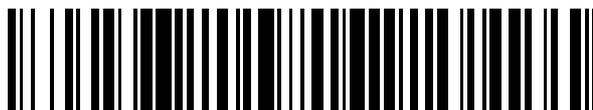


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 178**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/30** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

**A61K 47/40** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**C08L 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09836947 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2373345**

54 Título: **Hidrogeles biocompatibles basados en polisacáridos**

30 Prioridad:

**17.12.2008 US 138335 P**

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

**13.10.2016**

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)  
3400 N. Charles Street  
Baltimore MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**GERECHT, SHARON;  
SHEN, YU-I;  
HO, CHIA CHI y  
SUN, GUOMING**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 586 178 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

Hidrogeles biocompatibles basados en polisacáridos

## ANTECEDENTES

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención está relacionada con hidrogeles biocompatibles basados en polisacáridos, componentes de los mismos y a su uso como vehículos de administración para proteínas, oligonucleótidos, agentes farmacéuticos y células.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los hidrogeles poliméricos han encontrado una amplia variedad de aplicaciones farmacéuticas y biomédicas debido a su similitud estructural tridimensional y su similitud funcional con los tejidos naturales. Se ha preparado una amplia variedad de hidrogeles, basándose en tanto métodos de reticulación física como química. Se desea el enfoque de reticulación química para diseñar hidrogeles biodegradables debido a que son relativamente fáciles de formular controlando parámetros experimentales, tales como el tipo y la concentración de agentes de reticulación, concentraciones de iniciador, y las relaciones y concentraciones de precursores.

- 15 Aunque se han desarrollado muchos tipos diferentes de hidrogeles poliméricos ya desde los años 50 (Kopecek, J. Nature 2002, vol. 417, pp. 388-391), todos se clasifican en una de las dos categorías básicas de polímero: natural o sintético. Los polímeros naturales han ganado interés en las últimas décadas debido a su biocompatibilidad y la presencia de grupos biológicamente reconocibles para soportar las actividades celulares (Van Tomme et al. Expert Rev. Med. Dev. 2007, vol. 4, pp. 147-164). Entre los polímeros naturales, el dextrano es un polisacárido coloidal, hidrófilo, biocompatible y no tóxico compuesto de residuos D-glucopiranosos ligados en  $\alpha$ -1,6 lineales con una baja fracción de cadenas laterales ligadas en  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4. Por tanto, el dextrano puede ser biodegradado por dextranasa, que existe en tejidos de mamífero (incluyendo humanos). Desde un punto de vista estructural, el dextrano tiene grupos hidroxilo reactivos (es decir, -OH) que pueden modificarse para formar hidrogeles mediante reticulación por productos fotoquímicos y otros medios. Como el dextrano es naturalmente resistente a la adsorción de proteínas y la adhesión celular, la modificación de su esqueleto de polímero permite el desarrollo de un hidrogel con características específicas. Debido a estas propiedades, el dextrano y sus híbridos se han investigado ampliamente como vehículos para fármaco y/o genes. Por ejemplos, se han empleado biomateriales basados en dextrano en la inmovilización de células (Massia et al., Biomaterials, 2000, vol. 21, pp. 2253) y la transfección génica (Azzam et al., Macromol. Symp., 2003, vol. 195, p. 247) y como vehículos para una variedad de fármacos farmacéuticamente activos (de Jong et al., Macromolecules, 2000, vol. 33, p. 3680; Kim et al., J. Biomater. Appl., 2000, vol. 15, p. 23; Won et al., Carbohydr. Polym., 1998, vol. 36, p. 327; Kim et al., Arch. Pharma. Res., 2001, vol. 24, p. 69; Chu, C.C., en: Biomaterials Handbook-Advanced Applications of Basic Sciences, y Bioengineering, D. L. Wise (Ed.), p. 871. Marcel Dekker, New York, NY (2003); Won et al., en: Biomaterials & Engineering Handbook, D. L. Wise (Ed.), p. 356. Marcel Dekker, New York, NY (2000); Zhang et al., J. Biomater. Appl., 2002, vol. 16, p. 305; Peppas et al., Europ. J. Pharma. Biopharma., 2000, vol. 50, p. 27; Van Tomme et al., Biomaterials, 2006, vol. 27, p. 4141).

- Se han hecho muchos intentos para manipular polímeros basados en dextrano para diversas aplicaciones (Heinze et al., en Polysaccharides II, Springer-Verlag Berlin: Berlin, 2006; p. 199). Van Tomme et al. revisaron recientemente los hidrogeles basados en dextrano tanto químicamente como físicamente reticulados que se desarrollaron para la liberación de proteínas (Van Tomme et al. Expert Rev. Med. Dev. 2007, vol. 4, pp. 147-164). Para generar hidrogeles de dextrano químicamente reticulados, el principal reto de la modificación es introducir enlaces polimerizables para la eficaz reticulación. Un enfoque común es incorporar grupos vinilo mediante diferentes tipos de acrilatos, permitiendo así la fotorreticulación. Tales acrilatos incluyen acrilato de glicidilo (Edman, et al., I. J. Pharm. Sci. 1980, vol. 69, pp. 838-842), metacrilato de glicidilo (van Dijk-Wolthuis et al., Macromolecules, 1995, vol. 28, pp. 6317-6322), metacrilato (Kim et al., J. Biomed. Mater. Res., 2000, vol. 53, pp. 258-266; Ferreira et al., Biomaterials, 2007, vol. 28, pp. 2706-2717), acrilato (Zhang et al., J Polym. Sci. Polym. Chem., 1999, vol. 37, pp. 4554-4569) y metacrilato de hidroxietilo (van Dijk-Wolthuis et al., Macromolecules, 1997, vol. 30, pp. 4639-4645; van Dijk-Wolthuis et al., Polymer, 1997, vol. 38, pp. 6235-6242). Se demostró que estos hidrogeles eran vehículos de proteínas eficaces. Chu et al. también desarrollaron hidrogeles de dextrano basados en anhídrido maleico e isocianato de alilo (AI) (Kim et al., J. Biomed. Mater. Res., 2000, vol. 53, pp. 258-266; Zhang et al., J. Polym. Sci. Polym. Chem., 2000, vol. 38, pp. 2392-2404), que se mostró que tenían propiedades ajustables. Aparte de la fotorreticulación UV, también se ha empleado la reacción de Schiff para formar reticulaciones oxidando anillos de dextrano en grupos aldehído (Maia et al., "Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels", Polymer, 2005, vol. 46, pp. 9604-9614; Ito et al., Biomaterials, 2007, vol. 28, pp. 3418-3426).

- 55 Un enfoque para preparar hidrogeles basados en dextrano implica el uso de un precursor de polímero sintético de manera que los hidrogeles resultantes puedan ser tanto polímeros sintéticos como que existen de forma natural dentro de una única entidad. Entre los precursores de polímero sintético que se acoplaron con dextrano, el poli(etilenglicol) (PEG) es popular debido a que es un polímero anfifílico único, biocompatible, pero no biodegradable,

y se ha explorado para muchas aplicaciones biomédicas. Aunque el PEG no es biodegradable, el PEG de peso molecular más bajo puede ser fácilmente eliminados del cuerpo por el riñón e hígado, haciéndolo así más adecuado para la administración de fármacos. Además, el PEG también se ha empleado para mejorar la biocompatibilidad (Zhang et al., *Biomaterials*, 2002, vol. 23, p. 2641-2648; Chung et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2003, vol. 32, p. 17), promover la inmovilización de péptidos (Hern et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, vol. 39, p. 266; Wang et al., *J. Membr. Sci.*, 2002, vol. 195, p. 103), prolongar el tiempo de circulación del fármaco de proteína (Koumenis et al., *Int. J. Pharma.*, 2000, vol. 198, p. 83; Greenwald et al., *Adv. Drug Deli. Rev.*, 2003, vol. 55, p. 217), aumentar la bioactividad (Muslim et al., *Carbohydr. Polym.*, 2001, vol. 46, p. 323-330) y reducir la inmunogenicidad (Hu et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2002, vol. 34, p. 396-402).

## 10 SUMARIO

Las realizaciones de la invención incluyen composiciones de un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en las que el polisacárido incluye un primer grupo hidroxilo sustituido de fórmula (I) y un segundo grupo hidroxilo sustituido de fórmula (II), en el que la fórmula (I) y la fórmula (II) son diferentes. El primer y segundo grupos hidroxilo sustituidos pueden estar en el mismo monómero o monómeros diferentes.

La fórmula (I) tiene la estructura  $-O_1-X$ , en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido, y X es un resto reticulable. La fórmula (II) tiene la estructura  $Y-(CR^2R^3)_n-CO_2H$ , en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$  en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ,  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ,  $R^2$  y  $R^3$  pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo  $C_1-C_4$ , o pueden combinarse para formar un anillo de 3-6 miembros, y cuando  $n > 1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  en átomos adyacentes pueden formar un doble o triple enlace, o  $R^2$  y  $R^3$  en átomos de carbono diferentes pueden formar un anillo de 3-6 miembros.

Realizaciones de la invención incluyen un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en las que el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III), y en las que el grado de sustitución de la fórmula (III) en el polisacárido es inferior a aproximadamente 0,2; en las que la fórmula (III) es  $-O_1-C(O)NR^7-CH_2CH=CH_2$  y  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido y  $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ . En algunas realizaciones,  $R^7$  es hidrógeno

En algunas realizaciones, el polisacárido incluye adicionalmente un segundo grupo hidroxilo sustituido que tiene la fórmula (IV), en las que la fórmula (III) y la fórmula (IV) son diferentes, y el grupo hidroxilo sustituido de fórmula (III) y la fórmula (IV) puede estar en el mismo monómero o monómeros diferentes. La fórmula (IV) es  $Y-(CR^2R^3)_n-Z$ , en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$ ,  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ;  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ; Z está seleccionado del grupo que consiste en  $-CO_2H$  o  $NR^4R^5$ , en la que  $R^4$  y  $R^5$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .

Otras realizaciones incluyen una composición que consiste esencialmente en los polisacáridos descritos anteriormente.

Otras realizaciones incluyen composiciones del polisacárido y una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico.

Otras realizaciones incluyen composiciones del polisacárido y un segundo material reticulable, tal como diacrilato de poli(etilenglicol). Otras realizaciones incluyen composiciones del polisacárido, diacrilato de poli(etilenglicol) y una proteína, oligonucleótido, o agente farmacéutico.

Otras realizaciones incluyen composiciones de polisacárido reticulado. Realizaciones adicionales incluyen composiciones de una mezcla reticulada del polisacárido y diacrilato de poli(etilenglicol). Realizaciones adicionales incluyen composiciones de una mezcla reticulada de polisacárido, diacrilato de poli(etilenglicol), y una proteína, oligonucleótido, o agente farmacéutico.

Realizaciones de la invención incluyen métodos de administración de una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico a un sujeto administrando al sujeto una composición de al menos un polisacárido reticulado y una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico.

Realizaciones de la invención incluyen composiciones formadoras de hidrogel que tienen al menos aproximadamente el 80 % de un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en las que el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III). La fórmula (III) tiene la estructura  $-O_1-C(O)NR^7-CH_2CH=CH_2$  en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido y  $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ . La composición incluye adicionalmente hasta aproximadamente el 20 % de una segunda molécula reticulable. En algunas realizaciones  $R^7$  es H. En algunas realizaciones, la segunda molécula reticulable es diacrilato de poli(etilenglicol). En otras realizaciones,  $R^7$  es H, y la segunda molécula reticulable es diacrilato de poli(etilenglicol).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra una preparación de hidrogel. La **Figura 1A** muestra la reacción química (izquierda) para formar un hidrogel a modo de ejemplo (derecha). La **Figura 1B** muestra una tabla de diferentes hidrogeles y sus conversiones.

5 La **Figura 2** ejemplifica los perfiles de hinchamiento y degradación de hidrogeles de Dex/PEGDA. La **Figura 2A** ilustra gráficamente los volúmenes de hinchamiento de hidrogeles de dextrano durante 24 horas, a tres relaciones de Dex/PEGDA diferentes: (i) 20/80; (ii) 40/60; (iii) 60/40; y (iv) los volúmenes de hinchamiento máximos de todos los hidrogeles. La **Figura 2B** es una tabla de biodegradación enzimática de hidrogeles de Dex/PEGDA en dextranasa durante 24 horas. Los niveles de significancia se establecieron en: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , y \*\*\* $p < 0,001$ . Los valores mostrados son medias  $\pm$  DE.

10 La **Figura 3** ejemplifica la mecánica y densidad de reticulación de hidrogeles de Dex/PEGDA. La **Figura 3A** es una gráfica del módulo de compresión de hidrogeles de dextrano a tres relaciones de Dex/PEGDA diferentes, demostrando la disminución en el módulo con el aumento en el contenido de dextrano. La **Figura 3B** es una tabla de densidad de reticulación ( $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) de hidrogeles de Dex/PEGDA. Los niveles de significancia se establecieron en: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , y \*\*\* $p < 0,001$ . Los valores mostrados son medias  $\pm$  DE.

15 La **Figura 4** ilustra la biocompatibilidad de hidrogeles de Dex/PEGDA. Toxicidad *in vitro* de monómeros de Dex/PEGDA en células endoteliales (EC): La **Figura 4A** ilustra la toxicidad *in vitro* de monómeros de Dex/PEGDA sobre EC con imágenes de microscopía óptica de EC cultivadas en placa de Petri en ausencia (control) o presencia de 10  $\mu\text{l/ml}$  de PEGDA (control) o diferentes prepolímeros de Dex/PEGDA (60/40). Se observaron adhesión y propagación de EC bajo todas las condiciones, con números más bajos de células en cultivos que contenían Dex-AM/PEGDA. La **Figura 4B** ilustra la toxicidad *in vitro* de monómeros de Dex/PEGDA sobre EC con gráficos de proliferación celular cuantificados por la cifra de células (izquierda) y un ensayo de proliferación de células XTT (derecha) que muestra una reducción significativa en la actividad celular en cultivos complementados con Dex-AM/PEGDA, en comparación con células cultivadas en condiciones de control y con todos los otros hidrogeles basados en Dex. La **Figura 4C** ilustra la biocompatibilidad *in vivo* de hidrogeles de Dex/PEGDA con imágenes que muestran cómo el trasplante subcutáneo de Dex-AI/PEGDA, Dex-AE/PEGDA y Dex-AC/PEGDA (relación 40/60) provocó respuesta inmunitaria después de 1 a 3 semanas (1S, 3S) como se demuestra por tinción H&E de secciones histológicas. La **Figura 4D** muestra una respuesta inflamatoria ampliada observada 1 semana después de la implantación de (i) Dex-AC/PEGDA en comparación con (ii) Dex-AE/PEGDA y (iii) Dex-AI/PEGDA, y se encontró que se redujo después de 3 semanas (iv) como se demuestra por inmunohistoquímica para macrófagos (anti-ED-1). La **Figura 4E** es una imagen representativa de vasos sanguíneos dilatados (anti-CD31) observados en la capa de granulación como parte de la respuesta de curación. Las barras de escala son 100  $\mu\text{m}$ .

20 La **Figura 5** muestra la liberación de VEGF<sub>165</sub> de hidrogeles de Dex/PEGDA. La **Figura 5A** muestra que la liberación acumulada de VEGF<sub>165</sub> de hidrogel de Dex/PEGDA (relación 40/60) mostró aproximadamente el 20 % de liberación de hidrogel de Dex-AE/PEGDA, y solo hasta aproximadamente el 3 % de liberación de otros hidrogeles. Los valores se representan como la liberación en porcentaje acumulada medida usando análisis cuantitativos. Los valores mostrados son medias  $\pm$  DE. La **Figura 5B** muestra imágenes de bajo aumento de tinción H&E para el estudio subcutáneo *in vivo* que muestra hidrogeles de Dex-AE/PEGDA con VEGF (peso/volumen de EGF) y sin VEGF (sin VEGF) en la semana 1 (s1), semana 3 (s3), semana 5 (s5), y semana 7 (s7). La **Figura 5C** muestra que el trasplante de Dex-AE/PEGDA que libera VEGF (relación 40/60) provocó la invasión de macrófagos como se demuestra por inmunohistoquímica de alto aumento con anti-ED-1. La **Figura 5D** muestra que se observó de poco a ningún tejido de granulación después de 7 semanas del trasplante de Dex-AE/PEGDA sin VEGF (**Figura 5D(i)**) y VEGF que libera Dex-AE/PEGDA (**Figura 5D(ii)**). La **Figura 5E** muestra que después de 7 semanas del trasplante, la mayoría del hidrogel de Dex-AE/PEGDA que libera VEGF se fragmentó (como se demuestra por tinción H&E y alto aumento, **Figura 5E(i)**), se engulló con macrófagos (como se demuestra por tinción con anti-ED1 y alto aumento, **Figura 5E(ii)**) y se engulló con vasos sanguíneos (como se demuestra por tinción con anti-CD31 y alto aumento, (**Figura 5E(iii)**). Las barras de escala son 100  $\mu\text{m}$ .

25 La **Figura 6** muestra la propiedad de hinchamiento de Dex-AE/PEGDA de bajo grado de sustitución a diferentes relaciones de alimentación.

30 La **Figura 7** muestra el estudio mecánico de hidrogeles de Dex-AE/PEGDA de bajo grado de sustitución con diferentes relaciones de alimentación.

La **Figura 8** muestra la liberación acumulada de VEGF de hidrogeles de Dex-AE/PEGDA de bajo grado de sustitución.

35 La **Figura 9** muestra diferentes relaciones de hidrogeles de Dex-AE/PEGDA de bajo grado de sustitución en la semana 5 teñidos con ED1, que muestra la respuesta de macrófagos al implante. El resultado indica la rápida respuesta junto con mayor crecimiento hacia adentro de tejido y fragmentación del gel a relación de alimentación de 80/20.

La **Figura 10** muestra Dex-AE/PEGDA de bajo grado de sustitución, relación 80/20, en la semana 3 teñido con SMA y vWF para identificar las redes de vasculatura (flechas sólidas). Se observan varias vasculaturas (flechas no rellenas) dentro del gel con encapsulación de VEGF en comparación con sin encapsulación de VEGF que solo muestra la formación de vasos en la periferia exterior del gel.

- 5 La **Figura 11** ilustra la caracterización química de (A) dextrano; (B) Dex-AI; (C) Dex-AE; (D) Dex-AM; (E) Dex-AC. La **Figura 11A** muestra los espectros de FTIR con las siguientes asignaciones de picos: 1, 2, 3 y 4:  $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$ ; 5:  $\sim 1538\text{ cm}^{-1}$ ; 6:  $\sim 1532\text{ cm}^{-1}$ ; 7:  $\sim 1527\text{ cm}^{-1}$ ; 8:  $\sim 1528\text{ cm}^{-1}$ ; 9:  $\sim 1708\text{ cm}^{-1}$ ; 10:  $\sim 1706\text{ cm}^{-1}$ ; 11:  $\sim 1709\text{ cm}^{-1}$ ; 12:  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ; 13:  $\sim 3420\text{ cm}^{-1}$ ; 14:  $\sim 3386\text{ cm}^{-1}$ ; 15:  $\sim 3343\text{ cm}^{-1}$ ; 16:  $\sim 3335\text{ cm}^{-1}$ ; 17:  $\sim 3319\text{ cm}^{-1}$ . La **Figura 11B** muestra los espectros de RMN  $^1\text{H}$  con los siguientes desplazamientos químicos: a: 4,68 ppm; b: 5,76 ppm; c: 4,99-5,15 ppm.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- Algunas realizaciones de la presente invención se tratan en detalle a continuación. En la descripción de las realizaciones se emplea terminología específica por claridad. Sin embargo, la invención no pretende limitarse a la terminología específica así seleccionada. Una persona experta en la técnica relevante reconocerá que pueden emplearse otros componentes equivalentes y desarrollarse otros métodos sin apartarse de los amplios conceptos de la presente invención. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia como si cada una se hubiera incorporado individualmente. Los encabezados usados en el presente documento se proporcionan para fines de claridad y de organización solo, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

#### Definiciones

- 20 Por “enfermedad” se indica cualquier afección o trastorno que daña o interfiere con la función normal de una célula, tejido, órgano o sujeto.

- Por “cantidad eficaz” se indica la cantidad de un agente requerida para mejorar los síntomas de una enfermedad con respecto a un sujeto no tratado. La cantidad eficaz de un agente terapéutico activo para el tratamiento de una enfermedad o lesión varía dependiendo del modo de administración, la edad, peso corporal y salud general del sujeto. Por último lugar, el profesional clínico que atiende decidirá la cantidad y pauta de dosificación apropiadas.

Por “modifica” se indica altera. Un agente que modifica una célula, sustrato o entorno celular produce una alteración bioquímica en un componente (por ejemplo, polipéptido, nucleótido o componente molecular) de la célula, sustrato o entorno celular.

- 30 Como se usa en el presente documento, los términos “previenen”, “prevenir”, “prevención”, “tratamiento profiláctico” y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto, que no lo tiene, pero está en riesgo de o es susceptible a desarrollar un trastorno o afección.

Por “sujeto” se indica un animal. En algunas realizaciones, un sujeto puede ser un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino.

- 35 Por “dispositivo de administración terapéutica” se indica cualquier dispositivo que proporcione la liberación de un agente terapéutico.

Como se usa en el presente documento, los términos “tratan”, “tratar”, “tratamiento”, “terapéutico” y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados al mismo. Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o síntomas asociados al mismo se eliminen completamente.

- 40 El término “alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$ ”, como se usa en el presente documento, significa hidrocarburos  $\text{C}_1\text{-C}_4$  de cadena lineal, ramificada, o cíclicos, que están completamente saturados de híbridos de los mismos tales como (cicloalquil)alquilo. Ejemplos de sustituyentes alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (incluyendo *n*-propilo ( $n\text{-Pr}$ ,  $^n\text{Pr}$ ), *iso*-propilo (*i*-Pr,  $^i\text{Pr}$ ) y ciclopropilo (*c*-Pr,  $^c\text{Pr}$ )), butilo (incluyendo *n*-butilo ( $n\text{-Bu}$ ,  $^n\text{Bu}$ ), *iso*-butilo (*i*-Bu,  $^i\text{Bu}$ ), *sec*-butilo (*s*-Bu,  $^s\text{Bu}$ ), *terc*-butilo (*t*-Bu,  $^t\text{Bu}$ ), o ciclobutilo (*c*-Bu,  $^c\text{Bu}$ )), etc.

- 45 El término “anillo de 3-6 miembros”, como se usa en el presente documento, significa un anillo saturado, insaturado o aromático que tiene 3 a 6 átomos en el anillo y al menos dos átomos de carbono en el anillo. Átomos no de carbono pueden incluir nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y silicio. Algunas realizaciones tienen 1 o 2 heteroátomos en el anillo. En algunas realizaciones, el anillo de 3-6 miembros puede ser un “anillo  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_6$ ” que tiene 3-6 átomos de carbono en el anillo. Ejemplos de anillos de 3-6 miembros incluyen ciclopropano, ciclopropeno, epóxidos, aziridina, tioepóxidos, ciclobutano, ciclobuteno, ciclobutadieno, oxetano, azetidina, tietano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclopentadieno, pirrolidina, pirrolina, pirrol, imidazol, tetrahydrofurano, dihydrofurano, furano, oxazol, oxadiazol, tiazol, tiadiazol, tetrahydrotiofeno, dihydrotiofeno, tiofeno, ciclohexano, ciclohexeno, ciclohexadieno, benceno, piperazina, piridina, tetrahydropirano, pirano, tiano, tiopirano, morfolina, diazinas (incluyendo piridazinas, pirimidinas y pirazinas), y anillos de triazina.

Un polisacárido que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido también puede denominarse un “polisacárido modificado”.

5 Como se usa en el presente documento, “monómero”, “unidad de monómeros de sacárido”, “monómero de sacárido” y similares se usan para referirse a una única unidad de sacárido del polisacárido. Los monómeros de sacáridos que llevan un sustituyente se denominan el presente documento “monómeros modificados” o “monómeros de sacárido modificados” o “unidades de monómeros de sacárido modificados.”

Polisacáridos modificados y composiciones de los mismos

#### Polisacáridos modificados que contienen carboxilato

10 Las realizaciones de la invención incluyen composiciones de un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en las que el polisacárido incluye un primer grupo hidroxilo sustituido de fórmula (I) y un segundo grupo hidroxilo sustituido de fórmula (II), en las que la fórmula (I) y la fórmula (II) son diferentes. El primer y segundo grupos hidroxilo sustituidos pueden estar en el mismo monómero o monómeros diferentes.

15 La fórmula (I) tiene la estructura  $-O_1-X$ , en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido, y X es un resto reticulable. La fórmula (II) tiene la estructura  $Y-(CR^2R^3)_n-CO_2H$ , en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$  en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ,  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ,  $R^2$  y  $R^3$  pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo  $C_1-C_4$ , o pueden combinarse para formar un anillo de 3-6 miembros, y cuando  $n > 1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  en átomos adyacentes pueden formar un doble o triple enlace, o  $R^2$  y  $R^3$  en átomos de carbono diferentes pueden formar un anillo de 3-6 miembros.

20 En algunas realizaciones, el polisacárido modificado tiene al menos dos sustituyentes de fórmula (I). Estos sustituyentes pueden estar presentes en la misma unidad de monómeros de sacárido, o el polisacárido modificado puede tener más de una unidad de monómeros de sacárido modificados que lleva un sustituyente de fórmula (I).

25 En algunas realizaciones, el polisacárido modificado tiene al menos dos sustituyentes de fórmula (II). Estos sustituyentes pueden estar presentes en la misma unidad de monómeros de sacárido, o el polisacárido modificado puede tener más de una unidad de monómeros de sacárido modificados que lleva un sustituyente de fórmula (II).

30 Como se ha establecido anteriormente,  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido de una unidad de monómeros de sacárido sustituidos. Un grupo hidroxilo sustituido puede tener la estructura de fórmula (I) o la fórmula (II), mientras que tanto la fórmula (I) como la fórmula (II) estén presentes en el polisacárido. Por ejemplo, un monómero de sacárido del polisacárido puede tener un sustituyente de fórmula (I), mientras que un monómero separado tiene un sustituyente de fórmula (II). En otros casos, el sustituyente de fórmula (I) y fórmula (II) puede estar presente en el mismo monómero. Múltiples monómeros del polisacárido pueden tener sustituyentes de fórmula (I) o fórmula (II). La fórmula (I) y la fórmula (II) son diferentes. En otras palabras, la fórmula (I) y la fórmula (II) no describen la misma estructura, y ambas deben estar presentes en el polisacárido.

35 Como se usa en el presente documento, un resto reticulable es un sustituyente químico capaz de reaccionar con otro sustituyente químico, formar un enlace covalente o reticulación entre dos restos. En general, la reacción de reticulación se produce entre moléculas diferentes, formando una reticulación entre dos moléculas de polisacárido diferentes, o entre una molécula de polisacárido y otra molécula, aunque también pueden producirse reticulaciones dentro de un único polisacárido. Como será fácilmente entendido en la materia, dos polisacáridos o porciones diferentes de un único polisacárido, cada uno de los cuales contiene al menos un resto reticulable, pueden hacerse reaccionar con una molécula de no sacárido o polímero que tiene dos o más restos reticulables. En la estructura resultante, dos polisacáridos o porciones diferentes del mismo polisacárido se unen por un resto de enlace no de sacárido, por ejemplo, un poli(etilenglicol). Cuando se reticulan, un polisacárido puede tener múltiples reticulaciones consigo mismo y/o múltiples otras moléculas.

45 En algunas realizaciones, el resto reticulable es un resto que contiene doble enlace. Un resto que contiene doble enlace es un sustituyente que tiene al menos un doble enlace en la estructura, el doble enlace puede ser parte de, por ejemplo, una estructura de vinilo, alilo, acrilato, metacrilato o acrilato de alquilo. En algunas realizaciones, el resto reticulable se deriva de acrilato de glicidilo, metacrilato de glicidilo, metacrilato, acrilato, metacrilato de hidroxietilo, anhídrido maleico o isocianato de alilo. Como se usa en el presente documento, “derivado de” significa que el resto reticulable es el producto de una reacción entre el grupo hidroxilo y, por ejemplo, acrilato de glicidilo o isocianato de alilo. En ciertas realizaciones, el resto reticulable es un carbamato de alilo o alil-uretano. En otras realizaciones, el sustituyente de fórmula (I) tiene la estructura  $-O_1-C(O)-NR^3-CH_2CH=CH_2$  en la que  $R^3$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ . En algunas realizaciones, el resto reticulable se deriva de isocianato de alilo. En otras palabras, el sustituyente de fórmula (I) tiene la estructura  $-O_1-C(O)-NH-CH_2CH=CH_2$ .

#### Polisacáridos con bajo grado de sustitución

55 Las realizaciones de la invención incluyen un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en el que el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III), y en el que el grado de sustitución de

la fórmula (III) en el polisacárido es inferior a aproximadamente 0,2; en el que la fórmula (III) es  $-O_1-C(O)NR^7-CH_2CH=CH_2$  y  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido y  $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ . “Grado de sustitución” (DS) se define como el número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por monómero de sacárido. Un grado de sustitución inferior a aproximadamente 0,2 significa que el número de grupos hidroxilo sustituidos que tienen la estructura de fórmula (III) en el polisacárido, dividido por el número total de monómeros en el polisacárido, es inferior a aproximadamente 0,2. El grado de sustitución puede calcularse a partir del espectro de RMN. Por ejemplo, la relación de la suma de las intensidades integradas normalizadas de los picos de grupos hidroxilo con respecto a las intensidades integradas normalizadas del pico de protones anoméricos se resta del número de grupos hidroxilo sin sustituir en una unidad de monómero sin modificar para determinar el grado de sustitución. Para polisacáridos de dextrano, por ejemplo, cada unidad de monómero de dextrano tiene tres grupos hidroxilo. Si, por ejemplo, la suma de las intensidades integradas de los picos de hidroxilo fue 11, y la intensidad integrada del protón anomérico fue 4, la relación sería 2,75. Este valor (2,75) se resta del número total de hidroxilos (3), para calcular el grado de sustitución ( $3-2,75 = 0,25$ ). Esto también se corresponde con un promedio de un grupo hidroxilo sustituido para cada 4 unidades de monómero. En algunas realizaciones, el grado de sustitución puede ser entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,2. En otras realizaciones, el grado de sustitución es inferior a aproximadamente 0,18, inferior a aproximadamente 0,15, inferior a aproximadamente 0,13, o inferior a aproximadamente 0,10. En algunas realizaciones, el grado de sustitución es superior a aproximadamente 0,01, superior a aproximadamente 0,03, superior a aproximadamente 0,05, o superior a aproximadamente 0,07. Las realizaciones de la invención pueden tener cualquier combinación de máximo y mínimo previamente especificado.

En algunas realizaciones,  $R^7$  es hidrógeno.

En algunas realizaciones, el polisacárido incluye adicionalmente un segundo grupo hidroxilo sustituido que tiene la fórmula (IV), en la que la fórmula (III) y la fórmula (IV) son diferentes, y el grupo hidroxilo sustituido de fórmula (III) y fórmula (IV) puede estar en el mismo monómero o monómeros diferentes. La fórmula (IV) es  $Y-(CR^2R^3)_n-Z$ , en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$ ,  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ;  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ; Z está seleccionado del grupo que consiste en  $-CO_2H$  o  $NR^4R^5$ , en la que  $R^4$  y  $R^5$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .

En algunas realizaciones, Z es  $NR^4R^5$ . En algunas realizaciones, la fórmula (IV) es  $-O_1-(CH_2CH_2)-NH_2$ .

Es ventajoso preparar hidrogeles que utilizan altos porcentajes (por ejemplo, superiores al 80 %) de polisacáridos. Por ejemplo, tales hidrogeles presentan biocompatibilidad y biodegradación mejoradas. Sin embargo, los polisacáridos convencionales, cuando se usan con agentes de reticulación, frecuentemente no tienen características formadoras de gel favorables. Se ha encontrado que los polisacáridos con bajos grados de sustitución de un resto de reticulación en un grupo hidroxilo forman hidrogeles con alto contenido de polisacáridos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención incluye polisacáridos que son capaces de formar un hidrogel que tiene al menos aproximadamente el 80 % de un polisacárido, cuando el polisacárido tiene al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en el que el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III). No se requiere grado de sustitución máximo o mínimo particular, mientras que pueda formarse un gel sólido. Hidrogeles y composiciones formadoras de hidrogel según estas realizaciones se describen a continuación.

### Composiciones

Algunas realizaciones incluyen composiciones que consisten esencialmente en el polisacárido modificado. El polisacárido modificado en la composición puede estar aislado o purificado, que significa que el polisacárido modificado se ha separado al menos parcialmente de los reactivos usados para preparar el polisacárido modificado. El polisacárido modificado puede estar sin reticular, o puede estar reticulado.

Otras realizaciones de la invención incluyen el polisacárido modificado descrito anteriormente por sí mismo, o como parte de una mezcla con otros materiales.

En otras realizaciones, el al menos un monómero de sacárido sustituido con hidroxilo es un monómero de glucopiranososa. El monómero de glucopiranososa puede estar sustituido en cualquier grupo hidroxilo libre disponible, o puede estar sustituido en más de un grupo hidroxilo libre disponible. El monómero de glucopiranososa puede incorporarse en el polisacárido en cualquier orientación adecuada, por ejemplo, mediante un enlace 1,2, 1,3, 1,4, 1,6, u otro enlace.

En algunas realizaciones, el polisacárido es dextrano. En algunas realizaciones, el dextrano tiene un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 20.000. El dextrano puede tener un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 30.000, al menos aproximadamente 40.000, al menos aproximadamente 50.000, o al menos aproximadamente 60.000. El dextrano puede tener un peso molecular promedio inferior a aproximadamente 200.000, inferior a aproximadamente 150.000, o inferior a aproximadamente 100.000. El dextrano puede tener un peso molecular entre dos puntos extremos cualesquiera. El peso molecular pueden ser promedio en número o promedio en peso. Por ejemplo, la molécula de dextrano puede tener un peso molecular promedio entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 200.000, entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 100.000 o entre aproximadamente 40.000 y aproximadamente 70.000.

En algunas realizaciones, la composición comprende además una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico. En general, cualquier proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico que pueda administrarse por un hidrogel puede administrarse por las composiciones de la presente invención. Ejemplos de proteínas que pueden administrarse por hidrogeles incluyen albúmina de suero bovino (BSA) u ovoalbúmina. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína terapéutica, tal como insulina o inmunoglobulinas (tales como IgG). En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un factor de crecimiento. Ejemplos de factores de crecimiento incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de insulina (IGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor derivado de células del estroma (SDF) y angiopoyetina (Ang). En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.

En alguna realización, la composición comprende además diacrilato de poli(etilenglicol). En otras realizaciones, el diacrilato de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 2000, al menos aproximadamente 4000, al menos aproximadamente 6000, al menos aproximadamente 8000, o al menos aproximadamente 10.000. En algunas realizaciones, el diacrilato de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 50.000, inferior a aproximadamente 20.000, o inferior a aproximadamente 15.000. El diacrilato de poli(etilenglicol) puede tener un peso molecular de entre dos puntos extremos previamente desvelados cualesquiera. El peso molecular pueden ser promedio en número o promedio en peso. En general, polímeros de poli(etilenglicol) más grandes se eliminan más lentamente del cuerpo por los riñones. El poli(etilenglicol) más grande puede producir hidrogeles con una estructura más suelta, mayor tamaño de poro y mayor hinchamiento. Los expertos en la materia pueden usar experimentación rutinaria para determinar y seleccionar un poli(etilenglicol) o diacrilato de poli(etilenglicol) para proporcionar propiedades físicas deseadas para un hidrogel según la invención.

En algunas realizaciones, la relación de peso entre el polisacárido y el diacrilato de poli(etilenglicol) es entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10. En otras realizaciones, la relación de peso del polisacárido y el diacrilato de poli(etilenglicol) es entre aproximadamente 80:20 y 20:80. En otras realizaciones, el peso del polisacárido y el diacrilato de poli(etilenglicol) es entre aproximadamente 70:30 y 30:70. En otras realizaciones, la relación de peso entre el polisacárido y el diacrilato de poli(etilenglicol) es entre aproximadamente 60:40 y 40:60. En algunas realizaciones, la relación de peso entre el polisacárido y diacrilato de poli(etilenglicol) es aproximadamente 20:80, aproximadamente 40:60 o aproximadamente 60:40.

En realizaciones que tienen un polisacárido que tiene un bajo grado de sustitución de la fórmula (III), descrito anteriormente, la composición puede tener un porcentaje (en peso) de polisacárido modificado de superior a aproximadamente el 80 %. En otras realizaciones, el porcentaje (en peso) de polisacárido modificado puede ser superior a aproximadamente el 40 %, superior a aproximadamente el 50 %, superior a aproximadamente el 60 % o superior a aproximadamente el 70 %.

#### Composiciones reticuladas

En algunas realizaciones, la composición incluye un polisacárido modificado reticulado descrito anteriormente. La composición puede estar reticulada entre moléculas de polisacárido, o entre moléculas de polisacárido y una o varias de otras moléculas reticulables. Otras realizaciones incluyen composiciones de una mezcla reticulada de polisacárido y una segunda molécula reticulable. En algunas realizaciones, la segunda molécula reticulable es un polímero. Como se usa en el presente documento, una molécula o polímero "reticulable" es un material que lleva al menos dos grupos reactivos capaces de formar un enlace covalente o reticulación con el resto reticulable del polisacárido. Ejemplos de moléculas reticulables incluyen, por ejemplo, grupos vinilo, grupos acrilato y grupos metacrilato. Pueden usarse polímeros que tienen al menos dos grupos reticulables, tales como, diacrilato de poli(alquilenglicol), dimetacrilato de poli(alquilenglicol). Ejemplos específicos incluyen diacrilato de poli(etilenglicol). Pueden usarse otros polímeros, tanto degradables como no degradables. Ejemplos incluyen polímeros de ácido hialurónico, quitosano o poli(ésteramida) que tienen restos reticulables. También pueden usarse restos reticulables distintos de dobles enlaces, tales como polímeros que contienen tiol. Los polímeros que contienen tiol pueden reticularse con restos de reticulación de doble enlace en el polisacárido, o restos que contienen tiol en el polisacárido. Esta química puede ser útil para la no fotorreticulación en la que no es deseable irradiación UV.

Como se ha descrito anteriormente, cuando se usa una segunda molécula reticulable, hay un resto de enlace no de sacárido entre los polisacáridos reticulados. Por ejemplo, cuando la segunda molécula reticulable es diacrilato de poli(etilenglicol), el resto de enlace es un polietilenglicol. En algunas realizaciones, la composición reticulada es un hidrogel. En otras realizaciones, la composición reticulada es un hidrogel que comprende una mezcla de polisacárido y diacrilato de poli(etilenglicol).

#### Otros hidrogeles y composiciones formadoras de hidrogel

Realizaciones de la invención incluyen composiciones formadoras de hidrogel que tienen al menos aproximadamente el 80 % de un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en las que el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III). La fórmula (III) tiene la estructura  $-O_1-C(O)NR^7-CH_2CH=CH_2$  (III) en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo sustituido y  $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ . La composición incluye adicionalmente hasta aproximadamente el 20 % de una segunda molécula reticulable. En algunas realizaciones,  $R^7$  es H. En algunas realizaciones, la segunda molécula reticulable es

diacrilato de poli(etilenglicol). En otras realizaciones,  $R^7$  es H, y la segunda molécula reticulable es diacrilato de poli(etilenglicol).

Una "composición formadora de hidrogel", como se usa en el presente documento, significa una composición capaz de formar un hidrogel sólido cuando se fotoreticula, en vez de un gel tipo fluido. Los expertos en la materia generalmente serán capaces de distinguir un hidrogel sólido de un hidrogel tipo fluido. Por ejemplo, un "hidrogel sólido" es capaz de mantener su forma después de la fotoreticulación, o tiene estructura suficiente tal que pueden medirse propiedades mecánicas, tales como el módulo. Sin embargo, a modo de ejemplo, y no limitación, un hidrogel sólido puede considerarse un hidrogel que tiene un aumento en la resistencia mecánica. Alternativamente, un hidrogel sólido puede ser un gel con un módulo superior a aproximadamente 200 Pa, superior a aproximadamente 500 Pa, superior a aproximadamente 700 Pa, o superior a aproximadamente 1000 Pa. En algunas realizaciones, el grado de sustitución de la fórmula (III) es aproximadamente 0,2 o menos.

Como se ha mencionado anteriormente, los hidrogeles según la invención pueden formarse por reticulación mediante el uso de, por ejemplo, medios químicos y fotoquímicos. La reticulación fotoquímica puede ofrecer algunas ventajas que incluyen reducción en la exposición a iniciadores químicos u otros reactivos, y mayor control del grado de reticulación teniendo control directo de la exposición a la luz. En muchos casos, es todavía ventajoso reducir el tiempo de exposición a la radiación UV. Por este motivo, ciertas realizaciones incluyen hidrogeles y composiciones formadoras de hidrogel que forman hidrogeles sólidos en un periodo de tiempo particular. Por ejemplo, las composiciones pueden formar hidrogeles sólidos en menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 45 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 20 minutos usando fotoirradiación a 365 nm con una potencia de la lámpara de aproximadamente 100W.

Otras realizaciones incluyen un composición formadora de hidrogel que tiene un segundo grupo hidroxilo sustituido que tiene la fórmula (IV), en la que la fórmula (III) y la fórmula (IV) son diferentes, y el grupo hidroxilo sustituido de fórmula (III) y fórmula (IV) puede estar en el mismo monómero o monómeros diferentes. Como se trata anteriormente, la fórmula (IV) tiene la estructura  $Y-(CR^2R^3)_n-Z$  en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$ ,  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ;  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ; Z está seleccionado del grupo que consiste en  $-CO_2H$  o  $NR^4R^5$ , en la que  $R^4$  y  $R^5$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .  $R^2$  y  $R^3$  son independientemente hidrógeno, alquilo  $C_1-C_4$ , o pueden combinarse para formar un anillo de 3-6 miembros, y cuando  $n > 1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  en átomos adyacentes pueden formar un doble o triple enlace, o  $R^2$  y  $R^3$  en átomos de carbono diferentes pueden formar un anillo de 3-6 miembros. En algunas realizaciones, Z es  $NR^4R^5$ . En otras realizaciones, la fórmula (IV) es  $-O_1-(CH_2CH_2)-NH_2$ .

Otras realizaciones incluyen composición fotoreticulada de las composiciones formadoras de hidrogel descritas anteriormente.

Otras realizaciones incluyen un hidrogel que tiene al menos aproximadamente el 80 % de al menos una porción de polisacárido y hasta aproximadamente el 20 % de porciones de diacrilato de poli(etilenglicol), en el que la porción de polisacárido se deriva de un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, y el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III). El hidrogel se forma por fotoreticulación. Como se trata anteriormente, la fórmula (III) tiene la estructura  $-O_1-C(O)NR^7-CH_2CH=CH_2$  en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido y  $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .

Otras realizaciones incluyen un hidrogel que tiene al menos aproximadamente el 80 % de al menos una porción de polisacárido y hasta aproximadamente el 20 % de porciones de diacrilato de poli(etilenglicol), como se trata anteriormente, en el que el polisacárido tiene un segundo grupo hidroxilo sustituido que tiene la fórmula (IV), en la que la fórmula (III) y la fórmula (IV) son diferentes, y el grupo hidroxilo sustituido de fórmula (III) y fórmula (IV) puede estar en el mismo monómero o monómeros diferentes. Como se trata anteriormente, la fórmula (IV) tiene la estructura  $Y-(CR^2R^3)_n-Z$  en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$ ,  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ;  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ; Z está seleccionado del grupo que consiste en  $-CO_2H$  o  $NR^4R^5$ , en la que  $R^4$  y  $R^5$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .  $R^2$  y  $R^3$  son independientemente hidrógeno, alquilo  $C_1-C_4$ , o pueden combinarse para formar un anillo de 3-6 miembros, y cuando  $n > 1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  en átomos adyacentes pueden formar un doble o triple enlace, o  $R^2$  y  $R^3$  en átomos de carbono diferentes pueden formar un anillo de 3-6 miembros. En algunas realizaciones, Z es  $NR^4R^5$ . En otras realizaciones, la fórmula (IV) es  $-O_1-(CH_2CH_2)-NH_2$ .

En general, son ventajosos hidrogeles biocompatibles que tienen una mayor concentración de polisacárido, debido a que una mayor porción del hidrogel puede ser metabólicamente degradada. Esto produce mayor control de la cantidad de componentes añadidos liberados de la matriz de hidrogel, debido a que puede metabolizarse más de la matriz *in vivo*.

En algunas realizaciones, la composición formadora de hidrogel puede producir un hidrogel con una relación de hinchamiento superior a aproximadamente el 1200 %. La relación de hinchamiento puede determinarse gravimétricamente sumergiendo una muestra de hidrogel seco de peso conocido en agua destilada, y midiendo el aumento en el peso hasta que el peso ya no cambie. La relación de hinchamiento puede entonces calcularse según la fórmula (1)

$$\text{Relación de hinchamiento} = ((W_{s,t} - W_d) / W_d) \times 100 \% \quad (1)$$

en la que  $W_d$  es el peso de hidrogeles secos, y  $W_{s,t}$  es el peso de hidrogeles hinchados en el tiempo t. Se supuso que los hidrogeles alcanzaron un estado de equilibrio de hinchamiento cuando no hubo diferencia en la relación de hinchamiento entre dos intervalos adyacentes.

- 5 En otras realizaciones, la composición puede producir un hidrogel que tiene una relación de hinchamiento superior a aproximadamente el 1500 %, superior a aproximadamente el 1700 % o superior a aproximadamente el 1900 %. Los hidrogeles de la presente invención pueden tener una relación de hinchamiento superior a aproximadamente el 1200 %, superior a aproximadamente 1500, superior a aproximadamente el 1700 %, o superior a aproximadamente el 1900 %. En general, un aumento de la relación de hinchamiento produce un aumento de la velocidad de liberación de cualquier componente añadido tal como proteínas.

#### Componentes añadidos

- 15 En algunas realizaciones, la composición reticulada o hidrogeles tratados previamente incluyen adicionalmente una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico. En algunas realizaciones, la composición reticulada comprende una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico que se libera de la composición con el tiempo, cuando está presente en un entorno, por ejemplo, un entorno acuoso, que tiene una concentración más baja de la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico. "Se libera de la composición", como se usa en el presente documento, significa que la concentración de proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico disminuye en la composición reticulada. El entorno acuoso puede ser, por ejemplo, un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) u otro tampón. La disolución tamponada también puede incluir la enzima dextranasa o puede añadirse la enzima dextranasa. El "entorno acuoso" también incluye situaciones en las que la composición reticulada se administra a un sujeto con el fin de administrar una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico al sujeto. El entorno en el que la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico se libera puede ser sangre, linfa, tejido, por ejemplo, un tejido de órgano, jugos gástricos, u otro entorno.

- 20 En algunas realizaciones, cuando una composición reticulada de polisacárido modificado, diacrilato de poli(etilenglicol) y proteína se incuba a 37 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS), menos del 10 % de la proteína (en peso) se libera de la composición reticulada en las primeras 24 horas.

#### Métodos

- 30 Los hidrogeles según la invención pueden usarse como andamiajes para ingeniería de tejidos, cosméticos, cuidado de heridas y otros fines. Las realizaciones a modo de ejemplo de la invención incluyen métodos de administración de una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico que comprenden administrar a un sujeto una composición reticulada que tiene al menos un polisacárido modificado descrito anteriormente, y una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico que va a administrarse, en la que la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico se libera de la composición reticulada con el tiempo después de la administración. Algunas realizaciones incluyen métodos de administración de proteínas a un sujeto que comprenden administrar a dicho sujeto una composición reticulada que tiene al menos un polisacárido descrito anteriormente y dicha proteína. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína terapéutica.

- 35 Otras realizaciones de la invención incluyen métodos de aumento de la regeneración vascular que comprenden administrar una composición descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición incluye adicionalmente una proteína que aumenta la regeneración vascular. En algunas realizaciones, la proteína es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Otras proteínas que aumentan la regeneración vascular incluyen factor de crecimiento de insulina (IGF), factor derivado de células del estroma (SDF) y angiopoyetina (Ang), tal como angiopoyetina-1 (Ang-1).

En algunos casos, el hidrogel puede provocar la respuesta del tejido y aumentar o promover la regeneración vascular sin ninguna proteína adicional.

- 45 Cuando una proteína, tal como VEGF, que aumenta el crecimiento vascular se administra en una composición descrita anteriormente, la proteína se libera con el tiempo de la composición, causando el aumento del crecimiento vascular. Las composiciones de este tipo pueden usarse, por ejemplo, para el tratamiento de heridas o quemaduras aplicando la composición a la superficie del cuerpo. La composición también puede administrarse por vía subcutánea (es decir, por debajo de la piel) para aumentar el crecimiento o regeneración vascular. En otros casos, la composición puede implantarse en una localización específica en el cuerpo, induciendo el crecimiento vascular para el tratamiento de, por ejemplo, isquemias.

- 50 Las composiciones reticuladas y los hidrogeles descritos anteriormente pueden administrarse por cualquier vía de administración disponible de hidrogeles a un sujeto. Las composiciones pueden formularse con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable dependiendo del método de administración. Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, por vía parenteral, por vía subcutánea o por vía tópica, dependiendo del material que va a administrarse al sujeto y el tejido elegido como diana.

En algunas realizaciones, la composición puede administrarse a un sujeto como una composición no reticulada, seguido de reticulación fotoquímica. De esta forma, los hidrogeles pueden moldearse a una forma particular, basándose en la localización de la administración, por ejemplo, en un órgano elegido como diana. La composición no reticulada puede estar reticulada externa o internamente.

- 5 En algunas realizaciones, la composición se reticula antes de la administración. La composición reticulada puede formarse en una forma particular, por ejemplo, como estructura ovoide, de esfera, disco, hoja u otra estructura. Las composiciones reticuladas pueden administrarse interna o externamente.

- 10 Después de la administración, la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico se libera de la composición reticulada. La velocidad de liberación puede ser estacionaria, es decir, un cierto porcentaje, en peso, durante un periodo de tiempo. En otros casos, una porción de la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico puede ser liberada a una velocidad inicial creciente después de la administración, seguido de una liberación en estado estacionario. En otros casos, la velocidad de liberación puede disminuir con el tiempo después de la administración.

- 15 En algunas realizaciones, un cierto porcentaje, en peso, de la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico se libera en un periodo de tiempo dado. Las realizaciones de la invención incluyen métodos para la liberación sostenida de una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico administrando las composiciones descritas previamente. En algunas realizaciones, la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico puede liberarse durante aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, o aproximadamente 72 horas o más.

- 20 Por ejemplo, menos de aproximadamente el 10 %, en peso, de la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico puede liberarse de la composición reticulada en las primeras 24 horas. En diferentes realizaciones, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 10 %, o menos de aproximadamente el 5 % en peso puede liberarse durante las primeras 12 horas, 24 horas o 48 horas. En ciertas circunstancias es ventajosa la liberación de orden cero, en la que el componente adicional se libera en un estado estacionario. En otros casos se desea una liberación sensible a los estímulos temporal. El perfil de liberación puede seleccionarse basándose en la aplicación deseada.

- 25 El perfil de liberación puede modificarse cambiando el (los) sustituyente(s) en el polisacárido, o variando la relación entre polisacárido modificado y segundo compuesto reticulable en la composición reticulada, variando los tamaños del polisacárido o segundo compuesto de reticulación, o cambiando el grado de sustitución en el polisacárido. Otros factores tales como el pH también pueden influir en la velocidad de liberación. El perfil de liberación también está influido por la velocidad de degradación de la composición reticulada, que variará de sujeto a sujeto.

- 30 Hay dos mecanismos de liberación básicos, difusión, y degradación, y pueden producirse combinaciones de los dos. En el mecanismo de difusión, un mayor grado de hinchamiento hará la difusión más rápida, causando así liberación más rápida. Un hidrogel con estructuras sueltas (es decir, menos reticuladas) también hará la difusión más rápida. Un mayor grado de reticulación produce estructuras densas, con menos difusión. La velocidad de degradación está dominada por los polímeros de degradación. Para el mismo sistema de hidrogel (por ejemplo, Dex-AE/PEGDA), más componente de polímero degradable significa degradación más rápida, y por tanto, liberación más rápida. Por consiguiente, los expertos en la materia serán capaces de modificar la estructura del hidrogel y el polímero para lograr un perfil de liberación deseado.

#### Preparación

- 40 Los polisacáridos descritos anteriormente pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polisacárido sin sustituir que lleva un grupo hidroxilo reactivo puede hacerse reaccionar con un reactivo que lleva un resto reticulable para producir la estructura de fórmula (I). El reactivo puede reaccionar con el grupo hidroxilo libre directamente, o el reactivo o grupo hidroxilo puede activarse para reaccionar con el reactivo. Ejemplos de sustituyentes que pueden reaccionar directamente con el grupo hidroxilo libre para producir la estructura de fórmula (I) incluyen epóxidos, tales como acrilato de glicidilo y metacrilato de glicidilo; anhídridos, tales como anhídrido maleico, acrílico anhídrido o anhídrido metacrílico; isocianatos, tales como isocianato de alilo; haluros de acilo, tales como cloruro de acilo, o cloruro de metacrililo; haluros de alquilo tales como bromuro de alilo, o acrilato de 2-cloroetilo, o metacrilato de 2-cloroetilo. Otros reactivos pueden tener grupos activables, es decir, restos que pueden activarse para reaccionar con el grupo hidroxilo libre. Grupos activables incluyen ácidos carboxílicos, hidróxidos o aminas para formar, por ejemplo, ésteres, éteres, carbonatos o enlaces carbamato (uretano).

- 50 El polisacárido puede hacerse reaccionar con un reactivo que lleva un grupo ácido carboxílico o carboxilato libre para formar el sustituyente que tiene la fórmula (II). Por ejemplo, pueden prepararse sustituyentes que tienen un enlace éter con el sacárido a partir de ácidos haloalquilcarboxílicos, tales como ácido cloroacético, ácido 2-bromopropiónico, ácido 4-bromobutírico o ácido 5-clorovalérico. Pueden prepararse sustituyentes que tienen un enlace éster, por ejemplo, mediante reacción con un anhídrido cíclico, tal como anhídrido maleico o anhídrido succínico, u otro reactivo carboxilato activado tal como un di-ácido mono-activado. Pueden prepararse sustituyentes que tienen un enlace carbamato, por ejemplo, a partir de reactivos de isocianato que llevan ácido carboxílico, tales como isocianato de glicilo, otros isocianato de aminoácido, o de aminas activadas.

Un grupo hidroxilo en el polisacárido puede primero sustituirse para formar el sustituyente de fórmula (I), seguido de sustituir otro grupo hidroxilo para formar el sustituyente de fórmula (II), o viceversa. En algunos casos, ambos sustituyentes pueden formarse en la misma reacción añadiendo ambos reactivos al polisacárido sin sustituir.

5 El polisacárido que tiene grupos hidroxilo sustituidos con la estructura de fórmula (III) con un bajo grado de sustitución puede prepararse, por ejemplo, haciendo reaccionar un polisacárido con isocianato de alilo en presencia de un activador, tal como dilaurato de dibutilestaño (DBTDL). El grado de sustitución se controla reduciendo la relación molar de isocianato de alilo con respecto a polisacárido para producir el grado de sustitución deseado.

10 El polisacárido modificado que tiene el sustituyente de fórmula (III) puede entonces hacerse reaccionar con un reactivo para formar un sustituyente de fórmula (IV) usando los reactivos tratados previamente. Pueden prepararse sustituyentes de fórmula (IV) en la que Z es  $\text{NR}^5\text{R}^6$ , por ejemplo, haciendo reaccionar el polisacárido modificado con un reactivo que lleva amina similar a aquellos descritos previamente que tienen un ácido carboxílico. Por ejemplo, el polisacárido puede hacerse reaccionar con bromhidrato de 2-bromoetilamina para formar el sustituyente que tiene la fórmula  $-\text{O}_1-(\text{CH}_2\text{CH}_2)-\text{NH}_2$ . Alternativamente, un polisacárido puede hacerse reaccionar con un reactivo para formar un sustituyente de fórmula (IV), y entonces hacerse reaccionar con un reactivo para formar un grupo hidroxilo con la estructura de fórmula (III).

15 El polisacárido puede purificarse, por ejemplo, mediante precipitación, o por cromatografía, tal como cromatografía de exclusión por tamaño.

20 Las composiciones reticuladas pueden prepararse por reticulación del polisacárido modificado usando cualquier química adecuada, basándose en el resto de reticulación. En algunas realizaciones, en las que el resto de reticulación comprende un doble enlace, se usa fotorreticulación para reticular la composición. La composición puede incluir además una segunda molécula reticulable o polímero. La segunda molécula reticulable o polímero debe tener al menos dos grupos reticulables capaces de formar reticulaciones con los restos reticulables del polisacárido modificado.

25 Pueden incorporarse proteínas, oligonucleótidos o agentes farmacéuticos en la composición reticulada. En algunos casos, la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico se incorpora poniendo en remojo las composiciones reticuladas en una disolución que contiene la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico. En otros casos, la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico puede estar presente en una disolución que contiene polisacárido modificado no reticulado, con o sin una segunda molécula reticulable. La composición se reticula entonces, por ejemplo, por fotorreticulación, para formar una composición reticulada que incluye la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico.

30 En realizaciones a modo de ejemplo, el polisacárido modificado es una molécula de dextrano modificada, y la segunda molécula reticulable se basa en poli(etilenglicol), por ejemplo, diacrilato de poli(etilenglicol) (PEGDA).

35 La preparación de hidrogeles basados en dextrano se ilustra usando hidrogeles de Dex-Al/PEGDA, como se muestra más adelante en la **Figura 1**. El objetivo de esta etapa era preparar los hidrogeles basados en dextrano mediante la fotorreticulación de precursores basados en dextrano y PEGDA, usando una lámpara de UV de onda larga (365 nm). Se introdujo un precursor de polímero sintético para hacer que se produjeran tanto polímeros sintéticos como naturales en un único hidrogel resultante, obteniéndose así propiedades ajustables. Entre los precursores de polímero sintético, PEG se ha empleado ampliamente para muchas aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades anfífilas, biocompatibles, pero no biodegradables, únicas. Aunque PEG no es biodegradable, puede ser fácilmente eliminado del cuerpo por el riñón e hígado, haciéndolo así más adecuado para aplicaciones biomédicas. Además, el PEG se ha empleado para mejorar la biocompatibilidad (Zhang et al., Biomaterials, 2002, vol. 23, p. 2641-2648), para aumentar la bioactividad (Muslim et al., Carbohydr. Polym., 2001, vol. 46, p. 323-330) y para reducir la inmunogenicidad (Hu et al., Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2002, vol. 34, p. 396-402).

40 El incluir un polímero sintético, tal como poli(etilenglicol), en la composición reticulada proporciona la capacidad de ajustar las propiedades del hidrogel resultante. Las propiedades ajustables incluyen propiedades mecánicas, tales como el hinchamiento y el módulo del hidrogel. Otras propiedades influidas por el tipo de polímero sintético incluyen la densidad de reticulación y el perfil de liberación de cualquier proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico incorporado.

45 Las propiedades de la composición reticulada pueden variarse variando los componentes de la composición, usando un polisacárido modificado diferente, o cambiando el grado de sustitución de uno o más sustituyentes en el polisacárido modificado. Otras propiedades pueden ajustarse variando el tamaño del polisacárido, o el tamaño del segundo compuesto o polímero reticulable.

50 De la descripción anterior será evidente que pueden hacerse variaciones y modificaciones a la invención descrita en el presente documento para adaptarla a los diversos usos y condiciones. Tales realizaciones también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

55 La citación de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye definiciones de esa variable como cualquier elemento individual o combinación (o subcombinación) de elementos

enumerados. La citación de una realización en el presente documento incluye esa realización como cualquier realización individual o en combinación con cualquier otra realización o porciones de la misma.

Los términos enumerados en singular también incluyen múltiples, a menos que el contexto indique de otro modo.

Los ejemplos desvelados a continuación se proporcionan para ilustrar la invención, pero no para limitar su alcance. Otras variantes de la invención serán rápidamente evidentes para un experto habitual en la materia y están englobadas por las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, bases de datos y patentes citadas en el presente documento se incorporan por este documento por referencia para todos los fines.

Métodos de preparación, caracterización y uso de los compuestos de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos. Los materiales de partida se preparan según procedimientos conocidos en la técnica o como se ilustra en el presente documento. Los siguientes ejemplos se proporcionan de manera que la invención pueda ser más completamente entendida. Estos ejemplos son ilustrativos solo y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ningún modo.

## EJEMPLOS

### *Materiales*

Se compraron dextrano (Dex, MW 70.000), isocianato de alilo (AI) y ácido cloroacético (AC) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). El dextrano se secó en una estufa de vacío durante 24 horas a 50 °C antes de uso. Se compraron sulfóxido de dimetilo (DMSO), dilaurato de dibutilestaño (DBTDL), bromhidrato de 2-bromoetilamina (BEAHB), trietilamina, anhídrido maleico (AM), cloruro de acrilóilo, PEG (MW 4.000) y otros productos químicos de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), y se secaron en una estufa de vacío durante 24 horas a temperatura ambiente antes de uso. Se obtuvo 2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona de Ciba Specialty Chemicals Corporation (Tarrytown, NY). Se compró albúmina de suero bovino (BSA; MW 69.000) de Sigma Chemical Company. Se compró ciclohexano de Fischer Scientific (Fairlawn, NJ).

### *Estadística*

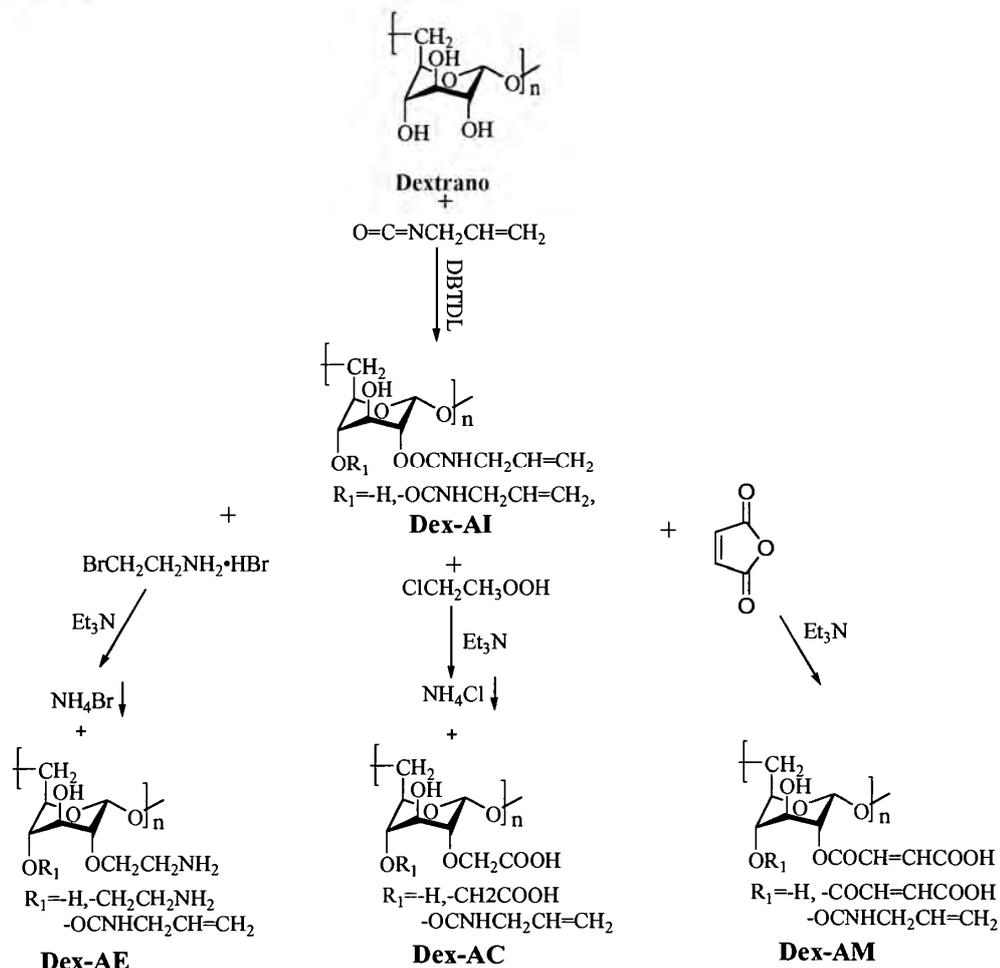
Todas las mediciones de las propiedades del hidrogel - que incluyen hinchamiento, degradación, biocompatibilidad y liberación - se realizaron en muestras por duplicado con lecturas por duplicado para cada punto de datos. Las pruebas mecánicas se realizaron en muestras por triplicado con lecturas por triplicado para cada punto de datos. Se realizaron pruebas a posteriori de Bonferroni y pruebas de ANOVA bilaterales paramétricas cuando corresponda (GraphPad Prism 4.02, GraphPad Software, San Diego, CA). Los niveles de significancia se determinaron usando pruebas a posteriori entre Dex-AI y cada una de sus modificaciones, y se establecieron en: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ . Se informan todos los datos gráficos.

## EJEMPLO 1

### *Síntesis de macrómeros de dextrano*

La síntesis de macrómeros de dextrano implicó dos etapas, como se muestra en el Esquema 1, para polisacárido modificado a modo de ejemplo. Puede prepararse polisacárido modificado adicional de una manera similar.

## ESQUEMA 1



La primera etapa fue la incorporación de AI en el dextrano (para formar Dex-AI), seguido de acoplamiento adicional de Dex-AI con BEAHB (para formar Dex-AE), AC (para formar Dex-AC) y AM (para formar Dex-AM). Se sintetizó Dex-AI y se caracterizó según métodos publicados (Zhang et al. "Synthesis and Characterization of Biodegradable Hydrophobic-Hydrophilic Hydrogel networks with Controlled Swelling Property", J. Polym. Sci. Polym. Chem., 2000, vol. 38, pp 2392-2404). Brevemente, se injertó AI sobre dextrano en presencia de catalizador de DBTDL. Primero se disolvió dextrano previamente secado (por ejemplo, 3 g) en DMSO anhidro bajo gas nitrógeno seco. Entonces se inyectó el catalizador de DBTDL (1,01 ml) en la disolución, y se añadió gota a gota AI (1,64 ml) a la disolución anterior. La reacción se llevó a cabo durante cinco horas a 30 °C. El polímero resultante se precipitó en exceso de isopropanol frío. El producto se purificó adicionalmente por disolución y precipitación en DMSO e isopropanol, respectivamente. Este Dex-AI resultante se dializó entonces (corte de peso molecular [MWCO]: 1000 Da) contra agua destilada durante tres días, se liofilizó durante tres días adicionales y se guardó a 4 °C en la oscuridad para uso adicional.

Se introdujeron tres moléculas diferentes en Dex-AI. En la preparación de Dex-AE, Dex-AC y Dex-AM, Dex-AI reaccionó con BEAHB, AC y AM, respectivamente. Por ejemplo, se sintetizó Dex-AC en presencia de trietilamina. Se disolvió Dex-AI previamente secado (3,0 g) en DMSO anhidro bajo una atmósfera de nitrógeno. Entonces se inyectó trietilamina (2,6 ml) en la disolución anterior. Mientras tanto, se disolvió AC (1,8 g) en DMSO anhidro y entonces se añadió gota a gota a la disolución anterior. Esta disolución de reacción se agitó durante cinco horas a 30 °C. El polímero Dex-AC resultante se obtuvo precipitando en alcohol isopropílico frío. El producto se purificó adicionalmente al menos tres veces por disolución y precipitación con DMSO y alcohol isopropílico frío, respectivamente. El Dex-AC resultante se dializó (MWCO: 1000 Da) contra agua destilada durante tres días y se liofilizó durante tres días adicionales. Dex-AE y Dex-AM se prepararon similarmente. También se preparó Dex-AE por Sun et al. (Carbohydr. Polym. 2006, vol. 65, pp. 273-287).

#### Caracterización química

Se caracterizaron dextrano, Dex-AI, Dex-AE, Dex-AM y Dex-AC para su estructura química por FTIR y RMN  $^1H$  (Figura 11). Para la caracterización por FTIR, todas las muestras se secaron en una estufa de vacío durante al menos 24 horas, y la recogida se realizó en un Nicolet Magna 560 FTIR (Nicolet, Madison, WI) con un accesorio

MIRacle ATR (Pike, Madison, WI). Para el análisis de RMN  $^1\text{H}$ , las muestras se disolvieron en DMSO deuterado (DMSO- $d_6$ ) a una concentración del 25 por ciento (peso/volumen) y sus espectros se registraron en un espectrómetro Varian INOVA 400 MHz (Palo Alto, CA). El pico de DMSO a 2,50 ppm se usó como la línea de referencia.

## 5 Resultados

Se introdujeron diferentes grupos funcionales mediante la reacción de dextrano (70 KDa) con un compuesto que tiene restos reticulables, por ejemplo AI, AC, AM y BEAHB (para formar el grupo funcional AE), en dos etapas básicas: la incorporación de AI, seguido de la incorporación de restos amina (Dex-AE) o ácido carboxílico (Dex-AC y Dex-AM). El **Esquema 1** resume esta estrategia de síntesis. Se hizo reaccionar dextrano con AI (Dex-AI) en presencia de catalizador de dilaurato de dibutilestano (DBTDL). Los grupos hidroxilo sin reaccionar en Dex-AI permitieron la reacción con bromhidrato de 2-bromoetilamina (BEAHB), ácido cloroacético (AC) y anhídrido maleico (AM) para formar Dex-AE, Dex-AC y Dex-AM, respectivamente. Se compararon los espectros de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) del dextrano con los de Dex-AI, Dex-AE, Dex-AM y Dex-AC (**Figura 11A**) y revelaron las típicas bandas de absorción de doble enlace a  $1645\text{ cm}^{-1}$ . Esto confirmó que los dobles enlaces C=C se incorporaron satisfactoriamente en el dextrano. Los picos a  $1708\text{ cm}^{-1}$  y  $1538\text{ cm}^{-1}$ , los picos característicos de la amida I y la amida II de grupos uretano de Dex-AI, se desplazan en los espectros de Dex-AE, Dex-AM y Dex-AC cuando estas tres moléculas se incorporan. El pico a  $3420\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al grupo OH del dextrano, pero se desplazó a  $3386\text{ cm}^{-1}$  cuando se introdujo AI. Este pico también se desplazó a medida que se introdujeron las otras moléculas. La **Figura 11B** muestra los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN  $^1\text{H}$ ) de los diferentes macrómeros. El pico de resonancia característico a 4,68 ppm fue el protón anomérico, que no tuvo reactividad y no cambió durante ninguna reacción de macrómeros, mientras que los otros tres picos adyacentes, de 4,49 a 4,91 ppm, se asignaron a los tres protones hidroxilo de unidades de repetición de dextrano, y estos picos cambiaron con cada modificación adicional. Los picos del grupo terminal vinilo de todos los derivados de dextrano aparecieron a 5,76 ppm y de 4,99 a 5,15 ppm. Tanto FTIR como RMN confirmaron la modificación química de los macrómeros de dextrano diseñados.

## EJEMPLO 2

### *Síntesis de diacrilato de poli(etilenglicol) (PEGDA)*

Se sintetizó PEGDA como se describe previamente (Sun et al., Carbohydr. Polym. 2006, vol. 65, pp. 273-287). Brevemente, se disolvió PEG previamente secado (8,0 g) en benceno anhidro bajo una atmósfera de nitrógeno a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron trietilamina (1,19 ml) y cloruro de acrilóilo (0,81 ml). La mezcla de reacción se agitó durante dos horas a temperatura ambiente y a continuación se aumentó a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . El polímero resultante se precipitó en hexano. Se purificó adicionalmente tres veces por disolución y precipitación con benceno y hexano, respectivamente. Entonces, el PEGDA se dializó (MWCO: 1000 Da) contra agua destilada durante tres días y a continuación se dializó durante tres días.

## 35 EJEMPLO 3

### *Preparación de hidrogel de Dex/PEGDA*

Para explorar el efecto de diferentes derivados sobre las propiedades del hidrogel, se examinaron tres relaciones diferentes de Dex/PEGDA: baja (20/80), media (40/60) y alta (60/40). La preparación se ilustra usando Dex-AI/PEGDA en la **Figura 1A**. Se disolvieron los diferentes macrómeros de dextrano modificados y PEGDA a diferentes relaciones (como se ha descrito anteriormente) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,5 por ciento (peso/peso) de 2-metil-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959,12959, Ciba). La mezcla se pipeteó en un molde estéril (volumen de 50  $\mu\text{l}$  por pocillo, para obtener discos que medían 4 mm de diámetro x 2 mm de espesor), y se fotopolimerizó (aproximadamente  $10\text{ mW/cm}^2$  de luz UV durante diez minutos; BlakRay). Los hidrogeles resultantes se lavaron en agua destilada durante 24 horas para eliminar los precursores sin reaccionar antes de la caracterización adicional. En comparación con el método previo (Sun et al., Carbohydrate Polymers, 2006; vol. 65, no. 3, pp. 273-287), que necesita 16-20 horas para formar geles completos, este método mejorado es más adecuado para aplicaciones de ingeniería de tejidos (Ferreira et al., Biomaterials, 2007, vol. 28, no. 17, pp. 2706-2717; Gerech et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2007, vol. 104, no. 27, pp. 11298-11303).

La **Figura 1B** muestra la conversión (% en peso) de cada tipo de hidrogeles sintetizados que disminuyeron con el aumento en los derivados de dextrano en las relaciones alimentadas de hidrogel. Por ejemplo, la conversión de Dex-AI/PEGDA disminuyó del 93,52 % al 82,21 % cuando Dex-AI aumentó del 20 % al 60 %. Esta reducción de la conversión podría atribuirse a la menor reactividad de los dobles enlaces (C=C) en derivados de dextrano que aquellos en PEGDA (Sun et al., Carbohydrate Polymers, 2006; vol. 65, no. 3, pp. 273-287; Guo et al., K, Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry, 2005, vol. 43, no. 17, pp. 3932-3944, y así el aumento en el derivado de dextrano condujo a una disminución de la conversión. Las conversiones de hidrogeles de Dex-AE/PEGDA muestran resultados similares a los resultados publicados previos (Sun et al., Carbohydrate Polymers, 2006; vol. 65, no. 3, pp. 273-287), pero sus conversiones son inferiores a las de los otros tres hidrogeles a las mismas relaciones. De forma interesante, la adición adicional de dobles enlaces en Dex-AI, es decir, Dex-AM, no aumenta la conversión. El

aumento del grado de sustitución de dobles enlaces no afecta la estructura del gel significativamente, sino que solo cambia la velocidad de gelación (Sun et al., Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2009, vol. 20, no. 14, pp. 2003-2022). En este caso, la adición de doble enlace incorporando anhídrido maleico no aumenta la conversión tampoco. Como todos los hidrogeles se preparan en el mismo tamaño de moldes, la conversión más baja a relación de alimentación más alta dará lugar a una estructura de red suelta.

#### EJEMPLO 4

##### *Estudio de hinchamiento de hidrogeles de Dex/PEGDA*

Se determinó gravimétricamente la relación de hinchamiento de hidrogeles basados en dextrano. Se sumergieron especímenes de hidrogel previamente secado en agua destilada a temperatura ambiente. Los hidrogeles hinchados se sacaron del agua a intervalos predeterminados y se pesaron después de quitar el exceso de agua de la superficie con un papel de filtro húmedo. Entonces se calculó la relación de hinchamiento según la siguiente fórmula:

$$\text{Relación de hinchamiento} = ((W_{s,t} - W_d) / W_d) \times 100 \% \quad (1)$$

en la que  $W_d$  es el peso de hidrogeles secos, y  $W_{s,t}$  es el peso de hidrogeles hinchados en el tiempo t. Se supuso que los hidrogeles alcanzaron un estado de equilibrio de hinchamiento cuando no hubo diferencia en la relación de hinchamiento entre dos intervalos adyacentes.

El hinchamiento de todos los hidrogeles alcanzó el equilibrio a aproximadamente diez horas, mientras que diferencias significativas en los volúmenes de hinchamiento se observaron como contenido de dextrano elevado (**Figura 2A(i-iii)**). El máximo volumen de hinchamiento aumentó con contenido de dextrano creciente (**Figura 2A(iv)**). Los análisis de ANOVA bilateral revelaron que el progreso del hinchamiento con el tiempo dependió significativamente de la modificación del esqueleto de dextrano a medida que aumentó el contenido de dextrano en hidrogeles de Dex-AI/PEGDA, Dex-AM/PEGDA y Dex-AC/PEGDA ( $p < 0,001$ ).

#### EJEMPLO 5

##### *Biodegradación enzimática de hidrogeles de Dex/PEGDA*

Se prepararon muestras de hidrogel ( $n=2$ ) como se ha descrito anteriormente, se pesaron y se incubaron en tampón PBS (pH=7,4) con dos concentraciones de dextranasa (0,5 unidad/ml y 5,0 unidad/ml) a 37 °C durante 24 horas. Las muestras de hidrogel se sacaron de las disoluciones, se lavaron con agua destilada y se liofilizaron en una secadora FreeZone (2,5 l; Labconco, Kansas City, MO) a -48 °C durante tres días y se pesaron. El grado de biodegradación se estimó a partir de la pérdida de peso del polímero basándose en la siguiente ecuación:

$$W_1 = ((W_o - W_d) / W_o) \times 100 \% \quad (2)$$

en la que  $W_o$  es el peso original de las muestras de hidrogel, y  $W_d$  es el peso de muestras de hidrogel secas después de degradarse durante 24 horas.

El estudio enzimático reveló que todos los materiales de hidrogel fueron degradables a velocidades más rápidas a media que aumentaba el contenido de dextrano (**Figura 2B**). Se observaron pequeñas diferencias o diferencias no significativas en las velocidades de degradación de diferentes modificaciones de dextrano a la misma relación de Dex/PEGDA. Los análisis de ANOVA bilateral revelaron que las velocidades de degradación del hidrogel fueron independientes de la modificación química ( $p > 0,05$ ).

#### EJEMPLO 6

##### *Estudio mecánico de hidrogeles de Dex/PEGDA*

Se determinaron las propiedades mecánicas de las muestras de hidrogel ( $n=3$ ) usando un Q800 Dynamic Mechanical Analyzer (TA Instruments, New Castle, DE) en modo de compresión por inmersión no confinada. Brevemente, se determinó el diámetro de cada disco de hidrogel hinchado usando un compás calibrador digital, y la muestra se sumergió en un baño de PBS entre placas de compresión paralelas no confinadas. Las muestras de hidrogel se comprimieron a una velocidad del 10 por ciento de espesor/min hasta el fallo o hasta que alcanzaron el 60 por ciento de su espesor inicial. El módulo se calculó entonces como la relación de la curva de tensión-deformación a baja deformación (<25 por ciento de deformación), es decir, la porción lineal de la curva.

El módulo de los hidrogeles de Dex/PEGDA disminuyó con un aumento en las relaciones de Dex/PEGDA (**Figura 3A**). Se encontró que los hidrogeles a relaciones 20/80 de Dex/PEGDA tenían un mayor módulo. Sin embargo, cuando el macrómero de dextrano en el componente de hidrogel aumentó al 60 por ciento, se observó una espectacular disminución en el módulo de Dex-AE/PEGDA y Dex-AM/PEGDA. Por ejemplo, el aumentar el contenido de Dex-AI en el hidrogel del 20 al 40 por ciento y luego hasta el 60 por ciento produjo una reducción del módulo del 23,6 por ciento y del 48,3 por ciento, respectivamente, mientras que se observaron reducciones del módulo del 54,1 por ciento y del 87,7 por ciento con contenido de Dex-AE elevado en los hidrogeles.

EJEMPLO 7

*Determinación de la densidad de reticulación*

La densidad de reticulación de los hidrogeles hinchados se evaluó usando métodos establecidos (Guo et al., Biomaterials 2007, vol. 28, pp. 3284-3294; Peppas et al., J. Biomed. Mater. Res., 1985, vol. 19, pp. 397-411). El peso molecular promedio entre reticulaciones ( $M_c$ ) puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$\overline{M_c} = \frac{3 \rho_p RT}{E} (v_{2,s})^{1/3} \quad (3)$$

en la que  $\rho_p$  es la densidad de polímeros, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta,  $v_{2,s}$  es la fracción de volumen del polímero en el estado hinchado y E es el módulo elástico. La densidad de reticulación ( $\rho_x$ ) se define como:

$$\rho_x = \frac{\rho_p}{M_c} \quad (4)$$

De (3) y (4), la densidad de reticulación se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho_x = \frac{E}{3RT} (v_{2,s})^{-1/3} \quad (5)$$

La fracción de volumen del polímero ( $v_{2,s}$ ) se calculó como se ha informado antes (Guo et al., Biomaterials 2007, vol. 28, pp. 3284-3294; Peppas et al., J. Biomed. Mater. Res., 1985, vol. 19, pp. 397-411):

$$v_{2,s} = \frac{W_{a,d} - W_{c,d}}{W_{a,s} - W_{c,s}} \quad (6)$$

en la que  $W_{a,d}$  y  $W_{c,d}$  son el peso del hidrogel secado en aire y ciclohexano, respectivamente, mientras que  $W_{a,s}$  y  $W_{c,s}$  son el peso del hidrogel en aire y ciclohexano después de haberse hinchado en agua, respectivamente. Entonces, la densidad de reticulación puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho_x = \frac{E}{3RT} \times \left( \frac{W_{a,d} - W_{c,d}}{W_{a,s} - W_{c,s}} \right)^{1/3} \quad (7)$$

Utilizando datos del módulo y del hinchamiento, la densidad de reticulación de los hidrogeles de Dex/PEGDA se calculó como se ha demostrado previamente (N.A. Peppas y H.J. Moynihan, 1985; K. Guo y C.C. Chu, 2007). Los presentes inventores encontraron que la densidad de la estructura de red disminuyó con el aumento del contenido de dextrano. Además, a la relación 60/40 de Dex/PEGDA se mostró que Dex-AI/PEGDA y Dex-AC/PEGDA tenían estructura de red que era significativamente más densa que Dex-AE/PEGDA y Dex-AM/PEGDA (**Figura 3B**).

EJEMPLO 8

*Biocompatibilidad de hidrogeles de Dex/PEGDA*

*In vitro*: Se detectó la proliferación celular tanto por recuento diario de células como usando el kit XTT (Sigma), según las instrucciones del fabricante y como se ha demostrado previamente (Gerecht et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, vol. 104, pp. 11298-11303; Gerecht et al., Biomaterials, 2007, vol. 28, pp. 4826-4835). Brevemente, se cultivaron células endoteliales (EC) (línea C166) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en presencia de disolución de macrómero (10 µl/ml de medio de cultivo) y se contaron diariamente o se incubaron durante cuatro horas en medio que contenía disolución al 20 por ciento (v/v) de {hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio} (XTT). Para el análisis, se tomaron 150 µl del medio, se dispusieron en una placa de 96 pocillos y se leyeron en un lector de microplacas a 450 nm.

*Resultados in vitro*: Con el fin de explorar las oportunidades de usar los hidrogeles basados en dextrano recientemente desarrollados en aplicaciones biomédicas, fue importante evaluar cualquier toxicidad del macrómero de dextrano modificado. Como las moléculas de precursor no pueden formar completamente hidrogeles durante la fotorreticulación, algunos residuos de precursor quedan dentro de los geles. Los macrómeros sin reaccionar pueden liberarse durante el hinchamiento. Se investigó la toxicidad que puede resultar de la presencia de macrómero de dextrano libre. Se subcultivó la línea de células endoteliales (EC) C166 y se propagó en una placa de Petri en medio de crecimiento que contenía disolución de macrómero con el mayor contenido de dextrano (es decir, una relación 60/40 de Dex/PEGDA). Después de 24 horas, las EC se unieron y se propagaron bajo todas las condiciones; sin

embargo, se observó un bajo número de EC en el medio que contenía el macrómero de Dex-AM/PEGDA (**Figura 4A**). La comparación de las velocidades de proliferación revelaron efectos tóxicos del macrómero de Dex-AM/PEGDA, mientras que la velocidad de proliferación celular en medio que contenía Dex-AI/PEGDA, Dex-AE/PEGDA y Dex-AC/PEGDA fue indistinguible de aquella en los medios de control (**Figura 4B**).

5 *In vivo*: Se prepararon hidrogeles de Dex/PEGDA en forma de un disco (2 mm de espesor x 4 mm de diámetro) bajo condiciones estériles. Se alojaron ratas Lewis hembra (n=2) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) que pesaban 200 a 250 g por separado y tuvieron acceso a agua y comida a voluntad. Los animales se cuidaron según los protocolos autorizados del Comité sobre el Cuidado de Animales de la Universidad Johns Hopkins, en conformidad con las pautas del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (publicación del NIH #85-23, revisada 1985). Los animales se anestesiaron usando inhalación continua de 2 por ciento de isoflurano/O<sub>2</sub>. Se realizaron dos implantaciones de muestra por momento de tiempo. Se hicieron tres pequeñas incisiones de la línea media en el dorso de la rata, y los implantes se introdujeron en bolsillos subcutáneos laterales creados por disección roma. Todos los animales continuaron con buena salud general durante todo el estudio, como se evalúa por su aumento de peso. En cada momento de tiempo predeterminado (1 y 3 semanas), las ratas se sacrificaron, y los andamiajes implantados se eliminaron en bloque con el tejido circundante (aproximadamente 10 x 10 mm). Las muestras se fijaron y se procesaron para histología como se describe más adelante.

Se fijaron explantes de hidrogel de Dex/PEGDA con Accustain (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 24 horas, se deshidrataron en etanol graduado (70 al 100 por ciento), se incorporaron en parafina, se seccionaron en serie usando un micrótopo (4 µm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

20 *Resultados in vivo*: Para investigar la biocompatibilidad de los hidrogeles de Dex/PEGDA recientemente desarrollados por los presentes inventores, los presentes inventores prepararon hidrogeles de Dex-AI/PEGDA, Dex-AE/PEGDA y Dex-AC/PEGDA (se excluyeron hidrogeles de Dex-AM/PEGDA debido a su alta toxicidad *in vitro*), y se implantaron por vía subcutánea en ratas durante hasta tres semanas. Como algunos de los hidrogeles de Dex/PEGDA a altos niveles de contenido de dextrano (es decir, a la relación 60/40) son muy blandos (como se indica por los resultados del módulo mostrados anteriormente), los experimentos usaron la relación media de Dex/PEGDA (es decir, 40/60) a la que los hidrogeles son manejables para fines de trasplante. En los tres hidrogeles, los presentes inventores observaron una reacción de cuerpos extraños con una densa capa de macrófagos, y varias células gigantes multinucleadas adyacentes a los hidrogeles seguidas inmediatamente por una capa de granulación mediada por colágeno suelta (**Figura 4C**). Los tres hidrogeles mostraron espesor de capa de granulación decreciente después de tres semanas (**Figura 4C**), que indica que estos hidrogeles no tienen efecto adverso sobre el tejido local en el proceso de cicatrización. Sin embargo, se observó una aumentada respuesta inflamatoria una semana después de la implantación de los hidrogeles de Dex-AC/PEGDA y, a un menor grado en los hidrogeles de Dex-AI/PEGDA y de Dex-AE/PEGDA, como se ha determinado por un mayor número de macrófagos presentes en la capa (**Figura 4D(i-iii)**). La elevada respuesta inflamatoria en los hidrogeles de Dex-AC/PEGDA observada en la semana uno se observó en el momento de tiempo de tres semanas (**Figura 4D(iv)**). Se observaron un gran número de vasos sanguíneos dilatados presentados en la capa de granulación, que indica una respuesta de curación activa en todos los hidrogeles (**Figura 4E**). En general, la reacción de cuerpos extraños para todos los hidrogeles de Dex/PEGDA durante un periodo de tres semanas es similar a la previamente informada para materiales biocompatibles (Wang et al., Nat Biotech., 2002, vol. 20, no. 6, pp. 602-606; Wang et al., J. Biomed Mater Res A, 2003, vol. 66A, no. 1, pp. 192-197).

En general, la zona activa mostró una disminución de la respuesta inflamatoria para todos los hidrogeles de Dex/PEGDA durante un periodo de tres semanas, similar a la previamente informada para materiales biocompatibles (Wang et al., Nat. Biotechnol., 2002, vol. 20, pp. 602-606; Wang et al., Biomed Mater. Res. A, 2003, vol. 66, 192-197). La respuesta inflamatoria de hidrogeles basados en Dex-AI y Dex-AE en todos los momentos de tiempo fue similar a la previamente informada para PLGA y PGS (Wang et al., Nat. Biotechnol., 2002, vol. 20, pp. 602-606; Wang et al., Biomed. Mater. Res. A, 2003, vol. 66, 192-197), que se sabe que son altamente biocompatibles.

#### EJEMPLO 9

##### *Estudios de liberación de VEGF<sub>165</sub>*

50 Se prepararon muestras de hidrogel como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3, excepto que la forma de 165 aminoácidos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF<sub>165</sub>) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se mezcló con macrómero (1 µg/100 µl) en el molde antes de la fotopolimerización, produciendo una concentración de VEGF final de 20 ng por 1 mg de gel seco. La disolución se irradió entonces con UV durante diez minutos para permitir que se formara el gel. Los geles se sacaron cuidadosamente del molde, se sumergieron en 2,0 ml de PBS y se incubaron a 37 °C. En intervalos predeterminados, se recogieron 400 µl de la disolución de PBS y se añadieron de nuevo 400 µl de disolución de PBS de blanco en el medio de inmersión para mantener el volumen de disolución total a 2,0 ml. Las muestras se almacenaron a -80 °C antes de realizarse el análisis de ELISA (Pierce Biotechnology) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se capturó VEGF<sub>165</sub> en los patrones y muestras del kit de ELISA sobre la microplaca recubierta con anticuerpo anti-VEGF<sub>165</sub> humano. Después de eliminar las proteínas no unidas, se añadió reactivo de anticuerpo biotinilado para unirse al sitio secundario sobre VEGF<sub>165</sub>. Entonces, para producir una señal colorimétrica, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante para unirse a TMB. Se prepararon

patrones según las instrucciones del fabricante. El lavado de la placa se realizó tres veces entre cada etapa para eliminar cualquier reactivo en exceso. La señal colorimétrica se detectó usando un espectrofotómetro de microplacas de UV (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a longitudes de onda de absorbancia de 450 nm y 550 nm. La curva patrón se interpoló para determinar la cantidad de VEGF<sub>165</sub> en cada momento de tiempo predeterminado. Los resultados se presentan en términos de la liberación acumulada en función del tiempo:

$$\text{Liberación acumulada (\%)} = \left( \sum_{i=0}^{t-1} M_i / M_{\infty} \right) \times 100 \quad (8)$$

en la que

$$\sum_{i=0}^{t-1} M_i$$

es la cantidad acumulada de VEGF liberado del hidrogel en el tiempo  $t$ , y  $M_{\infty}$  es la cantidad inicial de VEGF cargado en el hidrogel.

#### Resultados

En estos estudios, VEGF mostró dos patrones de liberación distintos (**Figura 5A**). Dex-AE/PEGDA mostró una liberación rápida obvia, en la que aproximadamente el 20 por ciento del VEGF se liberó durante las primeras 24 horas, seguido de una liberación continua de cantidades más pequeñas. Sin embargo, los presentes inventores encontraron que los perfiles de liberación de VEGF de los hidrogeles de Dex-AI/PEGDA, Dex-AC/PEGDA y de Dex-AM/PEGDA fueron similares, sin pruebas de liberación rápida; en estos hidrogeles, solo aproximadamente el 3 por ciento del VEGF se liberó dentro de las primeras 24 horas. Este resultado fue inesperado basándose en los resultados previos con hidrogeles de Dex-AE/PEGDA. Las propiedades estructurales de Dex-AE/PEGDA, que tiene la mayor velocidad de hinchamiento, el módulo más bajo y la densidad de reticulación más baja, proporcionan una posible explicación de este efecto.

El hinchamiento/difusión y la degradación son los principales mecanismos de liberación del fármaco para hidrogeles biodegradables. El mecanismo de liberación basado en la biodegradación sería más importante debido a que el hinchamiento/difusión solo no podría liberar completamente fármacos de molécula grande de hidrogeles. Para evaluar si la liberación de VEGF de Dex-AE tiene posibilidades de futura aplicación biomédica, los presentes inventores probaron Dex-AE/PEGDA y Dex-AE/PEGDA que libera VEGF usando trasplante subcutáneo como se ha descrito anteriormente.

La **Figura 5B** muestra el estudio subcutáneo hasta 7 semanas a bajo aumento. El hidrogel cargado con VEGF mostró crecimiento hacia adentro de tejido distinto en 5 semanas, mientras que el hidrogel solo no mostró tal crecimiento hacia adentro de tejido. Esto indica que VEGF puede promover el crecimiento hacia adentro de tejido, y el crecimiento hacia adentro de tejido facilitará adicionalmente la degradación del hidrogel.

Después de una semana desde la implantación, se observó la invasión de macrófagos al hidrogel de Dex-AE/PEGDA que libera VEGF a alto aumento (**Figura 5C**). Después de siete semanas desde la implantación, hubo de poco a ningún tejido de granulación evidente en tanto Dex-AE/PEGDA como Dex-AE/PEGDA que libera VEGF; ambos mostraron una capa muy fina de macrófagos rodeando inmediatamente el gel, sugiriendo que el proceso de curación del tejido circundante está completo (**Figura 5D**). El hidrogel fragmentado se engulló con macrófagos y se observaron vasos sanguíneos después de siete semanas desde la implantación de los hidrogeles de Dex-AE/PEGDA que liberan VEGF, que indica crecimiento hacia adentro de tejido y degradación del hidrogel (**Figura 5E**).

#### EJEMPLO 10

Un problema importante de otros hidrogeles de dextrano son la lenta degradación y menos crecimiento hacia adentro de tejido. El descubrimiento de que los hidrogeles que tienen demasiada densidad de reticulación retardan la degradación y la penetración de tejido puede explicar este problema. Un segundo problema es el límite a la cantidad de dextrano que puede usarse para formar un hidrogel estable, limitando la velocidad y el grado de degradación. Previamente, solo se formaron hidrogeles estables a relaciones de dextrano/PEGDA entre 70/30 y 0/100 (Sun et al., Carbohydrate Polymers, 2006; vol. 65). En este estudio, se examinaron hidrogeles recientemente preparados que tenían Dex-AE y PEGDA a tres relaciones diferentes de Dex-AE/PEGDA: baja (40/60), media (60/40) y alta (80/20). Los nuevos Dex-AE tienen grado de sustitución mucho más bajo de grupos isocianato de alilo, que incorporan dobles enlaces y proporcionan los sitios de reticulación. Se encuentran diferencias en las propiedades físicas y biológicas de los hidrogeles, que incluyen hinchamiento, mecánica, liberación de factor de crecimiento endotelial vascular y formación vascular *in vivo*.

*Síntesis de macrómeros de dextrano que tienen bajo grado de sustitución*

Se inyectó dextrano seco (por ejemplo, 3,0 g) disuelto en DMSO anhidro (30 ml) bajo gas nitrógeno seco. Se inyectó catalizador de DBTDL (0,1 ml) en la disolución gota a gota, y entonces se añadió gota a gota AI (0,16 ml). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante 6 horas. El polímero resultante se precipitó en exceso de isopropanol frío. El producto se purificó adicionalmente por disolución y precipitación en DMSO e isopropanol, respectivamente. El grado de sustitución (DS, el número de grupos de sustitución por unidad de anhidroglucosa) de AI obtenido bajo esta condición es 0,09, como se ha determinado por RMN.

Para sintetizar Dex-AE, el Dex-AI preparado anteriormente se hizo reaccionar adicionalmente con bromhidrato de 2-bromoetilamina (BEAHB) en presencia de trietilamina. Se disolvió Dex-AI seco (2,0 g) en DMSO anhidro (24 ml) bajo gas nitrógeno seco. Se inyectó trietilamina (11,2 ml) en la disolución anterior. Se disolvió BEAHB (3,75 g) en DMSO (10 ml) y a continuación se añadió a la disolución anterior gota a gota. Esta disolución de reacción se agitó a 50 °C durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró entonces para eliminar el Et<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>Br precipitado. El polímero de Dex-AE resultante se obtuvo precipitando la disolución filtrada en exceso de alcohol isopropílico frío. El producto se purificó adicionalmente al menos 3 veces por disolución y precipitación en DMSO y alcohol isopropílico frío, respectivamente. El producto final se secó a temperatura ambiente a vacío durante la noche antes del uso adicional. El Dex-AE resultante se dializó (MWCO: 1000 Da) contra agua destilada durante siete días y se liofilizó durante tres días adicionales.

#### EJEMPLO 11

##### *Preparación de hidrogel de Dex/PEGDA*

Se disolvieron los diferentes macrómeros de dextrano modificados y PEGDA a diferentes relaciones (como se ha descrito anteriormente) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,1 % (peso/peso) de 2-metil-1-[4-(hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959, I2959, Ciba). La mezcla se pipeteó en un molde estéril (80 µl de volumen por pocillo, para obtener discos que medían 4 mm de diámetro x 2 mm de espesor), y se fotopolimerizó (aproximadamente 10 mW/cm<sup>2</sup> de luz UV durante diez minutos; BlakRay). Los hidrogeles resultantes se lavaron en agua destilada durante 24 horas para eliminar los precursores sin reaccionar antes de la caracterización adicional.

##### *Hidrogeles que tienen 80 % de dextrano*

Como se ha tratado previamente, son ventajosos los hidrogeles que tienen altas cantidades de polisacárido (es decir, superiores al 80 %). Previamente, sin embargo, solo se formaron hidrogeles sólidos a relaciones de dextrano/PEGDA entre 70/30 y 0/100 (Sun et al., Carbohydrate Polymers, 2006; vol. 65). En este estudio, se examinaron los hidrogeles recientemente preparados que tenían Dex-AE y PEGDA a tres relaciones diferentes de Dex-AE/PEGDA: baja (40/60), media (60/40) y alta (80/20). El bajo grado de sustitución permite la preparación de hidrogeles que tienen 80 % o más de dextrano, como se resume en la Tabla 1 más adelante. Para hidrogeles indicados 1X en la tabla más adelante, Dex-AI se preparó a partir de una relación de peso de dextrano sin modificar e isocianato de alilo de aproximadamente 2:1 a diferentes temperaturas, produciendo diferentes grados de sustitución. Como referencia, Dex-AI con un grado de sustitución de 0,35 en la tabla a continuación se refiere al material preparado en el Ejemplo 1. Dex-AI se modificó adicionalmente con BEAHB para preparar macrómeros de Dex-AE. Cuando se fotopolimerizó con PEGDA (4000 MW) a una relación 80/20, no se formaron hidrogeles en ninguna muestra 1X. Cuando se usaron Dex-AI que tienen grado de sustitución más bajo, se formaron hidrogeles. En la tabla a continuación, 0,5X se refiere a la cantidad relativa de isocianato de alilo usada en la reacción Dex-AI, correspondiente a una relación de peso de dextrano sin modificar con respecto a isocianato de alilo de aproximadamente 4:1 (2:0,5). Asimismo, 0,25X se refiere a una relación de peso de dextrano con respecto a isocianato de alilo de aproximadamente 8:1 (2:0,25). 0,1X se refiere a una relación de peso de aproximadamente 20:1 (2:0,1), que es el mismo Dex-AI descrito en el Ejemplo 10, que tiene un grado de sustitución de 0,09. 0,05X se refiere a una relación de peso de aproximadamente 40:1 (2:0,05).

	0,05X	0,1X	0,25X	0,5X	1X	1X	1X
Temp. de reacción (°C)	30	30	30	30	30	25 <sup>a,b</sup>	45 <sup>b</sup>
DS	<0,05	0,09			0,35	0,25	0,77
80/20	- <sup>1</sup>	+	±	±	- <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>	- <sup>4</sup>
100/0	-	±	-	-	-	-	-

Nota: La concentración de precursor fue 0,1 g/ml; + representa que puede formarse gel en el plazo de 10 min, - representa que no pueden formarse geles, ± representa que puede formarse gel, pero no son como un sólido.

<sup>1</sup> a 80/20, el precursor no formó hidrogeles en el plazo de 10 minutos, pero se forma en 20-30 minutos.

<sup>2,3,4</sup> a 80/20, el precursor no formó hidrogeles incluso a tiempo más largo.

## EJEMPLO 12

*Estudio de hinchamiento de hidrogeles de Dex/PEGDA*

El estudio de hinchamiento determina la capacidad de retención de agua de los hidrogeles. El grado de sustitución de los dobles enlaces es aproximadamente el 25 % de Dex-AE preparado en el Ejemplo 3. Para examinar si tal modificación tiene algún efecto sobre las propiedades de hidrogeles recientemente formados, se probó la capacidad de retención de agua estudiando la relación de hinchamiento de los diferentes hidrogeles de Dex-AE/PEGDA. Se encontró que los hidrogeles alcanzaron el estado de hinchamiento en equilibrio en el plazo de aproximadamente 10 horas, excepto que el hidrogel en la relación de alimentación de 80/20 mostró un ligero aumento en la relación de hinchamiento. El aumento en el componente de Dex-AE en la relación de alimentación condujo a hinchamiento más rápido y mayor (**Figura 6**). En comparación con el material del Ejemplo 3, estos hidrogeles muestran relaciones de hinchamiento mucho mayores. Por ejemplo, para Dex-AE/PEGDA a la relación 60/40, el hinchamiento es del 2100 % mientras que el Dex-AE/PEGDA del Ejemplo 3 tiene una relación de hinchamiento del 1300 %. Este aumento en la relación de hinchamiento es sorprendente en vista de los recientes datos que muestran que no se espera que los cambios en el grado de sustitución de isocianato de alilo tengan un pronunciado efecto sobre el hinchamiento de hidrogeles (Sun et al., Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2009, vol. 20, no. 14, pp. 2003-2022).

Estudios previos muestran que la relación de hinchamiento del hidrogel de Dex-AE/PEGDA está principalmente dominada por sus estructuras. Este aumento de la relación de hinchamiento puede ser atribuible a la estructura relativamente suelta de los hidrogeles recientemente preparados. La disminución en la cantidad de dobles enlaces redujo los sitios de unión, causando la menor densidad de reticulación.

## EJEMPLO 13

*Estudio mecánico de hidrogeles de Dex/PEGDA*

La resistencia mecánica apropiada es crítica para los andamiajes de hidrogel 3D. Es importante hacer algunos andamiajes con un amplio intervalo de resistencia controlable. La **Figura 7** muestra que el aumento en Dex-AE en el componente de alimentación de hidrogel causó la disminución en la resistencia mecánica. Estudios previos revelaron que el aumento en el componente de Dex-AE conduce a densidad de reticulación reducida, y los presentes inventores confirmaron adicionalmente este cambio con diferentes DS de dobles enlaces. En comparación con resultados previos, la tensión mecánica a 40/60 y 60/40 es muy próxima y se aproximan a 13~15 MPa y 4~5 MPa, respectivamente. Obviamente, la disminución en la cantidad de dobles enlaces de Dex-AE no afectó la estructura del hidrogel significativamente. Este resultado puede sugerir que solo una pequeña cantidad de fotorreticulación es necesaria para proporcionar resistencia mecánica. Grados de reticulación mayores normalmente dan lugar a estructuras frágiles, que pueden destruir las propiedades mecánicas. Como se ha tratado previamente, es ventajoso reducir el tiempo de exposición a UV de las composiciones formadoras de hidrogel. Con Dex-AI de bajo grado de sustitución, los hidrogeles sólidos que tienen una relación 80/20 de Dex-AE/PEGDA se formaron en 10 minutos de fotorreticulación.

## EJEMPLO 14

*Liberación del factor de crecimiento*

Se prepararon muestras de hidrogel como se describe en el EJEMPLO 10 anterior, excepto que se mezcló VEGF<sub>165</sub> (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) con macrómero (1 µg/ 100 µl) en el molde antes de la fotopolimerización, produciendo una concentración de VEGF final de 20 ng por 1 mg de gel seco. La disolución se irradió entonces con UV durante diez minutos para permitir que se formara el gel. Los geles se sacaron cuidadosamente del molde, se sumergieron en 2,0 ml de PBS y se incubaron a 37 °C. Al mismo tiempo, se incubó cantidad equivalente de VEGF en un vial separado y su bioactividad se probó a los mismos intervalos predeterminados como prueba acumulada. A intervalos predeterminados, los presentes inventores recogieron 400 µl de la disolución de PBS y añadieron 400 µl de disolución de PBS de blanco de nuevo en el medio de inmersión para mantener el volumen de disolución total a 2,0 ml. Las muestras se almacenaron a -80 °C antes de que los presentes inventores realizaran un análisis de ELISA (Pierce Biotechnology), que los presentes inventores hicieron según las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se capturaron VEGF<sub>165</sub> en los patrones y muestras del kit de ELISA sobre la microplaca recubierta con anticuerpo anti-VEGF<sub>165</sub> humano. Después de eliminar las proteínas no unidas, se añadió reactivo de anticuerpo biotinilado para unirse al sitio secundario sobre VEGF<sub>165</sub>. Entonces, para producir una señal colorimétrica, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante para unirse a TMB. Se prepararon patrones según las instrucciones del fabricante. El lavado de la placa se realizó tres veces entre cada etapa para eliminar cualquier reactivo en exceso. La señal colorimétrica se detectó usando un espectrofotómetro de microplacas de UV (SpectraMax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a longitudes de onda de absorbancia de 450 nm y 550 nm. La curva patrón se interpoló para determinar la cantidad de VEGF<sub>165</sub> en cada momento de tiempo predeterminado. Los resultados se presentan en términos de la liberación acumulada en función del tiempo.

Los factores de crecimiento son importantes reguladores de la vasculogénesis. Sin embargo, la mayoría de los factores de crecimiento perderán sus bioactividades, mientras que el ELISA solo detecta el VEGF biológicamente

activo. Así, en este estudio, los presentes inventores usan el VEGF bioactivo como la referencia real en cada momento de tiempo. La **Figura 8** muestra que VEGF tiene una liberación rápida del hidrogel a la relación 40/60 y 60/40, aproximadamente el 35 % de VEGF se liberó durante las primeras 10 horas, mientras que más del 50 % de VEGF se liberó en el plazo de 96 horas. Sin embargo, el 18 % de VEGF se liberó del material del Ejemplo 3. El hidrogel a 60/40 muestra liberación más rápida que aquel a la relación 40/60 durante el resto de la prueba de liberación. Sin embargo, el hidrogel a la relación 80/20 no muestra ninguna liberación rápida, y la liberación continua solo alcanzó aproximadamente la mitad de VEGF de los otros dos hidrogeles.

El proceso de liberación de fármaco puede accionarse por difusión y degradación o ambos. Antes de tener lugar la degradación, la difusión es el mecanismo de liberación. Durante la etapa de liberación temprana, la liberación del fármaco está así principalmente dominada por el hinchamiento. Como se trata anteriormente, el hinchamiento de los hidrogeles recientemente sintetizados es muy superior al de los hidrogeles previos, que se atribuye a la mayor liberación. Además, el método revisado es más preciso en determinar la liberación. Un estudio previo ignoró la cuestión de bioactividad de VEGF, y usó la cantidad de carga original de VEGF, en lugar de VEGF bioactivo real. El presente método es así más representativo de la liberación real. Sorprendentemente, la liberación de VEGF del hidrogel de 80/20 muestra mucha menos cantidad que de los otros dos geles. Una posible explicación podría atribuirse a la existencia de grupos amina. El aumento en Dex-AE en la relación de alimentación de hidrogel aumenta la cantidad de grupos amina, que puede aumentar las interacciones con fármacos basados en proteína, potenciar la interacción entre el hidrogel y el VEGF, y así reducir la liberación rápida y prolongar el periodo de liberación de VEGF.

## 20 EJEMPLO 15

### *Vascularización in vivo de hidrogeles de Dex-AE/PEGDA*

Se prepararon hidrogeles de Dex-AE/PEGDA en la forma de un disco (2 mm de espesor x 4 mm de diámetro) bajo condiciones estériles. Se alojaron ratas Lewis hembra (n=2) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) que pesaban 200 a 250 g por separado y tuvieron acceso a agua y comida a voluntad. Los animales se cuidaron según los protocolos autorizados del Comité sobre el Cuidado de Animales de la Universidad Johns Hopkins, en conformidad con las pautas del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (publicación del NIH #85-23, revisada 1985). Los animales se anestesiaron usando inhalación continua de 2 % de isoflurano/O<sub>2</sub>. Se realizaron dos implantaciones de muestra por momento de tiempo. Los presentes inventores hicieron tres pequeñas incisiones de la línea media en el dorso de la rata, y los implantes se introdujeron en bolsillos subcutáneos laterales creados por disección roma. Todos los animales continuaron con buena salud general durante todo el estudio, como se evalúa por su aumento de peso. En cada momento de tiempo predeterminado (1 y 3 semanas), las ratas se sacrificaron, y los andamiajes implantados se eliminaron en bloque con el tejido circundante (aproximadamente 10 x 10 mm). Las muestras se fijaron y se procesaron para histología como se describe más adelante.

### *Histología*

Se fijaron explantes de hidrogel de Dex-AE/PEGDA con Accustain (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 24 horas, se deshidrataron en etanol graduado (70 al 100 %), se incorporaron en parafina, se seccionaron en serie usando un micrótopo (4 µm) y se teñieron con tanto hematoxilina y eosina (H&E) como inmunohistoquímica para CD31 y ED1.

### *Resultados*

Estudios subcutáneos (EJEMPLO 9) mostraron que los hidrogeles de Dex-AE/PEGDA liberan VEGF y pueden promover el crecimiento hacia adentro de tejido, y que el crecimiento hacia adentro de tejido facilitará adicionalmente la degradación de hidrogel. Sin embargo, al igual que los andamiajes de ingeniería de tejido, este periodo de tiempo es todavía demasiado largo para algunas aplicaciones *in vivo*. Entonces se utilizó Dex-AE modificado con un menor grado de sustitución de AI, para aumentar posiblemente la degradación de hidrogel y el crecimiento hacia adentro de tejido.

La **Figura 9** ilustra resultados obtenidos de diferentes relaciones de hidrogeles de Dex-AE/PEGDA de bajo grado de sustitución en la semana 5 teñidos con ED1, que muestran la respuesta de macrófagos en el implante. Estos resultados demuestran la rápida respuesta junto con el mayor crecimiento hacia adentro de tejido y fragmentación del gel a la relación de alimentación de 80/20. Estudios previos indicaron que mayores relaciones de dextrano conducen a una estructura suelta. Entre los tres hidrogeles en este estudio, 80/20 tiene la estructura más suelta, y puede facilitar el crecimiento hacia adentro de tejido más que los otros. Mientras tanto, en este sistema de hidrogel de Dex-AE/PEGDA, PEGDA no es degradable, y la dextranasa solo degradó dextrano, así un aumento en el componente de dextrano condujo a una degradación más rápida. Por tanto, se observó un mayor crecimiento hacia adentro de tejido dentro del hidrogel de 80/20 en este estudio.

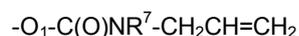
El estudio anterior indica que el hidrogel a la relación 80/20 es un buen candidato para la ingeniería de tejido blando. Para examinar esto, se examinó la capacidad de vasculogénesis de un hidrogel 80/20. La **Figura 10** muestra Dex-AE/PEGDA a la relación 80/20 en el plazo de 3 semanas teñido con SMA y vWF para identificar las redes de vasculatura (flechas sólidas). Se observan varias vasculaturas (flechas no rellenas) dentro del hidrogel con encapsulación de VEGF en comparación con sin encapsulación de VEGF, que solo muestra la formación de vasos

en la periferia exterior del hidrogel. A diferencia de los estudios previos, que solo demostraron que VEGF promueve el crecimiento hacia adentro de tejido, este estudio indica adicionalmente que VEGF puede atraer células endoteliales en el hidrogel y promover la formación vascular.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en la que el grupo hidroxilo sustituido tiene la fórmula (III), y en la que el grado de sustitución de la fórmula (III) en el polisacárido es inferior a 0,2;

5 en la que la fórmula (III) es



y  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido y  $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .

2. La composición de la reivindicación 1, en la que  $R^7$  es hidrógeno.

10 3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el polisacárido comprende además un segundo grupo hidroxilo sustituido que tiene la fórmula (IV), en la que la fórmula (III) y la fórmula (IV) son diferentes, y el grupo hidroxilo sustituido de fórmula (III) y fórmula (IV) puede estar en el mismo monómero o monómeros diferentes; en la que la fórmula (IV) es



15 en la que Y es  $-O_1-$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$ ,  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ;  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ; Z está seleccionado del grupo que consiste en  $-CO_2H$  o  $NR^4R^5$ , en la que  $R^4$  y  $R^5$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ;

$R^2$  y  $R^3$  son independientemente hidrógeno, alquilo  $C_1-C_4$ , o pueden combinarse para formar un anillo de 3-6 miembros, y cuando  $n > 1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  en átomos adyacentes pueden formar un doble o triple enlace, o  $R^2$  y  $R^3$  en átomos de carbono diferentes pueden formar un anillo de 3-6 miembros.

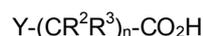
20 4. Una composición que comprende un polisacárido con al menos un monómero que tiene al menos un grupo hidroxilo sustituido, en la que el polisacárido incluye un primer grupo hidroxilo sustituido de fórmula (I) y un segundo grupo hidroxilo sustituido de fórmula (II), en la que la fórmula (I) y la fórmula (II) son diferentes, y el primer y segundo grupos hidroxilo sustituidos pueden estar en el mismo monómero o monómero diferente;

en la que la fórmula (I) es



en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y X es un resto reticulable; y

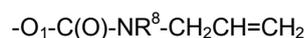
la fórmula (II) es



30 Y es  $-O_1$  o  $-O_1C(O)-$ , o  $-O_1C(O)NR^1-$  en la que  $O_1$  es el átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo sustituido, y  $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ ,  $n = 1, 2, 3$  o  $4$ ,  $R^2$  y  $R^3$  pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo  $C_1-C_4$ , o pueden combinarse para formar un anillo de 3-6 miembros, y cuando  $n > 1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  en átomos adyacentes pueden formar un doble o triple enlace, o  $R^2$  y  $R^3$  en átomos de carbono diferentes pueden formar un anillo de 3-6 miembros.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que el resto reticulable se deriva de acrilato de glicidilo, metacrilato de glicidilo, metacrilato, acrilato, metacrilato de hidroxietilo, anhídrido maleico o isocianato de alilo.

35 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la fórmula (I) es



en la que  $R^8$  es hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ .

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que consiste esencialmente en el polisacárido.

40 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que al menos uno de dicho monómero de sacárido sustituido con hidroxilo es un monómero de glucopiranososa.

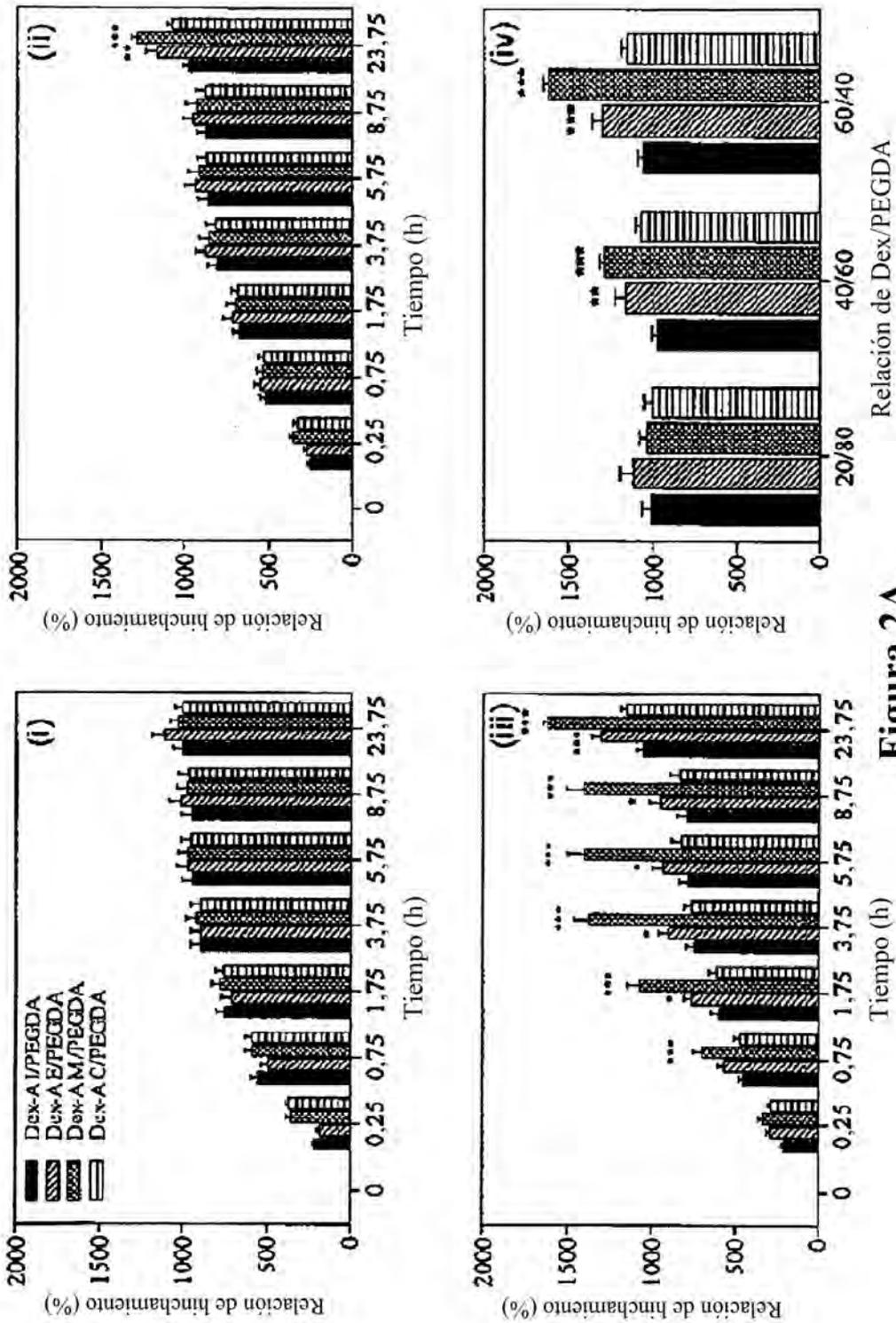
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el polisacárido es dextrano.

10. La composición de la reivindicación 9, en la que el dextrano tiene un peso molecular promedio de al menos 20.000.

45 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además una segunda molécula reticulable.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que la composición es una composición formadora de hidrogel que comprende:
- al menos aproximadamente el 80 % de polisacárido; y hasta aproximadamente el 20 % de una segunda molécula reticulable.
- 5 13. La composición formadora de hidrogel de la reivindicación 12, en la que  $R^7$  es hidrógeno, y la segunda molécula reticulable es diacrilato de poli(etilenglicol).
14. La composición de la reivindicación 3, 12 o 13, en la que Z es  $NR^4R^5$ .
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, en la que la segunda molécula reticulable es diacrilato de poli(etilenglicol).
- 10 16. La composición de la reivindicación 15, en la que el diacrilato de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de al menos 2000.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende además una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico.
- 15 18. La composición de la reivindicación 17, que comprende una proteína, en la que la proteína es un factor de crecimiento.
19. La composición de la reivindicación 18, en la que el factor de crecimiento es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en la que el polisacárido está reticulado.
- 20 21. La composición de la reivindicación 20, en la que la composición es un hidrogel que comprende una mezcla reticulada de polisacárido y diacrilato de poli(etilenglicol).
22. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para su uso en administrar una proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico a un sujeto en necesidad de tratamiento con la proteína, oligonucleótido o agente farmacéutico.
- 25 23. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, para su uso en aumentar la regeneración vascular en la que la composición comprende una proteína que estimula la regeneración vascular.
24. La composición de la reivindicación 22 o 23, en la que la proteína es factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
25. La composición de la reivindicación 22, para la liberación sostenida de una proteína terapéutica a un sujeto en necesidad de tratamiento.
- 30 26. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en la que la composición se administra por vía subcutánea, o se aplica a la superficie.





**Figura 2A**

	Pérdida de peso, % (0,5 U/ml)					Pérdida de peso, % (5 U/ml)						
	Dex-AI /PEGDA	Dex-AE /PEGDA	Dex-AM /PEGDA	Dex-AC /PEGDA	Dex-AI /PEGDA	Dex-AE /PEGDA	Dex-AM /PEGDA	Dex-AC /PEGDA	Dex-AI /PEGDA	Dex-AE /PEGDA	Dex-AM /PEGDA	Dex-AC /PEGDA
20/80	7,97±1,37	8,16±1,73	8,44±1,16	7,22±1,71	10,81±0,75	12,78±0,99	15,73±0,60 *	13,42±1,16	10,81±0,75	12,78±0,99	15,73±0,60 *	13,42±1,16
40/60	11,41±1,46	14,46±1,26	14,01±1,28	6,26±1,06	14,06±0,68	17,09±0,61	20,71±2,33 **	14,01±0,72	14,06±0,68	17,09±0,61	20,71±2,33 **	14,01±0,72
60/40	14,01±1,33	18,49±0,81 *	17,25±1,91	13,81±1,28	16,97±2,47	21,77±2,45 *	22,06±1,64 *	16,71±0,28	16,97±2,47	21,77±2,45 *	22,06±1,64 *	16,71±0,28

Figura 2B

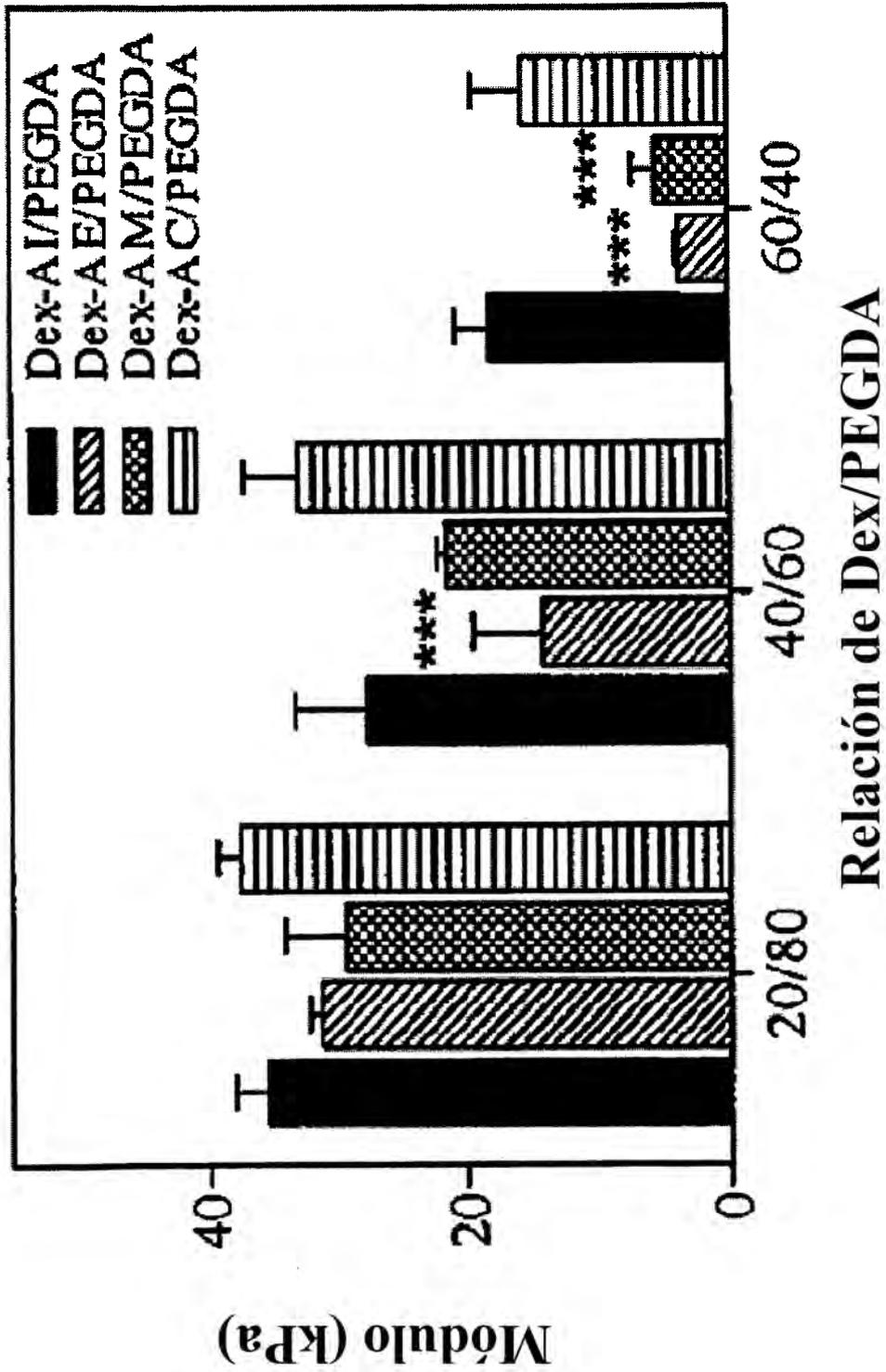
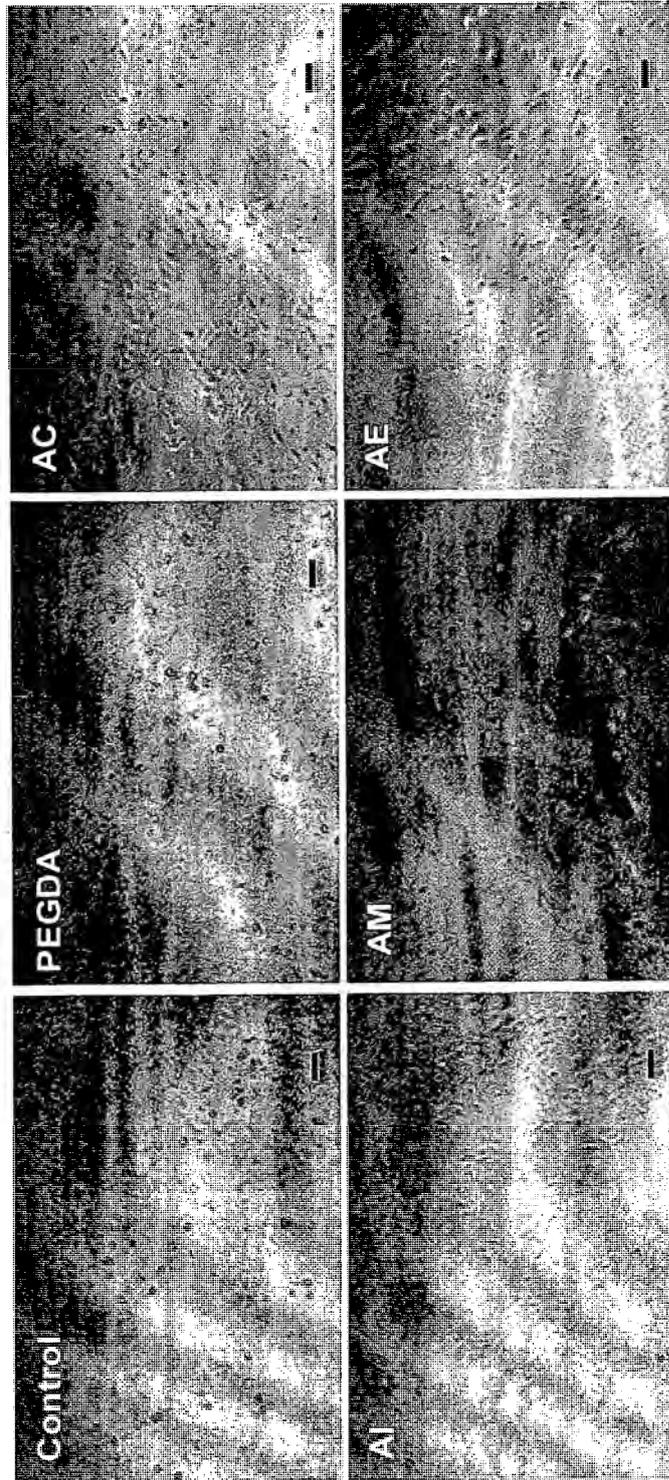


Figura 3A

Muestra de hidrogel	Relaciones de Dex/PEGDA		
	20/80	40/60	60/40
Dex-AI/PEGDA	11,29±0,37	8,78±024	5,81±0,16
Dex-AE/PEGDA	10,38±0,28	4,91±0,09**	1,31±0,05**
Dex-AM/PEGDA	9,61±0,23 *	7,29±0,28**	2,07±0,11**
Dex-AC/PEGDA	11,86±0,52	10,64±026**	5,24±0,20*

Figura 3B



**Figura 4A**

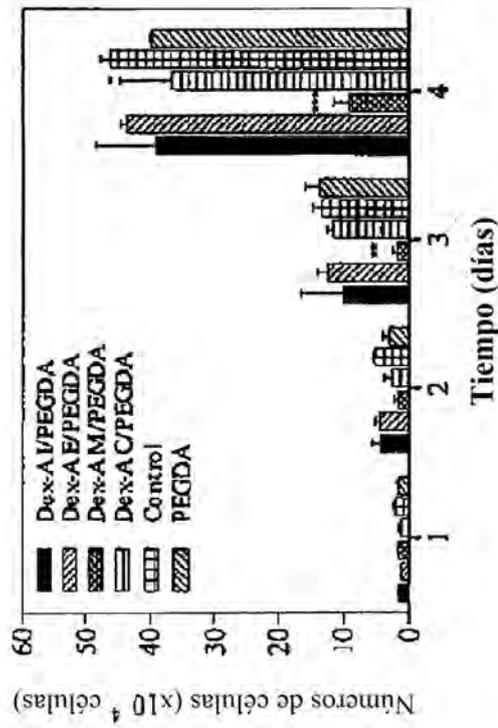
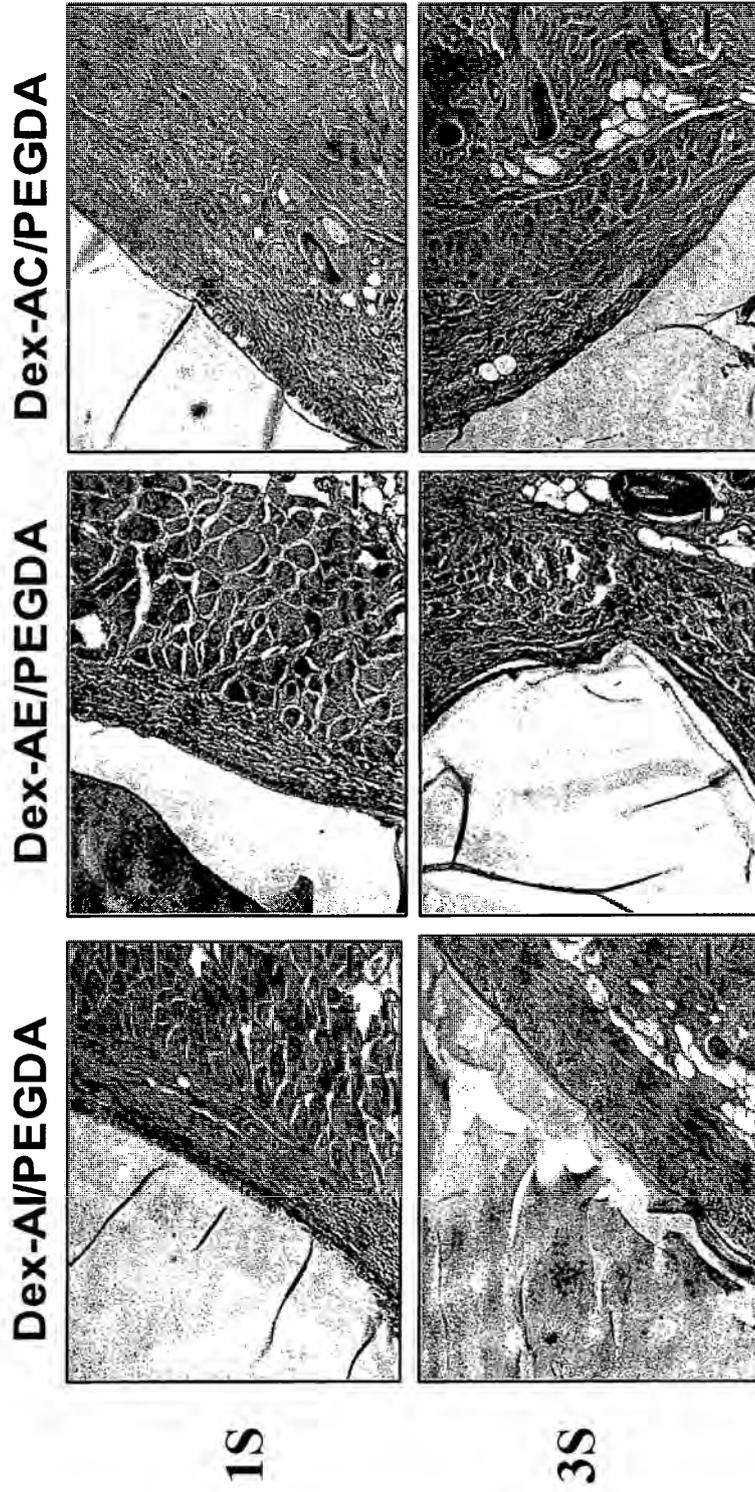
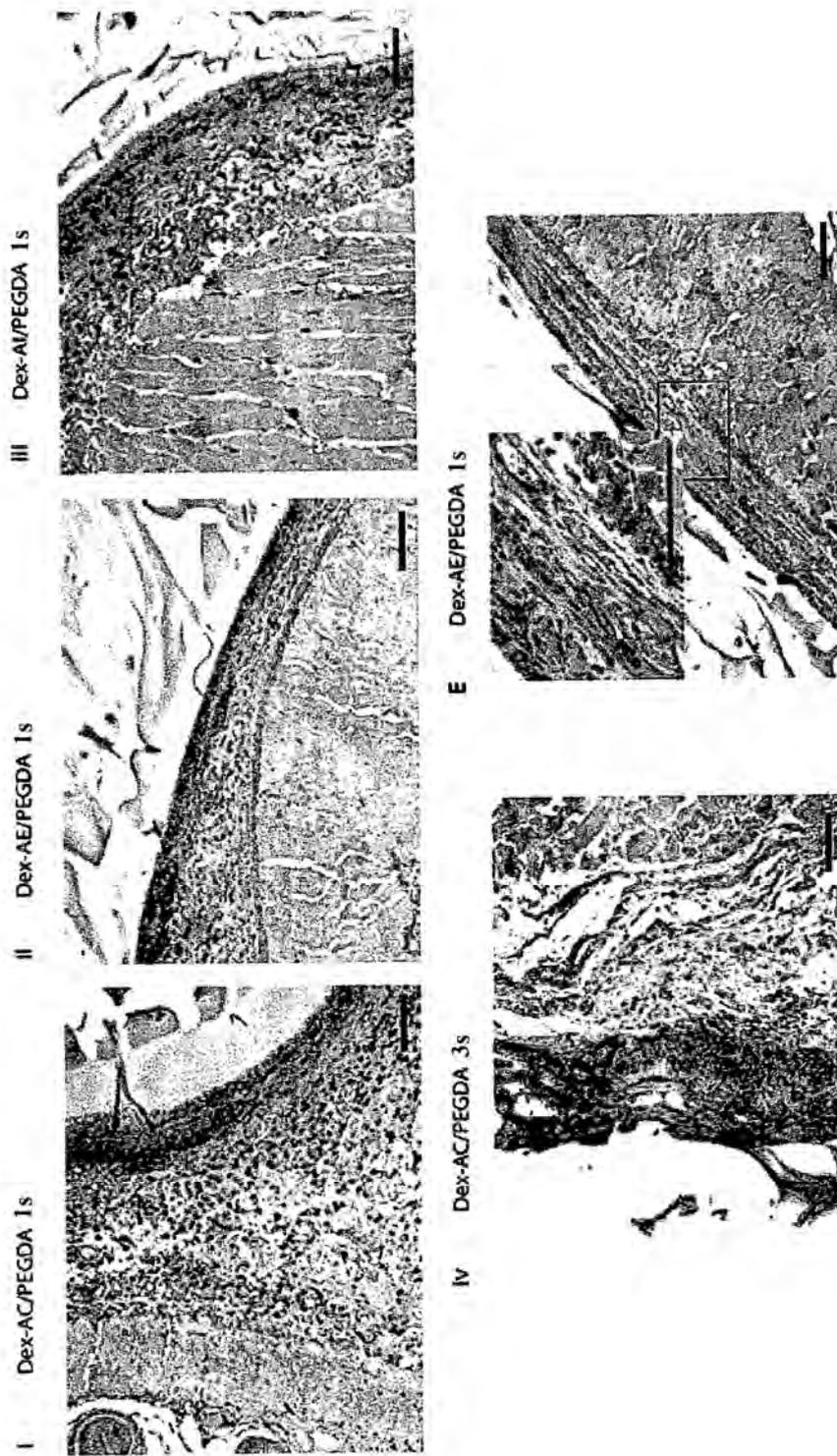


Figura 4B



**Figura 4C**



**Figura 4E**

**Figura 4D(i-iv)**

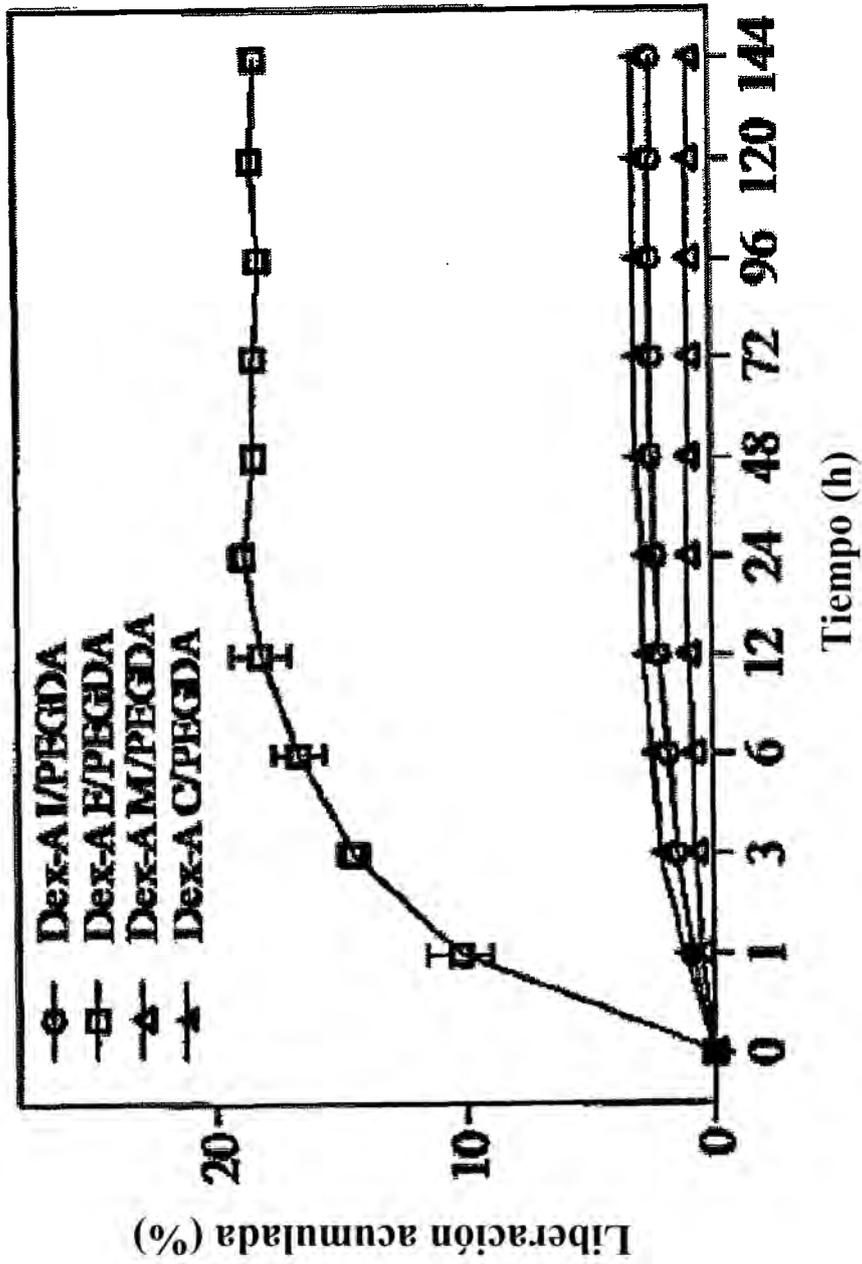
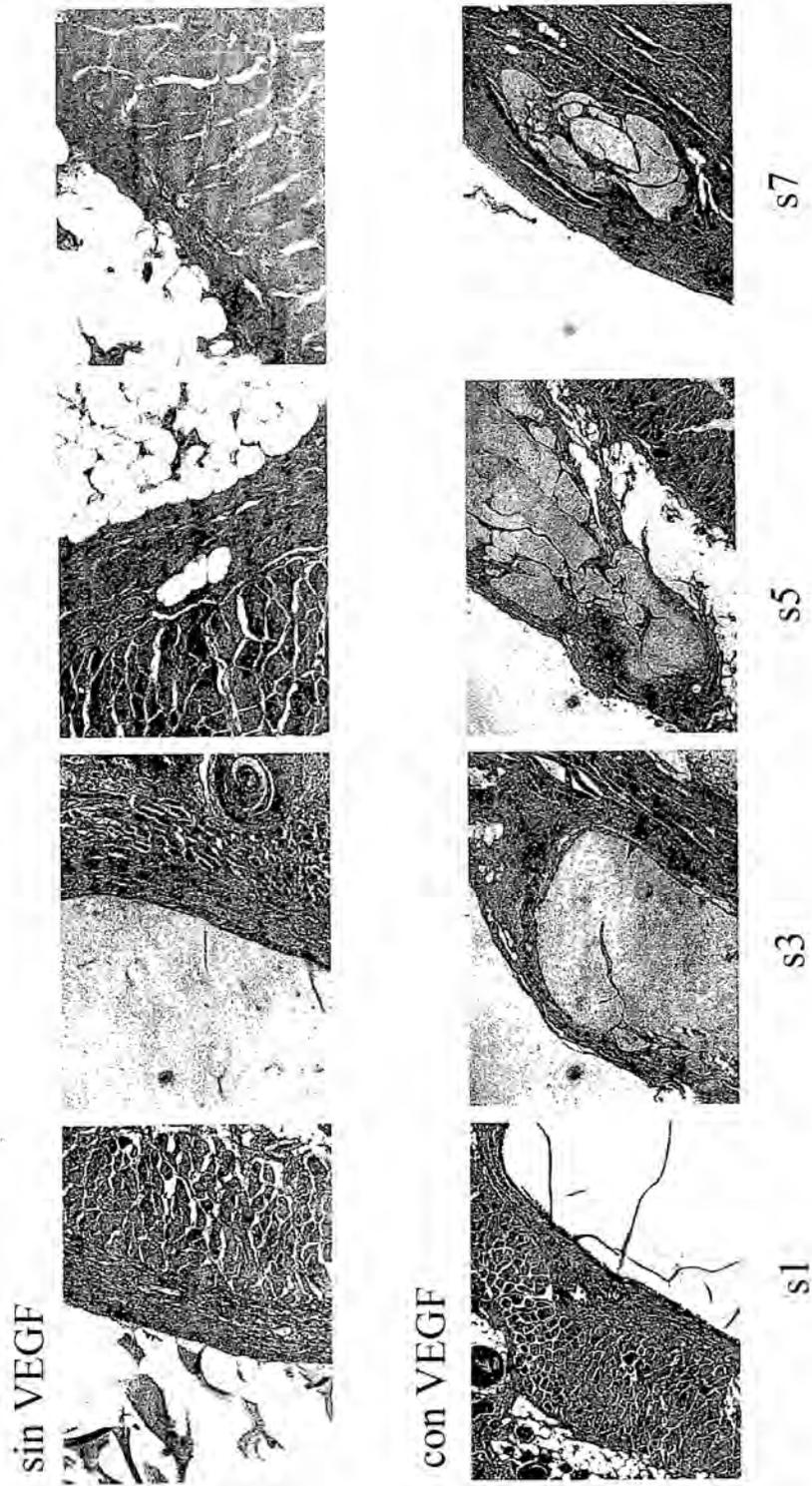


Figura 5A



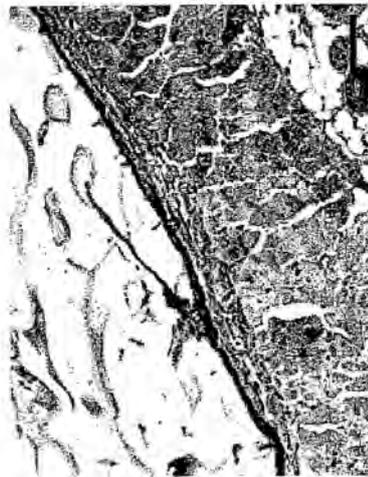
**Figura 5B**



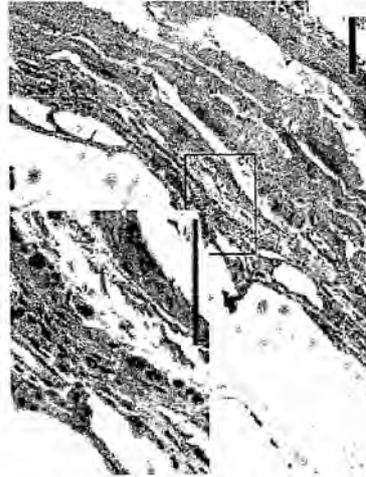
**Figura 5D(ii)**



**Figura 5D(i)**



**Figura 5C**



**Figura 5E(iii)**



**Figura 5E(ii)**



**Figura 5E(i)**

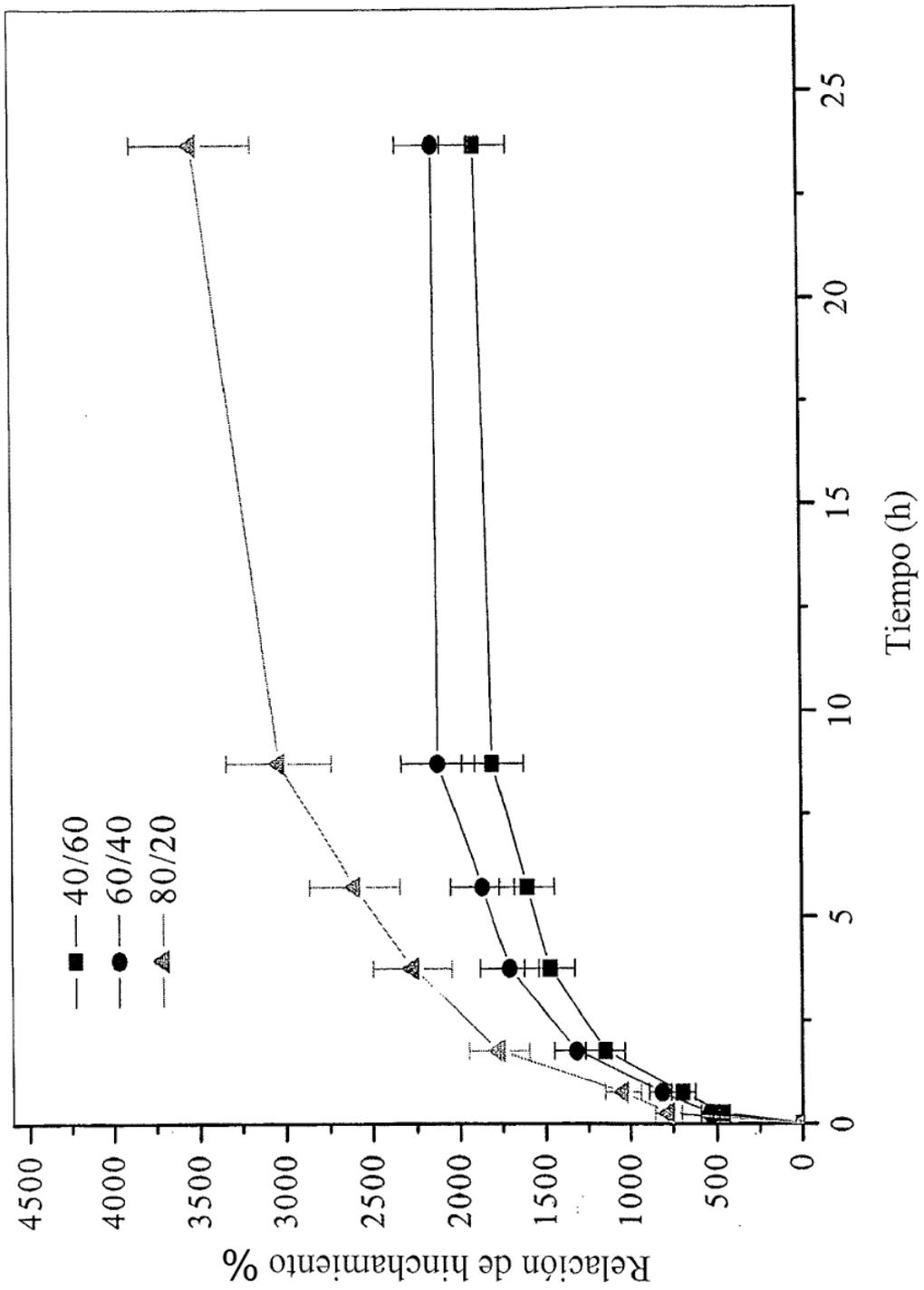
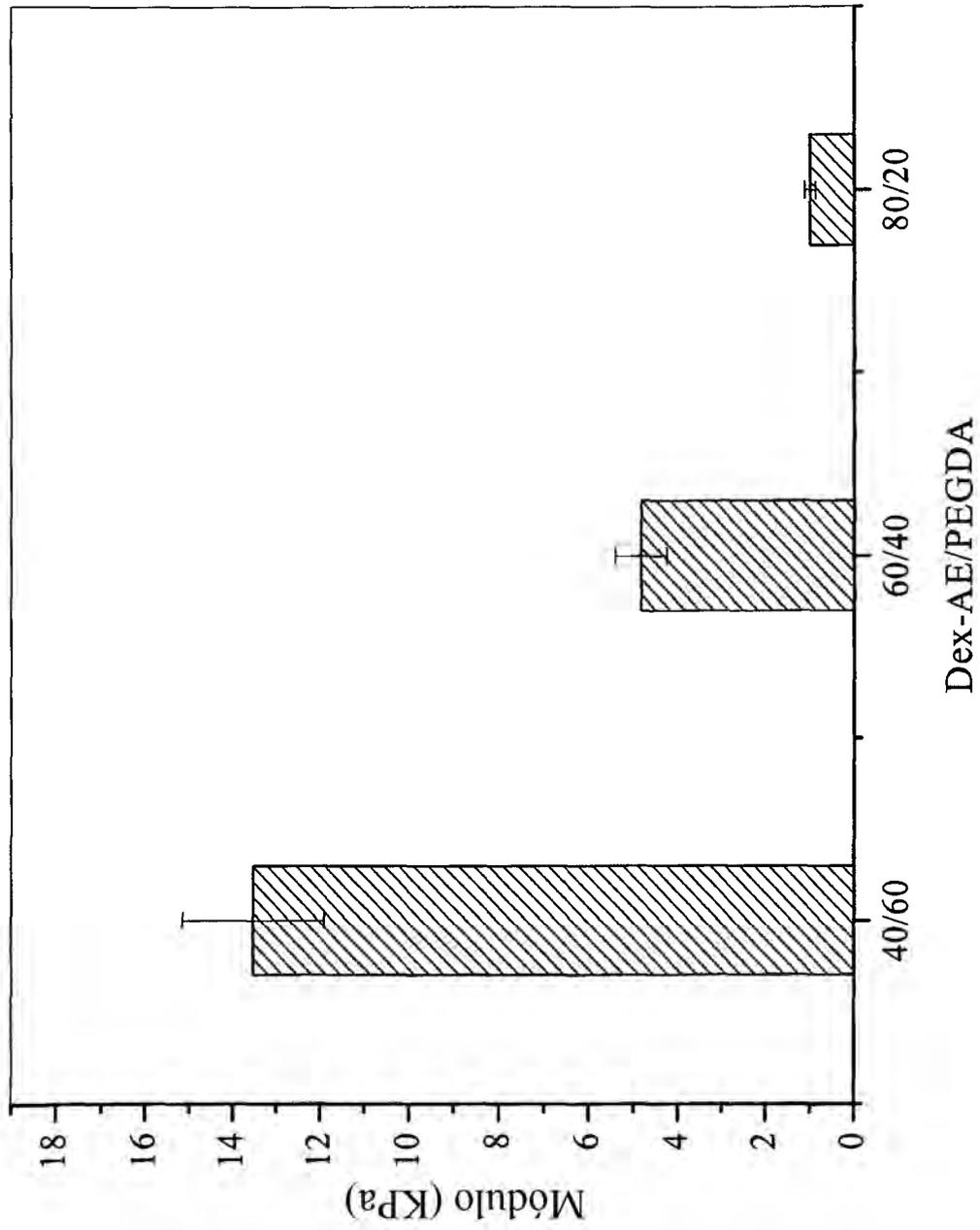
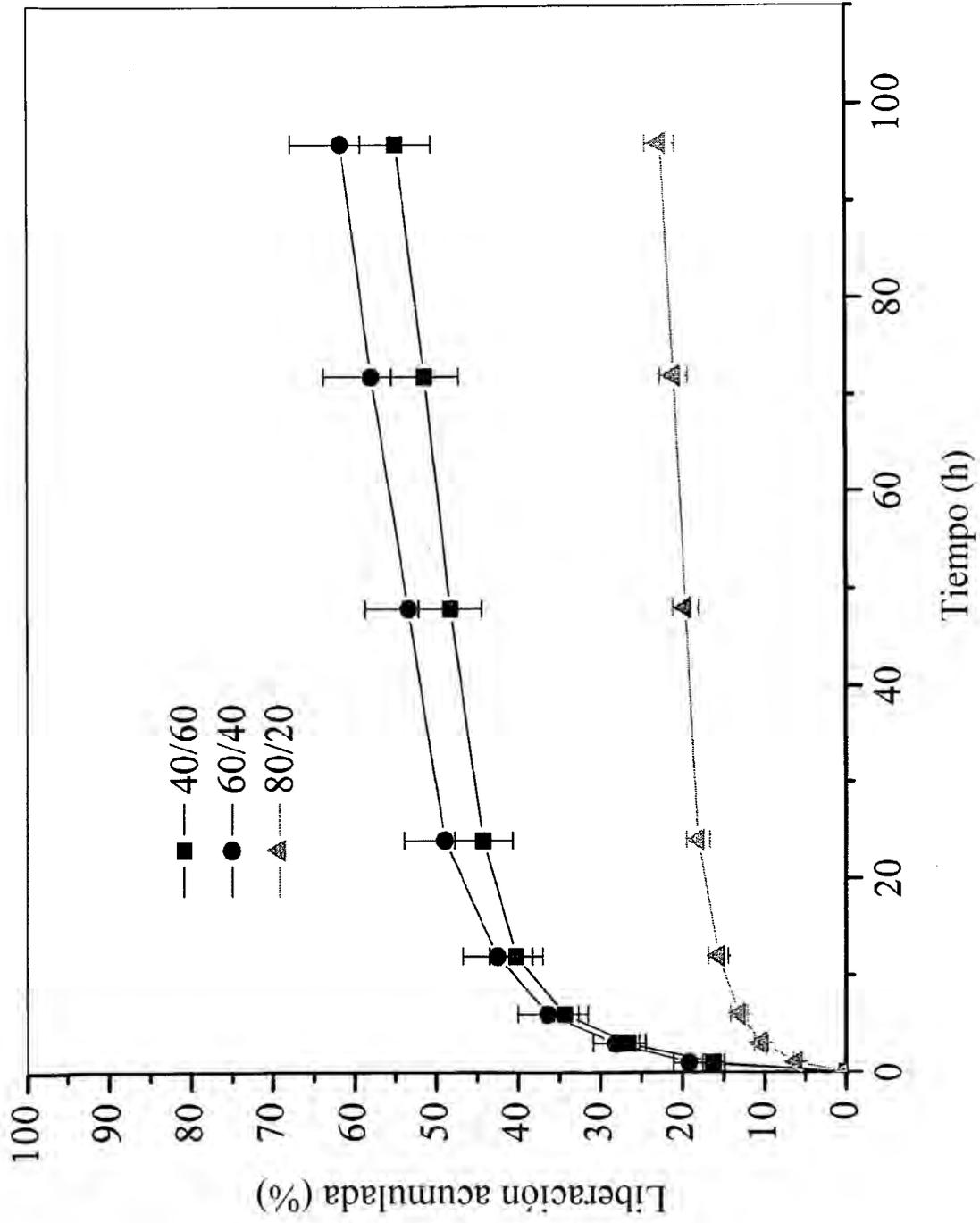


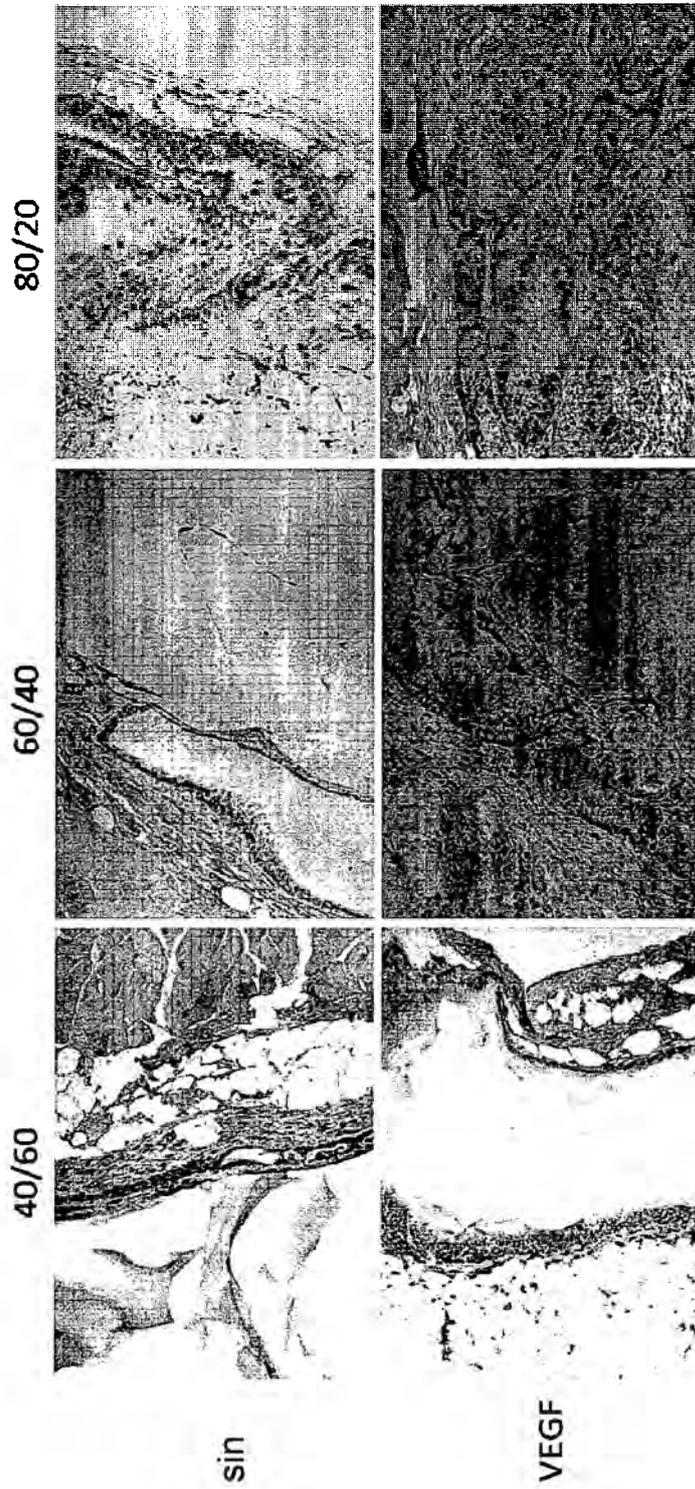
Figura 6



**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9**

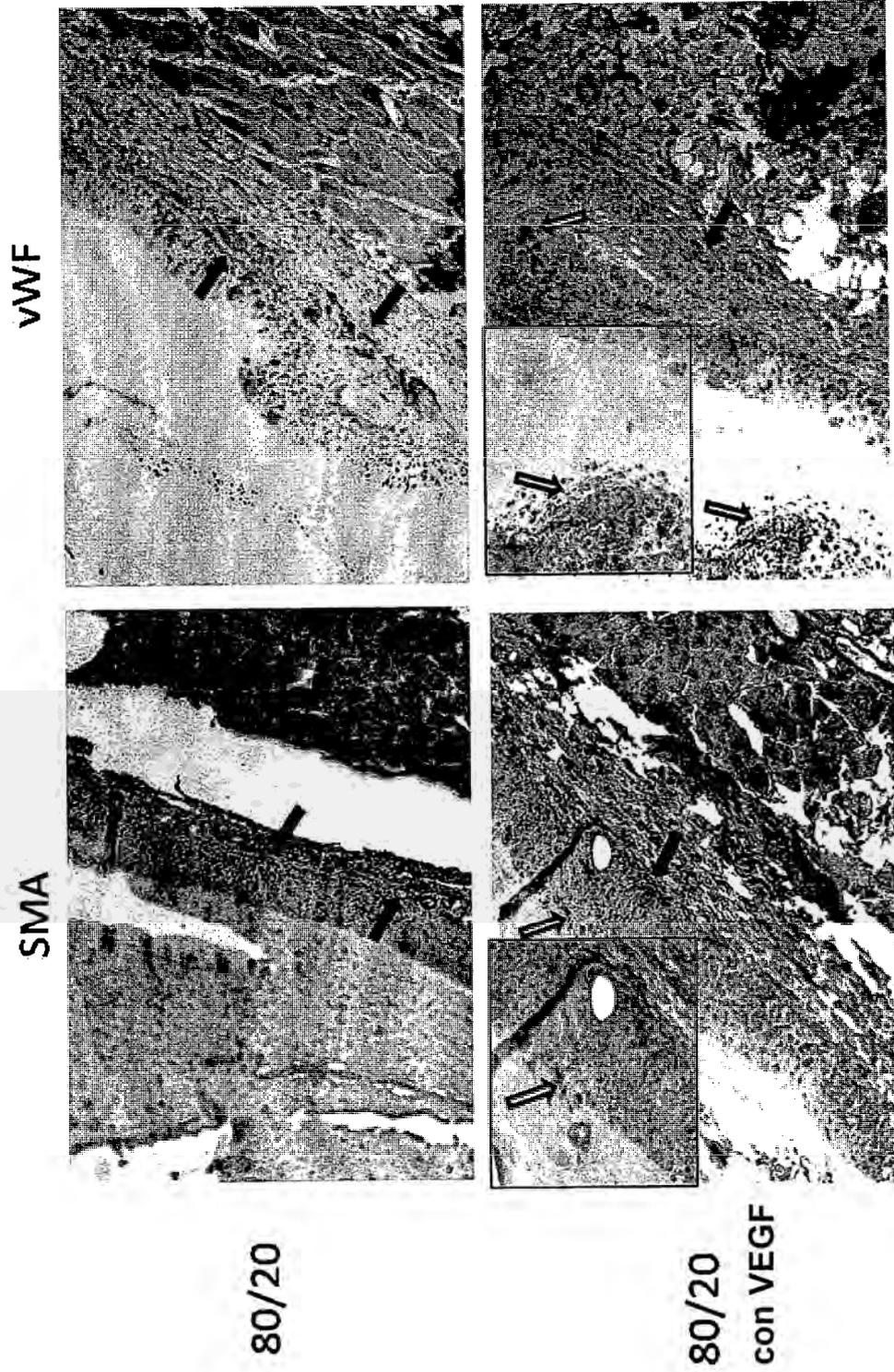


Figura 10

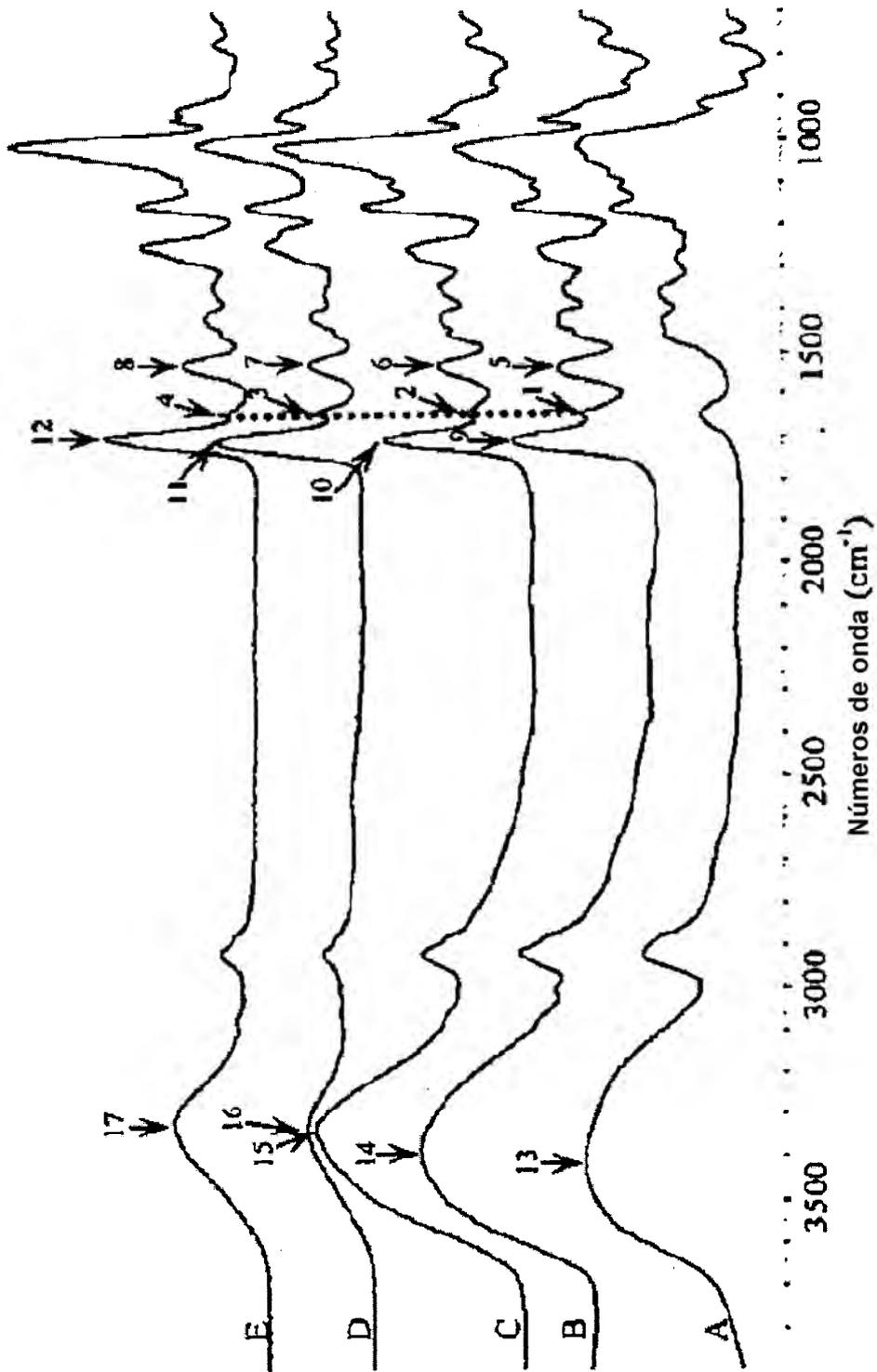


Figura 11A

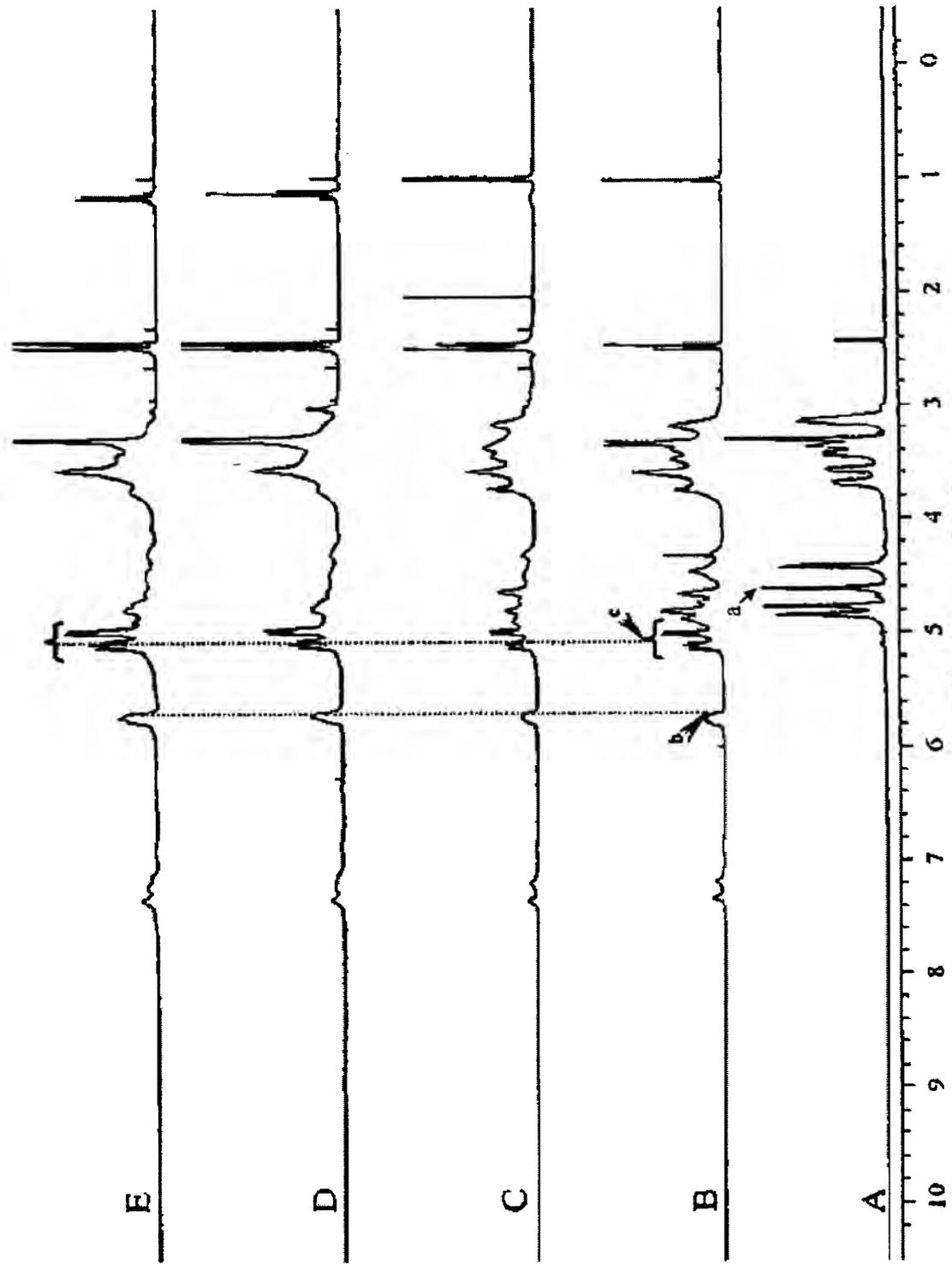


Figure 11B