la duración del uso que se hace, pero cuyos elementos de origen biológico sean reversibles (o inestables), es decir, que puedan desestructurarse y degradarse cuando se desee. Hoy en día, la mayoría de los procedimientos conocidos permiten la preparación de material en forma de un gel denominado "químico". Una posibilidad para obtener un gel autosoportado que tenga estas propiedades es introducir este gel en una arquitectura de red polimérica interpenetrante o semi-interpenetrante (RPI o semi-RPI).

55

Por lo tanto, existe la necesidad real de un procedimiento que haga frente a las deficiencias, defectos, limitaciones, inconvenientes y obstáculos del estado de la técnica, en particular de un procedimiento que implemente un material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que combine un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol.

5

Este procedimiento permite la preparación de dicha red polimérica interpenetrante (RPI) en una etapa ("one pot" en inglés) en unas condiciones operativas que respeten la naturaleza de cada polímero evitando de este modo su degradación.

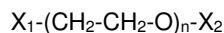
10 Por otra parte, este procedimiento permite controlar la formación de dicha red *in situ*, proporcionando de este modo un material "a medida", conveniente para la aplicación a la que está destinado.

Descripción de la invención

15 La presente invención está diseñada específicamente para satisfacer esta necesidad proporcionando un procedimiento de preparación de un material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol (PEG), que comprende las siguientes etapas:

20 i) preparar una mezcla introducido en un tampón

- una solución de fibrinógeno,
- monómeros de fórmula (I):



25

en la que X_1 y X_2 , son grupos químicos idénticos o diferentes, seleccionados entre el grupo que comprende vinilo, acrilato, metacrilato o alilo y n es un número entre 1 y 140, por ejemplo, de 1 a 50, preferiblemente de 2 a 20,

- opcionalmente monómeros de fórmula (II) seleccionados entre los derivados de polietilenglicol que tienen un grupo seleccionado entre el grupo que comprende $-CH_3$, $-NH_2$, $-OH$, $-CH_2CH_3$, vinilo, acrilato, metacrilato o alilo; derivados de acrilato, metacrilato y estireno seleccionados entre el grupo que comprende hidroxietilmetacrilato, hidroxietilacrilato, acetato de vinilo, N-vinil pirrolidona, N-vinil piridina, acilonitrilo, ácido acrílico, estireno sulfonato sódico, bromuro de (vinilbencil)trimetilamonio, cloruro de (vinilbencil)trimetilamonio, cloruro de trimetil-viniloxycarbonilmetilamonio, bromuro de trimetil-viniloxycarbonilmetilamonio, bromuro de trietil-2-viniloxycarbonil-etilamonio, bromuro de aliloxycarbonilmetil-trimetilamonio, poli(etilenglicol)metacrilato, poli(etilenglicol)acrilato,
- un iniciador de la polimerización;

30

35

ii) preparar una mezcla de reacción añadiendo una solución de trombina a la mezcla preparada en i);

40

iii) incubar la mezcla de reacción obtenida en ii) a una temperatura entre 20 °C y 40 °C;

iv) realizar una polimerización y reticulación de los monómeros de fórmula (I) opcionalmente con los monómeros de fórmula (II).

45 El procedimiento de la invención permite preparar un material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que es homogéneo, manipulable, estable en el tiempo y de dimensiones estables.

El procedimiento de acuerdo con la invención, particularmente a través de la temperatura de incubación y la polimerización, permite controlar la gelificación y la polimerización/reticulación de los monómeros. La gelificación y la reticulación pueden realizarse simultánea o secuencialmente.

50

Asimismo, cuando la polimerización es una fotopolimerización, el material obtenido después de la síntesis (al final de la etapa (iv)) es ventajosamente un material estéril.

55 En el marco de la presente invención, los términos polietilenglicol (PEG), polióxido de etileno o polioxi-etileno (POE) se usan indistintamente para designar la red de polietilenglicol obtenida por reticulación de una mezcla de monómeros de fórmula (I) o por polimerización/reticulación de una mezcla de monómeros de fórmulas (I) y (II).

Los monómeros de fórmulas (I) pueden calificarse de disfuncionales (con dos funciones reactivas según el mecanismo de reticulación propuesto). Los monómeros de fórmula (II) son monofuncionales (una única función

reactiva según el mecanismo de polimerización propuesto).

En el marco de la presente invención, por "tampón" se entiende una solución acuosa cuyo contenido en agua es de al menos el 30 % en peso pudiendo incluso llegar al 99 % en peso total del disolvente y que mantiene aproximadamente el mismo pH a pesar de la adición de pequeñas cantidades de un ácido, una base o una dilución. El contenido en agua del tampón es en particular del 70 al 98 % en peso total del disolvente.

El tampón puede comprender adicionalmente otros disolventes seleccionados entre el grupo que comprende metanol, etanol, piridina, acetona, ácido acético, DMSO, benceno, diclorometano.

A modo de ejemplo del tampón, pueden citarse tampones fosfato, Hepes, Tris, barbital sódico, Tris-maleato.

Durante toda la duración del procedimiento, el pH del medio acuoso se mantiene entre 6 y 8 por medio de una solución de tampón, por ejemplo, una solución de trihidroxiaminometano (Tris).

El fibrinógeno puede ser, por ejemplo, fibrinógeno humano, de cerdo o de res.

En el procedimiento de la invención, los monómeros de fórmulas (I) pueden usarse en solitario o en combinación con los monómeros (II) tales como se han definido previamente.

En el caso de monómeros de fórmula (I), n puede definirse como el número medio de unidades de oxietileno (-CH₂CH₂O-) contenido en dichos monómeros.

Preferiblemente, los monómeros de fórmula (I) son aquellos en los que X₁ y X₂, son funciones químicas idénticas o diferentes, que se seleccionan entre el grupo que comprende metacrilatos o acrilatos y n es un número entre 2 y 20.

Por ejemplo, los monómeros de fórmula (I) pueden usarse en solitario. Estos monómeros son precursores de la red de polietilenglicol (PEG).

La red (PEG) puede contener entre el 1 y el 100 % en peso de monómeros de fórmula (I) y entre el 99 y el 0 % en peso de monómeros de fórmula (II). Por ejemplo, la red (PEG) puede contener entre el 10 y el 100 % en peso de monómeros de fórmula (I) y entre el 90 y el 0 % en peso de monómeros de fórmula (II).

En un modo de realización particular de la invención, cuando se desea tener un material que tenga propiedades bactericidas o bacterioestáticas, el monómero de fórmula (II) puede tener ventajosamente un grupo amonio.

Puede ser adecuado cualquier iniciador, generador de radicales libres conocido por el experto en la técnica, que permita la polimerización.

Por ejemplo, el iniciador puede ser un iniciador térmico seleccionado entre el grupo que comprende peróxidos, compuestos diazo o persulfatos, por ejemplo, persulfato de potasio, persulfato de amonio y peróxido ácido.

Por ejemplo, el iniciador puede ser un iniciador de la fotopolimerización. Puede seleccionarse entre el grupo que comprende los Irgacures (por ejemplo 2959, 184, 651, 819) [6], 2-hidroxi-4-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona, benzofenona, 2,4-dimetilbenzofenona, benzoína, benzofenonas iónicas seleccionadas entre el grupo que comprende cloruro de 4-trimetilmetilamonio benzofenona, sal sódica de 4-sulfometilbencilo, cetonas aromáticas y aldehídos, particularmente benzaldehído, acetofenona, biacetilo, paraclorobenzofenona, ácido ferúlico, y todos los compuestos que se producen bajo radiación UV/visible de radicales. Se selecciona preferiblemente irgacure 2959.

Las concentraciones de los diferentes compuestos en la mezcla (etapa i) pueden ser, por ejemplo:

- para el fibrinógeno de 1 a 50 mg/ml, preferiblemente entre 5 y 25 mg/ml,
- para los monómeros de fórmula (I) y opcionalmente (II) de 1 a 400 mg/ml, preferiblemente 100 mg/ml de 0,1 a 1 mg/ml, preferiblemente 0,42 mg/ml.

La trombina usada en la etapa (ii) puede proceder, por ejemplo, de plasma humano, de cerdo o de res.

La concentración de la trombina en la mezcla de la etapa (ii) puede ser, por ejemplo, de 0,1 a 2,5 U/ml, preferiblemente de 0,2 a 1 U/ml.

En la etapa iii), la temperatura de incubación puede ser, por ejemplo, entre 30 y 40 °C, preferiblemente 37 °C.

5 Es durante este paso cuando el gel físico de fibrina se forma a partir de fibrinógeno por hidrólisis enzimática. Esta hidrólisis enzimática se cataliza por la trombina. Inesperadamente, la formación del gel, la actividad de la enzima y las propiedades del gel no se alteran por la presencia de los monómeros de fórmula (I) y opcionalmente monómeros de fórmula (II), y su polimerización.

10 Cuando el iniciador es un iniciador térmico, la polimerización de los monómeros de las fórmulas (I) y/o (II) puede ocurrir al mismo tiempo que la etapa (iii) o después de la etapa (iii). Cuando la polimerización tiene lugar después de la etapa (iv), puede realizarse, por ejemplo, a una temperatura entre 25 °C y 60 °C. Preferiblemente, la temperatura se selecciona de manera que el gel de fibrina no se desnaturalice.

15 La polimerización térmica puede realizarse entre 0,5 y 10 horas, preferiblemente entre 1 y 3 horas.

En la etapa iv), cuando el iniciador es un iniciador de la fotopolimerización, por ejemplo los que se han mencionado anteriormente, la polimerización puede realizarse bajo una radiación UV/visible, a una longitud de onda entre 190 y 800 nm, preferiblemente bajo una radiación UV de longitud de onda entre 300 y 380 nm.

20 La fotopolimerización en la etapa iv) puede realizarse durante 1 a 10 horas, preferiblemente de 1 hora y 30 minutos a 3 horas.

25 Las diferentes soluciones se preparan en tampón Tris o HEPES, preferiblemente Tris-HCl, a una concentración de 25 a 100 mM, preferiblemente 50 mM, a un pH de 7,2 a 7,5, preferiblemente 7,4 que contiene CaCl₂ de 10 a 50 mM, preferiblemente 20 mM y NaCl de 50 a 250 mM, preferiblemente 150 mM.

Las concentraciones finales de los diferentes compuestos en la mezcla (etapa ii) pueden ser, por ejemplo:

- para el fibrinógeno de 1 a 50 mg/ml, preferiblemente entre 5 y 25 mg/ml,
- 30 - para los monómeros de fórmula (I) y opcionalmente (II) de 1 a 400 mg/ml, preferiblemente 100 mg/ml,
- para el iniciador de 0,1 a 1 mg/ml, preferiblemente 0,42 mg/ml, y
- para la trombina de 0,1 a 2,5 U/ml, preferiblemente de 0,2 a 1 U/ml.

35 Después de la etapa (iv), el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente una etapa de reticulación enzimática del gel físico de fibrina. En esta etapa complementaria, se puede usar, por ejemplo, transglutaminasa o lisiloxidasa como enzima.

40 La transglutaminasa es una enzima que puentea mediante enlaces covalentes (o une) ciertos aminoácidos entre sí (básicamente el ácido glutámico y la lisina) y que contribuye a la reticulación de proteínas durante los procesos de gelificación. Esto puede conducir a un sistema más resistente a la biodestrucción y que tiene mejores propiedades mecánicas.

45 De acuerdo con esta realización, puede usarse una enzima, por ejemplo la transglutaminasa. La muestra de RPI obtenida después de la etapa (iv) se sumerge entonces inmediatamente o posteriormente en una solución de transglutaminasa a una concentración variante de 0,1 a 10 U/ml, preferiblemente entre 0,5 y 3 U/ml en tiempos variables de 5 minutos a 6 horas, preferiblemente de 30 minutos a 3 horas.

50 El procedimiento de la invención puede implementarse en cualquier recipiente, vaso de precipitados, cristizador, pastillero, etc. pudiendo cerrarse preferiblemente. El recipiente también se puede hacer a medida, por ejemplo, con dos placas de vidrio o cualquier material transparente a los rayos UV e impermeable al agua. Estas placas pueden separarse por un sello en Teflon™ o en polietileno de diferentes espesores de 100 μm a 3 mm, preferiblemente de 1 mm.

55 La invención se refiere también al material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol (PEG) que puede obtenerse por el procedimiento de acuerdo con la invención.

El material que puede obtenerse por el procedimiento de acuerdo con la invención tiene la ventaja de estar en forma de un gel, homogéneo y manipulable teniendo además una estabilidad dimensional en el tiempo y capaz de resistir a

la degradación, por ejemplo, por la acción del calor. Además, la resistencia a la degradación de dicho material bajo la acción de las enzimas se mejora significativamente.

5 Como se ha indicado previamente, el material de la invención está bajo la forma de una red polimérica interpenetrante (RPI) que combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol (PEG) entre los que no hay ningún enlace químico, es decir, ningún enlace covalente. En esta red polimérica interpenetrante (RPI), cada polímero forma una red química o física que tiene una existencia tridimensional o 3D. Por ejemplo, la red PEG puede sintetizarse por reticulación de poli(etilenglicol)di(met)acrilato ($X_1 = X_2 = (\text{meta})\text{acrilato}$ donde n puede variar de 2 a 140). La red PEG se hincha en el agua o en el tampón.

10 De acuerdo con una realización ventajosa de la invención, en el material, la red polimérica interpenetrante (RPI) combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol elaborada con poli(etilenglicol)dimetacrilato ($X_1 = X_2 = \text{metacrilato}$ y $n = 8$ a 9 o $n = 13$ a 14).

15 De acuerdo con otra realización ventajosa de la invención, es posible sintetizar la red de polietilenglicol con poli(etilenglicol)diacrilato ($X_1 = X_2 = \text{acrilato}$ y $n = 8$ a 9 o $n = 13$ a 14).

En el material, la red de polietilenglicol (PEG) puede contener entre el 1 y el 100 % de monómeros de fórmula (I) y entre el 99 y el 0 % en peso de monómeros de fórmula (II) como se ha definido anteriormente.

20 Más particularmente, los monómeros de fórmula (I) son aquellos en los que X_1 y X_2 , idénticos o diferentes, se usan en solitario se seleccionan entre el grupo que comprende metacrilatos o acrilatos y n es un número entre 2 y 20.

El material de la invención puede estar constituido por:

- 25
- a) del 1 al 50 % en peso seco de fibrina;
 - b) del 50 al 99 % en peso seco de una red de polietilenglicol (PEG).

El material de acuerdo con la invención tiene unas mejores propiedades mecánicas con respecto a las de un gel constituido únicamente por fibrina.

30 También posee propiedades (casi) reversibles de deshidratación e hidratación. Este no es el caso, por ejemplo, del gel de fibrina en solitario. En efecto, después de un ciclo de deshidratación, el gel de fibrina no se puede rehidratar a más del 25% del valor inicial.

35 El material de acuerdo con la invención puede rehidratarse del 25 al 100 %, preferiblemente del 45 al 95 %.

Asimismo, el material de acuerdo con la invención tiene una resistencia significativamente mejorada a la degradación, por ejemplo: por las proteasas, por la temperatura, etc. La fibrina se estabiliza en este material. De hecho, cuando un gel de fibrina se sumerge en tampón Tris (50 mM pH 7,4) durante 48 h, se extrae el 25 % de la proteína. En la RPI esta proporción está comprendida entre el 20 y el 0,1 % generalmente entre el 1 y el 0,1 %. La red de polietilenglicol (PEG) parece proteger la fibrina de la degradación.

45 El material de acuerdo con la invención tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) entre -100 °C y $+100$ °C, preferiblemente entre -50 y $+20$ °C. La temperatura de transición vítrea T_g (*glass transition temperature* en inglés) de un material polimérico se define como la temperatura por debajo de la cual las cadenas poliméricas tienen una baja movilidad relativa. Por debajo de la T_g , el polímero está en un estado vídrioso, por encima de la T_g , el polímero está en un estado parecido al caucho. La temperatura de transición vítrea de un material puede medirse, por ejemplo, mediante el análisis térmico diferencial DSC.

50 El material de la invención puede tener también un módulo de conservación (medido en modo de cizalladura, G') entre 100 Pa y 10 MPa, por ejemplo, entre 1000 Pa y 6 MPa, en el estado hidratado a 37 °C y un módulo de conservación (medido en modo de tensión E') entre 0,01 y 3000 MPa, por ejemplo, entre 1 y 3000 MPa, en el estado seco.

55 El módulo X de un material sometido a una tensión sinusoidal se escribe en la forma compleja:

$$X^* = X' + iX''$$

De acuerdo con el modo de sollicitación usado, tensión o cizalladura, los módulos X se señalan respectivamente E o G, X' se señalan E' o G' y X'' se señalan E'' o G''. i es un número complejo, tal como $(i)^{\square}=1$ [7].

5 En el modo de tensión, la parte real del módulo E', *módulo elástico o de conservación*, mide la capacidad del material para almacenar energía mientras que la parte imaginaria E'', *módulo viscoso o de pérdida*, representa la capacidad del material para disipar la energía. Según el estado en el que se encuentra el material en función de la temperatura, aparece un desfase entre la tensión ejercida sobre el material y su deformación. Este desfase es nulo cuando material es meramente elástico, y de 90° cuando es perfectamente viscoso. Por lo tanto, la tangente del ángulo de desfase ($\tan \square$) refleja la capacidad de amortiguación del material.

10 Para caracterizar un material, se registran los espectros de ATMD (análisis termomecánico dinámico) que representan E' o $\tan \square$ en función de la temperatura.

15 En el *modo cizalladura*, el módulo de conservación o de elasticidad en cizalladura (G') permite calcular la elasticidad del gel. El módulo de pérdida o módulo viscoso (G'') caracteriza la fase líquida del gel. Cuando $G''>G'$, la muestra se considera como líquida y cuando $G'>G''$, la muestra está gelificada. Por lo tanto, los procesos de gelificación se caracterizan por un tiempo de gel que se traduce en una igualdad de módulos G' y G''.

20 El material que puede obtenerse de acuerdo con el procedimiento de la invención es ventajosamente biocompatible. Cuando se desea obtener un material final estéril después de la síntesis (al final de la implementación del procedimiento de la invención), el material se obtiene ventajosamente por fotopolimerización.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un material de acuerdo con la invención o que puede obtenerse según el procedimiento de invención, como:

- 25
- apósito para heridas,
 - apósito quirúrgico,
 - un dispositivo para administrar agentes terapéuticos,
 - revestimiento para dispositivos médicos seleccionados entre el grupo que comprende endoprótesis

30 vasculares, válvulas cardíacas, catéteres, filtros protésicos vasculares,

 - soporte de moléculas activas seleccionadas entre el grupo que comprende factores de crecimiento, antibióticos, bactericidas, bacterioestáticos o enzimas,
 - o para cultivos de células eucariotas.

35 Otras ventajas pueden resultar evidentes para el experto en la técnica a partir de la lectura de los siguientes ejemplos, ilustrados por las figuras adjuntas, hechos con fines ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 muestra las fotos justo después de la etapa iv) de las RPI obtenidas a partir de mezclas de monómeros (a la concentración final de 100 mg/ml) de la fórmula $X_1-(CH_2-CH_2-O)_n-X_2$ en la que X_1 y X_2 son grupos metacrilato y:

- donde $n = 8$ a 9 y el fibrinógeno está a la concentración final de 5 mg/ml (RPI550-5)
- donde $n = 13$ a 14 y el fibrinógeno está a la concentración final de 5 mg/ml (RPI750-5)

45

- donde $n = 8$ a 9 y el fibrinógeno está a la concentración final de 25 mg/ml (RPI550-25)
- donde $n = 13$ a 14 y el fibrinógeno está a la concentración final de 25 mg/ml (RPI750-25).

La figura 2 muestra los espectros de absorción medidos con un espectrómetro de infrarrojos con transformada de Fourier con un módulo de reflexión total atenuada (ATR) de RPI 550-5 (a) y de RPI 750/5 (b). En el eje de abscisas «NO» representa «Número de Onda» y en el eje de ordenadas «TR» representa «Transmitancia».

50 La figura 3 representa la isoterma de deshidratación de las diferentes RPI medida con un Analizador Termogravimétrico (ATG) bajo una corriente de argón a 37 °C. (: RPI 550-5; : RPI 550-25; : RPI 750-5; : RPI 750-25). En el eje de abscisas «t» representa «tiempo» y en el eje de ordenadas «PM» representa «Pérdida de Masa».

55 La figura 4 representa los ciclos de hidratación-deshidratación de RPI 550-5 () , RPI 550-25 () , RPI 750-5 () y RPI 750-25 () . En el eje de abscisas «CG-S» representa «Ciclos de Hinchazón-Secado» y en el eje de ordenadas «VM» representa «Variación de Masa».

La figura 5 representa en análisis termomecánico dinámico (ATMD) en modo de tensión en función de la temperatura de red simple POE 550 (sintetizada en las mismas condiciones sin fibrinógeno en la mezcla (i),

de RPI 550-5 y de RPI 550-25 secas.

a- Módulos de conservación (MC); de abajo a arriba: RPI 550-5, red simple POE 550, RPI 550-25. En el eje de ordenadas «T» representa «Temperatura».

5 b- Tan Delta (TN); de arriba a abajo: red POE 550, RPI 550-5, RPI 550-25. En el eje de ordenadas «T» representa «Temperatura».

10 □ La figura 6 muestra los módulos de conservación en tensión (MC) en función de la temperatura (T) de RPI 550-25 (arriba) y de RPI 750-25 (abajo) - En la figura insertada: Tan Delta - de arriba a abajo: RPI 750-25, RPI 550-25.

EJEMPLOS

I. Caracterización de materiales

15

I.A. Caracterizaciones de las propiedades mecánicas para el análisis termomecánico dinámico (ATMD)

20 Las caracterizaciones termomecánicas en modo de tensión de los diferentes materiales (previamente secados durante 24 h a 37 °C en un horno) se miden por ATMD en un aparato Q800 (TA Instruments), con una sollicitación en modo de tensión. La deformación impuesta es del 0,05 % (menor deformación reversible), la fuerza de tensión previa del 120 %. Las muestras se solicitan a una frecuencia constante de 1 Hz con una rampa de temperatura de $T = -80\text{ °C}$ a 100 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min . Las muestras rectangulares tienen anchuras y longitudes variables pero un espesor medio de 0,1 mm.

25 I.B. Análisis térmicos

30 Las mediciones del análisis calorimétrico diferencial de barrido (DSC) se realizaron con un dispositivo DSC Q100 (TA Instruments) y el software de análisis es Universal Analysis. La muestra seca de una masa inferior a 10 mg se deposita en una cápsula de aluminio que se sella, y se coloca en el horno. La muestra se enfría 5 °C/min hasta -80 °C y después se realizó una isoterma de un minuto. Después, se realiza un calentamiento a 5 °C/min hasta 200 °C (primer barrido), seguido de otra isoterma de un minuto. Se realiza un segundo paso sobre la misma muestra. Los termogramas registrados en el segundo paso se analizan para determinar las temperaturas de transición vítrea.

35 I.C. Comportamiento hídrico de los materiales

I.C.1. Isotermias de deshidratación

40 Los análisis termogravimétricos (ATG) se realizan en un modelo Q50 de la empresa TA Instruments y el software de análisis es Universal Analysis. El cambio en la masa de una muestra se mide según la temperatura y el tiempo en una atmósfera de argón.

45 Una masa m de la muestra hidratada se deposita en el balde y después el horno se cierra. Durante los registros de las isotermias, la temperatura se equilibra a 37 °C y después se mantiene a esta temperatura durante 100 minutos, en una atmósfera de argón ($60\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

I.C.2. Ciclos de hidratación-deshidratación

50 Las muestras justo después de la etapa (iv), se sumergen durante 2 horas en 25 ml de tampón Tris-HCl pH 7,4 que contiene azida sódica al 0,02 % (NaN_3) con el fin de lograr la tasa máxima de hinchazón que corresponde a una masa m_1 hasta el punto T1. Entonces, las muestras se someten a 3 ciclos alternos de deshidratación-hidratación. Los experimentos de deshidratación se realizan durante 24 horas a 37 °C en un horno (masas m_2 , m_4 y m_6 correspondientes a los puntos T2, T4 y T6) y los de rehidratación se realizan en tampón Tris durante 2 horas a la misma temperatura (masas m_3 y m_5 correspondientes a los puntos T3 y T5). La última etapa hacia la masa m_7 (punto 55 T7) es una rehidratación en el tampón Tris-HCl de 24 h a 37 °C .

A partir de las masas obtenidas en cada etapa T_i , las curvas de hidratación-deshidratación se trazan representando la variación relativa de la masa

$$\Delta m = \frac{m_i \Delta m_i}{m_1}$$

en función del número de la etapa realizada.

I.D. Análisis espectroscópicos

5

Las medidas de absorbancia se realizan en un espectrofotómetro UVIKON XS de doble haz de la compañía SECOMAM.

Los espectros de infrarrojos se registran en un espectrofotómetro IR Tensor 27 equipado con un módulo en reflexión ATR (cono diamante de ángulo 45°).

10

I.E. Ensayos ELISA

Los ensayos ELISA, que permiten cuantificar la cantidad de proteína extraída de los materiales, se realizan como se indica a continuación: Las extracciones se hacen sumergiendo una muestra de 1 ml de gel de fibrina o de RPI en 4 ml de tampón de recuperación durante una noche a 37 °C. La solución que contiene las sustancias extraíbles se diluye 100 veces (con la excepción de polimerizaciones posteriores con la transglutaminasa) antes de la recuperación de pocillos. Para cada resultado, el experimento se realiza n = 3 y al menos 3 veces.

15

Los tampones usados son a base de tampón TBS (tampón salino Tris) compuesto por Tris 110 mM y NaCl 1,65 M a pH 7,4. El tampón de fijación está compuesto por 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl y el 0,02% de NaN₃. El tampón de saturación está compuesto por TBS que contiene el 5% de leche en polvo y el 0,1 % de Tween-20. El tampón de aclarado y de dilución está compuesto por TBS que contiene el 0,05 % de Tween-20 y el 0,02 % de NaN₃. Finalmente, el pNPP se disuelve en 1 M de dietanolamina que contiene 0,5 mM de MgCl₂ a pH 9,8. La primera etapa del ensayo ELISA consiste en fijar el antígeno incubando 100 µl del producto extraíble en cada uno de los pocillos durante 3 horas a 37 °C. Después de tres aclarados con 200 µl de tampón de aclarado, se añaden 200 µl de tampón de saturación en los pocillos, y la totalidad se incuba durante una noche a 4 °C. Después de cuatro aclarados con 200 µl de tampón de aclarado, se introducen 100 µl del anticuerpo primario diluido 1/200 (fibrinógeno anti-humano producido en conejo) en los pocillos y la totalidad se incuba durante 3 horas a 37 °C. Después del aclarado, se añaden 100 µl de anticuerpo secundario diluido en 1/30000 (inmunoglobulina G anti-conejo producido en cabras y acoplado a fosfatasa alcalina), la totalidad se incuba durante 3 horas a 37 °C. Después del aclarado, se añaden 200 µl de pNPP a 1 mg/ml (sustrato cromogénico). El desarrollo de la coloración se hace en la oscuridad durante 15 minutos y se detiene por 50 µl de NaOH 3 M. La medición del ensayo colorimétrico se realiza a 405 nm, y la intensidad de señal es directamente proporcional a la concentración de fibrinógeno.

20

25

30

35

I.F. Extracción sólido-líquido

La extracción con diclorometano en un soxhlet permite solubilizar los compuestos solubles en este disolvente (por lo tanto, no reticulado) y cuantificar su proporción en una muestra sólida.

40

La cantidad de material soluble contenido en las RPI corresponde a la proporción de monómero PEGDM no reticulado. Los materiales se extraen en soxhlet con CH₂Cl₂ a reflujo durante 48 horas. Las tasas de producto extraíble se calculan según la relación de las masas:

$$Mat.Ext.\% = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

45

donde m_i y m_f son respectivamente las masas de materiales antes y después de la extracción. Las extracciones se han realizado sobre muestras que contienen 100 mg de red POE, es decir m_i = 100 mg.

II. Características de los compuestos utilizados

50

El cloruro sódico (NaCl - CAS 27 800.291 Research organics), el dicloruro cálcico (CaCl₂, 2H₂O - CAS 22 317.297 - Research organics), el ácido clorhídrico (HCl al 37 % - CAS 20 252.290- Prolabo), la urea (CAS 28876.367 - Prolabo), el dodecil sulfato sódico (SDS-CAS 16103.01 - Biorad), el β-Mercaptoetanol (CAS 16107.10 - Biorad), la Dietanolamina (C₄H₁₁NO₂ - CAS 111-42-2), el Tween-20 Polioxitileno-Sorbitán Monolaurato (CAS 9005-64-5) y la

azida sódica (NaN_3 - CAS 26628-22-8) proceden de la compañía Sigma. Los diferentes poli(óxido de etileno)dimetacrilato (PEGDM - CAS 25852-47-5 - Aldrich) de masa molares 330 (PEGDM330), 550 (PEGDM550) y 750 (PEGDM750) $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, poli(etilenglicol)metacrilato monofuncional ($530\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ - ALDRICH), 2-hidroxi-4-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959 - CIBA), diclorometano (Carlo-Erba), trihidroxiaminometano (Tris, Prolabo o Carlo Erba), se usan sin tratamiento previo.

El fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) y la yodoacetamida (I-6185 - CAS 144-48-9) proceden de la compañía SIGMA. Este sustrato cromógeno (EC 224-246-5) se encuentra en tabletas y en forma de comprimidos de 5 mg.

10 El fibrinógeno tipo IV (Fg, F-4753 - SIGMA) usado es de origen bovino. La proteína liofilizada se conserva a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se mantiene a esta misma temperatura después de la solubilización.

La trombina liofilizada (EC3.421.5 - 34,8 unidades por mg de sólido-SIGMA) se conserva a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Su solución en el tampón Tris-HCl puede almacenarse durante 2 a 3 días a $+4\text{ }^\circ\text{C}$ y a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para una mayor duración.

15 La transglutaminasa (Activa WM - empresa Ajinomoto distribuido por UNIPEX), envasada en polvo, tiene una actividad de 100 unidades por gramo de sólido y se conserva a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

La termolisina (SIGMA) posee 33 unidades por mg de sólido y se conserva a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

20 Para los experimentos ELISA, el anticuerpo primario fibrinógeno anti-humano producido en el conejo procede de la compañía DAKO (CAS - A 0080). El anticuerpo secundario anti-IgG (Inmunoglobulina G - A 3687 - Sigma) de conejo se produce en cabras y se acopla a la fosfatasa alcalina.

25 Todas las soluciones se preparan en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se preparan soluciones madre en CaCl_2 2 M, NaCl 1,5 M, así como 10 mg/ml y 50 mg/ml de fibrinógeno. Las soluciones madre de trombina y transglutaminasa se preparan respectivamente en 20 unidades/ml y 10 unidades/ml en el tampón tris-HCl.

III. Ejemplos de elaboraciones de materiales y caracterización

30

Ejemplo 1: Síntesis de RPI POE550/Fibrina (100/5) (RPI550-25)

Las soluciones madre de fibrinógeno (10 mg/ml), trombina (20 U/ml), NaCl (1,5 M), CaCl_2 (2 M) e Irgacure 2959 (6 mg/ml) preparadas en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), así como el monómero PEGDM550 puro se incuban por separado durante 15 minutos a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en un baño de agua.

35 Se añaden 210 μl de tampón Tris-HCl, 10 μl de CaCl_2 (2 M), 100 μl de NaCl (1,5 M), 500 μl de fibrinógeno (10 mg/ml), 100 μl de monómero PEGDM 550 y 70 μl de Irgacure 2959 (6 mg/ml) en este orden en un tubo ependorff de 1,5 ml. La reacción de gelificación de la fibrina se inicia mediante la adición de 10 μl de una solución de trombina en el tampón Tris-HCl a la concentración de 20 unidades/ml. La mezcla de reacción de un volumen total de 1 ml se

40 homogeneiza con una pipeta y se introduce rápidamente entre dos láminas de vidrio separadas por un sello en Teflon (marca registrada) de un espesor medio de 1 mm. Estas láminas sujetas por pinzas se depositan sobre un soporte que se encuentra en un baño de agua mantenido a $37\text{ }^\circ\text{C}$. La polimerización radicalaria se realiza durante 1 h 30 min protegida de la luz del día con una lámpara de tipo VL-6 que tiene una potencia de 25W que emite radiaciones UV a $\lambda = 365\text{ nm}$.

45

La RPI 550-5 es un material blando deformable que se presenta bajo la forma de un rectángulo de 6,5 cm x 2 cm y un espesor medio de 1 mm (figura 1).

50 La RPI 550-5 contiene una fracción soluble en diclorometano del 36% en peso con respecto a la masa del monómero PEGDM550 introducido inicialmente. El 10 % de la masa de proteína puede extraerse de este RPI. Se indica el espectro infrarrojo de la RPI (figura 2). Se indica su comportamiento a la deshidratación en una corriente de argón a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (medida por ATG), por un lado, y a los ciclos de hidratación-deshidratación, por otro lado, respectivamente (figura 3 y figura 4).

55 La RPI 550-5 tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) detectada a $-37\text{ }^\circ\text{C}$ por medición DSC en el segundo barrido.

La RPI 550-5 tiene un módulo de conservación en modo cizalladura del orden de 0,8 MPa en el estado hidratado (medido en ATMD en modo cizalladura). Se indican las propiedades termomecánicas de esta RPI en el estado seco

(figura 5).

Ejemplo 2: Síntesis de RPI POE550/Fibrina (100/25) (RPI 550-25)

5 La RPI 550-25 (figura 1) se sintetiza siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1. Únicamente la concentración de la solución madre de fibrinógeno se fija a 25 mg/ml, todas las demás concentraciones permanecen iguales. Los volúmenes introducidos son los mismos.

10 La RPI POE550/Fibrina (100/25) no contiene fracción soluble en diclorometano (0 % de producto extraíble en diclorometano). Los ensayos ELISA muestran que el 1 % en peso de la proteína introducida se extrae de la RPI. Esta RPI tiene una temperatura de transición vítrea (Tg) detectada por DSC a -27 °C. Se indica su comportamiento a la deshidratación en una corriente de argón a 37 °C (medida por ATG), por un lado, y a los ciclos de hidratación-deshidratación, por otro lado, respectivamente (figura 3 y figura 4).

15 La RPI 550-25 tiene un módulo de cizalladura del orden de 0,3 MPa en el estado hidratado (medido en ATMD en modo cizalladura). Se indican propiedades termomecánicas de esta RPI en el estado seco (figura 5 y figura 6).

Ejemplo 3: Síntesis de RPI POE750/Fibrina (100/5) (RPI 750-5)

20 **[0108]** La RPI 750-5 se sintetiza siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1. Únicamente el monómero PEGDM 550 se reemplaza por el monómero PEGDM 750. Las concentraciones y los volúmenes introducidos son iguales.

25 La RPI 750-5 es rígida y quebradiza: Es posible cortarla con una punta de pipeta (figura 1). Se quiebra durante el secado. Contiene una fracción soluble en diclorometano del 24% en peso con respecto a la masa del monómero PEGDM750 introducido. El 25% de la masa de la proteína puede extraerse de esta RPI. Esta RPI tiene una temperatura de transición vítrea (Tg) detectada por DSC a -38 °C. Se indica el espectro infrarrojos de la RPI (figura 2). Se indica su comportamiento a la deshidratación en una corriente de argón a 37 °C (medida por ATG), por un lado, y a los ciclos de hidratación-deshidratación, por otro lado, respectivamente (figura 3 y figura 4).

30

Ejemplo 4: Síntesis de RPI POE750/Fibrina (100/25) (RPI 750-25)

35 La RPI 750-25 (figura 1) se sintetiza siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 2. Únicamente el monómero PEGDM 550 se reemplaza por el monómero PEGDM 750. Las concentraciones y los volúmenes introducidos son iguales.

40 La RPI 750-25 contiene el 0 % de fracción soluble en diclorometano. Los ensayos ELISA muestran que el 1 % en peso de la proteína introducida se extrae de la RPI. Se indica su comportamiento a la deshidratación en una corriente de argón a 37 °C (medida por ATG), por un lado, y a los ciclos de hidratación-deshidratación, por otro lado, respectivamente (figura 3 y figura 4).

La RPI 750-25 tiene un módulo de cizalladura del orden de 1,2 MPa en el estado hidratado (medido en ATMD en modo cizalladura). Se indican las propiedades termomecánicas de esta RPI en el estado seco (figura 6).

45 **Ejemplo 5: Post-reticulación enzimática de red de fibrina en la RPI POE550/Fibrina (100/5) (RPI 550-5)**

La RPI 550-5 sintetizada siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se sumerge durante 3 horas en 10 ml de una solución de transglutaminasa a 0,5 unidades/ml en el tampón Tris-HCl. Los ensayos ELISA muestran que menos del 0,2 % de la masa de la proteína introducida puede extraerse de esta RPI.

50

Ejemplo 6: Post-reticulación enzimática de la red de fibrina en la RPI POE550/Fibrina (100/25) (RPI 550-25)

55 La RPI 550-25 sintetizada siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 se sumerge durante 3 horas en 10 ml de una solución de transglutaminasa a 0,5 unidades/ml en el tampón Tris-HCl. Los ensayos ELISA muestran que el 0,2 % de la masa de la proteína introducida puede extraerse de esta RPI. Este material tiene un módulo de cizalladura del orden de 1 MPa en el estado hidratado (medido en ATMD en modo cizalladura a 1 Hz).

Ejemplo 7: Post-reticulación enzimática de la red de fibrina en la RPI POE750/Fibrina (100/5) (RPI 750-5)

La RPI 750-5 sintetizada siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 se sumerge durante 3 horas en 10 ml de una solución de transglutaminasa a 0,5 unidades/ml en el tampón Tris-HCl. Los ensayos ELISA muestran que el 0,2 % de la masa de la proteína introducida puede extraerse de esta RPI.

5 Ejemplo 8: Post-reticulación enzimática de la red de fibrina en la RPI POE750/Fibrina (100/25) (RPI 750-25)

La RPI 750-25 sintetizada siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 se sumerge durante 3 horas en 10 ml de una solución de transglutaminasa a 0,5 unidades/ml en el tampón Tris-HCl. Los ensayos ELISA muestran que el 0,2 % de la masa de la proteína introducida puede extraerse de esta RPI. Este material tiene un módulo de cizalladura del orden de 3 MPa en el estado hidratado (medido en ATMD en modo cizalladura a 1 Hz).

Ejemplo 9: Biocompatibilidad de RPI

Las células CHOK1 se han cultivado en la RPI 750-5 y la RPI 750/25 descritas, respectivamente en el ejemplo 3 y el ejemplo 4. Para ambos materiales:

- Las células se adhieren a los materiales, en particular sobre la RPI 750/25.
- Un marcado de los núcleos con DAPI (4',6-diamino-2-fenil-indol) muestra que las células están vivas después de al menos 5 días.
- 20 - Una observación por microscopía de fluorescencia muestra que las células se dividen después de adherirse en el material
- Un marcado fluorescente de la red de actina demuestra que las células se extienden sobre los materiales.
- Se han observado una pluralidad de células en fase de mitosis. Las células se multiplican sobre los
- 25 materiales.
- Las células tienen a penetrar en el material, en particular para la RPI 750/25

Todas estas observaciones permiten concluir que la RPI 750-5 y la RPI 750/25 son biocompatibles.

30 Ejemplo 10: Capacidad de retención/liberación de moléculas

La RPI 750/25 descrita en el ejemplo 4 se ha aclarado abundantemente tras la síntesis, después se sumerge en un medio de cultivo adaptado a CHOK1, se seca con papel absorbente y después se siembra en células eucariotas. Las células se adhieren y tienen una actividad celular mayor sobre este material que sobre el mismo material no "enriquecido" descrito en el ejemplo 10.

Ejemplo 11: Capacidad de retención/liberación de moléculas

La RPI 750/25 descrita en el ejemplo 4 se aclara con el tampón Tris-HCl tras la síntesis, se seca con papel absorbente, después se sumerge en una solución de antibiótico y se seca con papel absorbente. Se han usado tres antibióticos diferentes: cloranfenicol, estreptomina y ampicilina. Después, estos materiales se depositan sobre una placa de Petri cubierta de bacterias. Después de 24 h, en cada caso, se observa una zona abiótica (sin presencia de vida) que muestra que el antibiótico se ha liberado por el material. Todos los controles en los que el material está solo son negativos.

45 Por lo tanto, la RPI 750/25 tiene capacidades de retención/liberación de moléculas de principios activos.

Ejemplo 12: Comparación con otros oligómeros

50 La viabilidad de otras RPI y sus propiedades mecánicas se han verificado en primer lugar variando las longitudes de cadena del oligómero PEGDM, es decir, la densidad de reticulación de la red POE sintetizada en la RPI.

Se selecciona el PEGDM 330 con una masa molar inferior ($330 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) que el PEGDM 550. Se conserva una concentración de monómero sintético de 100 mg/ml. El PEGDM 330 no es lo suficientemente soluble en agua (solubilidad: 65 mg/ml), por lo tanto, su solución a 100 mg/ml en el tampón Tris-HCl no es homogénea y la síntesis de RPI da como resultado lógicamente un material no homogéneo.

Las redes POE sintetizadas a partir de mezclas 10/90 y 90/10 en masa de PEGDM 550 o PEGDM 750 con poli(etilenglicol)metacrilato monofuncional de masa $530 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ se han relacionado también con un gel de fibrina con

el fin de variar la densidad de reticulación de la red POE. Se conserva una concentración total en monómero poli(óxido de etileno) de 100 mg/ml. Se han obtenido materiales de textura en gel suave que no tienen una resistencia mecánica aceptable.

5 Lista de referencias

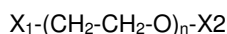
- [1] Ruszczak, Z.. (2003) "Effect of collagen matrices on dermal wound healing". *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 : 1595-1611
- 10 [2] Nguyen, K. T. y J. L. West (2002). "Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications". *Biomaterials* 23: 4307-4314.
- [3] Schmedlen, R. H., J. L. Masters, y col. (2002). "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering". *Biomaterials* 23: 4325-4332.
- [4] De Gennes, P.-G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*. London, Cornell University Press.
- 15 [5] Verderio E. A. M., Johnson, T., Griffin, M.. (2004) "Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing". *Amino Acids* 26: 387-404
- [6] W. Bensaïd, Triffitt J. T., Blanchat, C. Oudina, K. Sedel, L. , Petite, H. (2003) "A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation", *Biomaterials*, 24: 2497-2502.
- 20 [7] M.Fontanille, Y.Gnanou "chimie et physico-chimie des polymères "Edition Dunod, (2002) ISBN 2-10-049493-7 página: 410-413.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol (PEG), que comprende las siguientes etapas:

5 i) preparar una mezcla introducido en un tampón

- una solución de fibrinógeno,
- monómeros de fórmula (I):



10 en la que X_1 y X_2 , son grupos químicos idénticos o diferentes, seleccionados entre el grupo que comprende vinilo, acrilato, metacrilato o alilo y n es un número entre 1 y 140,

- 15 - opcionalmente monómeros de fórmula (II) seleccionados entre los derivados de polietilenglicol que tienen un grupo seleccionado entre el grupo que comprende $-CH_3$, $-NH_2$, $-OH$, $-CH_2CH_3$, le vinilo, acrilato, metacrilato o alilo; derivados de acrilato, metacrilato y estireno seleccionados entre el grupo que comprende hidroxietilmetacrilato, hidroxietilacrilato, acetato de vinilo, N-vinil pirrolidona, N-vinil piridina, acrilonitrilo, ácido acrílico, estireno sulfonato sódico, bromuro de (vinilbencil)trimetil-amonio, cloruro de (vinilbencil)trimetil-amonio, cloruro de trimetil-viniloxicarbonilmetil-amonio, bromuro de trimetil-viniloxicarbonilmetil-amonio, bromuro de trietil-2-viniloxicarbonil-etil)-amonio, bromuro de aliloxicarbonilmetil-trimetil amonio, poli(etilenglicol)metacrilato, poli(etilenglicol)acrilato,
- 20 - un iniciador de la polimerización;

25 ii) preparar una mezcla de reacción añadiendo una solución de trombina a la mezcla preparada en i);

iii) incubar la mezcla de reacción obtenida en ii) a una temperatura entre 20 °C y 40 °C;

30 iv) realizar una polimerización y reticulación de los monómeros de fórmula (I) opcionalmente con los monómeros de fórmula (II).

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero de polietilenglicol (PEG) contiene entre el 1 y el 100 % en peso de monómeros de fórmula (I) y entre el 99 y el 0 % en peso de monómeros de fórmula (II).

35 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los monómeros de fórmula (I) son aquellos en los que X_1 y X_2 , idénticos o diferentes, se seleccionan entre el grupo que comprende metacrilatos o acrilatos y n es un número entre 2 y 20.

4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el iniciador de la polimerización es un iniciador de la fotopolimerización.

45 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el iniciador de la fotopolimerización se selecciona entre el grupo que comprende Irgacure (2959, 184, 651, 819), 2-hidroxi-4-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona, benzofenona, 2, 4-dimetilbenzofenona, benzoína, benzofenonas iónicas seleccionadas entre el grupo que comprende cloruro de 4-trimetilmetilamonio benzofenona, sal sódica de 4-sulfometilbencilo, cetonas aromáticas y aldehídos, particularmente benzaldehído, acetofenona, biacetilo, paraclorobenzofenona, ácido ferúlico.

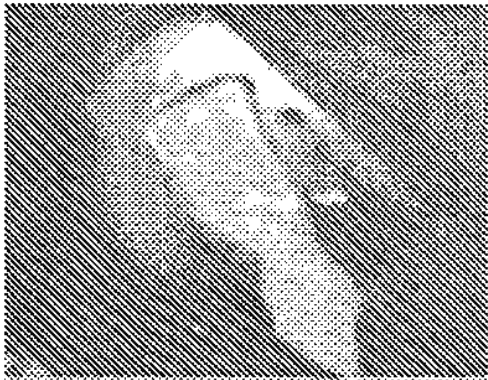
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el iniciador de la polimerización es un iniciador térmico.

50 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el iniciador térmico se selecciona entre el grupo que comprende peróxidos, compuestos diazo o persulfatos.

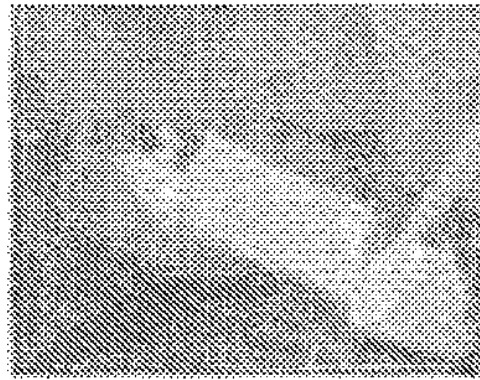
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que en la etapa iii), la temperatura de incubación es de 37 °C.

55 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8, en el que en la etapa iv), la polimerización se realiza bajo una radiación UV/visible a una longitud de onda entre 190 y 800 nm.

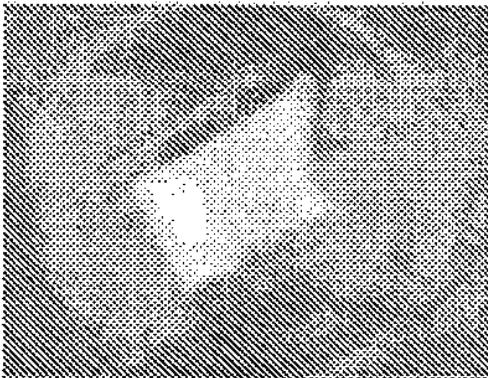
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que en la etapa iv), la polimerización se realiza durante 1 a 10 horas.
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 8, en el que la polimerización se realiza al mismo tiempo que la etapa (iii).
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 8, en el que la polimerización tiene lugar después de la etapa (iv), a una temperatura entre 25 °C y 60 °C.
- 10 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que después de la etapa (iv), el procedimiento de la invención comprende adicionalmente una etapa de reticulación enzimática del gel físico de fibrina.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la enzima utilizada es transglutaminasa.
- 15 15. Material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) que combina un gel físico de fibrina y una red de polietilenglicol (PEG) que puede obtenerse por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 20 16. Material de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la red de polietilenglicol (PEG) contiene entre el 1 y el 100 % en peso de monómeros de fórmula (I) y entre el 99 y el 0 % de monómeros de fórmula (II).
17. Material de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 o 16, en el que los monómeros de fórmula (I) son aquellos en los que X₁ y X₂, son grupos químicos idénticos o diferentes, seleccionados entre el grupo que comprende metacrilatos o acrilatos y n es un número entre 2 y 20.
- 25 18. Material en forma de red polimérica interpenetrante (RPI) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, constituido por:
- 30 a) del 1 al 50 % en peso seco de fibrina;
b) del 50 al 99 % en peso seco de una red de polietilenglicol (PEG).
19. Material de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) entre -100 °C y +100 °C.
- 35 20. Material de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que tiene un módulo de cizalladura (medido en modo de cizalladura G') entre 100 Pa y 10 MPa en el estado hidratado a 37 °C y un módulo de conservación (medido en modo de tensión E') entre 0,01 y 3000 MPa en el estado seco.
- 40 21. Uso de un material de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 o que puede obtenerse de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, como:
- 45 - apósito para heridas,
- apósito quirúrgico,
- un dispositivo para administrar agentes terapéuticos,
- revestimiento para dispositivos médicos seleccionados entre el grupo que comprende endoprótesis vasculares, válvulas cardíacas, catéteres, filtros protésicos vasculares,
- soporte de moléculas activas seleccionadas entre el grupo que comprende factores de crecimiento, antibióticos, bactericidas, bacterioestáticos o enzimas,
- 50 - o para cultivos de células eucariotas.



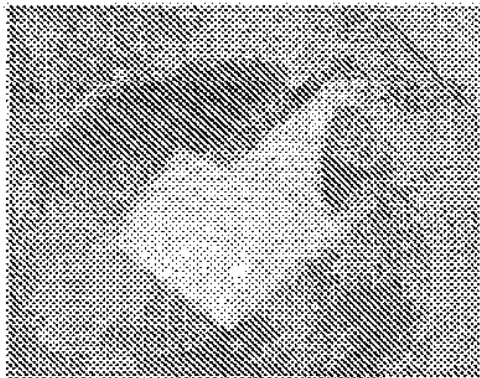
550-5



750-5



550-25



750-25

Figura 1

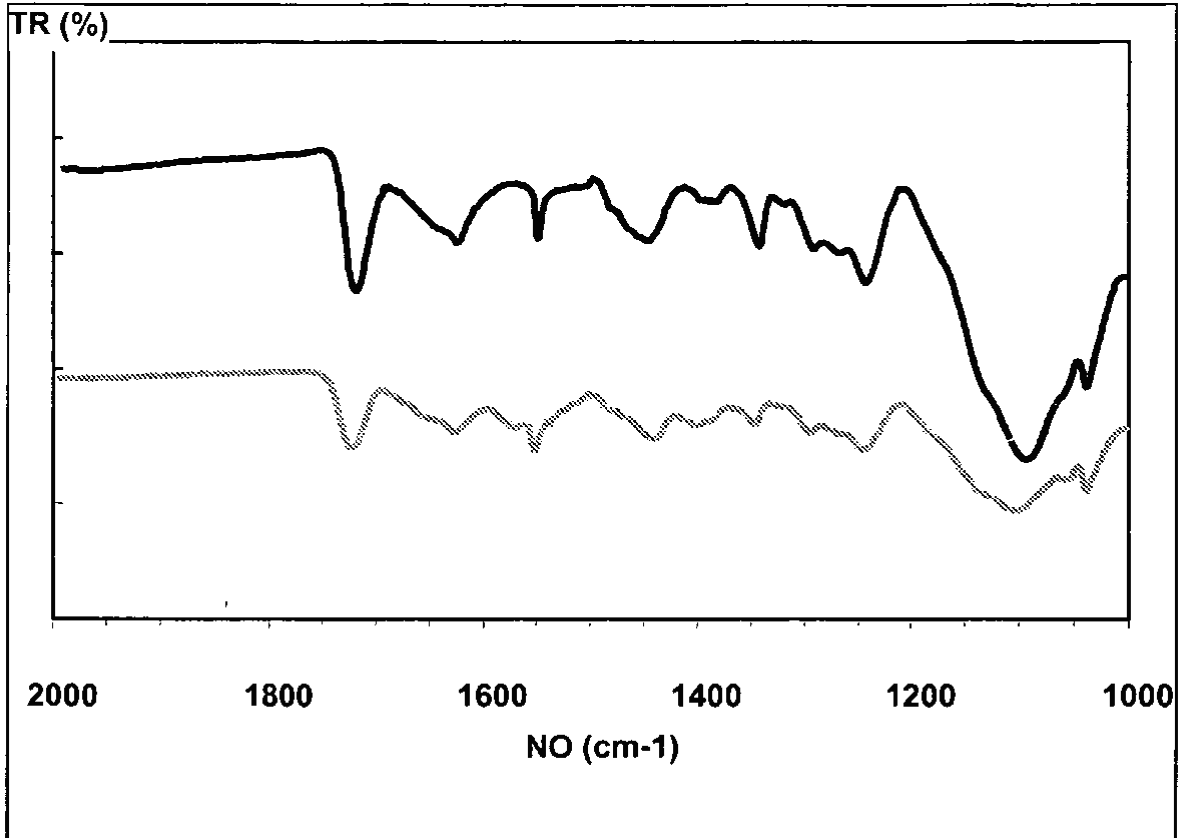


Figura 2

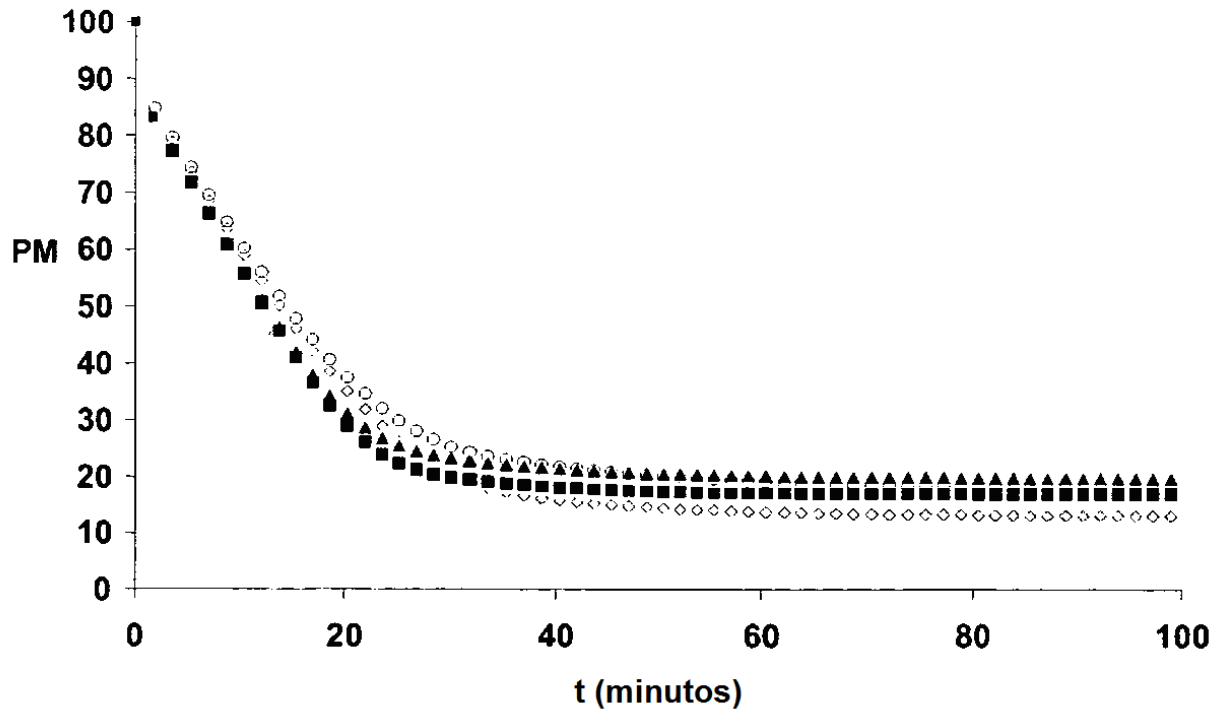


Figura 3

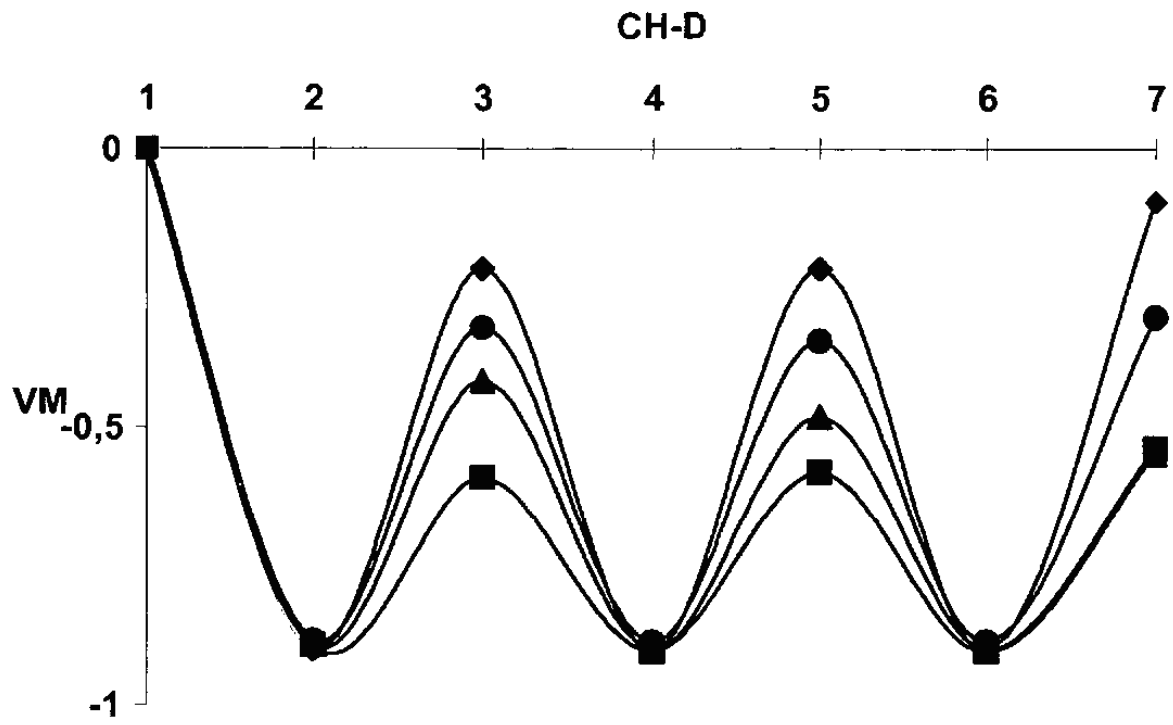


Figura 4

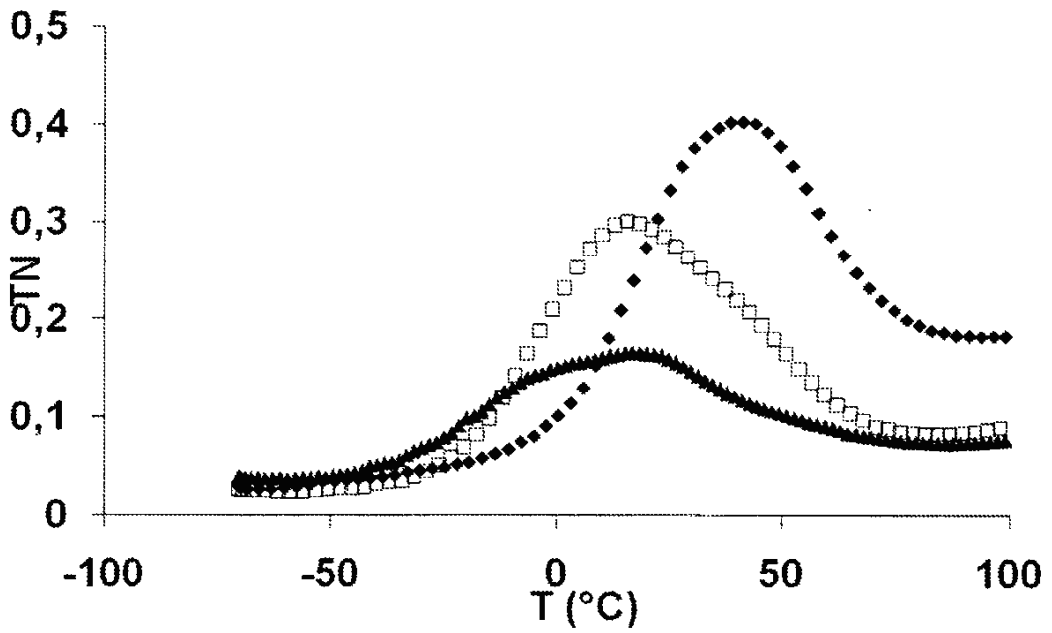
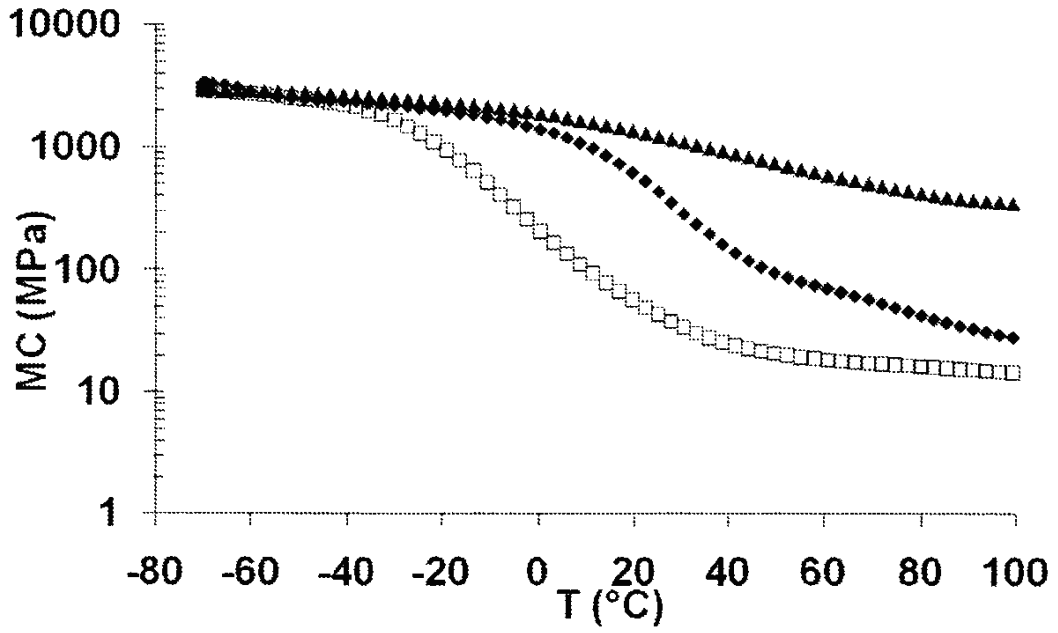


Figura 5

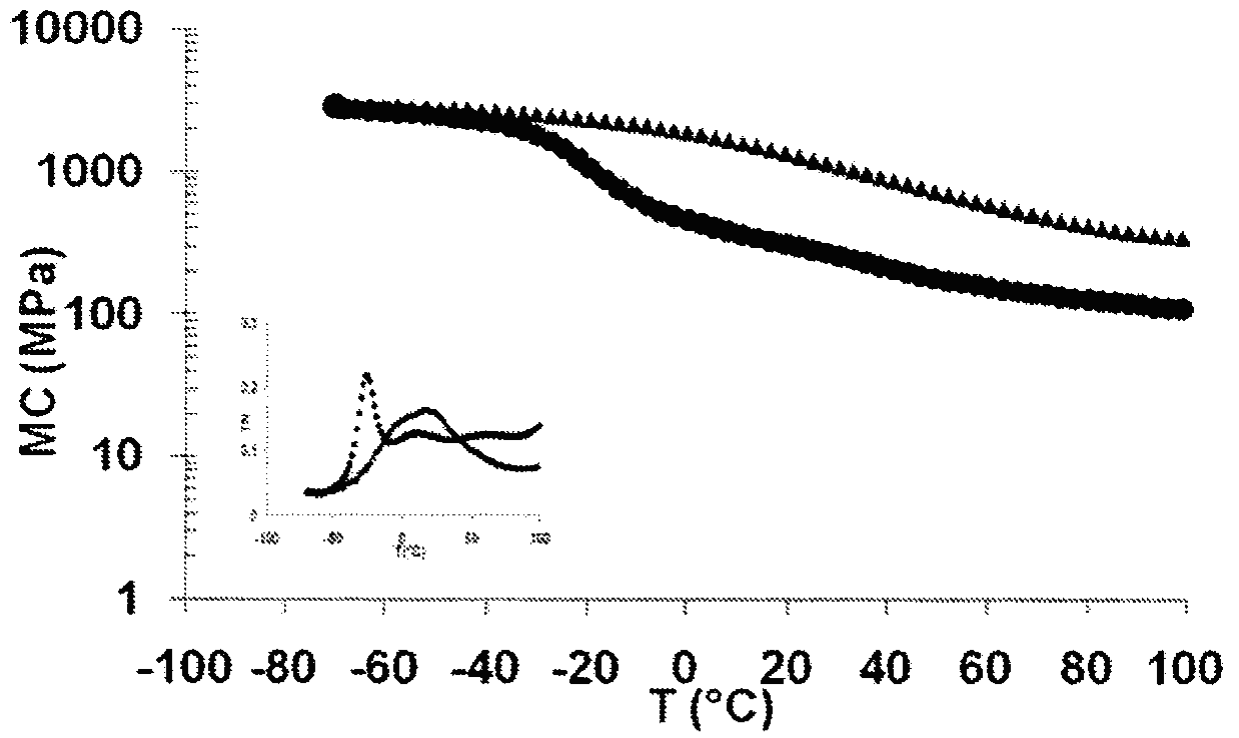


Figura 6