

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 388**

51 Int. Cl.:

A61L 24/08 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10814706 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2515957**

54 Título: **Modificación de agentes de entrecruzamiento enzimáticos para controlar las propiedades de las matrices entrecruzadas**

30 Prioridad:

22.12.2009 US 289368 P

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

18.11.2015

73 Titular/es:

LIFEBOND LTD (100.0%)
POB 3048, 9 Hafamish Street, Industrial Park
38900 Caesarea , IL

72 Inventor/es:

TOMER, GUY y
PREISS-BLOOM, ORAHN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 551 388 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

Modificación de agentes de entrecruzamiento enzimáticos para controlar las propiedades de las matrices entrecruzadas

Antecedentes

Utilidad de las matrices entrecruzadas de enzimas

5 Las matrices entrecruzamiento enzimáticos se forman en una variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, y médica. En aplicaciones médicas, en particular, hidrogeles entrecruzados enzimáticos son ampliamente utilizados en una variedad de aplicaciones médicas, incluyendo sellantes y adhesivos de tejidos, preparaciones hemostáticas, matrices para ingeniería de tejidos o plataformas para la administración de fármacos. Mientras que algunos hidrogeles tales como gelatina y poloxámero se pueden formar como resultado de interacciones físicas entre
10 las cadenas de polímero en condiciones específicas, por ejemplo, cambio en la temperatura, la mayoría de las soluciones de polímero deben estar entrecruzadas con el fin de formar hidrogeles. Además de la formación real del gel sólido, los hidrogeles implantables deben ser resistentes a las condiciones que prevalecen en el tejido donde se aplican, tal como el estrés mecánico, aumento de la temperatura, y la degradación química y enzimática. Por esta razón, en muchos casos es necesario las matrices de hidrogel. El entrecruzamiento se puede realizar fuera del cuerpo por pre-fundición o moldeado de hidrogeles. Esta aplicación se utiliza principalmente para aplicaciones de ingeniería de tejidos o de administración de fármacos. Alternativamente, entrecruzadas se puede realizar dentro del cuerpo (*la gelificación o entrecruzadas in situ*) donde se inyecta una solución líquida o se aplica al sitio deseado y es entrecruzado para formar un gel.

20 La formación del gel se puede iniciar por una variedad de métodos de entrecruzamiento. Los métodos químicos para la formación de gel incluyen la iniciación de la polimerización ya sea por contacto, como en cianoacrilatos, o estímulos externos, tales como foto-iniciación. También, la formación de gel se puede lograr mediante polímeros pre-formado entrecruzados químicamente usando cualquiera de los agentes de entrecruzamiento de bajo peso molecular tales como glutaraldehído o carbodiimida (Otani Y, Tabata Y, Ikada Y. *Ann Thorac Surg* 1999, 67, 922-6. Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, Hsu JC. *J Biomed Mater Res* 1999, 46, 520-30. Otani, Y.; Tabata, Y.; Ikada, Y. *Biomaterials* 1998, 19, 2167-73. Lim, D. W.; Nettles, D. L.; Setton, L. A.; Chilkoti, A. *Biomacromolecules* 2008, 9, 222-30.), o sustituyentes activados en el polímero (Iwata, H.; Matsuda, S.; Mitsuhashi, K.; Itoh, E.; Ikada, Y. *Biomaterials* 1998, 19, 1869-76).

30 Sin embargo, el entrecruzamiento químico puede ser problemático en aplicaciones de alimentos, cosméticos, o médicas debido a que los agentes de entrecruzamiento son a menudo tóxicos, carcinogénicos, o irritantes. Adicionalmente, son pequeñas moléculas que pueden difundir fácilmente fuera de la matriz entrecruzada y podrían causar daño local o sistémico.

35 Una alternativa al entrecruzamiento químico es el método de entrecruzamiento enzimático. Estos métodos para iniciar la formación de gel se han investigado sobre la base de una variedad de diferentes enzimas de entrecruzamiento. Los ejemplos incluyen entrecruzamiento enzimático de adhesivos, tales como cola de mejillón (Strausberg RL, Link RP. *Trends Biotechnol* 1990, 8, 53-7), or the enzymatic crosslinking of blood coagulation, as in fibrin sealants (Jackson MR. *Am J Surg* 2001, 182, 1S-7S. Spotnitz WD. *Am J Surg* 2001, 182, 8S-14S Buchta C, Hedrich HC, Macher M, Hocker P, Redl H. *Biomaterials* 2005, 26, 6233-41.27-30).

40 Entrecruzadas de una cola de mejillón se inició mediante la conversión enzimática de residuos fenólicos (i.e., dopa) de la proteína adhesiva en los residuos de quinona reactivos que pueden someterse a posteriores reacciones de entrecruzamiento inter-proteína (Burzio LA, Waite JH. *Biochemistry* 2000, 39, 11147-53. McDowell LM, Burzio LA, Waite JH, Schaefer JJ. *Biol Chem* 1999, 274, 20293-5). Las enzimas que se han empleado en esta clase de sellantes son por un lado tirosinasa y lacasa y peroxidasa por otra parte que actúan mediante la formación de quinonas y radicales libres, respectivamente a partir de tirosina y otros compuestos fenólicos. Estos a su vez pueden a las aminos libres en proteínas o a los grupos fenólicos similarmente modificadas en proteínas y polisacáridos.

45 Una segunda operación de entrecruzamiento que ha servido como un modelo tecnológico es las reacciones transglutaminasa catalizada que ocurren durante la coagulación de la sangre (Ehrbar M, Rizzi SC, Hlushchuk R, Djonov V, Zisch AH, Hubbell JA, Weber FE, Lutolf MP. *Biomaterials* 2007, 28, 3856-66). Los métodos biomiméticos para la formación de gel in situ han investigado el uso del factor XIIIa u otras transglutaminasas de tejido (Sperinde J, Griffith L. *Macromolecules* 2000, 33, 5476-5480. Sanborn TJ, Messersmith PB, Barron AE. *Biomaterials* 2002, 23, 2703-10).

50 Una adicional formación in situ del gel entrecruzado de particular interés es entrecruzadas de la gelatina por una transglutaminasa microbiana (mTG) independiente de calcio. La mTG cataliza una reacción de entrecruzamiento análoga como factor XIIIa pero la enzima microbiana no requiere ni trombina ni calcio para la actividad. Los estudios iniciales con mTG fueron dirigidos a las aplicaciones en la industria alimentaria (Babin H, Dickinson E. *Food*

Hydrocolloids 2001, 15, 271-276. Motoki M, Seguro K. Trends in Food Science & Technology 1998, 9, 204-210.), mientras que los estudios posteriores consideran aplicaciones médicas potenciales. Los estudios anteriores in vitro han demostrado que mTG puede entrecruzar la gelatina para formar un gel en minutos, el adhesivo de gelatina-mTG se puede unir con el tejido húmedo o mojado, y la resistencia adhesiva es comparable a, o mejor que, los sellantes a base de fibrina (Chen TH, Payne GF, et al. Biomaterials 2003, 24, 2831-2841. McDermott MK, Payne GF, et al. Biomacromolecules 2004, 5, 1270-1279. Chen T, Payne GF, et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006, 77, 416-22.). El uso de gelatina y mTG como un adhesivo médico se describe en el documento PCT y US2008/213243.

Una de las desventajas del uso de enzimas como los agentes de entrecruzamiento en la formación de matriz entrecruzada es que pueden continuar la reacción de entrecruzamiento después de que se haya formado el estado del gel deseado. Esto a menudo no se desea debido a entrecruzamiento excesivo puede dar lugar a un gel rígido, más frágil, y menos flexible. Además, las propiedades mecánicas de la matriz entrecruzada seguirán para cambiar durante la vida útil del gel, haciendo difícil de lograr las propiedades consistentes. Entrecruzamiento enzimático continuado más allá de los resultados de densidad de entrecruzamiento deseados de la capacidad de la enzima para continuar para catalizar la reacción de entrecruzamiento incluso una vez que se ha formado una matriz entrecruzada o hidrogel. Esto depende de la capacidad de la enzima para continuar a difundirse por toda la matriz incluso como aumenta considerablemente la viscosidad de la solución. Este punto de vista es consistente con Hu et al (Hu BH, Messersmith PB. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125 (47), pp 14298-14299), quien sugirió, basado en el trabajo realizado con las soluciones de polímero sintético péptido injertado, que durante la formación de red incipiente resultante de entrecruzamiento parcial de una solución de polímero, la viscosidad de la solución aumenta rápidamente, mientras que la movilidad de la transglutaminasa disminuye rápidamente.

El problema del excesivo entrecruzamiento enzimático que conduce a una reducción en las propiedades mecánicas se ha documentado previamente en varias ocasiones:

Bauer et al. demostraron que los altos niveles de transglutaminasa microbiana (mTG) causaron excesiva entrecruzamiento de proteínas de gluten de trigo conduciendo a una pérdida de elasticidad y los daños mecánicos de las redes del gluten. (Bauer N, Koehler P, Wieser H, and Schieberle P. Studies on Effects of Microbial Transglutaminase on Gluten Proteins of Wheat II Rheological Properties. Cereal Chem. 80(6):787-790).

Sakai et al. encontraron que una mayor cantidad de entrecruzamientos covalente entre fenoles fue eficaz para la mejora de la estabilidad mecánica, sin embargo, entrecruzamiento adicional entre los fenoles resultó en la formación de un gel de botella. (Sakai S, Kawakami K. Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically crosslinkable alginate, Acta Biomater 3 (2007), pp. 495-501)

En el caso de las enzimas de entrecruzamiento dependientes del cofactor, tales como transglutaminasa dependiente de calcio, eliminando el cofactor, mediante la unión o de otra manera, después de un cierto tiempo de reacción puede limitar el grado de entrecruzamiento. Sin embargo, la eliminación del cofactor no es técnicamente factible con frecuencia en la formación de hidrogel, donde el hidrogel puede atrapar el cofactor. Cuando se utilizan enzimas independientes de cofactor, tales como transglutaminasas disponibles de origen microbiano, grados limitados de entrecruzamiento se pueden obtener por tratamiento térmico del sistema de reacción. Sin embargo, dicho tratamiento induce efectos secundarios negativos sobre la funcionalidad de la proteína y por lo tanto no es deseable aplicar. Además, no todos los sistemas de reacción son apropiados para someterse a tratamiento térmico.

Aparte de lo que resulta en un entrecruzamiento excesivo dentro de la matriz entrecruzada, la difusión continuada de la enzima entrecruzada en la matriz después de que el estado entrecruzado deseado se ha logrado, también puede resultar en una alta velocidad de difusión de la enzima desde el gel, también conocida como elución de enzima. Esto también puede ser problemático, ya que los altos niveles de la enzima de entrecruzamiento liberados en el cuerpo pueden interactuar con los tejidos del cuerpo y causar daño local o sistémico.

Resumen de la invención

Existe una necesidad, y sería útil disponer, de una composición de enzima entrecruzada mejorada, que podría ser utilizada para una amplia variedad de aplicaciones.

Por lo tanto, existe una necesidad de, y sería útil disponer de un mecanismo para detener el entrecruzamiento enzimático de matrices entrecruzadas después de la formación inicial de la matriz sólida en un punto donde se han obtenido las propiedades mecánicas deseadas; y/o para reducir el grado y la velocidad de elución de la enzima a partir de la matriz entrecruzada sólida.

La presente invención, en al menos algunas realizaciones, supera los inconvenientes descritos anteriormente de la técnica anterior, y provee una solución a los problemas técnicos anteriores (entre sus muchas ventajas y sin desear proporcionar una lista cerrada), proporcionando una matriz o hidrogel que se forma por entrecruzamiento enzimático de

polímeros, en donde las moléculas de la enzima de entrecruzamiento se han modificado con el fin de mejorar la densidad de entrecruzamiento, las propiedades mecánicas, u otras propiedades de la matriz, y/o proporcionar control mejorado sobre la velocidad y/o el grado de entrecruzamiento.

5 Un método opcional de alterar las moléculas de enzima es mediante la modificación del volumen percibido de las moléculas de enzima en la matriz entrecruzada que se forma. El volumen percibido modificado se determina preferiblemente de acuerdo con el grado de entrecruzamiento de los polímeros para formar la matriz, de tal manera que el grado de entrecruzamiento disminuido, en comparación con el grado de entrecruzamiento con las moléculas de enzima no modificada, indica el aumento de volumen percibido.

10 Un método de aumento del volumen percibido de las moléculas de enzima es mediante el aumento del tamaño y/o el volumen hidrodinámico de las moléculas por unión covalente o no covalente de al menos una molécula o unidad estructural de las moléculas de enzima. Los inventores han demostrado que el grado de entrecruzamiento enzimático en hidrogeles o matrices entrecruzadas puede ser regulado por la unión covalente de las moléculas a la enzima de tal manera que la modificación de las moléculas de enzima da lugar a un nivel final de entrecruzamiento inferior. De esta manera, se puede prevenir el fenómeno de entrecruzamiento excesivo.

15 Otro método para aumentar el volumen percibido es a través de la modificación de la carga electrostática de las moléculas de enzima de tal manera que su carga neta es de signo opuesto a la carga neta de las cadenas del polímero o co-polímero. Esto se puede lograr cambiando el punto isoeléctrico (pI) de la enzima.

20 En una hipótesis no limitante, el aumento del volumen percibido de las moléculas de enzima reduce la movilidad o la difusión de las moléculas en la matriz o hidrogel entrecruzado. Esto le impide continuar su actividad de entrecruzamiento más allá del punto donde el entrecruzamiento es beneficioso para las propiedades del material deseadas del hidrogel.

25 El "volumen percibido" o "volumen efectivo" tal como se define en el presente documento se refiere al volumen hidrodinámico efectivo de la enzima de entrecruzamiento dentro de la matriz entrecruzada. El volumen percibido se puede aumentar por enlaces covalentes o no covalentes de la enzima con otra molécula, portador, polímero, proteína, polisacárido y otros, antes de la reacción de entrecruzamiento o durante la reacción de entrecruzamiento.

La "difusión" o "movilidad" como se define en el presente documento se refiere al movimiento molecular aleatorio de la enzima de entrecruzamiento u otras proteínas, en solución, hidrógeno, o matriz que resultan del movimiento browniano.

30 El "coeficiente de difusión" como se define en el presente documento se refiere a un término que cuantifica el grado de difusión para un solo tipo de molécula bajo condiciones específicas. Un ejemplo no limitante de un proxy para la medición de la difusión de la enzima es mediante la medición de la elución de la enzima a partir de un hidrogel.

La "movilidad reducida" como se define en el presente documento se refiere a un movimiento molecular más lento o coeficiente de difusión más pequeño de una proteína o enzima en una solución o dentro de un hidrogel.

El "tamaño" tal como se define en el presente documento se refiere al peso molecular o volumen hidrodinámico o volumen percibido de una molécula.

35 El "Peso molecular", abreviado como MW, como se usa en el presente documento se refiere al peso absoluto en Dalton o kilodalton de proteínas o polímeros. Por ejemplo, el MW de una proteína PEGilada (i.e. - proteína a la que se han acoplado una o más moléculas de PEG (polietilenglicol)) es la suma de MW de todos sus constituyentes.

40 El "volumen hidrodinámico" tal como se define en el presente documento se refiere al peso molecular aparente de una proteína o enzima que por lo general se puede medir usando la cromatografía de exclusión de tamaño. El volumen hidrodinámico de un constituyente se refiere al diámetro o el volumen del constituyente asume cuando está en movimiento en una forma líquida.

45 Tal como se define en el presente documento "matriz" se refiere a una composición de los materiales entrecruzados. Generalmente, cuando los materiales que forman la matriz están entrecruzados, la composición que incluye estas transiciones de materiales de un estado líquido a un estado de gel, formando de este modo un "gel", "hidrogel" o una "composición gelificada". El gel puede tener ciertas propiedades viscoelásticas y reológicas que las proporcionan con ciertos grados de durabilidad y capacidad de hinchamiento. Estos materiales son a menudo polímeros. La matriz puede contener materiales que no están entrecruzados, a veces referidos como co-polímeros.

Como se usa en el presente documento "polímero" se refiere a una molécula natural, sintética o semi-sintética, que contiene una unidad repetible.

5 Como se usa en el presente documento "co-polímero" se refiere a un componente de la matriz, que pueden o no participar en la reacción de entrecruzamiento y por lo general no es el principal constituyente de la matriz. Un ejemplo no limitante comprende polisacáridos tales como dextrano y/o un polímero celulósico tal como carboximetil celulosa. El co-polímero preferiblemente no está unido covalentemente a la enzima o al material de matriz, tal como la base de proteínas de la matriz.

Un "portador" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero, una proteína, polisacárido o cualquier otro constituyente que se une a la enzima de entrecruzamiento covalente o no covalentemente, ya sea antes o durante la reacción de entrecruzamiento.

10 La "Enzima de Entrecruzamiento" como se define en el presente documento se refiere a una enzima o combinación de enzimas que pueden ya sea directamente (por ejemplo, por transglutaminación) o indirectamente (por ejemplo a través de la formación de quinona o de radicales libres) grupos de sustrato sobre hebras de polímero en una matriz coherente, tal como un hidrogel.

15 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una matriz entrecruzada, que comprende un polímero de sustrato entrecruzado por una molécula de enzima modificada, dicha molécula de enzima modificada que tiene una modificación que altera un volumen percibido de las moléculas de enzima en la matriz entrecruzada como la matriz está siendo formada a través de entrecruzamiento de dicho polímero.

20 Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada tiene una modificación que aumenta un tamaño real de dicha molécula de enzima modificada. Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada tiene una modificación que aumenta un volumen hidrodinámico de dicha molécula de enzima modificada. Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada tiene una modificación que modifica una carga electrostática de dicha molécula de enzima modificada para ser de signo opuesto a una carga neta de dicho polímero sustrato cambiando el punto isoeléctrico (pI) de dicha enzima modificada en comparación con la enzima no modificada. Opcionalmente dicha modificación es del grupo-ε amino de las lisinas de la enzima a través de un proceso seleccionado del grupo que consiste de succinilación (con anhídrido succínico), acetilación (con anhídrido acético), carbamilación (con cianato), alquilación reductiva (aldehídos) y tratamiento con anhídrido maleico. Opcionalmente dicha modificación es de una o más cadenas laterales que contienen ácidos carboxílicos de la enzima para reducir el número de cargas negativas.

30 Opcionalmente dicha modificación comprende la unión covalente o no covalente de al menos una molécula o unidad estructural de dicha molécula de enzima modificada. Opcionalmente dicha modificación comprende la unión covalente de una molécula modificada con dicha molécula de enzima modificada. Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada tiene una velocidad de difusión reducida y una tasa de entrecruzamiento reducida en comparación con la enzima no modificada, pero tiene al menos similar actividad enzimática medida en comparación con la enzima no modificada.

Opcionalmente la tasa de entrecruzamiento reducida es al menos 10% de la tasa de entrecruzamiento de la enzima no modificada.

35 Opcionalmente dicha molécula modificada comprende un portador o polímero. Opcionalmente dicho polímero comprende un polímero sintético, un polímero celulósico, una proteína o un polisacárido. Opcionalmente dicho polímero celulósico comprende uno o más de carboximetil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, o metilcelulosa. Opcionalmente dicho polisacárido comprende uno o más de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparano, ácido hialurónico o un derivado de almidón.

40 Opcionalmente dicha molécula modificada comprende PEG (polietilenglicol). Opcionalmente dicho PEG comprende un derivado de PEG. Opcionalmente dicho derivado de PEG comprende PEG activado. Opcionalmente dicho PEG activado comprende uno o más de metoxi PEG (mPEG), sus derivados, mPEG-NHS, succinimidilo (NHS) ésteres de mPEG (mPEG-succinato-NHS), mPEG-glutarato-NHS, mPEG-valerato-NHS, mPEG-carbonato-NHS, mPEG-carboximetil-NHS, mPEG-propionato- NHS, mPEG-carboxipentil-NHS), mPEG-nitrofenilcarbonato, mPEG-propilaldehído, mPEG-tosilato, mPEG-carbonilimidazol, mPEG-isocianato, mPEG-epóxido o una combinación de los mismos. Opcionalmente dicho PEG activado reacciona con grupos amino o grupos tiol sobre dicha enzima. Opcionalmente, la relación molar de dicho PEG activado con los residuos de lisina de dicha enzima activada es en un intervalo de 0.5 a 25. Opcionalmente dicho PEG activado es monofuncional, heterobifuncional, homobifuncional, o multifuncional. Opcionalmente dicho PEG activado es PEG ramificado o PEG múltiple-brazo. Opcionalmente dicho PEG activado tiene un tamaño que varía de 1000 dalton a 40,000 dalton.

Opcionalmente, la matriz comprende además un co-polímero que no está unido covalentemente a dicha enzima o a dicho polímero de sustrato. Opcionalmente dicho co-polímero comprende un polisacárido o un polímero celulósico. Opcionalmente dicho polisacárido comprende dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de

queratán, heparina, sulfato de heparano, ácido hialurónico o un derivado de almidón. Opcionalmente dicho polímero celulósico comprende carboximetil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxietil celulosa, metil celulosa.

5 Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada se modifica por medio de entrecruzadas de dicha molécula de enzima modificada con una pluralidad de otras moléculas de enzima para formar un agregado de una pluralidad de moléculas de enzima entrecruzadas.

10 Opcionalmente una modificación o un grado de modificación de dicha molécula de enzima modificada afectan al menos una propiedad de la matriz. Opcionalmente dicha al menos una propiedad se selecciona entre el grupo que consiste en resistencia a la tracción, rigidez, grado de entrecruzamiento de dicho polímero de sustrato, la viscosidad, elasticidad, flexibilidad, tensión para romper, estrés para romper, coeficiente de Poisson, capacidad de hinchamiento y el módulo de Young, o una combinación de los mismos.

15 Opcionalmente un grado de modificación de dicha enzima modificada determina la movilidad de dicha enzima modificada en, o difusión de, la matriz. Opcionalmente dicha modificación de dicha enzima modificada reduce el coeficiente de difusión de dicha enzima modificada en una solución de dicha enzima modificada y dicha proteína o en una matriz de dicha enzima modificada y dicha proteína, en comparación con una solución o matriz de la enzima no modificada y dicha proteína. Opcionalmente un grado de modificación de dicha enzima modificada determina una o más propiedades mecánicas de la matriz. Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada muestra una mayor diferencial de la velocidad de entrecruzamiento en polímero entrecruzado que en solución en comparación con la molécula de enzima no modificada.

20 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para controlar la formación de una matriz, que comprende modificar una molécula de enzima con una modificación que altera un volumen percibido de las moléculas de enzima en la matriz entrecruzada como la matriz que se está formando; mezclar dicha molécula de enzima modificada con al menos un polímero de sustrato que es un sustrato de dicha molécula de enzima modificada; y formar la matriz mediante entrecruzamientos de dicho al menos un polímero de sustrato por dicha molécula de enzima modificada, en donde dicha formación de la matriz es al menos parcialmente controlada por dicha modificación de dicha molécula de enzima. Opcionalmente dicha modificación reduce una velocidad de entrecruzamiento de dicha molécula de enzima modificada como un grado de entrecruzamiento de dicho al menos un polímero de sustrato aumenta. Opcionalmente dicha molécula de enzima modificada y dicho al menos un polímero de sustrato se mezclan en solución, de manera que dicha modificación controla el grado de entrecruzamiento de dicho al menos un polímero de sustrato como una viscosidad de dicha solución aumenta. Opcionalmente dicha modificación comprende la PEGilación de la enzima a un pH en el intervalo de 7 a 9. Opcionalmente el pH de la reacción de PEGilación es 7.5 -8.5.

35 De acuerdo con al menos algunas realizaciones para el método y/o la matriz, dicho al menos un polímero de sustrato comprende un polímero de sustrato seleccionado del grupo que consiste en un polímero entrecruzable de forma natural, un polímero parcialmente desnaturalizado que es entrecruzable por dicha enzima modificada y un polímero modificado que comprende un grupo funcional o un péptido que es entrecruzable por dicha enzima modificada. Opcionalmente dicho al menos un polímero de sustrato comprende gelatina, colágeno, caseína o albúmina, o un polímero modificado, y en donde dicha molécula de enzima modificada comprende una transglutaminasa modificada y/o una enzima oxidativa modificada. Opcionalmente dicho al menos un polímero de sustrato comprende gelatina seleccionada del grupo que consiste en gelatina obtenida por hidrólisis parcial de tejido animal o colágeno obtenido a partir de tejido animal, en donde dicho tejido animal se selecciona entre el grupo que consiste en piel animal, tejido conectivo, astas, cuernos, huesos, escamas de pescado, y una gelatina recombinante producida usando sistemas de bacterias, de levadura, animal, insecto, o de plantas o cualquier tipo de cultivo celular, o cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, dicha gelatina es de origen mamífero o pescado. Opcionalmente, dicha gelatina es de tipo A (tratada con ácido) o de tipo B (tratada con álcali). Opcionalmente dicha gelatina es de 250-300 bloom. Opcionalmente dicha gelatina tiene un peso molecular promedio de 75 a 150 kDa.

45 Opcionalmente dicha transglutaminasa modificada comprende transglutaminasa microbiana modificada. Opcionalmente dicho polímero modificado se modifica para permitir entrecruzamientos por dicha transglutaminasa microbiana modificada. Opcionalmente dicha enzima oxidativa modificada comprende uno o más de tirosinasa, lacasa, o peroxidasa. Opcionalmente dicha matriz comprende además un hidrato de carbono que comprende un ácido fenólico para ser entrecruzado por dicha enzima oxidativa modificada como dicho al menos un polímero de sustrato. Opcionalmente dicho hidrato de carbono comprende uno o más de arabinóxilano o pectina. Opcionalmente dicha molécula de enzima se modificó a través de la PEGilación y en donde dicha PEGilación provee enmascaramiento inmunogénico mediante el enmascaramiento de dicha molécula de enzima a partir de un sistema inmune de un animal huésped que recibe la matriz. Opcionalmente dicho animal huésped es humano.

De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona un método para el sellado de un tejido contra la fuga de un fluido corporal, que comprende aplicar una matriz como se describe en el presente documento para el tejido. Opcionalmente dicho fluido corporal comprende sangre, de manera que dicha matriz es un agente hemostático.

5 De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona un agente hemostático o un sellante quirúrgico, que comprende una matriz como se describe en el presente documento.

De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona una composición para sellar una herida, que comprende una matriz como se describe en el presente documento. De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona un uso de la composición para el sellado con líneas de sutura o de grapas en un tejido.

10 De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona una composición para un vehículo para la administración de fármacos localizada, que comprende una matriz como se describe en el presente documento.

De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona una composición para la ingeniería de tejidos, que comprende una matriz como se describe en el presente documento, adaptada como un andamio inyectable.

15 De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona un método para modificar una composición, que comprende: proporcionar una enzima modificada que tiene un grupo funcional entrecruzable y una proteína que tiene al menos una unidad estructural entrecruzable por dicha enzima modificada; mezclar dicha enzima modificada y dicha proteína, en donde dicha enzima modificada reticula dicha proteína y también se reticula a dicha proteína a través de dicho grupo funcional entrecruzable.

20 Los ejemplos no limitantes de enzimas de entrecruzamiento directos, cuyos grupos de sustrato se entrecruzan directamente sobre hebras de polímero, incluyen transglutaminasas y enzimas oxidativas. Ejemplos de transglutaminasas incluyen transglutaminasa microbiana (mTG), transglutaminasa tisular (tTG), y Factor XIII. Estas enzimas pueden ser de fuentes ya sea naturales o recombinantes. Los aminoácidos glutamina y lisina en las hebras de polímero son sustratos para entrecruzar transglutaminasa.

25 Los ejemplos no limitantes de enzimas oxidativas son tirosinasa, lacasa, y peroxidasa. Estas enzimas se entrecruzan los polímeros mediante la formación de quinona (tirosinasa) o la formación de radicales libres (lacasa, peroxidasa). Las quinonas y los radicales libres a continuación interactúan unos con otros o con otros aminoácidos o ácidos fenólicos para los polímeros. Los sustratos entrecruzables para estas enzimas pueden ser cualquier proteína que contiene tirosina u otros aminoácidos aromáticos. Los sustratos también pueden ser hidratos de carbono que contienen ácidos fenólicos tales como ácido ferúlico. Tales hidratos de carbono pueden ser por ejemplo, arabinosilano o pectina.

30 Los polímeros sintéticos o parcialmente sintéticos con uno o más grupos funcionales apropiados también podrían servir como sustratos entrecruzables para cualquiera de las enzimas anteriores.

En otra realización de la presente invención, se utiliza una combinación de enzimas.

35 Como se define en el presente documento "hebras de polímero" o "cadenas de polímero", se refiere al polímero de sustrato para la enzima de entrecruzamiento, que de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, pertenece preferiblemente a una de las siguientes categorías (solamente como ejemplos no limitativos y sin querer dar una lista cerrada):

1) Cualquier polímero con grupos de sustrato que son naturalmente entrecruzables por la enzima y que es en sí mismo, es entrecruzable naturalmente por la enzima. Por ejemplo, en el caso de las transglutaminasas, esto incluiría proteína o polipéptidos tales como la gelatina, el colágeno, y la caseína, que son entrecruzables naturalmente por la enzima.

40 2) Los polímeros que contienen grupos de sustrato entrecruzables por la enzima, pero que no son entrecruzables naturalmente por la enzima como resultado de su estructura. En tales casos, la estructura del polímero debe ser modificado antes del entrecruzamiento de la enzima. Por ejemplo, en el caso de las transglutaminasas, esto incluiría proteínas, tales como albúmina o lactoglobulina, que son sustratos no naturales para la enzima debido a que tienen una estructura globular que dificulta el acceso de la enzima. Éstos se pueden hacer en sustratos mediante la desnaturalización parcial de la proteína usando agentes reductores, agentes desnaturalizantes o calor.

45 3) Polímeros, naturales o sintéticos, que no son sustratos para entrecruzamientos de la enzima, pero que han sido modificados con péptidos o grupos funcionales que son sustratos de la enzima, suministrando así el polímero modificado entrecruzable por la enzima.

Los ejemplos no limitantes de tales polímeros incluyen cualquier tipo de proteína apropiado, que puede por ejemplo comprender opcionalmente gelatina como se ha indicado anteriormente.

5 La gelatina puede comprender opcionalmente cualquier tipo de gelatina que comprende la proteína que se conoce en la técnica, preferiblemente incluyendo pero no limitando a la gelatina obtenida mediante la hidrólisis parcial de tejidos animales y/o colágeno obtenido a partir de tejido animal, incluyendo pero no limitando a la piel de animal, tejido conectivo (incluyendo pero no limitando a, ligamentos, cartilago y similares), astas o cuernos y similares, y/o huesos, y/o escamas de pescado y/o huesos u otros componentes; y/o una gelatina recombinante producida usando sistemas de bacterias, de levadura, animal, insecto, o de plantas o cualquier tipo de cultivo celular.

10 De acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, la gelatina de origen animal comprende preferiblemente gelatina a partir de orígenes de mamíferos y más preferiblemente comprende una o más de las pieles de cerdo, huesos de cerdo y ganado vacuno, o pieles partidas de ganado, o cualquier otra fuente de cerdo o bovino. Más preferiblemente, tales gelatina comprenden gelatina porcina, ya que tiene una menor tasa de anafilaxis. La gelatina de origen animal puede ser opcionalmente de tipo A (tratada con ácido) o de tipo B (tratada con álcali), aunque es preferiblemente de tipo A.

15 Preferiblemente, la gelatina de origen animal comprende gelatina obtenida durante la primera extracción, que se realiza generalmente a temperaturas más bajas (50-60 °C, aunque este rango de temperatura exacta no es necesariamente una limitación). La gelatina producida de esta manera estará en el rango de 250-300 bloom y tiene un alto peso molecular de al menos aproximadamente el 95-100 kDa. Preferiblemente, se utiliza gelatina 275-300 bloom.

Un ejemplo no limitante de un productor de tales gelatinas es PB Gelatins (Tessenderlo Group, Bélgica).

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la gelatina de origen animal comprende opcionalmente de gelatina de pescado. Opcionalmente cualquier tipo de pescado se puede utilizar, preferiblemente una variedad de peces de agua fría como la carpa, el bacalao o el lucio o el atún. El pH de esta gelatina (medido en una solución al 10%) varía preferiblemente de 4-6.

25 La gelatina de pescado de agua fría forma una solución en agua a 10 °C y por lo tanto toda la gelatina de pescado de agua fría se considera que tiene 0 bloom. Para la presente invención, opcionalmente y preferiblemente se utiliza una gelatina de pescado de agua fría de alto peso molecular, más preferiblemente incluyendo un peso molecular medio de al menos aproximadamente 95 a 115 kDa. Esto es equivalente al peso molecular de una gelatina de animal de 250-300 bloom. La gelatina de pescado de agua fría se somete a gelificación termorreversible a temperaturas mucho más bajas que la gelatina animal como resultado de sus niveles más bajos de prolina e hidroxiprolina. Por 1000 residuos de aminoácidos, la gelatina de pescado de agua fría tiene de 100-130 grupos de prolina y 50-75 de hidroxiprolina en comparación con los 135 a 145 de prolina y 90-100 de hidroxiprolina en las gelatinas de animales (Haug IJ, Draget KI, Smidsrød O. (2004). Food Hydrocolloids. 18:203-213).

Un ejemplo no limitante de un productor de una gelatina tal es Norland Productos (Cranbury, NJ).

35 En algunas realizaciones de la presente invención, se utiliza la gelatina de baja endotoxigenidad, para formar el componente de solución de gelatina de la composición de gelatina-mTG. Dicha gelatina está disponible comercialmente de proveedores tales como Gelita™ (Eberbach, Alemania). La gelatina de baja endotoxigenidad se define como la gelatina con menos de 1000 unidades de endotoxigenidad (EU) por gramo. Más preferiblemente, se utiliza gelatina de endotoxigenidad de menos de 500 EU/gramo.

40 Para aplicaciones de sensibilidad muy alta, tales como con materiales que estarán en contacto ya sea con la columna vertebral o el cerebro, se prefiere una gelatina con endotoxigenidad de menos de 100 EU/gramo, es más preferida una gelatina con menos de 50 EU/g. La gelatina con una endotoxigenidad menor de 10 EU/g es muy costosa, pero también podría ser utilizada como parte de al menos algunas realizaciones de la presente invención en aplicaciones sensibles.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el colágeno de tipo I, tipo II, o cualquier otro tipo de colágeno hidrolizado o no hidrolizado reemplaza la gelatina como la proteína en cuestión que va a ser entrecruzada. Varios tipos de colágeno han demostrado la capacidad de formar geles entrecruzados-mTG térmicamente estables.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se utiliza una gelatina humana recombinante. Dicha gelatina está disponible comercialmente de proveedores tales como Fibrogen™ (San Francisco, CA). La gelatina recombinante tiene preferiblemente al menos aproximadamente 90% de pureza y tiene más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de pureza. Algunas gelatinas recombinantes son no-gelificantes a 10 °C y por lo tanto se considera que tiene 0 bloom. Para algunas realizaciones de la presente invención, se utiliza preferiblemente una gelatina recombinante de alto peso molecular, más preferiblemente incluyendo una de peso molecular de al menos aproximadamente 95-100 kDa.

50 Como se indicó anteriormente, la proteína entrecruzable comprende preferiblemente gelatina pero también puede, adicional o alternativamente, comprender otro tipo de proteína. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente

5 invención, la proteína también es un sustrato para la transglutaminasa, y preferiblemente presenta apropiadas secuencias de polímero y de polipéptidos específicos a la transglutaminasa. Estas proteínas pueden incluir, opcionalmente, pero no se limitan a las secuencias de polímero sintetizado que independientemente tienen las propiedades para formar un bioadhesivo o polímeros que han sido modificados más preferiblemente con sustratos específicos a la transglutaminasa que mejoran la capacidad del material a ser entrecruzado por la transglutaminasa. Los ejemplos no limitantes de cada uno de estos tipos de materiales se describen a continuación.

10 Se han desarrollado secuencias de polipéptidos y polímero sintetizadas con un objetivo de transglutaminasa apropiado para entrecruzamiento, que tienen preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 °C puntos de transición. Las características físicas preferidas incluyen, pero no se limitan a la capacidad de unirse a tejidos y la capacidad de formar fibras. Como gelatinas de tipo gelificantes (descritas anteriormente), estos polipéptidos opcionalmente pueden usarse en composiciones que también cuentan con una o más sustancias que reducen su punto de transición.

Los ejemplos no limitantes de tales péptidos se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,428,014 y 5,939,385, ambas presentadas por ZymoGenetics Inc.

15 Ambas patentes describen polipéptidos entrecruzables transglutaminasa bioadhesivos, biocompatibles, en donde se sabe que la transglutaminasa cataliza una reacción de acil-transferencia entre el grupo γ -carboxamida de residuos de glutaminilo unidos a proteínas y el grupo ϵ -amino de residuos Lys, lo que resulta en la formación de enlaces ϵ - (γ -glutamil) lisina isopeptídicos.

20 De acuerdo con algunas realizaciones, la composición resultante se utiliza como un portador para la administración de fármacos localizada.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición resultante es un andamio inyectable para la ingeniería de tejidos.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición es una composición hemostática. De acuerdo con algunas realizaciones, la composición es una composición de sellado fluido corporal.

25 Las composiciones de la presente invención preferiblemente proporcionan hemostasis rápida, minimizando así la pérdida de sangre después de una lesión o cirugía.

30 Como se utiliza en el presente documento "herida" se refiere a cualquier daño en cualquier tejido de un paciente que resulta en la pérdida de sangre del sistema circulatorio o la pérdida de cualquier otro fluido corporal a partir de su vía fisiológica, tal como cualquier tipo de vaso. El tejido puede ser un tejido interno, tal como un órgano o vaso sanguíneo, o un tejido externo, tal como la piel. La pérdida de sangre o fluido corporal puede ser interno, tal como de una ruptura de un órgano, o externo, tal como de una laceración. Una herida puede estar en un tejido blando, tal como un órgano o en el tejido duro, tal como hueso. El daño puede haber sido causado por cualquier agente o fuente, incluyendo lesión traumática, infección o intervención quirúrgica. El daño puede ser potencialmente mortal o que no hace peligrar la vida.

35 El cierre de la herida quirúrgica se logra actualmente por suturas y grapas que facilitan la curación tirando los tejidos juntos. Sin embargo, muy a menudo no logran producir el sellado apropiado necesario para evitar fugas de fluido. Por lo tanto, existe una gran necesidad médica, no satisfecha de dispositivos y métodos para prevenir fugas después de la cirugía, incluyendo las fugas que se producen con frecuencia junto a las líneas de grapas y suturas. Tales dispositivos y métodos se necesitan como un adjunto a las suturas o grapas para lograr la hemostasia u otro estasis del fluido en las reconstrucciones vasculares periféricas, reconstrucciones de dura, torácica, cardiovascular, pulmonar, neurológica, y cirugías gastrointestinales. La mayoría de los dispositivos hemostáticos de alta presión actualmente en el mercado son nominalmente, en todo caso adhesivos. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención, de acuerdo con al menos algunas realizaciones, superan estos inconvenientes y, opcionalmente, se pueden usar para la hemostasia.

40 Tal como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa más o menos aproximadamente el diez por ciento del valor indicado.

45 Otras características y ventajas de las diversas realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

50 La invención se describe en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica, esta vez a los dibujos en detalle, se insiste en que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de solamente la presente invención, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios

y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos se hace evidente para los expertos en la técnica cómo las varias formas de la invención pueden ser reivindicadas en la práctica.

- 5 En los dibujos:
- Figura 1: Efecto del pH de reacción y concentración de PEG activado en el tamaño y la distribución de los productos de PEGilación;
- Figura 2: Efecto del tiempo de reacción y pH en el tamaño y distribución de los productos de PEGilación;
- Figura 3: Análisis SDS de mTG PEGilada utilizando diferentes concentraciones de PEG-NHS (2 kD);
- 10 Figura 4: Elución de mTG y mTG PEGilada a partir del mismo gel de gelatina entrecruzada;
- Figura 5: Elución de mTG (izquierda) y mTG PEGilada (derecha) de diferentes geles de gelatina entrecruzada;
- Figura 6: Explosión de los valores de presión para sellante de gelatina hecho con mTG no-PEGilada y 2 tipos de mTG PEGilada;
- Figura 7: análisis SDS-PAGE de productos de conjugación entre mTG y dextrano;
- 15 Figura 8: Análisis de SDS-PAGE de los productos de PEGilación de peroxidasa de rábano picante (HRP);
- Figura 9: Análisis SDS-PAGE de los productos de PEGilación de mTG, utilizando diversas condiciones de reacción, el gel demuestra diversos grados de PEGilación;
- Figura 10: Análisis SDS-PAGE de los productos de PEGilación de mTG, donde el PEG reactivo es un PEG-NHS bifuncional 10 kD;
- 20 La figura 11 muestra el espectro masa para carga de un lote típico de mTG PEGilada, adquirido por espectrómetro de masas MALDI-TOF; y
- La figura 12 muestra el análisis SDS-PAGE de los productos de PEGilación de mTG donde, la relación PEG reactivo para amina se mantiene constante, pero la concentración del reactivo se cambia.

Descripción detallada de la invención

- 25 Los títulos de las secciones que siguen se proporcionan solo para facilitar la descripción. Se debe entender que no se pretende que sean limitativos de ninguna manera. También, a menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en el arte al que esta invención pertenece. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales apropiados se describen a continuación. En caso de conflicto, la descripción de la patente, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.
- 30

Aumento del volumen percibido del agente entrecruzante enzimático en hidrogel

- 35 Se encontró que, además de la viscosidad de la solución de polímero que contiene la enzima y la densidad de entrecruzamiento de la solución parcialmente entrecruzada (disponibilidad de grupos reactivos), la tasa catalítica de una enzima de entrecruzamiento dentro de una matriz entrecruzada también puede ser controlada mediante el control del volumen percibido de la molécula de enzima.

- 40 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, dicho control opcional y preferiblemente puede conducir a la reducción de la tasa catalítica de entrecruzamiento ya que la matriz se acerca a un estado mecánico deseado, aumentando el volumen percibido de la molécula de la enzima antes de la iniciación de la reacción de entrecruzamiento o durante la reacción en sí. De esta manera, la matriz de solidificación atrapa la enzima de mayor tamaño en el estado de densidad de entrecruzamiento deseada y se evita un entrecruzamiento adicional. El volumen de enzima percibido es una función del peso molecular de la enzima y el volumen hidrodinámico, entre otros factores.

- 45 El grado de entrecruzamiento final dentro de una matriz entrecruzada puede ser limitado por la ingeniería de las moléculas de enzimas, el material de la matriz, el entorno de entrecruzamiento, o alguna combinación de estos factores

5 para aumentar el volumen percibido de las moléculas de enzima dentro de la matriz entrecruzada como se forma la matriz. Sin desear estar limitado por una sola hipótesis, es posible que el aumento del volumen percibido de la enzima, da lugar a la reducción de la movilidad de la enzima en la matriz entrecruzada. La reducción de la movilidad de la enzima para controlar la densidad de entrecruzamiento final es más efectiva cuando las moléculas de enzima mantienen la movilidad en las etapas de reacción de entrecruzamiento tempranas cuando la viscosidad de la solución es aún baja, pero pierde la movilidad cuando el entrecruzamiento progresa al aumentar la viscosidad de la solución, y perder la movilidad más severamente después de que se ha formado la matriz o hidrogel sólido inicial. Naturalmente, los niveles precisos de la movilidad de la enzima dentro de la matriz deben ser regulados para lograr el perfil y el grado de entrecruzamiento deseables para una aplicación particular.

10 Sin desear estar limitado por una sola hipótesis, una enzima con un aumento del tamaño o aumento del volumen hidrodinámico tiene un coeficiente de difusión o movilidad inferior en la matriz entrecruzada que la enzima no modificada, dando como resultado un acceso más limitado a sustratos entrecruzables.

Moléculas de enzima con mayor tamaño y/o volumen hidrodinámico

15 Un método preferido para la reducción de la movilidad de las moléculas de enzima en una matriz entrecruzada está aumentando el tamaño efectivo de las moléculas de enzima. Esto se puede lograr mediante el aumento del peso molecular de la molécula (MW) de la enzima, volumen hidrodinámico, o ambos MW y volumen hidrodinámico. Este es un método preferido porque no debería afectar a la composición estructural de la matriz entrecruzada.

20 Para hacer operantes las realizaciones descritas en el presente documento de la presente invención, el tamaño de molécula de enzima se incrementa preferiblemente de una manera que no elimina la actividad enzimática o su capacidad para el polímero de sustrato deseado en una matriz o hidrogel sólido. La enzima también retiene preferiblemente la actividad suficiente para formar la matriz dentro de una cantidad de tiempo apropiada. Adicionalmente, la molécula de enzima de mayor tamaño también retiene preferiblemente suficiente movilidad dentro de la matriz entrecruzada para catalizar el grado deseado de entrecruzamiento antes de cesar la movilidad dentro de la matriz.

25 Se han identificado un número de métodos para aumentar el tamaño de molécula de enzima en matrices o hidrogeles entrecruzados:

1. Entrecruzar la enzima por sí misma (entrecruzamiento intermolecular) con el fin de formar conjugados de unidades múltiples solubles. Un ejemplo de esto se describe en el ejemplo 18, a continuación.

2. Unión covalente (inmovilización) de la enzima sobre un portador:

30 I. Inmovilización a una proteína soluble, por ejemplo la albúmina; (Allen TM et al, 1985, JPET 234: 250-254, alpha-Glucosidase-albumin conjugates: effect of chronic administration in mice)

35 II. Inmovilización en un polímero soluble. Preferiblemente, el portador de polímero es más grande que la enzima, en donde una o más moléculas de enzima se inmovilizan en cada molécula del polímero. También es posible que una sola molécula de enzima sea unida a más de una molécula de polímero a través de dos o más sitios de unión. El portador puede ser natural, sintético o semi-sintético. Muchas de estas aplicaciones se desarrollaron con el fin de aumentar la estabilidad *in vivo* de las enzimas o para reducir la inmunogenicidad. Uno de dicha familia de polímeros es éteres de celulosa, que incluye pero no se limitan a carboximetil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxietil celulosa, metil celulosa y otros. Tal inmovilización previamente se ha logrado con enzimas tales como la tripsina (Villaonga et al, 2000, Journal of Molecular Catalysis B: 10, 483-490 Enzymatic Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose) y la lisozima (Chen SH et al, 2003, Enzyme and Microbial Technology 33, 643-649, Reversible immobilization of lysozyme via coupling to reversibly soluble polymer), aunque dicha inmovilización de enzima nunca antes se ha utilizado previamente para afectar a las propiedades mecánicas de los hidrogeles o matrices de enzima entrecruzadas.

45 III. La unión a un glicosaminoglicano (GAG), incluyendo pero no limitando al sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparano, y ácido hialurónico. Como el anterior, dicha unión se ha logrado (Luchter-Wasylewska E et al., 1991, Biotechnology and applied biochemistry 13: 36-47, Stabilization of human prostatic acid phosphatase by coupling with chondroitin sulfate), aunque nunca utilizado para afectar a las propiedades mecánicas de hidrogeles o matrices de enzima entrecruzadas.

50 IV. Las enzimas también pueden ser acoplados a polisacáridos, tales como derivados de dextrano y de almidón tales como almidón de hidroxietilo. Un ejemplo de esto se puede ver en el ejemplo 13, donde una enzima fue acoplado a dextrano oxidado.

3. La adición de una o más unidades estructurales a una sola molécula de la enzima a través de modificación(es) covalente(s). A menudo, pero no siempre, la dicha unidad estructural es más pequeña que la enzima. Un ejemplo de dicha modificación es la PEGilación de la enzima de entrecruzamiento, como se describe ampliamente a continuación en múltiples ejemplos.

5 4. Otros tipos de unión covalente. Por ejemplo, mediante el injerto de moléculas de biotina en la superficie de la enzima (biotinilación) y la inmovilización de la enzima biotinilada en las moléculas o polímeros que contienen avidina o estreptavidina. El portador puede ser un polímero soluble no entrecruzable cuya función es capturar la enzima de entrecruzamiento antes o durante la reacción de entrecruzamiento. Alternativamente, los grupos de captura, por ejemplo, avidina o estreptavidina se pueden injertar en el propio polímero entrecruzable, lo que resulta en la inmovilización gradual de la enzima de entrecruzamiento durante la reacción de entrecruzamiento sobre el polímero entrecruzable.

10 5. Unión no covalente de la enzima a un portador o polímero. Por ejemplo, las interacciones electrostáticas entre la enzima y el portador o polímero pueden proporcionar un enlace estable pero no covalente cuando la carga neta de la enzima tiene un signo opuesto a la carga neta del portador.

15 Tecnologías relacionadas con el aumento del tamaño de las moléculas enzimáticas

Aunque el aumento del tamaño de las enzimas se ha revelado con anterioridad en varias ocasiones, nunca ha sido considerado en el contexto de la formación y/o control de la formación de las matrices o hidrogeles de enzima entrecruzados. Aplicación de enzimas de tamaño-aumentado en matrices entrecruzadas es completamente nueva, como la reactividad de entrecruzamiento de enzimas de mayor tamaño en tales matrices previamente no se ha caracterizado en cualquier grado. Adicionalmente, los inventores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que la actividad enzimática aislada de enzima de mayor tamaño, como se probó en un ensayo de actividad enzimática colorimétrica, es claramente diferente de la actividad de entrecruzamiento de enzima de mayor tamaño en la formación de hidrogel, como se indica por la tasa de gelificación. Por ejemplo, el ejemplo 5 describe una comparación de la tasa de gelificación catalizada con los valores de actividad de enzima medidos utilizando un ensayo colorimétrico. La PEGilación se describe en este ejemplo como un método no limitativo, ilustrativo para aumentar el tamaño de la enzima.

La PEGilación es la unión covalente de moléculas de polietilenglicol (PEG) a las moléculas de enzima y es un método preferido para aumentar el tamaño de molécula de enzima. El funcionamiento de la adición de dichas una o más moléculas de PEG es conocido como PEGilación.

30 El PEG es un material deseable para su uso en el aumento de tamaño de la enzima, ya que es bio-inerte y también ha demostrado la capacidad de limitar la respuesta inmunogénica a las moléculas implantadas o inyectadas PEGiladas. Aunque no se sabe si la PEGilación de las enzimas como se describe en el presente documento también causa tal enmascaramiento inmunogénico (respuesta inmunogénica limitada), sin desear estar limitado por una sola hipótesis, es posible que, de hecho, la PEGilación de la enzima no limita la respuesta inmunogénica a la enzima y también, posiblemente, por extensión, a la matriz entrecruzada.

35 Un método de llevar a cabo la PEGilación de la enzima es mediante la reacción de la enzima con metoxil PEG activado (mPEG) que reacciona con grupos amina sobre la enzima (amina PEGilación). Ejemplos no limitantes de mPEG activado incluyen succinimidil (NHS) ésteres de mPEG (mPEG-succinato-NHS, mPEG-glutarato-NHS, mPEG-valerato-NHS, mPEG-carbonato-NHS, mPEG-carboximetil-NHS, mPEG-propionato-NHS, mPEG-carboxipentil-NHS), mPEG-nitrofenilcarbonato, mPEG-propionaldehído, mPEG-tosilato, mPEG-carbonilimidazol, mPEG-isocianato, mPEGepóxido.

Los mPEG activados pueden ser aquellos que reaccionan con grupos tiol sobre las enzimas (PEGilación tiol).

Los PEG activados pueden ser monofuncionales, heterobifuncionales u homobifuncionales.

Los PEG activados pueden ser PEG ramificados o PEG multi-brazo.

El tamaño del PEG activado puede variar de 1000 dalton a 40,000 dalton

45 La relación molar del PEG activado con los grupos de lisina de la enzima es de 0.1: 1 a 100: 1 y preferiblemente 0.5: 1 a 10: 1

Preferiblemente, el pH de la reacción de PEGilación es 7-9. Más preferiblemente, el pH de la reacción es 7.5 -8.5.

De acuerdo con una realización preferida, la enzima PEGilada puede ser adicionalmente purificada a partir de la enzima que no ha reaccionado o con el fin de reducir el rango de tamaño de los productos de PEGilación. La purificación se

puede realizar usando cromatografía de exclusión por tamaño. Alternativamente, o además, la purificación se puede hacer usando cromatografía iónica, tales como SP-sepharose, Q-sepharose, SM-Sepharose o DEAE-Sepharose. Alternativamente, o además, la purificación de la enzima que no ha reaccionado también se puede hacer usando la diálisis, ultrafiltración o fraccionamiento con sulfato de amonio.

- 5 Varios ejemplos proporcionados a continuación describen el uso de PEGilación de transglutaminasas para el control de la formación del hidrogel entrecruzado. El ejemplo 1, describe la reacción de PEGilación de mTG con PEG-NHS (5 kD). El tamaño y la distribución de los productos de PEGilación dependen de la relación de PEG con mTG, así como el pH de la reacción.
- 10 El ejemplo 2 describe la reacción de PEGilación de la mTG con PEG-NHS (5 kD). El tamaño y la distribución de los productos de PEGilación dependen de la duración y el pH de la reacción.
- El ejemplo 3 describe la reacción de PEGilación de la mTG con PEG-NHS (2 kD). El tamaño y la distribución de los productos de PEGilación dependen de la relación de PEG con mTG.
- 15 El ejemplo 4 describe un ensayo de TNBS para la determinación del grado de PEGilación de diversas preparaciones de mTG PEGilado (PEG 5 kD). Los resultados sugieren que el grado de PEGilación depende de la relación PEG activado:mTG en la reacción.
- El ejemplo 5 describe ensayos para la determinación de la actividad de mTG PEGilada. Los resultados sugieren que mTG PEGilada conserva la mayor parte de su actividad hacia pequeños sustratos, tales como hidroxilamina y CBZ-Gln-Gly pero pierde una parte significativa de su actividad hacia sustratos más grandes, tales como gelatina.
- 20 Los ejemplos 6 y 7 describen el análisis de SDS-PAGE de perfil de elución de mTG y mTG PEGilada a partir de geles de gelatina entrecruzada. Los resultados sugieren que la mTG PEGilada eluye del gel más lentamente y en menor medida que la mTG no-PEGilada, posiblemente debido a su mayor tamaño o el volumen hidrodinámico.
- El ejemplo 8 describe la medición de la actividad de mTG que se ha eluido de geles de gelatina entrecruzada. Los resultados sugieren que mTG no-PEGilada, que se eluye a partir de geles de gelatina entrecruzada conserva la mayor parte de su actividad (86% de la actividad calculada máxima).
- 25 El ejemplo 9 describe el ensayo mecánico de geles de gelatina entrecruzada con mTG pegilada o no pegilada. Los resultados demuestran que los geles de gelatina entrecruzada con mTG PEGilada son más fuertes y considerablemente más flexibles que los geles entrecruzados con mTG no-PEGilada.
- El ejemplo 10 describe la prueba de presión de rotura de varias formulaciones de sellantes de gelatina. Los resultados sugieren que los sellantes de gelatina hechos con mTG PEGilada demuestran resultados de presiones de rotura que son comparables a los de los sellantes hechos con mTG no-PEGilada.
- 30 El ejemplo 11 describe el uso del sellante para refuerzo de la línea de grapas para el modelo en porcino *in vivo*.
- El ejemplo 12 describe el efecto de la unión no-covalente de enzima de entrecruzamiento para portador insoluble.
- El ejemplo 13 describe el efecto de la modificación de la enzima con dextrano oxidado.
- 35 El ejemplo 14 demuestra que la modificación de peroxidasa de rábano picante (otra enzima de entrecruzamiento) por PEGilación puede modificar matrices formadas por entrecruzamiento por peroxidasa.
- El ejemplo 15 demuestra el efecto de la PEGilación parcial de la enzima entrecruzamiento.
- El ejemplo 16 demuestra que el PEG libre (molécula de PEG colocada en solución con la enzima de entrecruzamiento, pero unido no covalentemente a la enzima) no tiene efecto sobre la gelificación.
- 40 El ejemplo 17 ilustra el efecto de diversas mezclas de enzima modificada mezclados con la enzima no modificada en la gelificación.
- El ejemplo 18 ilustra el efecto de puentes PEG-enzima bi-funcionales sobre la gelificación.
- El ejemplo 19 se refiere al análisis de espectrometría de masa de mTG PEGilada (transglutaminasa microbiana).
- El ejemplo 20 describe la PEGilación de mTG en una relación de PEG fijo con amina con diversas concentraciones de reactivos, lo que demuestra el gran efecto de la concentración total del reactivo sobre el grado de PEGilación.

Sorprendentemente, se encontró en estos ejemplos que mientras la PEGilación redujo la velocidad a la que la gelatina entrecruzada de la transglutaminasa microbiana (mTG), no disminuyó su actividad en el ensayo de hidroxamato, que es un ensayo de actividad de norma de oro para transglutaminasas. Estos resultados contradicen los antecedentes de enseñanzas de la técnica que indicaban que la enzima de mayor tamaño podría ser indeseable para su uso en la formación de hidrogel, ya que podría tener significativamente menor eficacia en la causa de la formación de hidrogel.

Se debería indicar que las TGasas (transglutaminasas) a veces se mencionan en el contexto de la PEGilación en la técnica anterior; sin embargo, estas referencias enseñan el uso de TGasas como una herramienta para facilitar o mejorar sitio de PEGilación específico de otras proteínas (en lugar de como un sustrato para la PEGilación) catalizando la reacción de transglutaminación de residuos glutamilo en las dichas proteínas con un grupo amina primaria unido a las dichas moléculas de PEG. Sin embargo, dicha técnica anterior no enseña ni sugiere la PEGilación de las TGasas por sí mismas con el fin de alterar o controlar su actividad de entrecruzamiento o para alterar o controlar las propiedades mecánicas de las matrices de hidrogel entrecruzadas por estas enzimas.

La movilidad reducida de la enzima de entrecruzamiento por el acoplamiento en la matriz entrecruzada

En otra realización de la reducción de la movilidad de enzima en una matriz entrecruzada, la enzima se somete a una reacción de unión a la propia matriz entrecruzada simultánea para catalizar la reacción de entrecruzamiento. A medida que la enzima se mueve a través de la solución de polímero para entrecruzarse los polímeros en una matriz, se une gradualmente a los mismos polímeros y por lo tanto inmovilizado en la matriz. Por ejemplo, la enzima biotinilada se puede mezclar con un componente de polímero entrecruzable que contiene polímero recubierto de avidina o estreptavidina. La Patente de los Estados Unidos 6046024 (Method of producing a fibrin monomer using a biotinylated enzyme and immobilized avidin) describe un método de captura de trombina biotinilado de la solución de fibrinógeno mediante la adición de avidina-agarosa modificada. Aunque en este caso, la agarosa no era soluble, es posible unir avidina o estreptavidina al polímero soluble en agua así como se describe por la Patente de los Estados Unidos 5026785 (Avidin and streptavidin modified water-soluble polymers such as polyacrylamide, and the use thereof in the construction of soluble multivalent macromolecular conjugates). La biotinilación de la transglutaminasa y la posterior adsorción a las superficies tratadas con avidina se ha demostrado que es factible (Huang XL et al, J. Agric. Food Chem., 1995, 43 (4), pp 895-901). Alternativamente, la enzima de entrecruzamiento puede estar unida covalentemente a avidina o estreptavidina y el conjugado adicionado a la reacción de entrecruzamiento que contiene un polímero biotinilado. El biotinilado puede ser el mismo polímero entrecruzable, por ejemplo, gelatina, o un co-polímero no entrecruzable tal como dextrano. Los conjugados de dextrano-biotina de pesos moleculares de hasta 500,000 dalton están disponibles de fuentes comerciales.

Movilidad Reducida de entrecruzamiento de la enzima por electrostáticas Interacciones en matriz entrecruzada

En otra realización de la presente invención, la movilidad de la enzima se reduce a través de la unión reversible basada en las interacciones electrostáticas entre la enzima y un portador de polímero en el cual la carga neta de la enzima tiene un signo opuesto a la carga neta del portador. La enzima se puede pre-incubar con el portador y se adiciona a la reacción de entrecruzamiento o puede estar unida al portador durante la reacción de entrecruzamiento. Por ejemplo, si la enzima de entrecruzamiento está cargada positivamente a pH neutro se puede unir electrostáticamente a un portador de carga negativa, por ejemplo, carboximetil celulosa (CMC). La enzima se puede incubar con CMC para permitir la unión y luego el complejo adicionado a la reacción de entrecruzamiento, o la enzima y CMC se adicionan por separado. En este último caso la enzima se unirá a la CMC gradualmente durante la reacción de entrecruzamiento. También es posible unir la enzima a las mismas hebras del polímero entrecruzable, durante la reacción de entrecruzamiento, a condición de que el polímero entrecruzable lleve una carga de signo opuesto en relación con la enzima de entrecruzamiento. Alternativamente, el punto isoeléctrico (pI) de la enzima de entrecruzamiento puede ser desplazado de tal manera que la enzima adquiere una carga de signo opuesto que el del polímero o portador entrecruzable.

En otra realización, la enzima de entrecruzamiento se modifica de tal manera que su punto isoeléctrico (pI) se cambia para dar como resultado una carga neta diferente de la enzima a un pH dado. Ejemplos de formas para reducir el pI de la enzima son para modificar el grupo-ε amino de lisinas por procesos tales como, pero sin limitarse a succinilación (con anhídrido succínico), acetilación (con anhídrido acético), carbamilación (con cianato), alquilación reductiva (aldehídos) y tratamiento con anhídrido maleico. Esto da lugar a una disminución de la carga neta positiva en la proteína hasta en una unidad de carga por aminoácido modificado (excepto para succinilación que disminuye la carga positiva neta por hasta dos unidades de carga) y la disminución en el pI. A la inversa, las cadenas laterales que contienen ácidos carboxílicos tales como ácido glutámico y aspártico se puede modificar con el fin de disminuir el número de cargas negativas en la proteína y, como resultado aumentan el pI. Por ejemplo, es posible tratar la enzima con EDC 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) y etilendiamina (EDA). EDC activa los grupos de ácido carboxílico y un enlace amida se forma entre ellos y EDA. El resultado es un aumento en la carga neta positiva de la proteína y en el pI.

La liberación de proteínas a partir de hidrogeles se ha relacionado con las fuerzas de atracción y repulsión electrostática entre las cadenas de polímero de hidrogel y la proteína atrapado. Se ha sugerido que las fuerzas de repulsión

5 electrostática aumentan el coeficiente de difusión de la proteína atrapada y a la inversa, las fuerzas de atracción electrostáticas disminuyen el coeficiente de difusión en experimentos de liberación de proteína a partir de matriz de gelatina recombinante (Marc Sutter Juergen Siepmann, Wim E. Hennink and Wim Jiskoot, Recombinant gelatin hydrogels for the sustained release of proteins, Journal of Controlled Release Volume 119, Issue 3, 22 June 2007, Pages 301-312)

10 El cambio del pl de la misma cadena de polímero de hidrogel se ha sugerido como una manera de controlar la liberación de proteínas a partir de ese hidrogel. Sin embargo, los antecedentes de la técnica implican la manipulación de las interacciones electrostáticas entre las proteínas atrapadas dentro de un hidrogel y las cadenas de hidrogel se refieren a métodos para controlar la velocidad de liberación de las proteínas terapéuticas a partir del hidrogel, donde las proteínas no son en sí mismas involucradas en la formación del hidrogel. Para al menos algunas realizaciones de la presente invención, las interacciones electrostáticas se modifican para mejorar las propiedades mecánicas del hidrogel, que pueden estar relacionadas con la movilidad y el coeficiente de difusión de la enzima en la matriz de hidrogel que la enzima es entrecruzada.

15 El cambio del pl de la enzima de entrecruzamiento atrapada es por lo tanto, un método novedoso para evitar el exceso de entrecruzamiento debido a la difusión o la movilidad de la enzima de entrecruzamiento en la matriz entrecruzable está severamente restringida por la modificación del pl de la enzima atrapada en lugar de la del hidrogel polimérico.

Ejemplo 1: Efecto del pH de reacción, y relación de PEG:mTG en el tamaño y distribución de los productos de PEGilación

Materiales:

20 PEG Activado: mPEG-glutarato-NHS 5 kDa (SunBright ME-050GS, NOF corporation, Japan)

mTG: Ajinomoto activa 10% purificada adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico SP-Sepharose. Actividad: 604 unidades/mL en citrato de sodio 0.2 M pH 6. Citrato de sodio Hepes, SDS y beta mercaptoetanol fueron de Sigma Aldrich. 30% de acrilamida/Bis 29: 1 y Tinte Bio-Safe Coomassie G-250 fueron de Bio-Rad El marcador de peso molecular fue Precision Plus Dual Color (Bio-Rad)

25 1 unidad de actividad de mTG cataliza la formación de 1.0 mmol de hidroxamato por minuto a partir de N-CBZ-Gln-Gly e hidroxilamina a pH 6,0 a 37 °C. Un conjunto de reacciones se determinó, cada uno con un volumen de 0.2 mL. Todas las reacciones contenían 15 u/mL de mTG, la solución reguladora de reacción apropiada ya sea citrato de sodio 90 mM, pH 6 o Hepes 100 mM pH 7, y diversas cantidades de PEG activado. El PEG-NHS reacciona con aminas primarias en proteínas, la epsilon-amina en las cadenas laterales de los residuos de lisina, así como el extremo amino de las proteínas. Las relaciones del PEG con residuos de lisina en la mezcla de reacción se describen en detalle a continuación,

Las reacciones se incubaron a 37 °C, durante 1:36 hr y después se adicionó glicina a una concentración final de 110 mM, con el fin de neutralizar el exceso de moléculas de PEG activadas que no han reaccionado con la enzima.

35 Las muestras de cada reacción se desnaturalizaron por calentamiento a 90°C en presencia de SDS y beta mercaptoetanol y se analizaron mediante SDS-PAGE (8% del gel de resolución, 4% del gel de apilamiento, sistema de electroforesis Mini-Protean, BioRad). Para visualizar las proteínas del gel se tiñó con tinte Bio-Safe Coomassie G-250, seguido de decoloración con agua. El gel fue escaneado con el escáner CanoScan 8800F y la imagen se muestra en la Figura 1, que muestra el efecto del pH de la reacción y la concentración de PEG activado en el tamaño y la distribución de los productos de PEGilación. La asignación de los carriles fue de la siguiente manera:

40 Carril 1: mTG (control)

Carril 2: Marcador de tamaño molecular (de arriba a abajo: 250 kD, 150 kD, 100 kD, 75 kD, 50 kD, 37 kDa, 25 kD)

Carril 3: 53.3 mg/mL de PEG activado; citrato de Na 90 mM pH 6; relación PEG con lisina 9.15

Carril 4: 26.6 mg/mL de PEG activado; citrato de Na 90 mM pH 6; relación PEG con lisina 4.59

Carril 5: 13.3 mg/mL de PEG activado; citrato de Na 90 mM pH 6; relación PEG con lisina 2.30

45 Carril 6: 53.3 mg/mL de PEG activado; Hepes 100 mM pH 7; relación PEG con lisina 9.15

Carril 7: 26.6 mg/mL de PEG activado; Hepes 100 mM pH 7; relación PEG con lisina 4.59

Carril 8: 13.3 mg/mL de PEG activado; Hepes 100 mM pH 7; relación PEG con lisina 2.30

Como se puede ver en la Figura 1, grandes cantidades de PEG y un aumento de pH resultaron en una enzima que tiene un aumento del peso molecular aparente en el gel.

Ejemplo 2: Efecto del pH y la duración de la reacción en el tamaño y distribución de los productos de PEGilación

5 Todas las reacciones contenían 15 u/mL de mTG.

Materiales:

PEG Activado: mPEG-glutarato-NHS 5 kDa (SunBright ME-050GS, NOF corporation, Japan)

mTG: Ajinomoto activa 10% purificada adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico SP-Sepharose. Actividad: 604 unidades/mL en citrato de sodio 0.2 M pH 6

10 citrato de sodio, Hepes, SDS y beta mercaptoetanol fueron de Sigma Aldrich.

30% de acrilamida/BIS 29: 1 y tinte Bio-Safe Coomassie G-250 fueron de Bio-Rad.

Marcador de peso molecular fue de Precision Plus Dual Color (Bio-Rad)

1 unidad de actividad mTG catalizará la formación de 1.0 mmol de hidroxamato por minuto a partir de N-CBZ-Gln-Gly e hidroxilamina a pH 6.0 a 37 °C.

15 Un conjunto de reacciones se determinó, cada uno con un volumen de 0.2 mL, Todas las reacciones contenían 15 u/mL de mTG, solución reguladora de reacción apropiada ya sea Hepes 100 mM, pH 7 o Hepes 100 mM, pH 8 y 25 mg/mL de PEG-NHS. La relación de PEG con residuos de lisina en la mezcla de reacción fue de 4.59.

20 Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2 hr. Se tomaron muestras a diversos momentos como se describe a continuación y se adicionó glicina a una concentración final de 110 mM con el fin de neutralizar el exceso de moléculas de PEG activadas que no han reaccionado con la enzima.

25 Las muestras de cada reacción se desnaturalizaron por calentamiento a 90 °C en presencia de SDS y beta mercaptoetanol y se analizaron mediante SDS-PAGE (8% del gel de resolución, 4% del gel de apilamiento, sistema de electroforesis Mini-Protean, BioRad). Para visualizar las proteínas, el gel se tiñó con tinte Bio-Safe Coomassie G-250, seguido de decoloración con agua. El gel fue escaneado con el escáner CanoScan 8800F y la imagen se muestra en la Figura 2, lo que demuestra el efecto del tiempo de reacción y pH en el tamaño y distribución de los productos de PEGilación. La asignación de los carriles es de la siguiente manera:

Carril 1: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 8; 15 min de tiempo de reacción

Carril 2: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 8; 30 min de tiempo de reacción

Carril 3: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 8; 60 min de tiempo de reacción

30 Carril 4: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 8; 120 min de tiempo de reacción

Carril 5: Marcador del tamaño molecular (de arriba a abajo: 250kD, 150 kD, 100kD, 75 kD, 50kD, 37kD, 25kD)

Carril 6: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 7; 15 min de tiempo de reacción

Carril 7: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 7; 30 min de tiempo de reacción

Carril 8: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 7; 60 min de tiempo de reacción

35 Carril 9: 25 mg/mL de PEG activado; Hepes 100mM, pH 7; 120 min de tiempo de reacción

Como se muestra en la Figura 2, el aumento del tiempo de reacción y el aumento de pH dio lugar a una enzima que tiene un aumento aparente de peso molecular en el gel.

Ejemplo 3: PEGilación de mTG con PEG-NHS (2 kD): efecto de relación de PEG:mTG en el tamaño y la distribución de productos de PEGilación

Materiales:

PEG Activado: mPEG-glutarato-NHS 2 kDa (SunBright ME-050GS, NOF corporation, Japan)

mTG: Ajinomoto activa 10% purificada adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico SP-Sepharose. Actividad: 604 unidades/mL en citrato de sodio 0.2 M pH 6. citrato de sodio, Hepes, SDS y beta mercaptoetanol fueron de Sigma Aldrich. 30% de acrilamida/BIS 29: 1 y tinte Bio-Safe Coomassie G-250 fueron de Bio-Rad.

Marcador de peso molecular fue Precision Plus Dual Color (Bio-Rad).

1 unidad de actividad de mTG catalizará la formación de 1.0 mmol de hidroxamato por minuto a partir de N-CBZ-Gln-Gly e hidroxilamina a pH 6.0 a 37 °C. Las reacciones (200 µL) contenían 15 u/mL de mTG, Hepes 100 mM, pH 8 y diversas concentraciones de PEG NHS (2 kD). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 2 horas, seguido de adición de 10 mL de glicina 1.5 M (concentración final 71 mM) con el fin de neutralizar las moléculas de PEG-NHS que no han reaccionado con la enzima. Las muestras de cada reacción se desnaturalizaron por calentamiento a 90 °C en presencia de SDS y beta mercaptoetanol y se analizaron mediante SDS-PAGE (8% del gel de resolución, 4% del gel de apilamiento, sistema de electroforesis Mini-Protean, BioRad). Para visualizar las proteínas del gel se tiñeron con tinte Bio-Safe Coomassie G-250, seguido de decoloración con agua. El gel fue escaneado con el escáner CanoScan 8800F y la imagen se muestra en la Figura 3, demostrando el análisis SDS de mTG PEGilada utilizando varias concentraciones de PEG-NHS (2 kD). La asignación de los carriles fue de la siguiente manera:

Carril 1: Marcador del tamaño molecular

Carril 2: 1.75 mg/mL de PEG-NHS 2kD; relación PEG con lisina 0.74

Carril 3: 3.5 mg/mL; PEG-NHS 2kD; relación PEG con lisina 1.48

Carril 4: 7 mg/mL; PEG-NHS 2kD; relación PEG con lisina 2.97

Carril 5: 14 mg/mL;; PEG-NHS 2kD; relación PEG con lisina 5.93

Carril 6: 28 mg/mL; PEG-NHS 2kD; relación PEG con lisina 11.86

Carril 7: 56 mg/mL; PEG-NHS 2kD; relación PEG con lisina 23.72

Como se muestra en la Figura 3, el aumento de cantidades de PEG-NHS dio lugar a una enzima que tiene un aumento de peso molecular aparente en el gel.

Ejemplo 4: ensayo de TNBS para determinar el grado de PEGilación

Materiales:

La glicina y 5% de solución de TNBS (ácido picrilsulfónico) fueron de Sigma Aldrich, Bicarbonato de sodio era de Frutarom (Israel)

Solución de TNBS diluida se preparó mezclando 5% de TNBS, 1 en 500 en solución reguladora de bicarbonato (pH 8.5)

El espectrofotómetro fue Anthelie Advanced (Secomam)

Para la curva de calibración, las siguientes soluciones de glicina se prepararon en solución reguladora de bicarbonato (pH 8.5): 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL

0.5 mL de solución de TNBS diluida se mezcló con 1 mL de solución de glicina estándar o muestra. La mezcla se incubó a 37 °C, durante 2 horas. A continuación, se adicionaron 0.5 mL de de solución de SDS al 10% y 0.25 mL de HCl 1 M para detener la reacción. Las soluciones se transfirieron a una cubeta y el O.D. se leyó a 335nm utilizando un espectrofotómetro.

El porcentaje de grupos NH₂ libre se determinó para cada mTG PEGilada basado en la curva de calibración establecida para la glicina.

% de PEGilación = 100 - % de NH₂ libre

El MW promedio calculado de mTG PEGilada: 38,000+ (% PEGilación: 100 X 18X 5000).

Los resultados se muestran en la Tabla 1, a continuación.

PEG-NHS (5 kD) conc. en reacción mg/mL	Relación PEG con lisina	% de grupos NH ₂ libre	% PEGilación	Media calculada de MW de mTG PEGilada
3.5	0.59	38.8	61.2	93.08 kD
7	1.19	28.9	71.1	101.99 kD
14	2.37	20.8	79.2	109.28kD
28	4.75	13.9	86.1	115.49 kD
56	9.49	10.9	89.1	118.19 KD

Tabla 1

5 La tabla anterior muestra que el aumento de PEGilación da lugar al aumento del peso molecular aparente (calculado) de mTG; Además, el grado de PEGilación correlacionado con la reducción en el porcentaje de grupos de lisina libre, lo que indica que la PEGilación estaba ocurriendo como se esperaba en los grupos de lisina.

Ejemplo 5: ensayos para medir la actividad de la mTG PEGilada

Materiales:

10 La urea, citrato de Na, acetato de Na y cloruro de calcio fueron de Sigma Aldrich. Gelatina (piel de cerdo Tipo A 275 Bloom) era de Gelita

La reacción de PEGilación (8 mL) contenía 15 u/mL de mTG, HEPES 100 mM (pH 7) y 14 mg/mL de PEG-NHS (5 kD). Las condiciones de reacción fueron similares a los del carril 8 en la Fig. 1.

15 La reacción se incubó a 37 °C durante 1:50 horas, seguido por la adición de 0.4 mL de glicina 2.34 M (concentración final 100 mM) con el fin de neutralizar el PEG activado que no ha reaccionado. Después de 15 minutos a temperatura ambiente la mezcla de reacción se concentró a 2 mL usando Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit MWCO 30,000 (Millipore) y la solución reguladora de reacción cambió a 0.2 M de citrato de sodio. La mTG PEGilada concentrada se conoce como 4X, mientras que diluciones de 2 veces y 4 veces de la misma en solución reguladora de citrato se conocen como 2X y 1X, respectivamente.

Ensayo de actividad utilizando gelatina como sustrato

20 0.5 mL de mTG se mezcló con 1 mL de la formulación de gelatina (25% de gelatina, urea 3.8M, 0.15M de CaCl₂, acetato de Na 0.1 M pH 6), se incubaron a 37 °C y el tiempo de gelificación se registró. Por definición, el tiempo de gelificación es el tiempo en el cual las paradas de líquido que fluyen cuando el tubo de reacción en invertida.

Ensayo de actividad utilizando el ensayo de hidroxamato

Reacción A 15 µl 1X mTG no-PEGilada (15u/mL) + 135 µl de solución reguladora de citrato

Reacción B 15 µl 1X mTG PEGilada + 135 µl de solución reguladora de citrato

Reacción C 15 µl 2X mTG PEGilada + 135 µl de solución reguladora de citrato

Reacción D 15 µl 4X mTG PEGilada + 135 µl de solución reguladora de citrato

25 1 mL de cóctel de reacción se adicionó a cada uno de la reacción A-D y la mezcla se incubó a 37 °C, durante 10 minutos o 20 minutos. En cada momento, se adicionaron 0.23 mL de la reacción a un tubo con 0.5 mL de TCA y 0.5 mL.

Cóctel de sustrato de reacción hidroxamato (20 mL, pH 6):

240 mg de CBZ-Glu-Gly (Sigma Aldrich)

139 mg de clorhidrato de hidroxilamina (Sigma Aldrich)

61.5 mg de glutatión reducido (Sigma Aldrich) 4 mL de solución reguladora de citrato Na 0.2 M pH 6

Agua hasta 20 mL

Los resultados se muestran a continuación, en la Tabla 2.

Muestra probada	Actividad de enzima de pre-pegilación	Tiempo de gelificación con SLR	OD 525 en ensayo de hidroxamato	
			10 minutos	20 minutos
1X mTG No-PEGilada	15 u/mL	4 min	0.376	0.776
1X mTG PEGilada	15 u/mL	9 min	0.358	0.722
2X mTG PEGilada	30 u/mL	4.5 -5 min	0.667	1.34
4X mTG PEGilada	60 u/mL	2.75 min	1.263	2.152

5 Tabla 2

La Tabla 2 anterior muestra que la PEGilación de la transglutaminasa provocó un aumento en el tiempo de gelificación en 1X PEGilación, pero tuvo poco efecto sobre la actividad de la enzima en el ensayo de hidroxamato (que se produce en solución libre, sin que se forme un hidrogel). El aumento de cantidades de PEGilación en realidad aumenta el tiempo de gelificación, presumiblemente mediante la reducción de la movilidad de la enzima necesaria para la colisión con moléculas de sustrato dentro de la red de polímero entrecruzado de conformación. Las explicaciones alternativas son que la PEGilación está confiriendo una alteración estructural en el sitio activo de la enzima tal que no puede acomodar el sustrato tan eficientemente como enzima no PEGilada o que las una o más moléculas de PEG insertadas en las proximidades del sitio activo de la enzima causa impedimento estérico para una molécula de sustrato que se aproxima. Es posible que el menor tamaño de sustrato o la falta de formación de la red de polímero entrecruzado durante la reacción en el ensayo de hidroxamato sean la razón de la falta de reducción de la actividad de la enzima PEGilada en este ensayo. Todas estas explicaciones se proporcionan sin desear estar limitado por una sola hipótesis.

Estos resultados apoyan los efectos dispares de PEGilación en la formación de un hidrogel que en la actividad de la enzima en solución. Sin desear estar limitado por una sola hipótesis, se cree que estos diferentes efectos se producen como resultado del aumento de tamaño aparente y/o volumen percibido (que no sea causado por el aumento de tamaño) de la enzima, que a su vez proporcionan efectos beneficiosos para controlar la formación de un hidrogel. En cualquier caso, de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, el efecto diferencial de la PEGilación permite que el entrecruzamiento sea controlado durante la formación de un hidrogel.

Ejemplo 6: Perfil de elución de mTG PEGilada y no-PEGilada a partir de geles de gelatina

Materiales:

25 Gelatina (piel de cerdo Tipo A, 275 bloom) fue de Gelita

30% de acrilamida/BIS 29: 1 y tinte Bio-Safe Coomassie G-250 fueron de Bio-Rad

Marcador de peso molecular fue Precision Plus Dual Color (Bio-Rad)

Un gel de gelatina entrecruzado se hizo mezclando 0.67 mL de una mezcla de enzimas que comprende de mezcla 1: 1 de mTG PEGilada (Las condiciones de reacción fueron similares a las del carril 6 en la Fig. 1) y 20 u/mL de mTG con 1.33 mL de solución de gelatina (25% de gelatina, urea 3.8M, CaCl₂ 0.15 M, acetato de Na 0.1 M pH 6). El gel resultante se envolvió en papel film y se incubó a 37 °C, durante 2 horas. A continuación, el gel se colocó en un tubo que contiene 10 mL de solución salina y se incubó durante 4 horas a 37 °C, en una incubadora con agitador. Se tomaron muestras cada hora. Las muestras se concentraron usando Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit MWCO 30,000 (Millipore), desnaturalizado por calentamiento a 90 °C en presencia de SDS y beta mercaptoetanol y se analizaron mediante SDS-PAGE (8% del gel de resolución, 4% del gel de apilamiento, sistema de electroforesis Mini-Protean, BioRad). Para visualizar las proteínas el gel se tiñó con tinte Bio-Safe Coomassie G-250, seguido de decoloración con agua. Con el fin de cuantificar las intensidades de las bandas en SDS-PAGE, el gel fue escaneado con el escáner CanoScan 8800F y la

imagen resultante, mostrada en la Figura 4, se analizó utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). Las asignaciones de carril son de la siguiente manera:

- Carril 1: 10 μ L de la muestra tomada en t = 1 hora
- Carril 2: 20 μ L de la muestra tomada en t = 1 hora
- 5 Carril 3: 10 μ L de la muestra tomada en t = 4 horas
- Carril 4: 20 μ L de la muestra tomada en t = 4 horas
- Carril 5: marcador de tamaño molecular
- Carril 6: 7 μ L de mezcla de mTG + mTG PEGilada
- Carril 7: 3 μ L de mezcla de mTG + mTG PEGilada
- 10 Carril 8: 1.5 μ L de mezcla de mTG + mTG PEGilada

La figura 4 muestra la elución de mTG y mTG PEGilada desde el mismo gel de gelatina entrecruzada. La Tabla 3 muestra las cantidades relativas de transglutaminasa eluidas del gel.

	% de mTG de total *
1 hr de elución	21.6
4hr de elución	37.3
Mezcla de enzimas	14.9

Tabla 3:

* (= Total de mTG + mTG PEGilada)

- 15 Ejemplo 7: Elución de los diferentes tipos de mTG PEGilada de geles de gelatina entrecruzada:
 PEGilación a gran escala de mTG con diferentes concentraciones de PEG-NHS 2 kD o 5kD
 PEG activado:
 Reactivos:
 mPEG-glutaril-NHS, MW 5000 (SunBright ME-050GS, NOF corporation, Japan)
- 20 mPEG-succinil-NHS, MW 2000 (SunBright ME-050GS, NOF corporation, Japan)
 mTG: Ajnimoto activa 10% purificada adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico SP-sepharose.
 30% de acrilamida/BIS 29: 1 y tinte Bio-Safe Coomassie G-250 fueron de Bio-Rad SDS y beta mercaptoetanol fue de Sigma Aldrich
- 25 La reacción de PEGilación (32 mL) contenía 15 u/mL de mTG, HEPES 100 mM (pH 8) y diversas concentraciones de PEG-NHS (2 kD o 5 kD). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2.5 horas, seguido por adición de 2.2 mL de glicina 1.5 M (concentración final 97mM) con el fin de neutralizar el PEG activado que no ha reaccionado. Después de 15 minutos de incubación adicional a temperatura ambiente la mezcla de reacción se concentró a 8 mL utilizando Vivaspin 20 (Sartorius), mientras que al mismo tiempo la solución reguladora de reacción se cambió a citrato de Na 0.2 M pH 6.
- 30 1 volumen de diferentes mTG PEGiladas (descritas anteriormente) se mezclaron con 2 volúmenes de formulación de gelatina (25% de gelatina, urea 3.8M, CaCl₂ 0.15 M, acetato de Na 0.1 M pH 6). Las mezclas se vertieron en moldes con forma de hueso de perro recubierto de teflón. Después de que se produjo la gelificación, los geles fueron sacados de los moldes, se pesaron, se colocaron en un tubo de ensayo cerrado para prevenir el secado y se incubaron a 37 °C, durante 3 horas. A continuación, se adicionaron 5 mL exactamente de citrato de Na pH 6 por cada gramo de gel, y el

tubo de ensayo se incubó a 37 °C un agitador de aire a 100 rpm. Se tomaron muestras de 0.5 mL después de 1 hora, 2 horas, 3 horas y después de una incubación adicional de 18 horas a 30 °C.

5 Las muestras de cada momento se desnaturalizaron por calentamiento a 90 °C en presencia de SDS y beta mercaptoetanol y se analizaron mediante SDS-PAGE (8% del gel de resolución, 4% del gel de apilamiento, sistema de electroforesis Mini-Protean, BioRad). Para visualizar las proteínas del gel se tiñeron con tinte Bio-Safe Coomassie G-250, seguido de decoloración con agua. Con el fin de cuantificar las intensidades de las bandas en SDS-PAGE, el gel fue escaneado con el escáner CanoScan 8800F y la imagen resultante, mostrada en la Figura 5, se analizó utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

10 La cantidad teórica máxima de enzima que habría sido puesto en libertad fue cargada en el SDS-PAGE, así y fue tomada como la liberación del 100%. Las muestras de elución reales se corrieron lado a lado y las intensidades de las bandas se calcularon en relación a la liberación del 100%. Con el fin de cuantificar las intensidades de las bandas en SDS-PAGE, el gel fue escaneado con el escáner CanoScan 8800F y la imagen resultante se analizó usando el software Quantity One (Bio-Rad).

15 La Figura 5 muestra la elución de mTG (izquierda) y mTG PEGilada (derecha) de diferentes geles de gelatina entrecruzada. Las asignaciones de carril se dan a continuación.

Carril 1: mTG, referencia de liberación 100%

Carril 2: mTG liberada del gel de gelatina entrecruzada, momento 1 hora

Carril 3: mTG liberada del gel de gelatina entrecruzada, momento 2 horas

Carril 4: mTG liberada del gel de gelatina entrecruzada, momento de 3 horas

20 Carril 5: mTG liberada del gel de gelatina entrecruzada, momento 18 horas

Carril 6: mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG-NHS, 5kD) - 100% de referencia de liberación

Carril 7: mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG-NHS, 5kD) liberada del gel de gelatina, momento 1 hora

Carril 8: mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG-NHS, 5kD) liberado del gel de gelatina, momento 2 horas

Carril 9: mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG-NHS, 5kD) liberado del gel de gelatina, momento 3 horas

25 Carril 10: mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG-NHS, 5kD) liberada del gel de gelatina, momento 18 horas

Cantidades de liberación totales se muestran en la Tabla 4 a continuación.	% Elución del gel después de 18 horas
mTG no-PEGilada	26.7
mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG 5kD)	12.7
mTG PEGilada (14 mg/mL de PEG 5kD)	16.1
mTG PEGilada (7 mg/mL de PEG 2kD)	31.5
mTG PEGilada (14 mg/mL de PEG 2kD)	30.9

Tabla 4:% de elución a partir de geles de gelatina de diferentes tipos de mTG PEGilada

Ejemplo 8: Actividad de mTG eluida de geles entrecruzados

30 9 mL de mTG no-PEGilada que se eluyó a partir de geles de gelatina, durante 18 horas (véase el ejemplo 7) se concentró a 0.47 mL utilizando Vivaspin 20 (MWCO 30,000; Sartorius). La actividad de la enzima concentrada se determinó usando el ensayo de hidroxamato como se describe en el ejemplo 5.

Se encontró que la actividad medida fue 3.65 u/mL.

La actividad calculada (basada en la actividad inicial en el gel de 5 u/mL y % de liberación a 18 hr de acuerdo con SDS-PAGE en la Fig. 5 y su cuantificación en la Tabla 4 de 26.7%) es 4.24 u/mL.

Ejemplo 9: ensayos mecánicos de geles de gelatina entrecruzada con mTG pegilada o no pegilada.

Urea, citrato de Na, acetato de Na y cloruro de calcio fueron de Sigma Aldrich.

Gelatina (piel de cerdo tipo A 275 bloom) fue de Gelita.

5 mTG fue de Ajinomoto activa 10% purificada adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico SP-sepharose. Actividad: 604 unidades/mL de citrato de sodio 0.2 M, pH 6.

mTG PEGilada (ya sea de PEG-NHS 2 kD o 5 kD) con diversos grados de PEGilación se preparó como se describe en Ejemplo 7.

10 1 parte de la solución mTG PEGilada se mezcló con 2 partes de solución de gelatina (25% de gelatina, urea 3.8M, CaCl₂ 0.15M, acetato de Na 0.1 M pH 6). La mezcla se vierte en un molde con forma de hueso de perro recubierto de teflón. Después se produjo la gelificación, los geles fueron sacados de los moldes, se sumergieron en solución salina y se incubaron a 37 °C, durante 4 horas. Las dimensiones del gel de forma de hueso de perro se midieron a continuación, utilizando un calibrador digital. Las muestras de control se hicieron usando 1 parte de 15U/mL de mTG no-PEGilada y 2 partes de solución de gelatina. Para ambos tipos de muestras, se siguió el siguiente protocolo de prueba:

15 La muestra se sujeta en un sistema de ensayo de tracción (Instron modelo 3343) de tal manera que la muestra de gel entre las abrazaderas fue de aproximadamente 12 (ancho) x 1.9 (grosor) x 20 (longitud) mm. Las dimensiones precisas de cada muestra se midieron inmediatamente antes de la ensayo de tracción y se utilizaron estos valores medidos para calcular las propiedades del material de las muestras. Después de sujeción y la medición, la tensión se aplicó a cada muestra a una velocidad de 0.25 mm/s hasta que se logró una pre-carga de 0.025 N. Esto fue considerado como el punto de deformación 0%. Después de la precarga, la deformación por tracción se aplica continuamente a la muestra a 20 una velocidad de 0.5 mm/s hasta que la muestra fracasa por fractura.

La deformación máxima y la tensión se produjeron en el punto de fractura de tal manera que la última deformación por tracción y la tensión máxima a la tracción se registraron en el punto de fractura como la deformación a la rotura (%) y el estrés a la rotura (kPa). El módulo elástico se calculó a partir de la región lineal entre 10% y 30% de deformación para cada muestra.

25 Cada tipo del gel de gelatina entrecruzada fue probado con 5 repeticiones y las desviaciones media y estándar se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

	Tiempo de gelificación (min)	Módulo de Young (kPa)	Tensión de tracción en la rotura (kPa)	Alargamiento a la rotura (%)
Control (15u/mL)	4.5	92.4±7.4	42.5±2.9	47.8±4.9
7-2	4.5	72±2.9	52±13.6	81.9±24.7
14-2	6.5	46 ± 4.6	36.6±6.5	88.9 ± 19.8
7-5	3.5	90.4±2.8	76.9±11.6	98.9±16.3
14-5	4.25	64.2±5.6	77.7±25.5	159.9±52.6
28-5	5.5	47.6±2.8	79.3±16.5	221.7±59.6

30 La Tabla 5 muestra el ensayo mecánico de varios tipos de mTG PEGilada. La columna más a la izquierda se refiere a las condiciones de PEGilación, dadas como A-B; el valor de A como 7 se refiere a 7 mg/mL de PEG, el valor de A como 14 se refiere a 14 mg/mL de PEG, y el valor de A como 28 se refiere a 28 mg/mL de PEG; el valor de B como 2 se refiere a PEG 2 kD, mientras que el valor de B como 5 se refiere a PEG 5 kD. Como se muestra, el aumento de cantidades de PEG resultado en el aumento del tiempo de gelificación y la reducción de módulo de Young; Sin embargo, el aumento de tamaño de PEG resulta en el aumento de resistencia a la tracción y una mayor flexibilidad del gel resultante. 35

Ejemplo 10: Rendimiento del sellante en los tejidos vivos utilizando la prueba de presión de rotura.

Tejidos del intestino delgado porcino se limpiaron de material residual y se cortan en trozos de 10 cm. En cada pieza se realizó una punción con aguja de calibre 14. A continuación, los tejidos fueron remojados en una solución salina y se incubaron a 37 °C. Antes de aplicar el material sellante, que se preparó como se describe en el Ejemplo 7, el tejido se aplana y el sitio de aplicación de cada tejido se transfirió usando una almohadilla de gasa. Aproximadamente 0.1-0.2 mL del sellante de prueba se aplicó en cada lugar de aplicación utilizando una jeringa de 1 mL. Dentro de 5 minutos de la aplicación, el tejido se lavó con solución salina y se incubó a 37 °C, durante 4 horas. Cada grupo de ensayo fue examinado por triplicado o más.

Para la prueba de presión de rotura, los tejidos se colocaron en la caja de Perspex, un lado cerrado herméticamente (usando una abrazadera) y el otro conectado al medidor de presión y bomba de mano (usando un sistema de retención de plástico). La caja de Perspex se llenó con solución salina de manera que la muestra de tejido está totalmente sumergida. Se bombeó aire, utilizando la bomba de mano a una velocidad constante (20 mL/min). La presión de rotura se determinó por la aparición de burbujas.

Los resultados se muestran en la Figura 6, indicando los valores de presión de rotura para sellante de gelatina hecho con mTG no-PEGilada y 2 tipos de mTG PEGilada. Como se muestra, la mediana de los resultados indica un aumento en la fuerza de presión de rotura para ambos tipos de mTG PEGilada, aunque un efecto algo mayor se muestra para la enzima más moderadamente pegilada.

Ejemplo 11: Uso del sellante para refuerzo de la línea de grapas para el modelo en porcino *in vivo*

Se utilizó una grapadora quirúrgica circular Covidien EEE para realizar una anastomosis circular en el recto de un cerdo.

El sellante quirúrgico compuesto por solución de gelatina y TG PEGilada se preparó como en el ejemplo 7, con PEG-NHS 5 kDa 28 mg/mL en un volumen de reacción de 72 mL. La mezcla de reacción se concentró usando Viva-Spin 20 MWCO 30,000 (Sartorius) a 3 mL, de tal manera que la actividad de la enzima PEGilada concentrada fue equivalente a 40 u/mL de enzima no PEGilada. Se aplicaron 4 mL del sellante (compuesto por 2.66 mL de solución de gelatina y 1.33 de solución de enzima PEGilada), uniformemente alrededor de la circunferencia de la línea de grapas-rectal y se dejan curar durante 4 minutos. A continuación el animal fue cerrado.

14 días después de la cirugía, el cerdo fue sacrificado. La zona anastomótica de sellado se examinó para patología macroscópica y el sellante se palpó para evaluar cualitativamente sus propiedades mecánicas.

Resultado:

El sellante no se sometió a una degradación significativa durante el transcurso del período de implantación 14 días. Permaneció fuertemente adherido a la línea de grapas, manteniendo la integridad de 100% sobre la longitud de la línea de grapas. El material sellante fue maleable y flexible, coincide con la forma y el movimiento de la forma de la línea de grapa circular.

No se observaron ni inflamación ni adherencias abdominales en la zona del sellante o línea de grapas. La anastomosis se recuperó por completo, sin signos de fugas. No se observó estenosis en el recto.

Ejemplo 12 - Unión no covalente de la enzima de entrecruzamiento al portador insoluble

Se unió SP-sepharose a mTG (transglutaminasa microbiana) y se hizo un gel. La gelificación tuvo lugar en 16-23 minutos con transglutaminasa inmovilizada, mientras que la enzima soluble causó que la gelificación se produjera en menos de 6 minutos. Por lo tanto Inmovilización aumentó el tiempo requerido para la gelificación.

500 µL de perlas de SP-sepharose lavadas (GE Healthcare) se mezclaron con 2.7 mL 13.5 mg/mL de mTG purificada con 11.55 mL de NaAc 50 mM pH 5.5 (total 15 mL).

La mezcla se incubó en un agitador a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, las perlas se lavaron 3 veces con 11.5 mL de NaAc 50 mM pH 5.5, 3 minutos cada lavado. 70% de la proteína se unió a las perlas después de la etapa de lavado. Las perlas se resuspendieron en 9.5 mL de NaAc 50 mM, pH 5.5 a un volumen final de 10 mL. Las perlas cargadas con mTG se mezclaron con NaAc 50 mM, pH 5.5 en diversas composiciones en un volumen final de 600 µL de la siguiente manera (entre paréntesis la cantidad de mTG unida y la actividad de mTG teórico calculada sobre la base de la actividad medida de 1 mg de mTG no unida - 33 unidades de hidroxamato):

A: 292 µL de perlas+ 308 NaAc (1.244 mg/mL= 41 u/mL)

B: 400 µL de perlas + 200 µL de NaAc (1.704 mg/mL= 56.2 u/mL)

C: 500 µl de perlas+ 100 µL de NaAc (2.13 mg/mL= 70.3 u/mL)

D: 550 µL de perlas + 50 µL de NaAC (2.34 mg/mL= 77.2 u/mL)

5 Se mezclaron 500 µL de cada reacción de A-D con 1 mL de solución de gelatina al 25% en solución reguladora de acetato de sodio con urea 4.5 M,) con una jeringa a la jeringa de mezcla. Tiempo de gelificación se determinó como el tiempo en el cual la gelatina dejó de fluir por inspección visual.

Tiempo de gelificación:

R: aproximadamente 23 min

B: aproximadamente 21 min

C: aproximadamente 20 min

10 D: aproximadamente 16 min

Control (mTG no unida 10 u/mL): 5.5 min

15 Los tiempos de gelificación con mTG unida fueron significativamente más lentos en comparación con la enzima libre. Esto sugiere que la unión de la enzima a un andamio más grande o portador insoluble disminuye la movilidad de la enzima en una matriz de hidrogel con el resultado de que la gelificación, un signo de aumento de la rigidez mecánica, se alcanza en un momento más tarde a través de entrecruzamiento mediante enzima unida en comparación con la enzima libre (no unida). Por lo tanto, la unión de la enzima resultó en propiedades mecánicas modificadas de la matriz de hidrogel.

Ejemplo 13 – Modificación de enzima con dextrano oxidado

20 Este experimento demuestra que la modificación de la enzima mediante la unión de una molécula grande soluble puede dar lugar a la modificación de las propiedades mecánicas.

Métodos

1 gramo de dextrano se disolvió en 20 mL de agua purificada. Se adicionaron 1.3 gramos de peryodato de sodio y la reacción se agitó a temperatura ambiente, protegida de la luz con papel de aluminio durante 80 minutos (9: 50-11: 10).

Se adicionaron 2 gramos de glicerol para inactivar el peryodato sin reaccionar.

25 La reacción se dializó 3 veces contra 1L PuW durante 2:00 horas, con el cambio de agua en el medio.

La Tabla 6: Conjugación de mTG con dextrano oxidado:

	Relación mTG: dextrano	mTG	Dextrano oxidado	Fosfato 1M, pH 6.0	Agua destilada	250 mg/mL de NaBH ₄ CN en PuW
A	1:4	0.75ml (10mg)	0.8ml (36.4mg)	0.4	1.05	0.1ml (25mg)
B	1:1	0.75ml (10mg)	0.2ml (9.1mg)	0.4	1.65	0.1ml (25mg)
C	4:1	0.75ml (10mg)	0.05ml (2.3mg)	0.4	1.8	0.1ml (25mg)
D	10:1	0.75ml (10mg)	0.02ml (0.91mg)	0.4	1.83	0.1ml (25mg)

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante la noche y luego se purificaron mediante diafiltración usando Vivaspin 20 (Sartorius).

30 Resultados

La Figura 7 muestra el análisis SDS-PAGE de las reacciones de conjugación A-D. Las siguientes cantidades de mTG conjugado-dextrano se cargaron en un gel al 15.4% Mini-Protean TGX (Bio-Rad): 4.35 µg (Reacción A), 4.38 µg

(Reacción B), 1,98 µg (Reacción C) y 3 µg (Reacción D). Las muestras contenían 0.1% de SDS, pero sin agente reductor y se calentaron a 85 °C, durante 10 minutos antes de la carga. El gel se trabajó a un voltaje constante (200 V) y las bandas de proteína se visualizaron por tinción con solución de Coomassie Bio-Safe G-250 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular fue Precision Plus (Bio-Rad). El ejemplo muestra que es posible inmovilizar una enzima de entrecruzamiento, en este caso mTG (transglutaminasa microbiana), en un polímero soluble. Por otra parte, en relaciones mayores de dextrano:mTG, más moléculas de mTG libre se convierten en conjugados de alto MW con dextrano.

Ejemplo 14 - PEGilación de peroxidasa de rábano picante

Este experimento demuestra que la modificación de peroxidasa de rábano (otra enzima de entrecruzamiento) por PEGilación puede modificar matrices formadas por entrecruzamiento peroxidasa. En otra realización de la presente invención, la enzima de entrecruzamiento es peroxidasa de rábano picante (HRP) y HRP es modificada por la unión de moléculas de PEG a las moléculas de HRP con el fin de modificar las propiedades mecánicas del hidrogel de gelatina formada por HRP entrecruzamiento.

Métodos

Preparación de la gelatina modificada con fenol (gelatina-Ph): Se disolvieron dos gramos de gelatina de alto peso molecular Tipo A en 100 mL de solución reguladora 50 mM de ácido (2- (N-morfolino) etanosulfónico; Sigma Aldrich) MES, pH 6. A esta solución al 2% peso/peso, se le adicionaron los siguientes reactivos: 0.984 gramos de tiramina (Sigma Aldrich). 0.218 gramos de NHS (N-hidroxisuccinimida; Sigma Aldrich), 0.72 gramos de EDC (1-etil-3- [3-dimetilaminopropil] carbodiimida; Sigma Aldrich). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, y después se dializó extensamente frente a agua destilada. El dializado se secó por congelación y la espuma seca resultante se disolvió en solución reguladora fosfato 0.1 M, pH 6.0 a un volumen final de 16 mL o gelatina al 12.5% peso/peso de.

PEGilación de HRP: 2 mg/mL de HRP Tipo I (Sigma, St Louis, MO) se hicieron reaccionar con 60 mg/mL de PEG-NHS 5 kD en Hepes 100 mM pH 8.0, durante 2 horas, seguido por la adición de glicina 110 mM para inactivar PEG-NHS sin reaccionar y 30 minutos más de incubación. La HRP PEGilada se purificó por diálisis extensiva frente a solución reguladora fosfato 25 mM, pH 6.0.

Gelificación dependiente de HRP y HRP pegilada de gelatina-Ph: Componente de gelatina: 5 mL de gelatina-Ph + 0.5 mL de H₂O₂ 20 mM se mezclan en un vial de vidrio: 4.4 mL se transfirieron a la jeringa A. Componente HRP/HRP pegilada: 1 mL 0.035mg/mL de HRP o HRP PEGilada en la Jeringa B. Los componentes de gelatina y de enzima se mezclan mediante jeringa a transferencia de jeringa y después se incubó a 37 °C mientras que está invertida para determinar el tiempo de gelificación.

Después de 20 minutos, se pesaron los geles, se cubrieron con 10 mL de solución salina y se incubó a 37 °C, durante 16 horas, después de lo cual los geles se pesaron de nuevo para determinar la proporción de hinchamiento.

Resultados

Después de mezclar, la mezcla de gelatina y la enzima formó un gel dentro de los 3 minutos. El análisis SDS-PAGE para las proteínas HRP y HRP PEGilada se puede ver en la Figura 8. Las HRP y HRP PEGilada (20 µg de cada una) se cargaron en gel al 4-15% de Mini-Protean TGX (Bio-Rad). Las muestras contenían 0.1% de SDS, pero sin agente reductor y se calentaron a 85 °C, durante 10 minutos antes de cargarlo. El gel se trabajó a un voltaje constante (200 V) y las bandas de proteína se visualizaron por tinción con solución de Coomassie Bio-Safe G-250 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular fue Precision Plus (Bio-Rad)

Las proporciones de hinchamiento medidas se detallan a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7

	Peso 20 minutos después de gelificación (A)	Peso después de una noche a 37°C (B)	% hinchazón (B-A)/A x100
gel 1 de HRP	1.82	3.01	65.4
gel 2 de HRP	1.33	2.29	72.2
gel 3 de HRP	1.59	2.58	62.3

gel 1 de HRP PEGilada	1.69	3.62	114.2
gel 2 de HRP PEGilada	1.73	3.68	112.7

5 Como se puede observar en la Tabla 7 anterior, los geles elaborados con HRP PEGilada se hincharon en mayor medida que los geles hechos con HRP no pegilada. Esto demuestra que las propiedades mecánicas de los hidrogeles de gelatina formados por la HRP PEGilada (modificada), fueron significativamente diferentes que las propiedades mecánicas de los hidrogeles formados por la HRP libre (sin modificar). Ambos tipos de geles fueron resistentes al calor y no se disuelven después de 1 hora a 80 °C.

Ejemplo 15 - Efecto de la PEGilación parcial

10 La enzima de entrecruzamiento con pegilación en diferentes grados da lugar a diferentes grados de propiedades mecánicas. Este ejemplo demuestra cómo las propiedades mecánicas de un hidrogel enzimáticamente entrecruzado se puede controlar específicamente por la modulación del volumen hidrodinámico, en este caso el grado de PEGilación, de manera que un mayor volumen hidrodinámico (i.e. más PEGilación) resulta en una matriz más elástica y menos volumen hidrodinámico (i.e., menos PEGilación resulta en de una matriz menos elástica. Naturalmente, el volumen hidrodinámico no modificado (i.e., sin PEGilación) resulta en una matriz menos elástica. Los datos de Instron y los datos del gel SDS-PAGE se describen a continuación con respecto a estos efectos.

15 Métodos

Tres reacciones de pegilación se realizaron lado a lado. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, durante 2.5 h en HEPES 100 mM, pH 8.0 utilizando PEG-NHS 5K. Después de la reacción, el exceso de PEG sin reaccionar se neutralizó con glicina 110 mM y la incubación continuó durante 30 minutos más.

20 Reacción A y B tenían la misma relación de PEG:amina pero en A, tanto la mTG como el PEG fueron 3x más concentrados que en B. La reacción C es similar a A, pero la relación de PEG: amina fue la mitad de la relación en A. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

	A	B	C
Conc. PEG (mg/mL)	21.00	7.00	10.50
Conc. PEG (mM)	4.20	1.40	2.10
Conc. mTG (mg/mL)	5.96	2.00	5.95
Conc. mTG amina (mM)	3.15	1.05	3.14
Relación PEG/amina	1.33	1.33	0.67

25 Tras la finalización de estas reacciones, cada solución resultante de la solución de mTG PEGilada se hizo reaccionar con una solución de gelatina al 25% (en solución reguladora de acetato de sodio con urea 4.5 M) en una relación de 1: 2, la solución de mTG con la solución de gelatina, para formar un hidrogel de gelatina. Los niveles de actividad de mTG de cada solución mTG PEGilada se normalizaron de manera que el tiempo de reacción con la gelatina fue idéntico para todos los grupos. Después de la formación de cada hidrogel, se cultivó a 37 °C, durante 2 horas y luego se ensayó mecánicamente usando un sistema de ensayo de tracción.

30 Los resultados se muestran en la Figura 9, que es una imagen de un análisis SDS-PAGE de mTG PEGilada. mTG PEGilada de las reacciones A, B y C (5 µg de cada uno) se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% y se sometieron a SDS-PAGE. Las muestras contenían 0.1% de SDS, pero sin agente reductor y se calentaron a 85 °C, durante 10 minutos antes de cargarlo. El gel se desarrolló a un voltaje constante (200 V) y las bandas de proteína se visualizaron por tinción con solución de Coomassie Bio-Safe G- 250 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular fue Precision Plus
35 (Bio-Rad).

El perfil de SDS-PAGE muestra cómo las reacciones A, B, y C dieron lugar a moléculas mTG unidas con moléculas de PEG para diferentes grados de tal manera que muchas moléculas de PEG están unidos a la mTG en A, menos en B, e incluso menos en C.

5 Los distintos grados de PEGilación afectan significativamente las propiedades mecánicas de las matrices de gelatina como se puede ver por los resultados a continuación, en donde la mTG PEGilada, A, da lugar al hidrogel más elástico (mayor esfuerzo de tracción en la rotura) y la mTG no-PEGilada resulta en el hidrogel menos elástico, con los grupos parcialmente mTG PEGilada, B y C, que caen en el medio de la correlación entre grupos de grado de PEGilación respectivos.

Tabla 9

	mTG PEGilada fórmula A	mTG PEGilada fórmula B	mTG PEGilada fórmula C	Control (no PEGilado)
Módulo (kPa)	89.14	118.97	135.536	153.27
Esfuerzo de tracción en la rotura (kPa)	123.86	122.96	105.629	83.976
Deformación por tracción en la rotura (%)	193.11	125.11	87.571	63.863

10

Ejemplo 16 - PEG libre no tiene ningún efecto sobre la gelificación

Como control, los resultados de Instron de las propiedades mecánicas de los geles fueron probados con y sin PEG libre. Por "libre" se entiende que la molécula de PEG se colocó en solución con la enzima de entrecruzamiento, pero no se une covalentemente a la enzima. Los resultados mostraron que PEG libre no da lugar a las modificaciones de propiedades mecánicas provocadas por la unión de PEG a la enzima de entrecruzamiento (i.e., modificación de la propia enzima con PEG) covalente.

15

Métodos

Alícuotas de 4 mL de solución de gelatina (25% de gelatina, urea 4.5 M en solución reguladora de acetato de sodio) con o sin 20% de PEG 6000 se mezclaron cada una con alícuotas de 2 mL de 15 u/mL de mTG. 2 mL de cada solución resultante se vertió en un molde de hueso de perro como se ha descrito para el ejemplo 9. El gel resultante fue sacado del molde y se incubó en solución salina a 37 °C, durante 2 horas, seguido por el ensayo de tracción como se ha descrito para el ejemplo 9.

20

Resultados

Tabla 10

	-PEG	+ 20 % de PEG 6000
Módulo(kPa)	73.72	55.03
Esfuerzo de tracción en la rotura (kPa)	41.74	30.13
Deformación por tracción en la rotura (%)	57.7	57

25

Los resultados de la Tabla 10 demuestran que la adición de PEG libre, un plastificante, tenía un efecto mínimo o nulo sobre las propiedades mecánicas de la matriz de hidrogel entrecruzado de la enzima, pero que estas modificaciones de las propiedades mecánicas son de menor importancia en comparación con las modificaciones logradas aumentando el volumen hidrodinámico de las moléculas de enzima a través de la unión de PEG a la enzima. En particular, la elasticidad (tracción a la rotura) de la matriz no se mejoró en absoluto mediante la adición de PEG libre, mientras que la PEGilación de las moléculas de enzima da lugar a un aumento significativo en la elasticidad de la matriz, como se puede ver en varios otros ejemplos.

30

Ejemplo 17 - Enzima de entrecruzamiento no modificada/modificada mixta

Se ensayaron varias mezclas de enzima modificada mezclada con la enzima no modificada. Diferentes niveles de modificación de diversas propiedades mecánicas se pueden obtener de acuerdo con la mezcla específica.

5 En otra realización de la presente invención, la enzima modificada se utiliza junto con la enzima no modificada (libre) con el fin de lograr la modificación mecánica de una matriz de enzima entrecruzada.

Métodos

10 Alícuotas de 4 mL de solución de gelatina (25% de gelatina, urea 4.5 M, solución reguladora de acetato de sodio) con o sin PEG 6000 al 20% se mezclaron con 2 mL de 55 u/mL de mTG PEGilada con o sin mTG no-PEGilada adicional y 2 mL de cada solución resultante se vertió en un molde de hueso de perro como se ha descrito para el Ejemplo 9. El gel resultante fue sacado del molde y se incubó en solución salina a 37 °C durante 24 horas, seguido por el ensayo de tracción como se ha descrito para el Ejemplo 9.

Resultados

Tabla 11

	55 u/mL de mTG PEGilada	55 u/mL de mTG PEGilada+ 5 u/mL libre de mTG	55 u/mL de mTG PEGilada+ 10 u/mL libre de mTG
Módulo (kPa)	73.5	134.88	163.06
Esfuerzo de tracción en la rotura (kPa)	101.17	89.64	87.66
Deformación de tracción en la rotura (%)	170.51	74.73	57.65

15 Los resultados de la Tabla 11 indican que las propiedades mecánicas de un hidrogel de enzima entrecruzada se pueden modificar tanto mediante el uso de solo una enzima modificada y también, en menor grado, mediante el uso de una mezcla de enzima modificada con enzima libre.

Ejemplo 18 - Puentes de enzima-PEG bi-funcionales

20 Este experimento demostró entrecruzamientos de la enzima consigo misma a través de un puente de PEG bifuncional. Para este ejemplo, dos o más moléculas de enzima se pueden unir entre sí para aumentar el volumen hidrodinámico global del agregado de la enzima. Una forma de lograr esto es mediante el uso de una molécula bifuncional que forma un puente entre las moléculas de enzima.

Métodos

25 La mTG (15 u/mL, 0.5 mg/mL) se incubó con diversas concentraciones de PEG-NHS bifuncional 10 kD en Hepes 100 mM pH 8 a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido por la adición de glicina 110 mM durante 30 minutos más para neutralizar el exceso de PEG sin reaccionar. Las condiciones específicas se muestran en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12

Reacción #	Concentración de PEG (mg/mL)	Relación PEG:amina
A	0.78	0.296
B	1.56	0.59
C	3.125	1.18
D	6.25	2.36

5 Después de la reacción, 5 µg de enzima de cada composición de reacción se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7.5% y se sometió a análisis de SDS-PAGE. Las muestras contenían 0.1% de SDS, pero sin agente reductor y se calentaron a 85 °C, durante 10 minutos antes de cargarlas. El gel se trabajó a un voltaje constante (200 V) y las bandas de proteína se visualizaron por tinción con solución de Coomassie Bio-Safe G-250 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular fue Precision Plus (Bio-Rad).

10 Para la prueba de propiedad mecánica, alícuotas de 4 mL de solución de gelatina (25% de gelatina, urea 4.5 M, solución reguladora de acetato de sodio) se mezclaron con alícuotas de 2 mL de 15 u/mL de ya sea mTG libre o mTG PEGilada (reacción C). 2 mL de la solución resultante se vertió en moldes de hueso de perro como se ha descrito para el Ejemplo 9. El gel resultante fue sacado del molde y se incubó en solución salina a 37 °C durante 24 horas, seguido del ensayo de tracción como se ha descrito para el Ejemplo 9.

Resultados

15 Los resultados de SDS-PAGE de la Figura 10 muestra que una relación de PEG: mTG relativamente baja, algo de la mTG se convirtió a productos de muy alto MW, más grandes que los productos PEGilados obtenidos en las reacciones que contienen concentraciones similares de PEG 5 kD monofuncional. Esto demuestra que los productos de alto MW consisten en multímeros de moléculas de enzima entrecruzadas entre sí por un puente de PEG bifuncional y demuestran la eficacia del uso de PEG bifuncional para modificar moléculas de enzima de agentes de entrecruzamiento mediante la unión entre sí.

20 Los resultados de las pruebas mecánicas abajo muestran que la unión de las moléculas de entrecruzamiento de enzima entre sí da como resultado una modificación significativa a los hidrogeles de gelatina formados por entrecruzamiento con estas moléculas de enzimas unidas, en comparación con los hidrogeles de gelatina formados por entrecruzamiento con las moléculas de enzima libre. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

	15 u/mL de mTG	15 u/mL de mTG+ PEG-10K bifuncional
Módulo (kPa)	151.39	35.125
Esfuerzo de tracción en la rotura (kPa)	85.08	38.04
Deformación de tracción en la rotura (%)	67.82	121.4

25 Ejemplo 19 - análisis de espectrometría de masas de mTG PEGilada

Tres lotes diferentes de mTG PEGilada (enzima transglutaminasa microbiana modificada con PEG-NHS-5 kD) se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. La Figura 11 muestra el espectro m/z de uno de estos lotes.

Espectrometría de masas

30 La medición de la masa molecular intacta se realizó en un espectrómetro de masas Bruker Reflex III matrix-assisted laser desorption /ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) (Bruker, Bremen, Alemania) equipado con la extracción de iones retardada, reflector y un láser de nitrógeno 337 nm. Cada espectro de masas se genera a partir de los datos acumulados de 200 disparos de láser. La calibración externa para las proteínas se logró mediante el uso de BSA y proteínas mioglobina (Sigma, St Louis, MO).

Preparación de muestras para método de gota seca-MS MALDI-TOF.

35 Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) 0.5 L de volumen de matriz en ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA) - acetonitrilo (ACN) 2:1 y 0.5 L de solución de la muestra en ácido fórmico/isopropanol/H₂O (1: 3: 2) se mezclaron en el objetivo y se dejaron secar al aire. Después de la evaporación del solvente de las muestras, las muestras se vuelven a lavar 1-3 veces con 0.1% de TFA.

Tabla 14

Lote # de PEGilación	Tamaño medio del pico principal	Tamaño medio del pico secundario	Número calculado de PEG
1	82343.63	42202.23	9.16
2	87430.04	44676.7	11.2
3	84543.16	44937.4	8.97

Los resultados de la Tabla 14 indican que la PEGilación de la enzima de entrecruzamiento de mTG con reactivo PEG-NHS 5 kDa resulta en la unión de múltiples moléculas de PEG a cada molécula de enzima.

5 Ejemplo 20 - PEGilación de mTG en una relación PEG fija con amina con diversas concentraciones de reactivos.

Este ejemplo demuestra el gran efecto de la concentración total de reactivo sobre el grado de PEGilación. Cuando la relación de PEG:amina se mantiene en un valor fijo, se demostró una correlación entre la concentración de los reactivos (PEG y mTG) y el grado de PEGilación.

Métodos

10 La PEGilación de mTG con PEG-NHS-5 kD se llevó a cabo a temperatura ambiente en Hepes 100 mM pH 8.0 durante 2.5 horas, seguido de la adición de glicina 110 mM, para neutralizar PEG-NHS sin reaccionar. Después de la reacción, 5 µg de enzima cada composición de reacción se cargó en un gel de poliacrilamida al 6.0% y se sometió a análisis de SDS-PAGE. Las muestras contenían 0.1% de SDS, pero sin agente reductor y se calentaron a 85 °C, durante 10 minutos antes de la carga. El gel se trabajó a un voltaje constante (200 V) y las bandas de proteína se visualizaron por tinción con solución de Coomassie Bio-Safe G-250 (Bio-Rad). El marcador de peso molecular fue Precision Plus (Bio-Rad). Las reacciones se realizaron de acuerdo a las siguientes condiciones (Tabla 15):

Tabla 15

	A	B	C	D	E
Conc. de PEG (mg/mL)	1.75	3.50	7.00	14.00	21.00
Conc. de PEG (mM)	0.35	0.70	1.40	2.80	4.20
Conc. de mTG (mg/mL)	0.5ml	0.99	1.98	3.97	5.95
Conc. de mTG amina (mM)	0.26	0.52	1.05	2.09	3.14
Relación PEG/amina	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34

Resultados

20 Las siguientes moléculas de mTG PEGilada se pueden ver en los carriles de SDS-PAGE mostrados en la Figura 12. Como se puede ver, incluso cuando la relación de PEG:amina se mantuvo fija, la mayor concentración de reactivos dio lugar a un producto que fue más PEGilado.

25 Aunque las realizaciones seleccionadas de la presente invención se han mostrado y descrito de forma individual, se debe entender que cualesquiera aspectos apropiados de las realizaciones descritas se pueden combinar, o en efecto se pueden combinar una pluralidad de realizaciones.

Reivindicaciones

- 5 1. Una matriz entrecruzada, que comprende un polímero de sustrato entrecruzado por una molécula de enzima modificada, dicha molécula de enzima modificada que tiene una modificación que altera un volumen percibido de las moléculas de enzima en la matriz entrecruzada como la matriz que se forma a través de entrecruzamiento de dicho polímero.
2. La matriz de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de enzima modificada tiene una modificación que:
- a) aumenta un tamaño real de dicha molécula de enzima modificada; o
- b) aumenta un volumen hidrodinámico de dicha molécula de enzima modificada; o
- 10 c) modifica una carga electrostática de dicha molécula de enzima modificada para ser de signo opuesto a una carga neta de dicho polímero de sustrato, cambiando el punto isoeléctrico de dicha enzima modificada en comparación con la enzima no modificada.
3. La matriz de la reivindicación 2c),
- 15 en donde dicha modificación es cualquiera del grupo - ε amino de las lisinas de la enzima a través de un proceso seleccionado del grupo que consiste de succinilación, acetilación, carbamilación, alquilación reductiva y el tratamiento con anhídrido maleico o es de una o más cadenas laterales que contienen ácidos carboxílicos de la enzima para reducir el número de cargas negativas.
4. La matriz de cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en donde dicha modificación comprende la unión covalente o no covalente de al menos una molécula o unidad estructural a dicha molécula de enzima modificada.
- 20 5. La matriz de la reivindicación 4, en donde dicha modificación comprende la unión covalente de una molécula modificada para dicha molécula de enzima modificada.
6. La matriz de la reivindicación 5, en donde dicha molécula modificada comprende un portador o polímero.
7. La matriz de la reivindicación 6, en donde dicho polímero comprende un polímero sintético, un polímero celulósico, una proteína o un polisacárido.
8. La matriz de la reivindicación 7, en donde
- 25 a) dicho polímero celulósico comprende uno o más de carboximetil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, o metilcelulosa; o
- b) dicho polisacárido comprende uno o más de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparano, ácido hialurónico o un almidón o
- c) dicha molécula modificada comprende polietilenglicol (PEG).
- 30 9. La matriz de la reivindicación 8, en donde dicho PEG comprende PEG activado, y en donde dicho PEG activado comprende uno o más de metoxi PEG (mPEG), mPEG-NHS, ésteres de succinimidilo de mPEG, mPEG- glutarato-NHS, mPEG-valerato-NHS, mPEG-carbonato-NHS, mPEG-carboximetil-NHS, mPEG-propionato-NHS, mPEG-carboxipentil-NHS, mPEG-nitrofenilcarbonato, mPEG-propilaldehído, mPEG-tosilato, mPEG-carbonilimidazol, mPEG-isocianato, mPEG-epóxido o una combinación de los mismos.
- 35 10. La matriz de la reivindicación 9, en donde
- a) dicho PEG activado reacciona con grupos amino o grupos tiol sobre dicha enzima; y/o
- b) la relación molar de dicho PEG activado con los residuos de lisina de dicha enzima activada se encuentra en un intervalo de 0.5 a 25; y/o
- c) dicho PEG activado es monofuncional, heterobifuncional, homobifuncional o multifuncional; y/o
- 40 d) dicho PEG activado es PEG ramificado o PEG multi-brazo; y/o
- e) dicho PEG activado tiene un tamaño que varía de 1000 a 40,000 dalton.

11. La matriz de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un co-polímero que no está unido covalentemente a dicha enzima o a dicho polímero de sustrato.
12. La matriz de la reivindicación 11, en donde dicho co-polímero comprende un polisacárido o un polímero celulósico.
13. La matriz de la reivindicación 12, en donde
- 5 a) dicho polisacárido comprende dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparano, ácido hialurónico o un almidón o
- b) dicho polímero celulósico comprende carboximetil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxietilcelulosa o metilcelulosa.
- 10 14. La matriz de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula de enzima modificada se modifica por entrecruzamiento de dicha molécula de enzima modificada con una pluralidad de otras moléculas de enzima para formar un agregado de una pluralidad de moléculas de enzima entrecruzadas.
- 15 15. Un método para controlar la formación de una matriz, que comprende: modificar una molécula de enzima con una modificación que altera un volumen percibido de las moléculas de enzima en la matriz entrecruzada como la matriz que se está formando; mezclar dicha molécula de enzima modificada con al menos un polímero de sustrato que es un sustrato de dicha molécula de enzima modificada; y formar la matriz a través de entrecruzamientos de dicho al menos un polímero de sustrato por dicha molécula de enzima modificada, en donde dicha formación de la matriz es al menos parcialmente controlada por dicha modificación de dicha molécula de enzima.
- 20 16. El método de la reivindicación 15, en donde dicha molécula de enzima modificada y dicho al menos un polímero de sustrato se mezclan en solución, de manera que dicha modificación controla el grado de entrecruzamiento de dicho al menos un polímero de sustrato a medida que una viscosidad de dicha solución aumenta; y opcionalmente dicha modificación comprende la PEGilación de la enzima a un pH en un intervalo de 7 a 9.
17. El método o matriz de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un polímero de sustrato comprende
- 25 a) un polímero de sustrato seleccionado del grupo que consiste de un polímero entrecruzado naturalmente, un polímero parcialmente desnaturalizado que es entrecruzado por dicha enzima modificada y un polímero modificado que comprende un grupo funcional o un péptido que es entrecruzable por dicha enzima modificada; y/o
- b) gelatina, colágeno, caseína o albúmina, y en donde dicha molécula de enzima modificada comprende una transglutaminasa modificada y/o una enzima oxidativa modificada; y/o
- 30 c) en donde dicha gelatina se selecciona del grupo que consiste en gelatina obtenida por hidrólisis parcial de tejido animal o colágeno obtenido a partir de tejido animal, en donde dicho tejido animal se selecciona entre el grupo que consiste en piel de animal, tejido conectivo, astas, cuernos, huesos, escamas de pescado, y una gelatina recombinante producida usando sistemas de bacterias, levadura, animal, insecto, o plantas o cualquier tipo de cultivo celular, o cualquier combinación de los mismos.
18. El método o matriz de la reivindicación 17, en donde
- 35 a) dicha transglutaminasa modificada comprende transglutaminasa microbiana modificada o
- b) en donde dicha enzima oxidativa modificada comprende uno o más de tirosinasa, lacasa, o peroxidasa.
19. El método o matriz de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula de enzima se modifica a través de la PEGilación y en donde dicha PEGilación proporciona enmascaramiento inmunogénico mediante el enmascaramiento de dicha molécula de enzima a partir de un sistema inmune de un animal huésped que recibe la matriz.
- 40 20. Un agente hemostático o un sellante quirúrgico, que comprende una matriz como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
21. Una composición para uso en el sellado de una herida, que comprende una matriz como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 45 22. La composición de la reivindicación 21, para uso en el sellado de líneas de sutura o de grapas en un tejido.

23. Una composición para un vehículo para su uso en la administración de fármacos localizada, que comprende una matriz como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
24. Una composición para uso en la ingeniería de tejidos, que comprende una matriz tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, adaptada como un andamio inyectable.
- 5 25. Un método para modificar una composición, que comprende: proporcionar una enzima modificada que tiene un grupo funcional entrecruzable y una proteína que tiene al menos una unidad estructural entrecruzable por dicha enzima modificada; mezclar dicha enzima modificada y dicha proteína, en donde dicha enzima modificada se entrecruza con dicha proteína y también es entrecruzada con dicha proteína a través de dicho grupo funcional de entrecruzamiento.

Figura 1

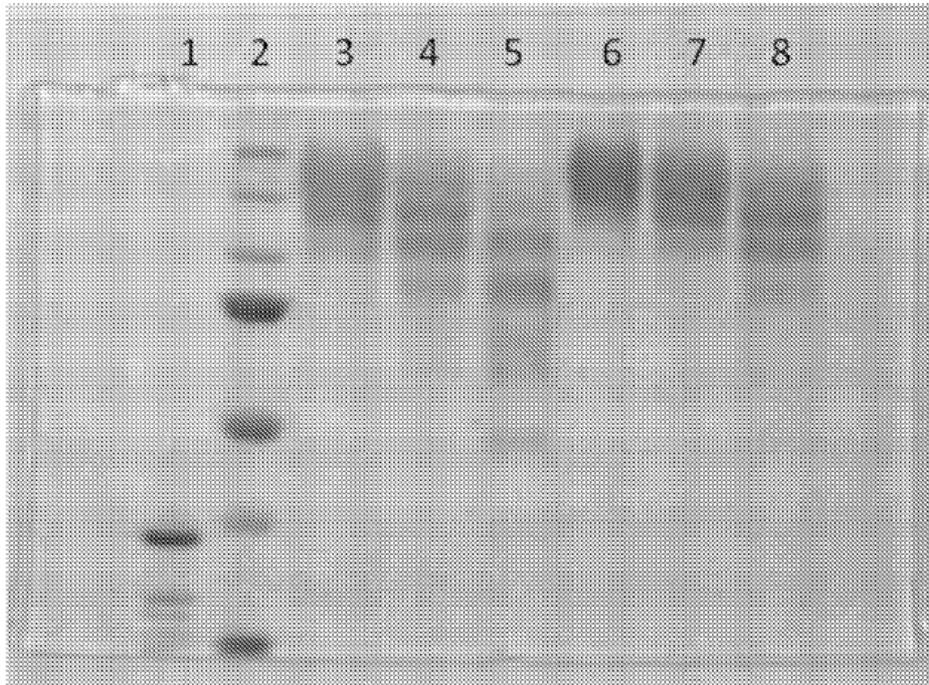


Figura 2

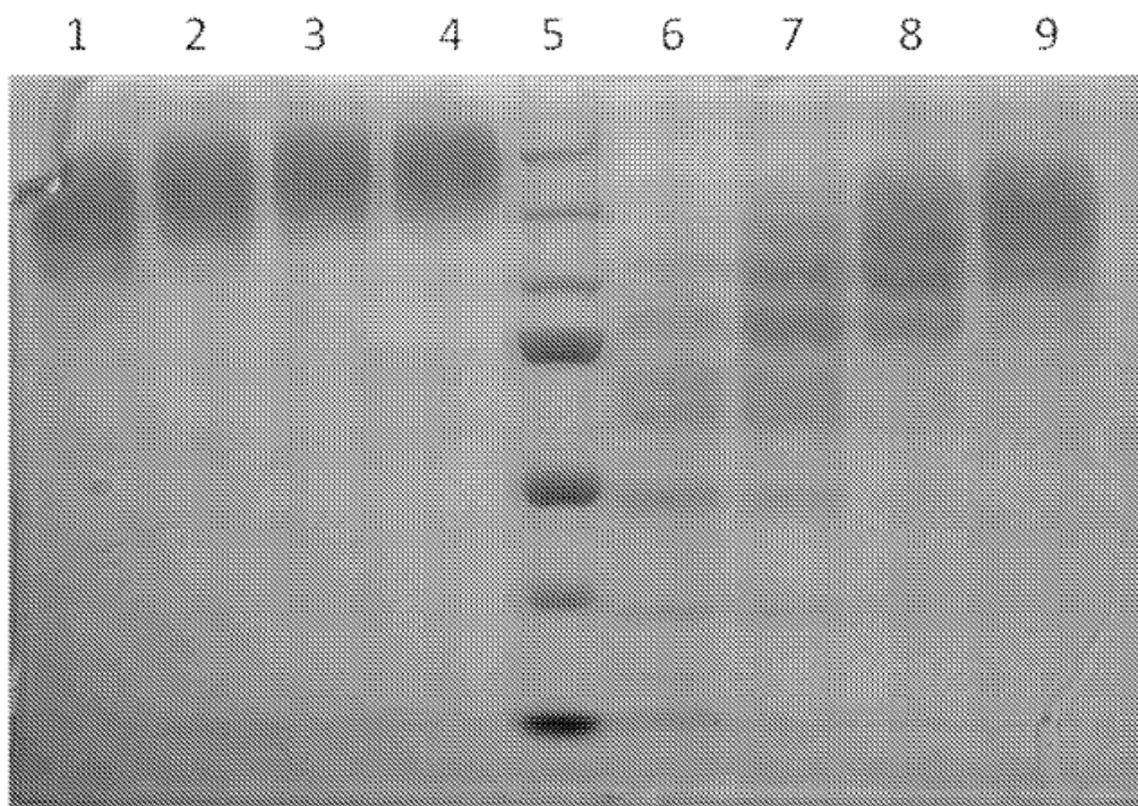


Figura 3

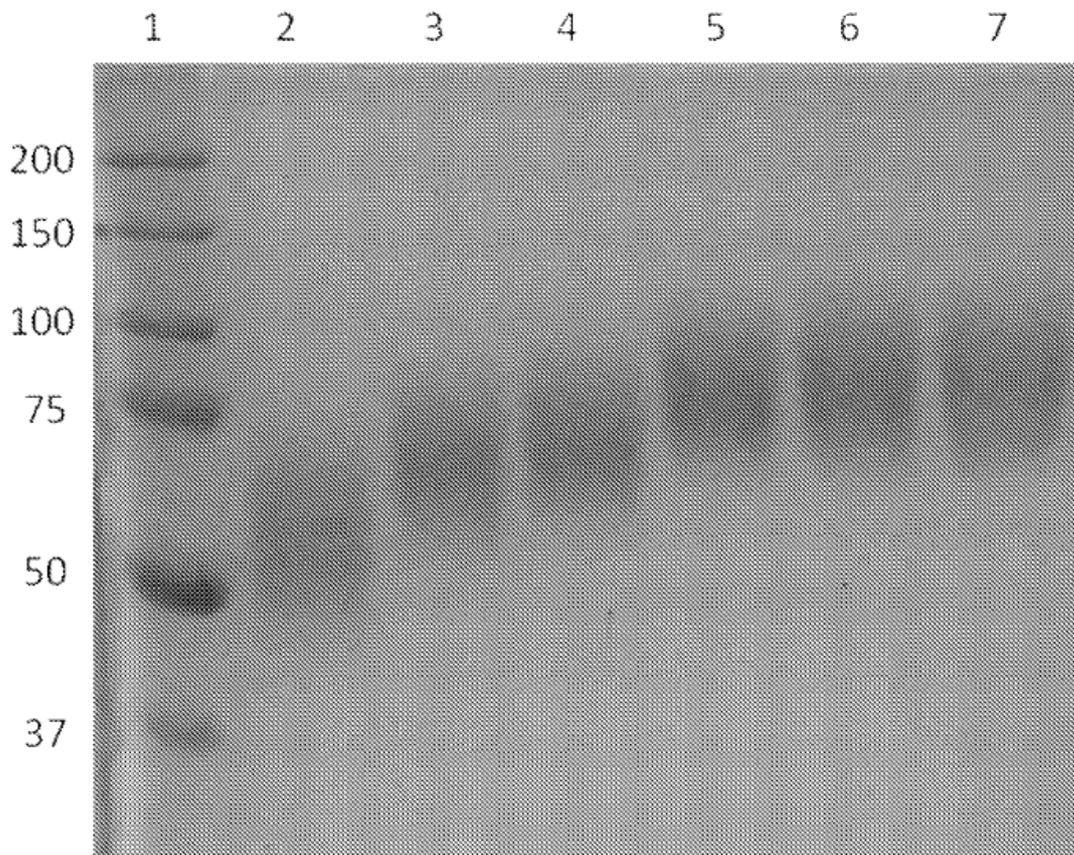


Figura 4

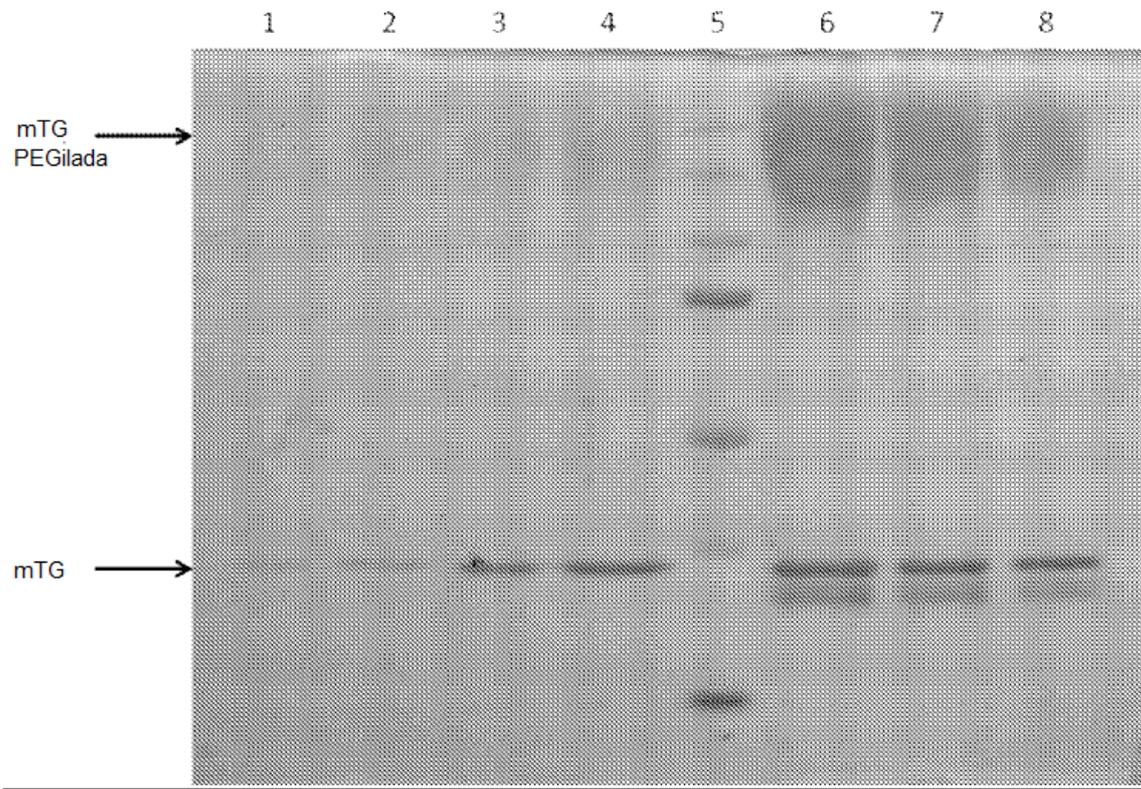


Figura 5

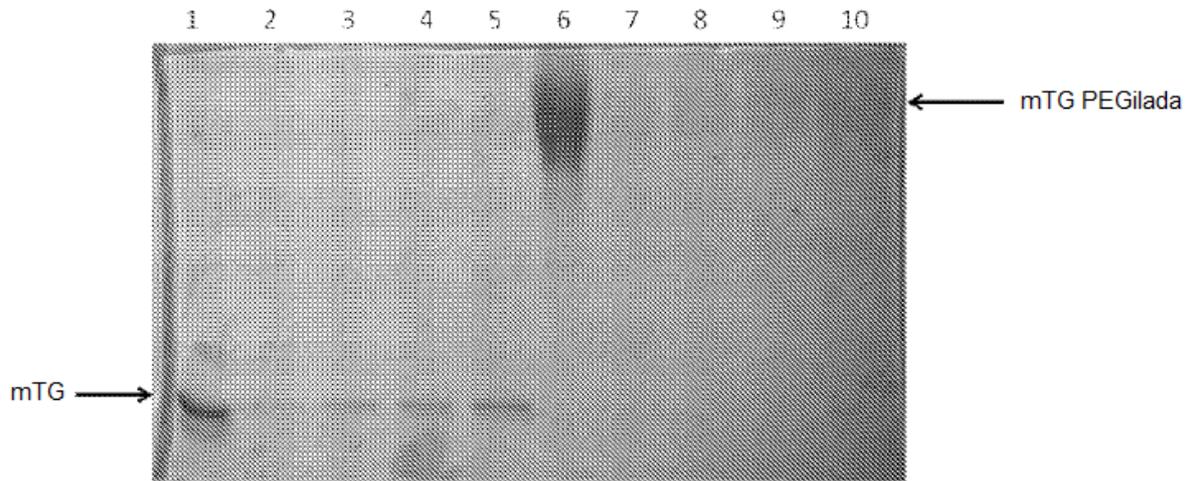


Figura 6

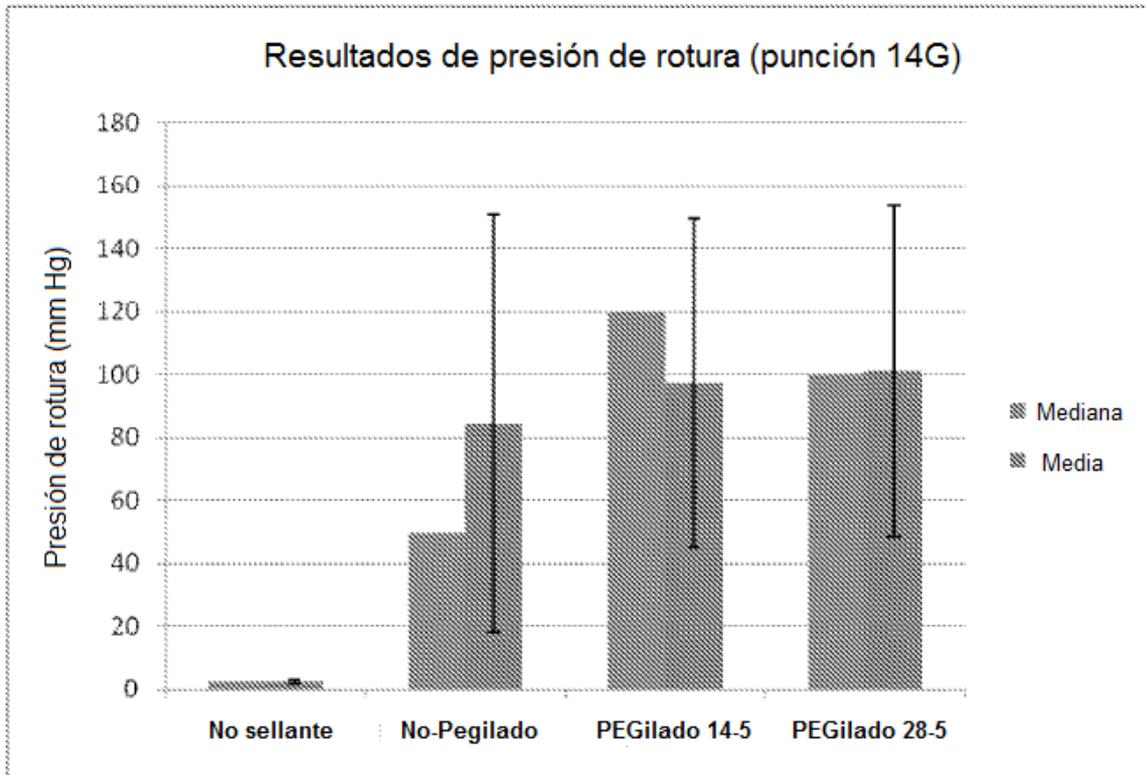


Figura 7

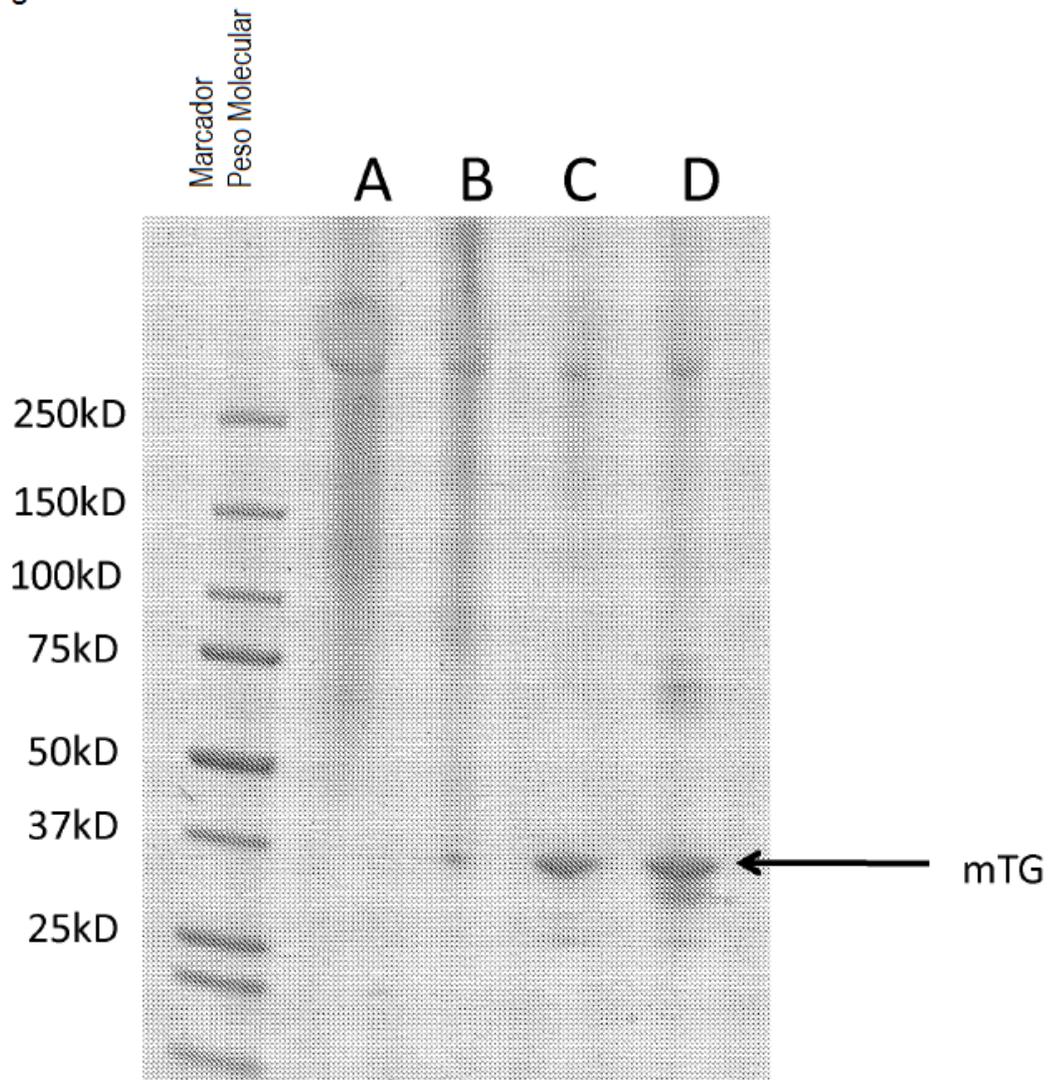


Figura 8

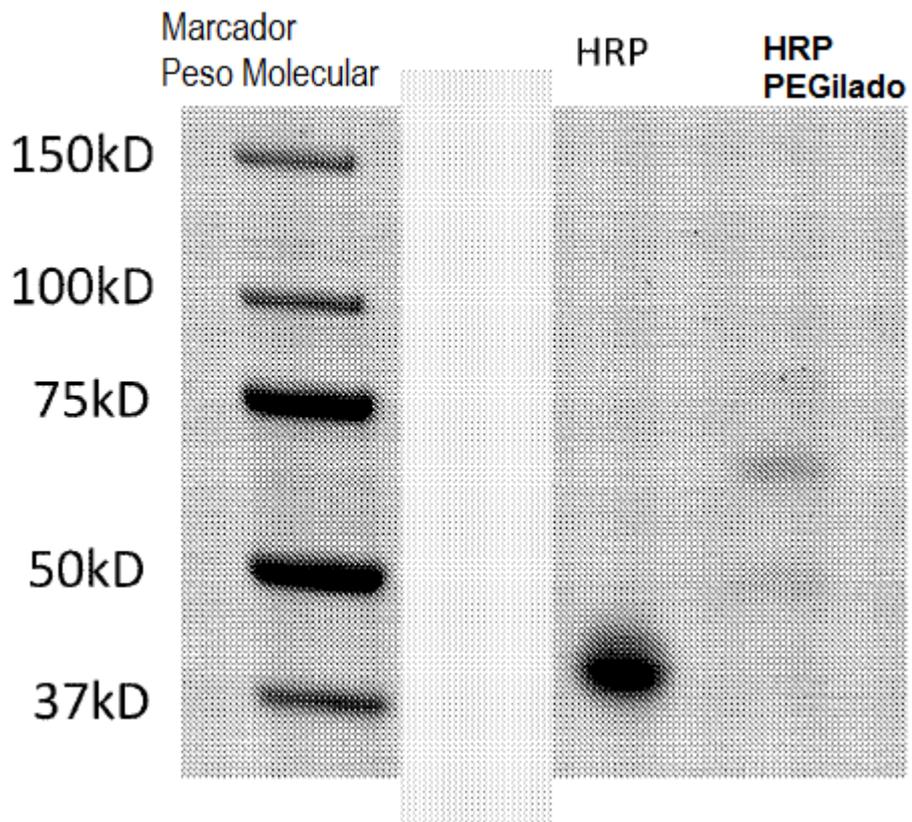


Figura 9

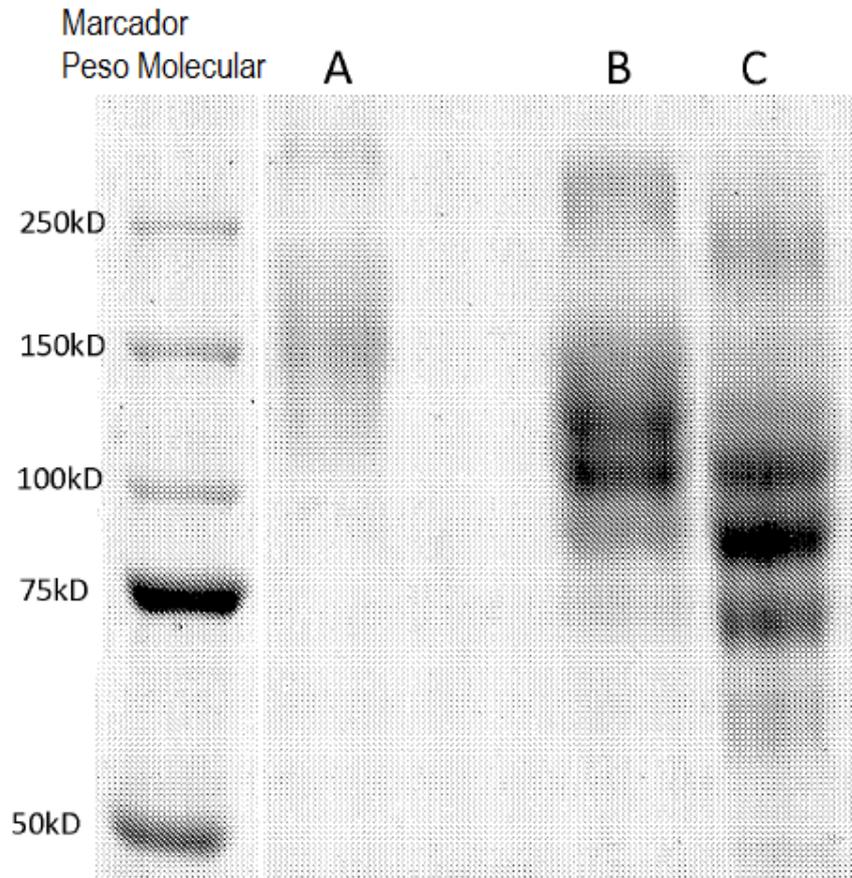


Figura 10

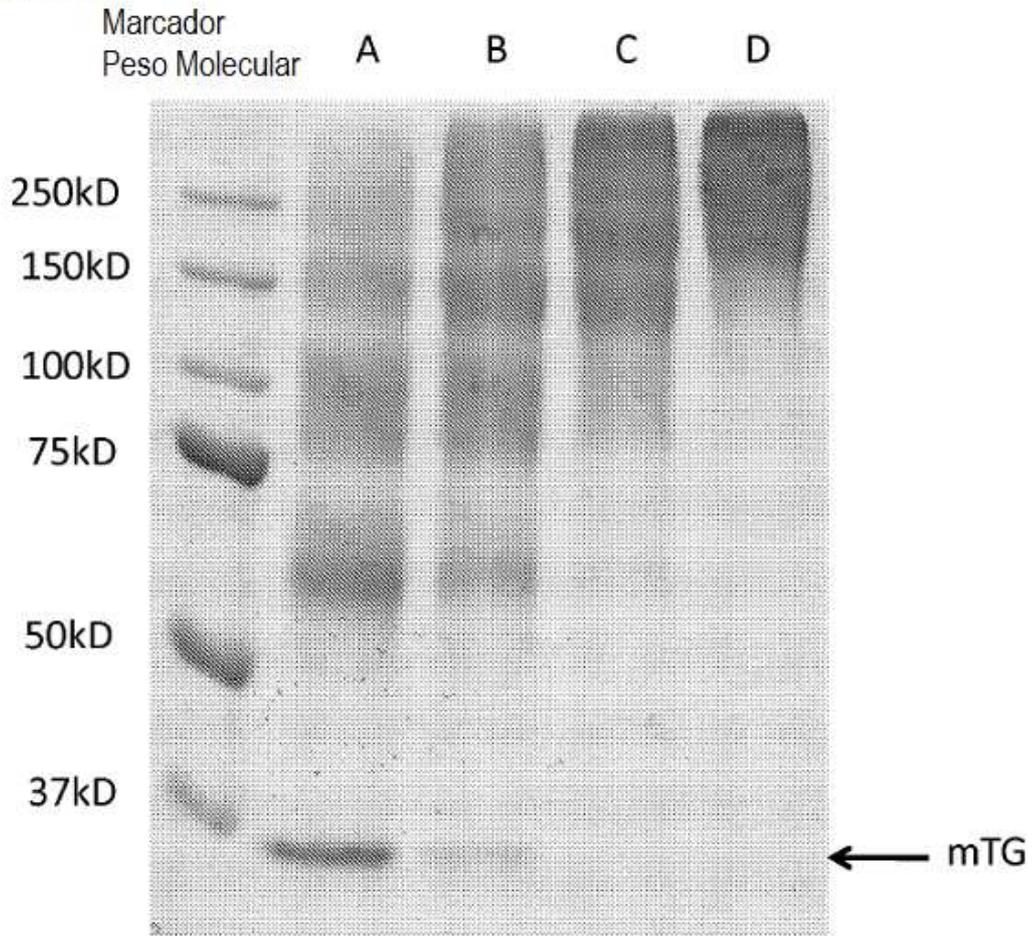


Figura 11

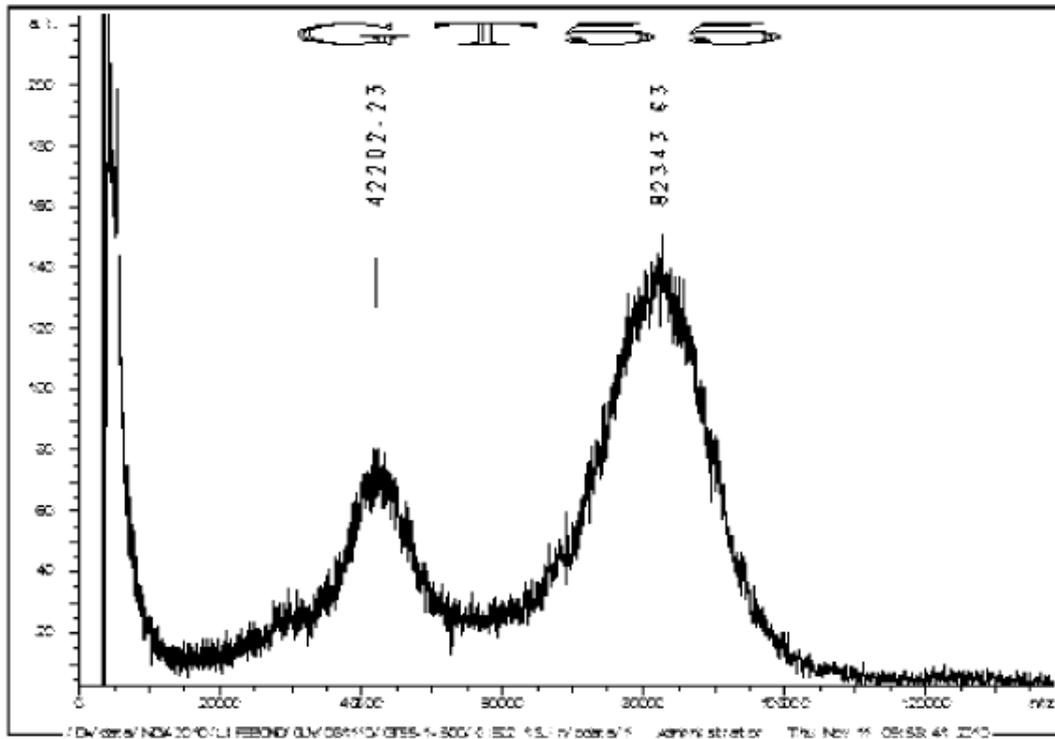


Figura 12

