

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 111**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013 PCT/US2013/057451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14036364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013 E 13832601 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2890407**

54 Título: **Materiales generadores de especies reactivas oxidativas y métodos de uso**

30 Prioridad:

31.08.2012 US 201261695432 P
29.08.2013 US 201314013117

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2018

73 Titular/es:

W. L. GORE & ASSOCIATES, INC. (100.0%)
555 Paper Mill Road
Newark, DE 19711, US

72 Inventor/es:

BROWN, TIFFANY J.;
LAFLEUR, ADAM S.;
MAZICH, KENNETH;
TOWLER, JEFFREY C. y
ZHANG, JI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 687 111 T3

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

DESCRIPCIÓN

Materiales generadores de especies reactivas oxidativas y métodos de uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a materiales que comprenden radicales libres estabilizados que son capaces de generar especies reactivas oxidativas y a sus usos.

Antecedentes de la invención

10 La esterilización de dispositivos médicos se puede proporcionar por varios medios. Dos medios comunes son esterilización con óxido de etileno (OE) y esterilización por exposición a radiación ionizante. Sin embargo, se ha mostrado que la exposición de ciertos polímeros y materiales orgánicos, comunes en la producción de dispositivos médicos, a radiación ionizante causa cierto nivel de degradación al polímero o material orgánico. Se cree que el grado al que se degrada un polímero o material orgánico se relaciona con la dosis de radiación ionizante absorbida. Así, cuando un dispositivo se construye de materiales poliméricos u orgánicos, la dosis de radiación aplicada debe ser suficientemente alta para esterilizar el dispositivo, mientras que simultáneamente sea tan baja como sea posible con el fin de minimizar la cantidad de degradación del dispositivo que ocurre. Cuando se usa para polímeros y copolímeros permanentes y absorbibles, la esterilización típica de los dispositivos envasados finales se logra con una dosis de aproximadamente 25 kGy.

20 Además, ciertos polímeros, cuando se exponen a radiación ionizante, experimentan escisión de cadenas que puede dar como resultado la formación de radical(es) libre(s) a lo largo de la cadena polimérica afectada. Se conoce que los radicales libres de este tipo generalmente existen en polímeros durante solo breves periodos de tiempo después de la generación. La alta energía de los radicales libres los hace inestables, reaccionando rápidamente o recombinándose siempre que sea posible. Si el radical libre se combina con otro radical libre, y los radicales libres están en cadenas poliméricas diferentes, ocurre la reticulación y aumenta eficazmente el peso molecular. Si el radical libre formado en la cadena polimérica irradiada se combina con otro elemento tal como, pero no se limita a, oxígeno, puede dar como resultado una reacción de degradación y posiblemente una disminución en el peso molecular total del polímero. En cualquier caso, la velocidad de reacción de los radicales libres es normalmente muy rápida una vez que existen las condiciones necesarias. Cuando los radicales libres reaccionan con una molécula de oxígeno, se pueden generar especies reactivas oxidativas (ERO).

30 Las ERO son especies que contienen oxígeno químicamente reactivas y biológicamente activas tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, radical hidroxilo, hipoclorito, peroxinitrito y radical perhidroxilo, y sus combinaciones. Además, las ERO son altamente reactivas debido a la presencia de electrones sin aparear de la capa de valencia.

35 En la biología, las ERO cumplen funciones críticas que implican la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el superóxido se genera naturalmente durante "el estallido respiratorio" por neutrófilos activados durante la fagocitosis de un microbio y es el mecanismo usado por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) fagocitadores con el fin de destruir las bacterias. En vista de esto, las actuales terapias con fármacos antibacterianos usan ERO, particularmente radicales hidroxilo, como el mecanismo para la acción bactericida (Kohanski et al., Cell, 130, 797-810 (2007)).

40 Las ERO también son activas en la señalización de células, que incluyen, pero no se limitan a, la estimulación de la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y angiogénesis celular (Klebanoff, Annals Internal Medicine, 93, 480-9 (1980)) (Turrens, Jnl Physiol, 552 (2), 335-44 (2003)) (Veal et al., Molecular Cell, 26, 1-14 (2007)). En particular, se ha mostrado que las ERO incluso a concentraciones relativamente bajas (micro- a nanomolares) actúan de moléculas clave de señalización de células para regular una variedad de procesos biológicos tales como la angiogénesis, proliferación celular y migración celular (Veal et al., Mol Cell. ;26(1) : 1-14 (2007)) (D'Autréaux et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8, 813-824 (2007)). También se ha mostrado que las ERO tienen influencia en la activación plaquetaria (Krotz et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24: 1988-96 (2004)). La participación en estos procesos biológicos pone a las ERO en la función crítica de regular numerosos estados fisiológicos y patológicos, que incluyen, pero no se limitan a, algunos cánceres, enfermedad cardiovascular, heridas crónicas, envejecimiento y neurodegeneración. Por ejemplo, se ha demostrado el uso de ERO en terapia clínica en la terapia fotodinámica (PDT) para el tratamiento del cáncer (Dolmans et al., Nature Reviews Cancer, 3, 380-7 (2003)).

50 Se conoce que el nivel más alto de ERO inhibe la proliferación celular e incluso induce la apoptosis celular. Así, una aplicación de dichos materiales de generación de ERO es fabricar dispositivos médicos, por ejemplo, prótesis endovascular y globos, para tratar estenosis y reestenosis en conductos humorales, que incluyen vaso sanguíneo, conducto biliar, esófago y colon.

55 Una estenosis es un estrechamiento anormal en los vasos sanguíneos u otros conductos que es causada por proliferación incontrolada y deposición de células, matriz extracelular, lípidos y otros contenidos celulares. Así, los materiales que liberan alto nivel de ERO se pueden usar para inhibir dicha proliferación celular y resolver la estenosis mediante la inducción de apoptosis.

La reestenosis se refiere a la reaparición de estenosis que sigue tras las intervenciones que tratan la estenosis original. La reestenosis normalmente se refiere a vaso sanguíneo que se ha estrechado; recibido tratamiento para limpiar el bloqueo y posteriormente se ha vuelto a estrechar. La reestenosis puede ocurrir tras intervenciones tales como tratamientos de angioplastia coronaria transluminal percutánea y prótesis endovascular. Estas intervenciones cardiovasculares inducen la proliferación no deseada de células vasculares de músculo liso (hiperplasia de la neointima), que con el tiempo conduce al re-estrechamiento de los vasos sanguíneos. Para prevenir la reestenosis, se introdujo la prótesis endovascular eluyente de fármaco (DES) en la cardiología clínica al principio del año 2000. Se recubrieron los fármacos antiproliferativos, tales como paclitaxel (un fármaco antineoplásico) y sirolimus (un fármaco inmunosupresor), sobre la superficie de la prótesis endovascular cardiovascular y se liberaron localmente a la pared del vaso sanguíneo. Estos fármacos inhiben eficazmente la proliferación de células vasculares del músculo liso, y así previenen la hiperplasia de la neointima dentro de la prótesis endovascular y, por consiguiente, la reestenosis.

Se ha demostrado que el alto nivel de ERO, particularmente peróxido de hidrógeno, puede inhibir eficazmente la proliferación de células de músculo liso (Deshpande, N.N., et al., Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*, 2002. 4(5): p. 845-54) y otras células (Li, M. et al., Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009. 292(8): p. 1107-13) y (Chen, Q. y B.N. Ames, Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(10): p. 4130-4). Los materiales generadores de ERO se pueden así usar para hacer los dispositivos médicos, tales como prótesis endovascular y globos, que una vez desplegados pueden suministrar localmente el alto nivel de ERO para prevenir/tratar reestenosis.

El documento US 2011280919A1 se refiere a un hemostático absorbible reforzado que comprende al menos un agente hemostático en una sola capa de tela sintética no tejida que tiene una mezcla de fibras discontinuas comprimidas de un copolímero de poliglicolida/polilactida y una polidioxanona.

El documento US 2008101982A1 desvela un método de esterilización de un material polimérico que es sensible a radiación. El método incluye las etapas de aplicar al menos un radiosensibilizador al material polimérico e irradiar el material polimérico con una radiación adecuada a una dosis eficaz y tiempo para esterilizar el material polimérico. También se desvela un método de potenciamiento de la capacidad de un dispositivo médico para resistir a la esterilización por radiación y un dispositivo médico polimérico bioabsorbible.

Hasta la fecha, los beneficios de ERO han estado limitados debido a la corta naturaleza de su existencia y dificultades en proporcionarlos a niveles terapéuticos y duraciones hasta los sitios deseados. Se ha descubierto de manera sorprendente que los radicales libres estabilizados se pueden formar en ciertos polímeros y dichos radicales libres pueden, a su vez, generar ERO cuando se exponen a un entorno acuoso que contiene oxígeno. Dada la relevancia biológica de ERO, los materiales, dispositivos y métodos que permiten la generación extendida de ERO en un sitio de tratamiento serían ventajosos en el campo médico y se contemplan en el presente documento.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un material compuesto biocompatible según la reivindicación 1.

Se desvela además un material biocompatible que comprende al menos un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable en el que el polímero se somete a radiación ionizante a una dosis total desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 50 kGy y en el que el material biocompatible comprende radicales libres estabilizados. Se contempla un material biocompatible que contiene radicales libres estabilizados que comprende al menos un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable, en el que el polímero se somete a radiación ionizante a una tasa de dosis inferior a aproximadamente 50 kGy y se esteriliza por métodos de radiación no ionizante. Se desvela además un método de proporcionar radicales libres estabilizados a un sitio de tratamiento que comprende aplicar el biocompatible, descrito anteriormente.

Además, se desvela un método de permitir la producción de especies reactivas oxidativas de un material biocompatible en un sitio de tratamiento, que comprende: aplicar un material biocompatible que comprende un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable que comprende radicales libres estabilizados a un sitio de tratamiento; exponer dicho material biocompatible a un medio acuoso que contiene oxígeno; y aumentar la cantidad de oxígeno con respecto al oxígeno atmosférico accesible al material biocompatible.

La invención que se define por el alcance de la reivindicación 1 incluye un material compuesto biocompatible que permite la producción multifásica de especies reactivas oxidativas que comprenden: al menos un primer polímero semicristalino hidrolíticamente degradable, que comprende radicales libres estabilizados; al menos un segundo polímero semicristalino hidrolíticamente degradable, que comprende radicales libres estabilizados; y en el que dicho al menos primer polímero no es el mismo que dicho al menos segundo polímero. También se contempla en el presente documento un material compuesto biocompatible que permite la producción de especies reactivas oxidativas cuando se pone en contacto con medios acuosos que comprende al menos un primer polímero semicristalino hidrolíticamente degradable, que comprende radicales libres estabilizados y al menos un segundo

material en el que el segundo material modifica el perfil de dicha producción de especies reactivas oxidativas, en tanto que esté dentro del alcance de la reivindicación 1.

5 Se desvela además un material biocompatible que se concibe con una aumentada capacidad para generar especies reactivas oxidativas que comprenden un material semicristalino hidrolíticamente degradable en el que el material se somete a radiación ionizante mientras se mantiene en una atmósfera inerte.

Se desvela un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable que comprende una concentración de radical libre estabilizado por entalpía del fundido cristalino de más a 10 unidades.

También se desvelan en el presente documento dispositivos que incorporan los materiales de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

10 La FIG. 1 muestra espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) que representan materiales cristalinos y amorfos donde cada espectro se ha desplazado a lo largo del eje y para diferenciación.

La FIG. 2 es una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable.

15 La FIG. 3 muestra espectros de EPR que indican el contenido de radicales libres de un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable a través de un intervalo de temperatura dado.

La FIG. 4 es una curva de DSC de un polímero amorfo.

La FIG. 5 muestra espectros de EPR que indican el contenido de radicales libres de un polímero amorfo a través de un intervalo de temperatura dado.

20 La FIG. 6 es una curva de DSC de un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable, específicamente polidioxanona.

La FIG. 7 muestra espectros de EPR que indican el contenido de radicales libres de un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable, específicamente polidioxanona, a través de un intervalo de temperatura dado.

25 La FIG. 8 muestra espectros de EPR que indican el contenido de radicales libres de un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable representativo, específicamente poli(3-hidroxitirato), a través de un intervalo de temperatura dado.

La FIG. 9 es una curva de DSC de un polímero semicristalino hidrolíticamente degradable representativo, específicamente P3OHB.

La FIG. 10 es una representación gráfica del contenido de radicales libres por entalpía de fusión para varios materiales sometidos a condiciones variadas.

30 La FIG. 11 muestra espectros de EPR de una muestra irradiada de un copolímero 2:1 de PGA/TMC medido en diversos momentos de tiempo tras la exposición a un medio acuoso que contiene oxígeno.

35 La FIG. 12 es una representación gráfica de medidas continuas de fotoluminiscencia informadas en unidades relativas de luz, o URL, que es un indicador de la presencia de ERO en una banda irradiada de copolímero 2:1 de PGA/TMC mediada en diversos momentos de tiempo tras la exposición a un medio acuoso que contiene oxígeno.

La FIG. 13 es una representación gráfica del contenido de peróxido de hidrógeno en una muestra de banda irradiada de copolímero 2:1 de PGA/TMC medida en diversos momentos de tiempo tras la exposición a un medio acuoso que contiene oxígeno.

40 La FIG. 13a es una representación gráfica de la liberación de peróxido de hidrógeno de una muestra de banda irradiada de copolímero 2:1 de PGA/TMC medida con el tiempo.

La FIG. 13b es una representación gráfica de la comparación de liberación de peróxido de hidrógeno con el tiempo de una mezcla de gránulos de polímero irradiada que comprende 90 % en peso de 2:1 de PGA/TMC y 10 % en peso de polidioxanona y una banda irradiada de copolímero 2:1 de PGA/TMC.

45 La FIG. 14 muestra una representación comparativa de mediciones continuas de fotoluminiscencia informadas en URL, que indica el contenido de ERO, de muestras de banda de polímero 2:1 de PGA/TMC irradiada en diversas condiciones atmosféricas.

La FIG. 15 es una representación gráfica de mediciones continuas de fotoluminiscencia informadas en URL, que indican el contenido de ERO, en una banda de polímero 2:1 de PGA/TMC que se ha irradiado con gamma y posteriormente expuesto a esterilización con óxido de etileno (OE).

La FIG. 16 es una representación gráfica del contenido de superóxido de la banda 2:1 de PGA/TMC de la FIG. 15 con el tiempo.

La FIG. 17 es una representación gráfica de mediciones continuas de fotoluminiscencia informadas en URL, que indica el contenido de ERO, en un copolímero 2:1 de PGA/TMC irradiado en forma de probeta sólida.

5 La FIG. 18 es una representación gráfica de contenido de superóxido en diversos momentos de tiempo tras la exposición a un medio acuoso que contiene oxígeno con el tiempo de una forma electrohilada de copolímero irradiado 2:1 de PGA/TMC.

10 La FIG. 19 es una representación gráfica de mediciones continuas de fotoluminiscencia informadas en URL de muestras de copolímero irradiado 2:1 de PGA/TMC. Las diferencias entre las mediciones de muestras indican el nivel de oxígeno singlete y superóxido generado por las muestras tras la exposición a un medio acuoso que contiene oxígeno.

La FIG. 20 es una representación gráfica de mediciones continuas de fotoluminiscencia informadas en URL, que indica el contenido de ERO, en muestras de copolímero 2:1 de PGA/TMC a diversos niveles de dosis de irradiación.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención es un material compuesto biocompatible que permite la generación de especies reactivas oxidativas que comprende un primer material polimérico semicristalino hidrolíticamente degradable y un segundo material polimérico semicristalino hidrolíticamente degradable, en el que el primer y segundo materiales tienen diferentes perfiles de generación de especies reactivas oxidativas y en el que al menos uno de dicho primer y segundo materiales poliméricos comprende radicales libres estabilizados; en el que el material compuesto biocompatible, tras el contacto con medios acuosos, permite la generación multifásica de especies reactivas oxidativas, y en el que el primer material polimérico y el segundo material polimérico se someten a diferentes dosis de radiación ionizante, teniendo dichas dosis una tasa de dosis inferior a 50 kGy. El material polimérico biocompatible semicristalino hidrolíticamente degradable contiene radicales libres estabilizados después de la exposición a radiación ionizante. El material es capaz de suministrar radicales libres estabilizados a localizaciones diana seleccionadas tales como, pero no se limitan a, una herida u otra localización sobre o en el cuerpo. Tras el contacto con un medio acuoso que contiene oxígeno, el radical libre que contiene material puede generar especies reactivas oxidativas durante un periodo de tiempo prolongado.

30 Para los fines de este documento, el término "polímero" pretende incluir tanto "homopolímeros" como "copolímeros". Los polímeros adecuados son semicristalinos debido a la presencia de regiones amorfas y regiones de estructura molecular altamente ordenada (regiones cristalinas). Dependiendo de la estructura química, se pueden formar cristales poliméricos cuando un polímero se enfría desde el estado amorfo viscoso (por encima del punto de fusión cristalino) hasta el estado sólido. En realizaciones alternativas, se pueden formar cristales de polímero calentando el polímero en estado vítreo hasta su temperatura de perfección cristalina, seguido por enfriamiento.

35 En un cristal, la propia cadena de polímero es capaz de orientarse regularmente en una región fuertemente empaquetada. Una región amorfa continua está más irregularmente empaquetada y no tan densa. Debido al empaquetamiento relativamente fuerte de la bobina de polímero en un cristal, el movimiento de cadenas del polímero se restringe en esta fase o región del polímero. El porcentaje del polímero que es cristalino se denomina el "porcentaje de cristalinidad". El porcentaje de cristalinidad ejerce una influencia sobre las propiedades del polímero. El porcentaje de cristalinidad se puede determinar por técnicas analíticas tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC) o métodos espectroscópicos relacionando el nivel de cristalinidad del material de ensayo con el de un material de control análogo en una condición cristalina saturada. Se usa DSC para cuantificar el calor latente de la fusión (cristalina) y proporciona una estimación de la energía necesaria para fundir la fracción cristalina.

45 Un polímero o copolímero experimenta hidrólisis cuando reacciona con medios acuosos, por lo que resulta la escisión de cadenas del polímero o copolímero. La hidrólisis puede avanzar a grados y tasas variables dependiendo de factores medioambientales y otros factores. La hidrólisis parcial ocurre cuando se han roto por reacciones con agua algunas cadenas del polímero, pero no todas. "Descomponer sustancialmente por hidrólisis" significa que una porción sustancial de la masa de polímero sólido se disuelve en el líquido acuoso circundante dando como resultado una pérdida de masa sólida de 20 por ciento o más, en una realización de 40 por ciento o más, en otra realización de 50 por ciento o más, en otra realización más de 75 por ciento o más, y en otra realización más de 95 por ciento o más. Los polímeros adecuados para su uso en la presente invención son hidrolíticamente degradables, que se define como la característica de un compuesto (por ejemplo, un polímero o un aducto polimérico) cuando se expone a líquidos acuosos que tienen pH casi neutro (por ejemplo, agua, sangre, transpiración) para ser sustancialmente descompuestos por hidrólisis en el plazo de 0 a 24 meses, en una realización en el plazo de 0 a 12 meses, en otra realización en el plazo de 0 a 6 meses, y en otra realización más en el plazo de 0 a 1 mes. La temperatura de un líquido acuoso al que se expone un compuesto puede estar entre temperatura ambiente y 37 °C. En el cuerpo también pueden estar presentes otros medios de degradación tales como ataque enzimático.

Un método útil en la determinación de si un polímero o un aducto polimérico es o no hidrolíticamente degradable incluye caracterizar el comportamiento de dicho polímero en un entorno acuoso adecuado por: (a) deposición del polímero o aducto polimérico sobre un sustrato estable, tal como una prótesis endovascular, para hacer un sustrato recubierto de polímero o aducto polimérico; (b) pesada del sustrato recubierto de polímero sólido o aducto polimérico restante; (c) inmersión del sustrato recubierto de polímero o aducto polimérico en un líquido acuoso que tiene pH casi neutro; y (d) pesada periódica del sustrato. Si después de la exposición durante un periodo de tiempo adecuado sigue habiendo una menor cantidad de polímero sólido o aducto polimérico restante, el polímero o aducto polimérico se considera "hidrolíticamente degradable".

En aplicaciones médicas, se desea que el polímero sea biocompatible que significa que un material tenga "la capacidad...para realizar una respuesta del hospedador apropiada en una aplicación específica" (The Williams Dictionary of Biomaterials, DF Williams, Liverpool University Press, 1999). Además, el polímero biocompatible puede ser bioabsorbible. "Bioabsorbible" significa que una sustancia se descompone sustancialmente por el entorno *in vivo* en una cantidad de tiempo de 1 a 24 meses; en una realización, en una cantidad de tiempo de 1 a 18 meses; en otra realización, en una cantidad de tiempo de 1 a 12 meses. Los polímeros semicristalinos hidrolíticamente degradables biocompatibles adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, poli(dioxanona) (PDO), poli(glicolida) (PGA), poli(lactida) (PLA), poli(ϵ -caprolactona), poli(anhídridos) tales como poli(ácido sebácico), poli(hidroxialcanoatos) tales como poli(3-hidroxibutirato) (P3OHB), y cualquier otro polímero que cumpla la definición de biocompatible, semicristalino e hidrolíticamente degradable. Los copolímeros hidrolíticamente degradables semicristalinos biocompatibles adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de los polímeros anteriores tales como poli(glicolida)/carbonato de trimetileno (PGA/TMC), poli(lactida)/carbonato de trimetileno (PLA/TMC), poli(hidroxibutirato/hidroxi valerato) (PHB/PHV), y cualquier otro copolímero que sea biocompatible, semicristalino e hidrolíticamente degradable. Los copolímeros citados en el presente documento se describen basándose en una relación de peso entre el primer polímero y el segundo polímero (por ejemplo, 2:1 de PGA/TMC significa dos partes de PGA con respecto a una parte de TMC basadas en peso).

La radiación ionizante es radiación compuesta de partículas o fotones que pueden liberar individualmente un electrón de un átomo o molécula, produciendo iones, que son átomos o moléculas con una carga eléctrica neta. Los tipos de radiación ionizante que pueden afectar una cadena de polímero incluyen, pero no se limitan a, rayos X, haz electrónico (haz e) y radiación gamma. Entre los diferentes tipos de radiación ionizante, varía la energía y la profundidad de penetración en un artículo. Por ejemplo, la radiación gamma, que son fotones (electromagnéticos) emitidos de una fuente radiactiva, tiene normalmente energía en el intervalo de 0,7 (Cesio-137) hasta 1,3 (Cobalto-60) megaelectronvoltios (MeV). Dada la forma y energía, la radiación gamma es altamente penetrante, incluso en artículos densos, y como tal ha encontrado uso como un modo de irradiación en masa (que se extiende en el transporte en masa completo), generalmente para la esterilización. La irradiación con haces E, por otra parte, son electrones acelerados (partículas) emitidos de una pistola de electrones, y así se puede ajustar para un amplio intervalo de energías desde 1 eV hasta > 1 MeV. Dada la forma e intervalo de la energía, la irradiación con haces e no es casi tan penetrante como la radiación gamma, y la profundidad de penetración está además afectada por la densidad de artículos irradiados. Como tal, el haz e ha encontrado aplicación en la esterilización de un dispositivo entero, y en la modificación de materiales donde se desea irradiar parcialmente dentro un material, para la modificación de propiedades o la(s) posterior(es) reacción (reacciones) química(s), dejando incluso sin afectar el material, estructura o sustrato subyacente.

La dosis absorbida, o cantidad de irradiación, sometida a un artículo normalmente se informa en unidades de "grays" o "rads", donde 1 rad = 0,01 gray (Gy). Incluso más normalmente, la dosis absorbida se informa en "kilograys" o "megarads", donde 1 kGy = 0,1 Mrad. En aplicaciones médicas, se ha mostrado que la irradiación de materiales es útil con el fin de esterilización. Donde se usa para polímeros y copolímeros permanentes y absorbibles, la esterilización del dispositivo envasado final típico se logra con una dosis de aproximadamente 25 kGy.

Sin embargo, ciertos polímeros, cuando se exponen a radiación ionizante, experimentan una escisión en cadena que puede dar como resultado la formación de radicales libres a lo largo de la cadena de polímero afectada. Como se usa en el presente documento, el término "radicales libres" se define como átomos, moléculas o iones con electrones no apareados o una configuración de capa abierta. Los radicales libres pueden tener carga positiva, negativa o cero. Con algunas excepciones, estos electrones sin aparear causan que los radicales sean altamente químicamente reactivos. Los materiales de la presente invención se logran exponiendo polímeros hidrolíticamente degradables semicristalinos, biocompatibles a la radiación ionizante mediante cualquier medio conocido en la técnica con el fin de generar radicales libres estabilizados allí dentro. Se puede usar cualquier tipo de irradiación ionizante, tal como gamma y haz e. La irradiación del artículo entero (masa) se realiza fácilmente con irradiación gamma, y con irradiación de haces e (a energía en eV suficientemente alta). Se puede lograr la irradiación parcial de artículos con un tratamiento por haces e de energía más baja. Se puede usar cualquier cantidad de radiación ionizante, la dosis es inferior a 50 kGy. En otra realización, se pueden aplicar niveles bajos de radiación ionizante lográndose la esterilización por métodos alternativos. En otra realización más, los polímeros hidrolíticamente degradables semicristalinos biocompatibles se someten a radiación ionizante a una dosis que supera la requerida para la esterilización, pero es inferior a la requerida para degradar sustancialmente el polímero.

Los materiales son entonces útiles para el suministro controlable de estos radicales libres estabilizados a una localización objetivo durante un periodo de tiempo controlable. Como se usa en el presente documento, lo que se indica por "radicales libres estabilizados" son radicales que se forman en una matriz protectora, tal como un cristal o estructura cristalina, y, por tanto, son incapaces de reaccionar o ser consumidos en una reacción química hasta que dicha matriz sea suficientemente degradada para permitir la exposición del radical al entorno circundante. La concentración de radicales libres estabilizados también se puede afectar mediante la variación de los parámetros de proceso tales como, pero no se limitan a, nivel, duración y nivel de energía de la exposición a radiación ionizante, grado de cristalinidad dentro del polímero semicristalino, presencia de aditivos tales como eliminadores, y orden de las etapas de proceso.

Una herramienta adecuada para la detección y el análisis de radicales libres en un material dado es la resonancia paramagnética electrónica (EPR). Este método es sinónimo al informado en la bibliografía como ESR, o resonancia de espín electrónico. En términos más sencillos, la mera presencia de una "señal" o "espectro" de EPR confirma la presencia de radicales libres en un material dado que interacciona con el campo magnético aplicado por el EPR. En ausencia de radicales libres, no se observarían espectros de EPR, en su lugar solo se observaría una línea plana. Las mediciones de EPR mostradas en la FIG. 1 muestran la existencia de radicales libres en las realizaciones de polímeros semicristalinos de la presente invención (PDO, 2:1 de PGA/TMC y P3OHB). A diferencia, los polímeros amorfos en la FIG. 1 (d,l-lactida y pTMC) muestran poca o ninguna señal de EPR, que indica la ausencia de radicales libres.

Además, las realizaciones de polímeros hidrolíticamente degradables semicristalinos de la presente invención muestran la desaparición de los picos de radicales libres a medida que la temperatura del polímero semicristalino se aproxima a la temperatura de fusión de los dominio cristalinos. Por ejemplo, la temperatura de fusión cristalina del copolímero 2:1 de PGA/TMC es aproximadamente 200 °C, con una endoterma de fusión significativa observada desde 180 hasta 200 °C, como se muestra en la FIG. 2. Durante la fusión, la movilidad de la cadena de polímero aumenta significativamente, aumentando la probabilidad de recombinación y la reacción de radicales libres con otras sustancias. Como se muestra en la FIG. 3, la señal de EPR de 2:1 de PGA/TMC irradiado con gamma de 45 kGy está presente a temperatura ambiente, 80 °C y 130 °C. A 180 °C, los dominios cristalinos empiezan a fundir y disminuye la señal de EPR. El enfriamiento desde 180 °C de nuevo hasta temperatura ambiente no regenera radicales libres como se demuestra por ningún pico de EPR. Una vez se liberan los radicales libres por los dominios cristalinos de la fusión del polímero semicristalino, no se vuelven a formar espontáneamente.

La FIG. 4 es una curva de DSC de los mismos comonomeros del ejemplo anterior [glicolida (GA) y carbonato de trimetileno (TMC)] que es 1:1 de PGA/TMC que tiene una estructura de cadenas al azar y pocos o ningún dominio cristalino. Después de la irradiación gamma a 45 kGy, esta forma de copolímero amorfo no cristalino no presenta una señal de EPR significativa. Como se muestra en la FIG. 5, la señal es inferior a 0,1 (unidades). Es importante observar el cambio en la escala reflejada en la FIG. 5 frente a la de FIG. 4. Tras el calentamiento, el trazo de la señal de EPR no se altera hasta 280 °C. El posterior enfriamiento de nuevo hasta temperatura ambiente no crea una señal de EPR significativa. La ausencia de una señal de EPR confirma que este copolímero al azar irradiado amorfo no contiene prácticamente radicales libres estabilizados.

Otro ejemplo de este fenómeno se puede observar en la FIG. 6, que incorpora el uso de poldioxanona (PDO) que tiene una temperatura del fundido cristalino de aproximadamente 110 °C. Como se muestra en la FIG. 7, después de la irradiación gamma a 45 kGy, el polímero semicristalino hidrolíticamente degradable de PDO presenta una fuerte señal de EPR a temperatura ambiente y tras el calentamiento a 80 °C. Sin embargo, una vez se alcanza la temperatura del fundido cristalino, desaparece la señal de EPR y no permanecen radicales libres (FIG. 7).

Las mediciones de EPR también muestran la existencia de radicales libres en otra realización de polímero semicristalino hidrolíticamente degradable bioabsorbible de la presente invención, poli-3-hidroxiobutirato (P3OHB). P3OHB tiene una temperatura del fundido cristalino de aproximadamente 170 °C (FIG. 9). Como se muestra en la FIG. 8, la señal de EPR de P3OHB irradiado con gamma de 45 kGy es fuerte a temperatura ambiente y tras el calentamiento hasta 80 °C y 130 °C, luego desaparece a medida que la temperatura aumenta adicionalmente por encima del fundido cristalino hasta 180 °C. El enfriamiento desde 180 °C de nuevo hasta temperatura ambiente no vuelve a crear una señal de EPR. Otra vez, una vez se liberan los radicales libres por fusión de los dominios cristalinos del polímero semicristalino, no se vuelven a formar espontáneamente nuevos radicales libres.

El movimiento de cadenas de polímero está limitado dentro de la fase cristalina de un polímero. Para una dosis dada de energía ionizante, la estabilidad de los radicales libres generados por la irradiación se relaciona con el grado de restricción del movimiento dentro de la fase cristalina. DSC evalúa el calor latente de fusión para proporcionar una estimación de la energía requerida para fundir la fracción cristalina (es decir, para vencer las fuerzas restrictivas de un cristal). La energía requerida para fundir la fracción cristalina se determina integrando el área de la endoterma del fundido en un trazo de DSC y se denomina la entalpía de fusión. Como se ha descrito anteriormente, se usa EPR para detectar radicales libres y puede proporcionar una estimación de la concentración de radicales libre en un material dado. Esta estimación de la concentración de radicales libres se determina por integración doble de los espectros de EPR por unidad peso de muestra (libro de referencia "Quantitative EPR" por Eaton et al., p. 30, 2010). La combinación de los dos, en el que la doble integral de la intensidad de EPR por unidad de peso de muestra se divide entre la entalpía de fusión, puede proporcionar una estimación total de la concentración de radicales libres por

unidad cristalina. Es más probable que las realizaciones de materiales con una fase cristalina más tenaz proporcionen puerto seguro para un radical libre formado. Este almacenamiento más eficaz de radicales libres estabilizados en polímeros semicristalinos hidrolíticamente degradables es útil en proporcionar mayor concentración de radicales libres por cristal. La FIG. 10 indica altas concentraciones de radicales libres por entalpía del fundido cristalino, superiores a 10 unidades, para muestras de 2:1 de PGA/TMC semicristalino, hidrolíticamente degradable, bioabsorbible después de la exposición a 45 kGy de irradiación gamma y después de 60 kGy de irradiación gamma. El efecto resultante demuestra que altas concentraciones de radicales libres estabilizados pueden persistir en polímeros semicristalinos hidrolíticamente degradables biocompatibles expuestos a elevados niveles de radiación ionizante. En una realización, la concentración de radicales libres por entalpía del fundido cristalino es mayor que 10 unidades. En otra realización, la concentración de radicales libres por entalpía del fundido cristalino es mayor que 15 unidades. En otra realización más, la concentración de radicales libres por entalpía del fundido cristalino es mayor que 20 unidades.

Los radicales libres estabilizados asegurados dentro del polímero semicristalino hidrolíticamente degradable biocompatible pueden evaluarse de forma controlada tras la exposición a un medio acuoso donde se asegura la hidrólisis del polímero. El pH y/o la temperatura del medio acuoso también pueden afectar la tasa de hidrólisis y, por tanto, la tasa de acceso a los radicales libres estabilizados. Los medios acuosos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disolución acuosa de tampón, líquidos biológicos y vapor de agua. Una vez se ha accedido a un medio acuoso, los radicales libres están disponibles para reaccionar con oxígeno disuelto en los medios acuosos. "Medio acuoso que contiene oxígeno" significa cualquier líquido que comprenda agua, o de otro modo sea capaz de la degradación hidrolítica de materiales, y oxígeno. En sistemas biológicos, los medios acuosos adecuados que contienen oxígeno incluyen, pero no se limitan a, exudado de heridas, sangre, suero, transpiración y líquido extracelular. Por ejemplo, un medio acuoso estaría presente dentro del cuerpo, dentro de un lecho de la herida, en la superficie de la piel, en cualquier superficie de la mucosa, así como otras áreas.

Cuando los radicales libres reaccionan con una molécula de oxígeno, se pueden generar especies reactivas oxidativas (ERO). Por ejemplo, cuando reaccionan con oxígeno disuelto, los radicales libres reducen el oxígeno molecular para generar superóxido, $O_2^{\cdot-}$. El superóxido es parte de una amplia familia de compuestos activos de especies reactivas de oxígeno doble, o ERO. El superóxido se puede descomponer espontáneamente o catalíticamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha informado que el superóxido también puede reaccionar con óxido nítrico ($NO\cdot$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Las reacciones acuosas de Fenton de peróxido de hidrógeno también conducen a radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y perhidroxi ($\cdot OOH$). Los compuestos anteriores y otros compuestos tales como oxígeno singlete (1O_2), hipoclorito (ClO^-), y todas sus combinaciones, se incluyen en la familia de ERO.

Debido a la estabilidad de los radicales libres en las porciones cristalinas de los materiales de la presente invención, se pueden generar ERO durante un periodo de tiempo prolongado. Por "periodo de tiempo prolongado" se indica que persiste durante más de un mínimo de 24 horas, en una realización durante más de una semana, en otra realización durante más de un mes.

La naturaleza evanescente del superóxido requiere seleccionar métodos de detección. Un método adecuado para detectar el superóxido implica el uso de compuestos quimioluminiscentes tales como luminol, o aún otros que son la fotoproteína Pholasin® (Knight Scientific Ltd., Plymouth, R.U.), con un espectrofotómetro adecuado tal como el lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc., Cary NC). Pholasin® reaccionará con el superóxido y otras ERO para dar luz, o iluminar. La atribución al superóxido se determina específicamente por la diferencia de la señal quimioluminiscente de Pholasin® entre los pocillos de muestra miembros, uno de los cuales incluye superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza la reacción de dismutación de superóxido en la que el superóxido se convierte en oxígeno y el peróxido de hidrógeno. Las realizaciones irradiadas en el presente documento demuestran la formación y presencia de radicales libres estabilizados, y la generación de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) una vez expuesto al medio acuoso que contiene oxígeno. Además, las realizaciones de copolímeros irradiados 2:1 de PGA/TMC en el presente documento demuestran una tendencia no lineal entre la dosis irradiada y la generación de ERO (incluyendo superóxido), en particular entre los niveles de 30 y 50 kGy (FIG. 10).

Otras especies de ERO que son capaces de ser generadas por materiales de la presente invención es el oxígeno singlete. Con un espectrofotómetro adecuado, se puede usar MCLA (2-metil-6-(p-metoxifenil)-3,7-(dihidroimidazo[1,2alfa]pirazin-3-ona)) para detectar oxígeno singlete. En este caso, la atribución a oxígeno singlete se determina entre muestras hermanas, una de las cuales incluye azida de sodio (NaN_3), que extingue el oxígeno singlete (Bancirova, Luminescence, 26 (6), 685-88 (2011)). Las realizaciones irradiadas en el presente documento demuestran la formación y presencia de radicales libres estabilizados, y la generación de oxígeno singlete una vez expuesto a medio acuoso que contiene oxígeno.

El peróxido de hidrógeno es otra especie de ERO más capaz de ser generada por los materiales de la presente invención. Se puede usar Amplex® Red (Molecular Probes, Eugene, OR) como sonda fluorescente para el peróxido de hidrógeno usando un lector de microplacas. La atribución a peróxido de hidrógeno se cuantifica por la reducción luminiscente observada en una muestra hermana que contiene la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Las realizaciones irradiadas en el presente documento demuestran la formación y presencia de radicales libres estabilizados, y la generación de peróxido de hidrógeno una vez expuesto a medio acuoso que contiene oxígeno.

Además del oxígeno presente en los medios acuosos, en algunas realizaciones, los materiales de la presente invención pueden comprender además un generador de oxígeno. Como se usa en el presente documento, el término "generador de oxígeno" se define como cualquier componente capaz de generar oxígeno. Cuando se incorpora en los materiales de la presente invención, el generador de oxígeno es ventajoso ya que el oxígeno adicional está disponible para reaccionar con los radicales libres estabilizados del material para posiblemente conducir la generación adicional de especies reactivas oxidativas. Puede desearse la capacidad para modificar la generación de ERO a través de la disponibilidad variable de oxígeno dado el intervalo de procesos biológicos que están afectados por ERO a diferentes concentraciones y/o duraciones.

En vista de la naturaleza químicamente reactiva de ERO, puede ser ventajoso incorporar compuestos adicionales en los materiales de la presente invención que sean capaces de reaccionar con ERO. Por ejemplo, un compuesto que contiene nitrógeno es capaz de reaccionar con ERO dando el producto óxido nítrico y se puede incorporar en los materiales o dispositivos descritos en el presente documento. Similar a ERO, el óxido nítrico es un mediador de múltiples procesos biológicos y se sabe que desempeña funciones críticas en los estados fisiológicos y patológicos, que incluyen, pero no se limitan a, salud cardiovascular y enfermedad).

Dada la capacidad de los radicales libres estabilizados para reaccionar de una manera controlable y generar moléculas biológicamente activas, tales como ERO, los métodos para proporcionarlos a sitios de tratamiento deseados son la base para el uso terapéutico. Por ejemplo, un material que genera superóxido como se describe en el presente documento se puede poner en o cerca de un sitio de tratamiento, tal como, pero no se limita a, una herida, de manera que el superóxido producido pueda ayudar en el proceso de curación. El contacto entre el sitio de tratamiento y el material que comprende los radicales libres estabilizados puede ser directo o indirecto. Por ejemplo, se puede situar una capa de composiciones terapéuticas u otros materiales médicos entre el sitio de tratamiento y los presentes materiales. El material que contiene radicales libres estabilizados puede entonces seguir en estrecha proximidad al sitio de tratamiento durante un periodo de tiempo deseado.

Además, tras la aplicación del material inventivo en el sitio de tratamiento deseado, se pueden utilizar mecanismos variados para potenciar la producción de ERO en el sitio de tratamiento. Por ejemplo, además de potenciar la producción de ERO aplicando un material que comprende radicales libres estabilizados, expone el material a un entorno acuoso que contiene oxígeno y modula la cantidad de oxígeno accesible al material. Se puede aumentar el oxígeno accesible aumentando la concentración de oxígeno atmosférico por terapia con oxígeno hiperbárico, por ejemplo. En otro ejemplo, la concentración local de oxígeno atmosférico se puede modular por terapia tópica con oxígeno. Se puede aumentar la cantidad de oxígeno suministrada por la sangre aumentando la concentración de oxígeno en la sangre. Por ejemplo, se podría aumentar el contenido de oxígeno en sangre aumentando el número de glóbulos rojos disponibles. Además, se podría aumentar la liberación de oxígeno por los glóbulos rojos por una reducción en el pH mediante el efecto de Bohr. Para aumentar la cantidad total de sangre que suministra oxígeno, se puede aumentar la perfusión en el sitio de tratamiento. Los métodos de aumento de la perfusión incluyen aplicar terapia de heridas con presión negativa, tratamiento quirúrgico o intervencionista. Además, como se ha descrito anteriormente, se puede incorporar un componente generador de oxígeno en el material hidrolíticamente degradable semicristalino biocompatible, aumentando así el oxígeno disponible para la reacción con los radicales libres estabilizados.

Dependiendo del uso deseado, los presentes materiales que comprenden radicales libres estabilizados pueden tomar múltiples formas tales como algunas de configuración bidimensional o tridimensional que incluyen, pero no se limitan a, un apósito para herida, un apósito para quemaduras, un bálsamo, una suspensión, un sustituto de piel, un armazón de tejido, una hoja, una pasta, una fibra, una emulsión, geles, micelas, recubrimientos, disoluciones o polvo, o sus combinaciones. Las diferentes formas del material que comprende radicales libres estabilizados pueden tener diferentes áreas superficiales específicas que a su vez pueden afectar la generación de ERO. En algunos casos, el material polimérico biocompatible puede tener un área superficial específica desde 0,001 m²/g hasta 50 m²/g. Por "área superficial específica" se indica la suma de las superficies accesibles de todas las partículas, fibras, espumas y/o estructuras porosas presentes por unidad de volumen o masa. Esta área superficial específica depende de la forma, tamaño, porosidad y microestructura del material. Se puede medir por el método de adsorción de gas. El área superficial específica se calcula a partir de la ecuación de BET basada en los volúmenes específicos de retención que se determinan a partir de los cromatogramas de gas de desorción de calor. Normalmente se usa nitrógeno como adsorbato.

Una forma posible es una hoja que se define como cualquier capa flexible o rígida en la que la relación de cualquiera de su ancho o anchura con respecto a su espesor es mayor que 10:1. Para los fines de la presente solicitud, una hoja puede consistir en una disposición relativamente plana de filamentos depositados. Por "filamento" se indica una fibra o fibras de longitud sustancial. Una hoja hecha depositando o ensamblando fibras se conoce como una banda. Las bandas y otros materiales pueden ser no tejidos, que significa que están hechos de fibras largas, unidas juntas por tratamiento químico, mecánico, por calor o disolvente. Además, una fibra se define como una estructura cilíndrica o tubular en la que la relación entre la longitud y el diámetro es generalmente mayor que 100:1 y el diámetro es generalmente inferior a 5 mm. Los materiales de hoja generadores de ERO adecuados pueden tener un espesor entre 1 µm y 20 mm. Algunas realizaciones preferidas tienen un espesor entre 100 µm y 10 mm. El espesor de hoja y la densidad pueden ser adaptados para proporcionar mayor adaptabilidad a la topografía superficial deseada, tal como adaptación al sitio de tratamiento.

Se puede elegir una forma plegable del material inventivo de manera que se pueda aplicar eficazmente a la localización diana donde se desea la generación de ERO. Cuando se usa en una forma de emulsión, suspensión o suspensión, el material generador de ERO se puede proporcionar al cuerpo por una jeringa u otro dispositivo de administración de líquidos adecuado. Cuando se usa en una forma de pasta, gel o pomada, el material generador de ERO se puede proporcionar al sitio de tratamiento por una espátula u otro dispositivo de administración de líquidos viscosos adecuado. Cuando se usa en una forma de polvo o partícula, el material generador de ERO puede ser rociado o pulverizado o depositado sobre el sitio de tratamiento deseado por cualquier medio adecuado. Debido a que las diferentes formas del material generador de ERO pueden tener diferentes áreas superficiales específicas y/o relaciones de aspecto, la forma elegida es un método de afectar la concentración y duración de las ERO que se producen en el sitio de tratamiento.

Aunque el material no necesita ser poroso, en ciertos casos se pueden desear porosidad o un área superficial elevada de manera que el medio acuoso que contiene oxígeno pueda infiltrar los espacios abiertos del material. Por "poroso" se indica que un material tiene una densidad aparente inferior a la de la densidad intrínseca del propio material. Porosidades en el intervalo de 5 por ciento hasta 99 por ciento normalmente son suficientes para potenciar el contacto del líquido biológico y afectar la generación de ERO en el sitio. Puede ser útil tener una porosidad en el intervalo de 10 por ciento hasta 90 por ciento en algunas circunstancias. Una ventaja adicional de los materiales generadores de ERO descritos en el presente documento es su capacidad para funcionar como un almacén de tejido. Como almacén de tejido, el material generador de ERO poroso puede inducir la neovascularización, rellenar con tejido colagenoso, servir de medio de crecimiento celular, estimular la migración celular en el material y promover la proliferación y diferenciación celular, y/o absorberse con el tiempo. El cambio de la porosidad puede alterar las características de generación de ERO según se necesite para afectar los procesos biológicos y, por tanto, se puede ajustar dependiendo de la aplicación deseada.

Otra característica útil de los materiales de generación de ERO en el presente documento es que se pueden proporcionar en una forma tridimensional o pueden ser moldeables. Por "moldeable" se indica la capacidad de una estructura para ajustarse o adaptarse a un contorno, forma, patrón o ajuste particular. Se pueden desear formas tridimensionales o materiales moldeables con el fin de llenar espacios vacíos o topografía irregular de contacto en o alrededor de un sitio de tratamiento o localización de tratamiento. Las realizaciones previstas incluyen, pero no se limitan a, un tapón, tubo, prótesis endovascular, pelusa, bobina, espuma, cabestrillo, grapa, partícula, chip, y sus variaciones.

Otra ventaja más del presente material generador de ERO es que se puede formar a partir de un material pigmentado o coloreado, o material naturalmente coloreado para potenciar la visualización. Por ejemplo, se puede usar un material generador de ERO amarillo para la fácil visualización de tejido de granulación, que se caracteriza por un aspecto de adoquín rojo brillante.

Como se usa en el presente documento, los materiales compuestos son materiales hechos de dos o más materiales constituyentes con propiedades significativamente diferentes que, cuando se combinan, producen un material con características diferentes de los componentes individuales. Específicamente, los materiales compuestos que permiten la generación multifásica de ERO serían valioso para afectar los numerosos procesos biológicos influidos por la presencia de ERO. Por ejemplo, estos materiales compuestos comprenden dos o más polímeros semicristalinos hidrolíticamente degradables diferentes, cada uno de los cuales comprende radicales libres estabilizados, pero que varían en términos de sus perfiles de generación de ERO. Tras la exposición a medios acuosos, estos materiales compuestos pueden presentar generación multifásica de especies reactivas oxidativas. La generación multifásica de ERO se puede lograr donde los polímeros componentes del material compuesto contengan una cantidad diferente de radicales libres estabilizados. En una realización, la generación de ERO se puede alterar modificando la tasa de degradación hidrolítica de al menos uno de los polímeros componentes, alterando así el acceso a los radicales libres estabilizados. En otra realización, la generación de ERO se puede alterar modificando el grado de cristalinidad de al menos uno de los polímeros componentes, alterando así la capacidad del polímero para estabilizar los radicales libres. En otra realización más, la generación de ERO se altera modificando la dosis de radiación de al menos uno de los polímeros componentes, alterando así el número de radicales libres formados durante la escisión de cadenas. En aún una realización más, la generación de ERO se puede alterar modificando la dosis de radiación y la profundidad de penetración en un polímero o un material compuesto de polímero. Para ciertas aplicaciones, se prevé que al menos uno de los polímeros componentes pueda ser bioabsorbible.

Alternativamente, se puede prever un material compuesto que podría proporcionar un estallido inicial de ERO y un periodo sostenido de generación de ERO. En una realización, se puede usar una mezcla de materiales compuestos de dos polímeros semicristalinos hidrolíticamente degradables diferentes para proporcionar un estallido potenciado de ERO donde tras la exposición a medio acuoso que contiene oxígeno, la cantidad de especies reactivas oxidativas producida por la mezcla es mayor que el promedio en peso de las especies reactivas oxidativas producidas por los al menos dos materiales poliméricos semicristalinos hidrolíticamente degradables individuales que se han sometido a radiación ionizante a la dosis de radiación dada.

Solo los materiales compuestos biocompatibles que entran dentro del alcance de la reivindicación 1 son según la invención. Además de los materiales compuestos en los que los polímeros componentes contienen radicales libres

estabilizados, se prevén los materiales compuestos que comprenden al menos un material que contiene radicales libres estabilizados y al menos un segundo material en el que el segundo material no contiene radicales libres estabilizados y serían valiosos proporcionando un dispositivo estable parcialmente permanente reforzado que es capaz de generar ERO. Se puede lograr dicho material compuesto que comprende al menos un material que contiene radicales libres estabilizados y al menos un segundo material en el que el segundo material no contiene radicales libres estabilizados mediante el recubrimiento del primer material sobre el segundo sustrato de material. El recubrimiento se puede hacer disolviendo el primer material deseado en disolución y aplicándolo sobre un segundo sustrato de material, tal como PTFE expandido, y retirando el disolvente. Además, también se puede realizar un recubrimiento por deposición por pulverización de pequeñas partículas del primer material sobre el segundo sustrato de material y posterior unión o fusión. Dicho recubrimiento puede variar en cobertura superficial sobre el sustrato, así como espesor y porosidad. Dicho artículo recubierto se puede someter a partir de aquí a una irradiación de profundidad parcial para generar los radicales libres estabilizados solo en la capa de polímero semicristalino hidrolíticamente degradable.

Se prevén un material compuesto que comprende al menos un material que contiene radicales libres estabilizados y al menos un segundo material en el que el segundo material modifica el perfil de generación de ERO. El material modificador puede lograr su efecto alterando la cantidad, tasa o duración de ERO o sus combinaciones. Un mecanismo para alterar el perfil de ERO es que el segundo material altere la accesibilidad a los radicales libres estabilizados. En un enfoque adicional para alterar la generación de ERO, el material modificador puede contener un generador de oxígeno y/o un desecante. En otra realización, el material modificador puede contener un componente eliminador donde las posibles dianas del eliminador pueden incluir oxígeno, oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, superóxido y sus combinaciones. Además, el material modificador puede contener una enzima tal como superóxido dismutasa, que reacciona con el superóxido, o una catalasa, que reacciona con peróxido de hidrógeno. La inclusión de un generador de oxígeno, desecante, componente eliminador y/o enzima en el segundo material alteraría el perfil de ERO generado y podría ajustarse para aplicaciones específicas. Además, el material modificador puede participar en una reacción química con ERO alterando así su perfil. Además, el material modificador puede ser capaz de generar una reacción exotérmica o endotérmica tras el contacto con medios acuosos. La adición o retirada de energía térmica puede modificar el movimiento de cadenas poliméricas y/o la cinética de otras reacciones químicas, cambiando así el perfil de generación de ERO.

Se prevén materiales compuestos que comprenden al menos un material que contiene radicales libres estabilizados y un agente(s) bioactivo(s) terapéutico(s). Los agentes bioactivos en este contexto se pueden seleccionar del grupo que consiste en sustancias osteoconductoras, sustancias osteoinductoras, factores de crecimiento, factores quimiotácticos, morfógenos, productos farmacéuticos, proteínas, péptidos y moléculas biológicamente activas de origen autógeno, alógeno, xenógeno o recombinante tales como factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), proteínas formogénicas óseas (BMP), antibióticos, antimicrobianos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), insulina, anticuerpos de inmunoglobulina tipo G y sus combinaciones.

Dada la relevancia biológica de ERO, también se prevé el uso de un artículo generador de ERO en combinación con otros compuestos terapéuticos, tales como un fármaco antibiótico o antineoplásico. Se podría usar un dispositivo de implante generador de ERO en combinación con cualquier clase de compuestos antibióticos administrados por vía sistémica, tales como quinolonas, beta-lactámicos y aminoglucósidos, y puede dar como resultado un tratamiento más eficaz que permite que se ponga un implante permanente en un campo contaminado o infectado. Dicha combinación también puede ser eficaz con una menor administración de antibiótico, disminuyendo la resistencia o prolongando la longevidad de dichos compuestos. Además, se podría usar un dispositivo generador de ERO en combinación con otros agentes antimicrobianos que incluyen, pero no se limitan a, plata, clorhexidina y sus combinaciones. La terapia de combinación resultante puede proporcionar un implante que es resistente a la colonización bacteriana, que permite nuevamente la colocación en un campo altamente contaminado o infectado. Un dispositivo generador de ERO usado en combinación con un fármaco antineoplásico, como los inhibidores de la topoisomerasa II tales como Paclitaxel(tm), puede permitir un tratamiento más eficaz donde el dispositivo proporciona una administración local de ERO y permite una menor dosis sistémica del fármaco quimioterapéutico a administrar.

El material modificador también puede actuar de barrera a elementos que incluyen, pero no se limitan a, humedad y/u oxígeno, que afectarían la reducción de oxígeno a ERO por los radicales libres. En otra realización, el material modificador puede funcionar de barrera de difusión. Las restricciones de difusión podrían incluir componentes reactivos o productos de reacción, alterando así el perfil de generación de ERO. Uno o más de los materiales componentes en el material compuesto de un material que contiene radicales libres estabilizados y un material modificador puede contener compuestos adicionales tales como un generador de oxígeno y/o un compuesto que contiene nitrógeno que reaccionaría con ERO dando el producto óxido nítrico.

Se prevé que los materiales compuestos como se describe en el presente documento existan en formas múltiples y sean capaces de generación de ERO durante múltiples periodos de tiempo, que incluyen un día, semana o mes, añadiéndose así al alcance de su posible aplicación.

Se prevé un material compuesto que comprende múltiples capas de materiales similares o distintos, tales como porosidad, para lograr un espesor deseado y en el que al menos una de las capas sea un material semicristalino bioabsorbible no tejido. El espesor adecuado de dicho material compuesto varía desde aproximadamente 100 µm hasta más de aproximadamente 10 mm. Por ejemplo, una capa de poros más abiertos puede estar en un lado del artículo para facilitar el crecimiento de tejido, mientras que se usa una capa de poro más ajustado en el lado opuesto para inhibir el crecimiento de tejido.

Además, los materiales de la presente invención se pueden incorporar en cualquier dispositivo médico implantable, tales como prótesis endovasculares, mallas, injertos, o cualquier composición terapéutica. Por "dispositivo médico implantable" se indica cualquier objeto implantado mediante cirugía, inyección, colocación, o aplicación, u otros medios adecuados cuya función primaria se logra ya sea a través de su presencia física o propiedades mecánicas.

Ejemplos

Solo los materiales compuestos biocompatibles que entran dentro del alcance de la reivindicación 1 son según la invención. Como consecuencia, los ejemplos se refieren a precursores de estos materiales compuestos biocompatibles o son para referencia solo.

Ejemplo 1: Método de detección de prueba de ERO usando el ensayo Pholasin®

Para determinar la cantidad de ERO presente en una muestra particular S utilizó un lector de microplacas multimodal FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc., Cary, NC), normalmente con una placa de muestra de 96 pocillos. Este lector tiene capacidad inyectora de jeringa doble, con la capacidad de inyección de reactivos en los pocillos de muestra. Se siguió el protocolo del kit de ensayo de ABEL 61M (Knight Scientific Ltd., 15 Wolseley Close Business Park, Plymouth, PL2 3BY, R.U.), que incluye la fotoproteína sensible a ERO Pholasin®, para los parámetros de microplacas. Se lavaron las bombas de inyector con osmosis inversa / agua desionizada (RO/DI) y el lector se estableció a la temperatura apropiada (normalmente 37 °C).

En la prueba de las muestras poliméricas, normalmente se usó un disco de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, que fue ligeramente más pequeño que el diámetro de un pocillo dado. Dado el número objetivo de muestras a analizar, se llenaron los números apropiados de pocillos con una disolución de tampón, y entonces se colocaron los discos poliméricos en los pocillos respectivos.

Se insertó rápidamente la placa de pocillos de muestra en la microplaca, y se iniciaron y recogieron mediciones continuas de fotoluminiscencia (informadas en unidades relativas de luz, o URL). Después de quince (15) minutos de equilibrado, se inyectó Pholasin® o se pipeteó en cada pocillo que contenía una muestra y la disolución de tampón. La recogida de datos continuó durante un periodo de tiempo adicional.

Ejemplo 2: Superóxido y otra determinación de ERO usando el ensayo de Pholasin®

Para determinar la señal atribuible a superóxido para una muestra dada, siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, se preparó simultáneamente un pocillo de muestra hermano para la microplaca en la que el tampón se aumentó adicionalmente con superóxido dismutasa (SOD). Se proporcionó SOD en el kit de prueba ABEL-61M. La diferencia en los trazos de URL normalizadas entre el Ejemplo 1 y el pocillo hermano con SOD dio la señal atribuible a superóxido, normalmente informada como la máxima URL. Las "otras ERO" que no incluyen superóxido son los datos registrados para el pocillo de muestra que contenía SOD.

Ejemplo 3: Método de prueba de oxígeno singlete usando el ensayo de MCLA en microplaca

Se utilizó un lector de microplacas multimodal de FLUOstar Omega, normalmente con una placa de muestra de 96 pocillos. La temperatura de la cámara de ensayo se estableció a 37 °C. En el ensayo de las muestras poliméricas, se usó normalmente un disco de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, que fue ligeramente más pequeño que el diámetro de un pocillo dado. El indicador quimioluminiscente usado para detectar el superóxido y el oxígeno singlete fue MCLA, o 2-metil-6-(p-metoxifenil)-3,7-(dihidroimidazo[1,2alfa]pirazin-3-ona (Bancirova, Luminescence, 26 (6), 685-88 (2011)). Se compró MCLA de Molecular Probes, Eugene, OR. Se prepararon pocillos de muestra hermanos del siguiente modo:

1. Probeta irradiada con disolución de MCLA tamponada
2. Probeta irradiada con MCLA tamponada y SOD
3. Probeta irradiada con MCLA tamponada y SOD y NaN₃
4. Probeta irradiada con MCLA tamponada y NaN₃
5. MCLA tamponada solo

Tras la preparación de pocillos, la placa de pocillos se insertó rápidamente en la microplaca, y se iniciaron mediciones continuas de la fotoluminiscencia (informada en unidades relativas de luz, o URL) y se recogieron

durante aproximadamente 5 minutos. La diferencia de URL entre las muestras 1 y 2 es atribuible al superóxido. La diferencia de URL entre 1 y 4 es atribuible a oxígeno singlete. La diferencia de URL entre 1 y 3 es atribuible a superóxido y oxígeno singlete. La URL del pocillo 5 se establece como nivel inicial de control.

Ejemplo 4: Método de ensayo de DSC modulada

- 5 Se realizó DSC modulada (MDSC) en un TA Instruments Q2000 DSC usando el modo de DSC modulada usando la siguiente configuración:
- Calentamiento de muestra inicial desde -50 °C hasta 250 °C usando una velocidad de calentamiento subyacente de 2 °C/min. La modulación se llevó a cabo usando un intervalo de temperatura de +/- 0,32 °C con un periodo de 60 segundos.

10 Ejemplo 5: Método de DSC estándar

Se realizó DSC en un TA Instruments Q2000 DSC usando el siguiente establecimiento:

- Calentamiento de muestra inicial desde -50 °C hasta 300 °C a 10 °C/min.

Ejemplo 6: Preparación de muestras de HC

- 15 Se prepararon probetas sólidas de un material polimérico dado mediante compresión en caliente de pellas o polvo como se recibieron del proveedor en hojas sólidas. Cada una se comprimió durante 5 minutos a 344 kPa (50 psi) y a una temperatura apropiadamente en o por encima del fundido como se estableció mediante DSC. Se dejó que las muestras se enfriaran y entonces se pusieron en un congelador a -20 °C para almacenamiento antes de la irradiación. Todas las probetas se irradiaron a 45 kGy (Sterigenics-Corona, CA).

Ejemplo 7: Método de prueba de EPR

- 20 Se adquirieron espectros de EPR con el espectrómetro Bruker Biospin X-band CW-EMX (Billerica, MA) que funcionaba nominalmente a aproximadamente 9 GHz con 100 kHz de modulación de campo magnético. Normalmente, los espectros se adquirieron con una potencia de microondas inferior a 1 mW para evitar la saturación de señales, y se ejecutaron múltiples barridos superpuestos para llegar a espectros de EPR.

Ejemplo 8: Resultados de EPR cristalinos y amorfos

- 25 Se prepararon probetas de poli(ácido d,l-láctico) (Polysciences Cat N° 23976), poli(3-hidroxitirato) (Polysciences Cat N° 16916) y poli(dioxanona) (Aldrich Cat N° 719846) como en el Ejemplo 6. Se prepararon probetas de poli(carbonato de trimetileno) (pTMC) y copolímero de bloque de pellas de 2:1 de PGA/TMC según el Ejemplo 6. Las probetas se sellaron al ambiente en envases individuales, y se irradiaron con gamma a un objetivo de 45 kGy (Sterigenics-Corona, CA). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. El tiempo entre la irradiación y la medición de EPR fue aproximadamente 8 semanas. Para cada muestra irradiada, se realizó DSC para detectar la presencia de una endoterma del fundido por el Ejemplo (4 o 5). Similarmente, para detectar la presencia de cualquier radical libre estabilizado, se realizó EPR en cada muestra irradiada por Ejemplo 7. Los resultados se tabulan en la
- 30 Tabla 1.

Tabla 1 - Resultados de DSC y EPR

Material	¿Cristalino?*	¿Radicales libres estabilizados?***
poli(d,l-lactida)	No	No
poli(TMC)	No	No
P3OHB	Sí	Sí
2:1 de PGA:TMC	Sí	Sí
PDO	Sí	Sí

* como se ha determinado por observación de un pico del fundido de DSC

** como se ha determinado por observación de espectros de EPR

35 Ejemplo 9

Se midió la concentración de radicales libres de 2:1 de PGA/TMC irradiado con 45 kGy (objetivo) en función de la temperatura por EPR. Se preparó el copolímero de bloque de 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. La FIG. 3 muestra la señal de EPR que disminuye al aumentar la temperatura. A media que la temperatura se aproxima a la temperatura del fundido cristalino (Tm aproximadamente 200 °C) de este polímero

semicristalino, desaparece la señal de EPR y, por tanto, la concentración de radicales libres. Una vez desaparecen los radicales libres a 180 °C, no se vuelven a formar tras enfriarse hasta temperatura ambiente como se demuestra por la respuesta de EPR plana para la última línea de temperatura ambiente en la FIG. 3.

Ejemplo 10

5 Se midió la concentración de radicales libres de 45 kGy irradiados de PDO en función de la temperatura por EPR. Se pidió el polímero semicristalino de PDO de Aldrich Cat N° 719846. La FIG. 7 muestra la señal de EPR que disminuye al aumentar la temperatura. A medida que la temperatura se aproxima a la temperatura del fundido cristalino (T_m aproximadamente 110 °C) de este polímero semicristalino, desaparece la señal de EPR y, por tanto, la concentración de radicales libres.

10 Ejemplo 11

15 Se midió la concentración de radicales libres de un bloque al azar irradiado con 45 kGy de 1:1 de PGA/TMC en función de la temperatura por EPR. Se preparó la forma de la pella del copolímero de bloque al azar de 1:1 de PGA/TMC según el Ejemplo 6. La FIG. 5 muestra una EPR muy pequeña a temperatura ambiente. Esta pequeña señal disminuye al aumentar la temperatura hasta la temperatura del fundido cristalino (T_m aproximadamente 200 °C) de PGA. La posterior medición a temperatura ambiente muestra incluso menos señal de EPR que con la muestra no calentada inicial. Esta pequeña señal de EPR sugiere que los pocos radicales libres presentes en la muestra inicial desaparecen tras el calentamiento hasta la temperatura del fundido de PGA y no se forman radicales libres tras el posterior enfriamiento hasta temperatura ambiente.

Ejemplo 12

20 Se midió la concentración de radicales libres de 45 kGy irradiados de poli(3-hidroxiobutirato) (P3OHB) en función de la temperatura por EPR. Se obtuvo P3OHB de Polysciences Cat N° 16916. La muestra se irradió a 45 kGy y se midió la señal de EPR por el Ejemplo 7. La FIG. 8 muestra una fuerte señal de EPR a temperatura ambiente en respuesta al material irradiado que tiene una concentración de radicales libres relativamente alta. Esta concentración de radicales libres y señal de EPR disminuye entonces al aumentar la temperatura. A medida que la temperatura se aproxima a la temperatura del fundido cristalino (T_m aproximadamente 170 °C) de este polímero semicristalino, desaparece la señal de EPR y, por tanto, la concentración de radicales libres. Una vez desaparecen los radicales libres a 180 °C, no se vuelven a formar tras enfriarse hasta temperatura ambiente como se demuestra por la respuesta de EPR plana para la última línea de temperatura ambiente.

Ejemplo 13 - Estabilidad de radicales libres con el tiempo

30 Se preparó 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se selló la banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. La muestra se irradió entonces con gamma a una dosis objetivo de 25 kGy. A partir de la muestra de banda irradiada grande, se cortaron probetas de submuestra hasta un tamaño de aproximadamente 2,5 cm x aproximadamente 8 cm. El peso inicial de cada probeta varió entre 1,5 y 1,8 g, como se mide en una microbalanza. Cada probeta se puso en un frasco de tapa roscada individual de 226 g (8 oz.) con aproximadamente 250 ml de 3x solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma Chemical, P3813, St. Louis, MO). Se cerraron a rosca las tapas de los frascos y se pusieron en un baño de circulación calentado establecido a 37 °C. El nivel del baño de agua cumplió o superó el nivel de agua en cada frasco de muestra.

40 A periodos de tiempo seleccionados, se sacaron frascos de muestra individuales y se sacó la muestra del frasco. La muestra se secó con material absorbente sobre una toalla de papel nueva y se pesó. Entonces se transfirió la muestra impregnada en tampón a una cámara de vacío ambiental (sin calentamiento) y se sometió a un alto vacío para retirar el agua residual. Se determinó la sequedad una vez se logró un peso de muestra constante. Se observó que esto ocurría en el plazo de 4-8 horas, aunque las muestras se mantuvieron normalmente a vacío durante la noche. Una vez secadas, cada muestra se envasó individualmente en un envoltorio de barrera impermeable con desecante nuevo. Se realizaron mediciones de EPR de banda X a temperatura ambiente en las muestras hidrolizadas irradiadas como se describe en el Ejemplo 7. Se midió una respuesta de EPR en momentos de tiempo de hasta 17 días como se muestra en la FIG. 11.

Ejemplo 14 - ERO con el tiempo

50 Se preparó 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se selló la banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. La muestra se irradió entonces con gamma a una dosis objetivo de 25 kGy. A partir de la muestra de banda irradiada grande, se cortaron probetas de submuestra hasta un tamaño de aproximadamente 2,5 cm x aproximadamente 8 cm. El peso inicial de cada probeta varió entre 1,5 y 1,8 g, como se mide en una microbalanza. Cada probeta se puso en un frasco de tapa roscada individual de 226 g (8 oz.) con aproximadamente 250 ml de 3x solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma Chemical, P3813, St. Louis, MO). Se cerraron a rosca las tapas de los frascos y se pusieron en un baño de

circulación calentado establecido a 37 °C. El nivel del baño de agua cumplió o superó el nivel de agua en cada frasco de muestra.

5 A periodos de tiempo seleccionados, se sacaron frascos de muestra individuales y se sacó la muestra del frasco. La muestra se secó con material absorbente sobre una toalla de papel nueva y se pesó. Entonces se transfirió la muestra impregnada en tampón a una cámara de vacío ambiental (sin calentamiento) y se sometió a un alto vacío para retirar el agua residual. Se determinó la sequedad una vez se logró un peso de muestra constante. Se observó que esto ocurría en el plazo de 4-8 horas, aunque las muestras se mantuvieron normalmente a vacío durante la noche. Una vez secadas, cada muestra se envasó individualmente en un envoltorio de barrera impermeable con desecante nuevo. Se hicieron mediciones de ERO en las muestras hidrolizadas irradiadas como se describe en el Ejemplo 1. Se detectaron ERO en momentos de tiempo de hasta 17 días como se muestra en la FIG. 12.

Ejemplo 15: Superóxido con el tiempo

15 Se preparó 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se selló la banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. La muestra se irradió entonces con gamma a una dosis objetivo de 25 kGy. A partir de la muestra de banda irradiada grande, se cortaron probetas de submuestra hasta un tamaño de aproximadamente 2,5 cm x aproximadamente 8 cm. El peso inicial de cada probeta varió entre 1,5 y 1,8 g, como se mide en una microbalanza. Cada probeta se puso en un frasco de tapa roscada individual de 226 g (8 oz.) con aproximadamente 250 ml de 3x solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma Chemical, P3813, St. Louis, MO). Se cerraron a rosca las tapas de los frascos y se pusieron en un baño de circulación calentado establecido a 37 °C. El nivel del baño de agua cumplió o superó el nivel de agua en cada frasco de muestra.

25 A periodos de tiempo seleccionados, se sacaron frascos de muestra individuales y se sacó la muestra del frasco. La muestra se secó con material absorbente sobre una toalla de papel nueva y se pesó. Entonces se transfirió la muestra impregnada en tampón a una cámara de vacío ambiental (sin calentamiento) y se sometió a un alto vacío para retirar el agua residual. Se determinó la sequedad una vez se logró un peso de muestra constante. Se observó que esto ocurría en el plazo de 4-8 horas, aunque las muestras se mantuvieron normalmente a vacío durante la noche. Una vez secadas, cada muestra se envasó individualmente en un envoltorio de barrera impermeable con desecante nuevo. Se hicieron mediciones de ERO en las muestras hidrolizadas irradiadas como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Se detectó superóxido en momentos de tiempo de hasta 17 días como se muestra en la FIG. 12.

30 Ejemplo 16: Método de prueba de Amplex Red en H₂O₂

Se preparó disolución de muestra para la determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) pesando material de prueba y entonces poniéndolo en 500 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una condición bien mezclada a temperatura ambiente y después de 30 minutos, se muestrearon 100 µl del sobrenadante resultante.

35 La disolución de reacción se preparó nueva mezclando 50 µl de disolución de Amplex Red en DMSO (Molecular Probes, Eugene, OR), 100 µl de disolución de peroxidasa de rábano picante (HRP, 10 unidades/ml, Molecular Probes) y 4,85 ml de disolución de tampón. En una placa de 96 pocillos, se mezclaron 100 µl de sobrenadante con volumen igual de disolución de reacción en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se midió la señal de fluorescencia en un lector de microplacas Fluostar Omega a 540 nm/580 nm (excitación / emisión). Se preparó un pocillo de muestra hermano con aproximadamente 700 U/ml de catalasa (de hígado bovino, Sigma-Aldrich, cat. N° C30). La diferencia de URL entre el pocillo de Amplex y el pocillo de Amplex con catalasa es atribuible al peróxido de hidrógeno y se normalizó por el peso de la muestra usado para preparar la disolución de muestra.

Ejemplo 17: Liberación temporal de peróxido de hidrógeno de 2:1 de PGA/TMC irradiado.

45 Se preparó 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se selló la banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. La muestra se irradió entonces con gamma a una dosis objetivo de 25 kGy. A partir de la muestra de banda irradiada grande, se cortaron probetas de submuestra hasta un tamaño de aproximadamente 2,5 cm x aproximadamente 8 cm. El peso inicial de cada probeta varió entre 1,5 y 1,8 g, como se mide en una microbalanza. Cada probeta se puso en un frasco de tapa roscada individual de 226 g (8 oz.) con aproximadamente 250 ml de 3x solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma Chemical, P3813, St. Louis, MO). Se cerraron a rosca las tapas de los frascos y se pusieron en un baño de circulación calentado establecido a 37 °C. El nivel del baño de agua cumplió o superó el nivel de agua en cada frasco de muestra.

55 A periodos de tiempo seleccionados, se sacaron frascos de muestra individuales y se sacó la muestra del frasco. La muestra se secó con material absorbente sobre una toalla de papel nueva y se pesó. Entonces se transfirió la muestra impregnada en tampón a una cámara de vacío ambiental (sin calentamiento) y se sometió a un alto vacío para retirar el agua residual. Se determinó la sequedad una vez se logró un peso de muestra constante. Se observó que esto ocurría en el plazo de 4-8 horas, aunque las muestras se mantuvieron normalmente a vacío durante la

noche. Una vez secadas, cada muestra se envasó individualmente en un envoltorio de barrera impermeable con desecante nuevo. Se detectó H₂O₂ en muestras por el Ejemplo 16 y se informó en la FIG. 13.

Ejemplo 17A: Liberación de 3 meses de peróxido de hidrógeno de 2:1 de PGA/TMC irradiado.

5 Se preparó 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se selló la banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. La muestra se irradió entonces con gamma a una dosis objetivo de 45 kGy. A partir de la muestra de banda irradiada grande, se cortaron probetas de submuestra hasta un tamaño de aproximadamente 2,5 cm x aproximadamente 8 cm. Se determinó el peso inicial de cada probeta por una microbalanza. Cada probeta se puso en un frasco de tapa roscada individual con aproximadamente 250 ml de 3x solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma Chemical, P3813, St. Louis, MO). Se cerraron a rosca las tapas de los frascos y se pusieron en un baño de circulación calentado establecido a 37 °C. El nivel del baño de agua cumplió o superó el nivel de agua en cada frasco de muestra.

10 A periodos de tiempo seleccionados, se sacaron frascos de muestra individuales y se sacó la muestra del frasco. Se secaron las muestras. Una vez secadas, cada muestra se envasó individualmente en un envoltorio de barrera impermeable con desecante nuevo.

15 Para la detección de peróxido de hidrógeno, se siguió un método ligeramente modificado del Ejemplo 16. Se preparó la disolución de muestra para H₂O₂ pesando el material de prueba y luego poniéndolo en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un nivel de peso de muestra con respecto a volumen de tampón de ~200 mg/ml. En una condición de buena mezcla a temperatura ambiente y después de 60 minutos, se extrajo una submuestra del sobrenadante resultante.

20 Se preparó la disolución de reacción de disolución de Amplex Red en DMSO (Molecular Probes, Eugene, OR). En una placa de 96 pocillos, se mezcló el sobrenadante anterior con disolución de reacción de DMSO en cada pocillo y se incubó a 37 °C. Entonces se midió la señal de fluorescencia en un lector de microplacas Fluostar Omega a 540 nm/580 nm (excitación/emisión). Se preparó un pocillo de muestra hermano con aproximadamente 100 U/ml de catalasa (de hígado bovino, Sigma-Aldrich, cat. N° C30). La diferencia de URL entre el pocillo de Amplex y el pocillo de Amplex con catalasa es atribuible al peróxido de hidrógeno. Se convirtió la señal de URL en concentración absoluta de peróxido de hidrógeno por correlación con una curva de calibración, creada a partir de reserva diluida de disoluciones al 3 % de peróxido de hidrógeno.

25 Para las muestras hidrolizadas, se detectó peróxido de hidrógeno más de 3 meses como se informa en la Figura 13a.

30 Ejemplo 17B: Producción potenciada de peróxido de hidrógeno con una mezcla de polímeros

35 Se preparó una mezcla de gránulos de polímero gránulo que comprendía 90 % en peso de 2:1 de PGA/TMC y 10 % en peso de polidioxanona (PDO) (PDO comprada de Boehringer Ingelheim, lote N° 76013) según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se sellaron las muestras de banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire, que incluía una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY). Las muestras se irradiaron a una dosis objetivo de 25 kGy. A partir de una submuestra más pequeña, se determinó la generación de peróxido de hidrógeno por el Ejemplo 16. Se convirtió la señal de URL en concentración absoluta de peróxido de hidrógeno por correlación con una curva de calibración, creada a partir de disoluciones de reserva diluidas de peróxido de hidrógeno.

40 Se comparó la señal para la muestra combinada anterior con datos previos de una muestra de solo 2:1 de PGA/TMC sin combinar que se preparó similarmente según la patente de EE.UU. N° 6.165.217, aunque se irradió a una dosis objetivo significativamente más alta de 45 kGy. A partir de una submuestra más pequeña, se determinó la generación de peróxido de hidrógeno por el Ejemplo 16. Se convirtió la señal de URL en concentración absoluta de peróxido de hidrógeno por correlación con una curva de calibración, creada a partir de disoluciones de reserva diluidas de peróxido de hidrógeno. Como se informa en la Figura 13b, la mezcla menos irradiada dio una cantidad significativamente más alta de peróxido de hidrógeno que el homólogo sin mezclar.

45 Ejemplo 18: ERO potenciadas, atmósfera inerte frente a aire

50 Se preparó una banda de polímero 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se sellaron muestras de banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno, incluida una bolsita de desecante. (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY). Inmediatamente antes del sellar del envoltorio, se retiró el aire ambiente en el interior del envoltorio por una purga de nitrógeno seco. Otro envoltorio de muestra no tuvo la purga de aire antes del cierre. Los envoltorios cerrados se irradiaron posteriormente con gamma (Sterigenics, Corona, CA) a una dosis objetivo de 45 kGy.

55 Tras las recepción, las muestras se sacaron y se realizó el ensayo Pholasin® como se describe en el Ejemplo 1 para determinar las señales de ERO. Se determinó la cantidad de superóxido por el ensayo de Pholasin® como se describe en el Ejemplo 2. Se prepararon dos muestras por condición, y se informó el promedio. 2:1 de PGA/TMC

irradiado con la atmósfera de nitrógeno produjo ERO considerablemente mayores que lo estimado por el ensayo de Pholasin® que el homólogo de aire (véase la FIG. 14).

Ejemplo 19: Procesamiento gamma, ejemplo esterilizado con OE

5 Se preparó una banda de polímero 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217 y se sometió a una irradiación gamma de 20 kGy objetivo (Sterigenics, Corona, CA) y posterior esterilización con óxido de etileno (Sterilization Services, Atlanta, GA 30336) y se probó por los Ejemplos 1 y 2. Se prepararon dos muestras por condición, y se informó el promedio. La muestra produjo ERO como se muestra en la FIG. 15, que incluye superóxido como se muestra en la FIG. 6, como se demuestra por el pico más alto a aproximadamente 20 minutos en comparación con la muestra de control de blanco.

10 Ejemplo 20: Realización de baja área superficial (HC'd) con ERO

Se prepararon probetas de copolímero de bloque sólido 2:1 de PGA/TMC a partir de material según la patente de EE.UU. N° 4.243.775 y se procesaron por el Ejemplo 6 de este documento. Se calculó que el área superficial de este material era aproximadamente 0,002 m²/g basado en la geometría del disco comprimido que posteriormente se usó por la determinación de ERO. La determinación de ERO se llevó a cabo siguiendo el Ejemplo 1 de este documento como se muestra en la FIG. 17.

Ejemplo 21: Alta área superficial, 2:1 de PGA/TMC electrohilado

20 Se midió el superóxido generado por la forma electrohilada de 2:1 de PGA/TMC irradiado con 45 kGy de gamma en función del tiempo usando el método de ensayo de Pholasin. Se preparó una muestra electrohilada de cuatro capas a partir de una disolución de 4 % peso de 2:1 de PGA/TMC en hexafluoro-2-propanol (HFIP). Se usó una unidad de electrohilado Elmarco NS Lab 500 para hilar fibras de esta disolución, seguido por 5 minutos a 120 °C para cristalizar en frío. Se produjo una primera capa por electrohilado de una fina capa de nanofibras 2:1 de PGA/TMC sobre una placa metálica. Para aumentar el espesor de capa, se añadió disolución adicional y se depositaron tres capas adicionales de fibras 2:1 de PGA/TMC electrohiladas. La muestra resultante comprendió un total de cuatro capas electrohiladas. El diámetro de fibra varió desde por debajo de 100 nm hasta más de aproximadamente 1,5 µm (micrómetros). Cada muestra se irradió usando haz e a una dosis de 45 kGy (Sterigenics, Corona, CA) probada por el Ejemplo 2 y los resultados se muestran en la FIG. 18. Se midió el área superficial específica de este material por BET y se encontró que era aproximadamente 4,3 m²/g.

Ejemplo 22: Detección de oxígeno singlete en material irradiado

30 Se preparó 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217. Se selló la banda en un envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. La muestra se irradió entonces con gamma a una dosis gamma objetivo de 45 kGy. Se probaron las probetas de material irradiado por el Ejemplo 3. Se determinaron las señales atribuibles a tanto superóxido como a oxígeno singlete como se muestra en la FIG. 19.

Ejemplo 23: Comparación de material irradiado y no irradiado en la formación de vasos sanguíneos

35 Se preparó material polimérico hidrolíticamente degradable semicristalino no irradiado esterilizado con óxido de etileno (Grupo A) del siguiente modo. Se preparó una banda de polímero 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217, se secó a vacío a 120 °C durante la noche, se envasó en envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. Se cortaron de la banda discos nominalmente de 1 cm de banda y entonces se volvieron a embalar en envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY). Para esterilizar las probetas, se transfirieron a envoltorios permeables al óxido de etileno (OE) y se sometieron a una exposición a óxido de etileno suficiente para la esterilización (300 minutos de exposición a OE) (Nelson Labs, Salt Lake City, Utah). Se recibió el material y se volvió a embalar en envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) hasta que se necesitó para uso adicional.

50 Se preparó material polimérico hidrolíticamente degradable semicristalino irradiado con gamma (Grupo B) del siguiente modo. Se preparó una banda de polímero 2:1 de PGA/TMC según la patente de EE.UU. N° 6.165.217, se secó a vacío a 120 °C durante la noche, se embolsó en envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY) para minimizar la hidrólisis temprana incontrolada del polímero. Se cortaron de la banda discos nominalmente de 1 cm de banda y entonces se volvieron a embalar en envoltorio de polímero impermeable al aire/oxígeno que incluyó una bolsita de desecante (Minipak, Multisorb Technologies, Buffalo, NY). Entonces, los discos se irradiaron a un objetivo (nominal) de 45 kGy de irradiación gamma (Sterigenics, Corona, CA) y el envase permaneció sin abrir hasta que se necesitó para uso adicional.

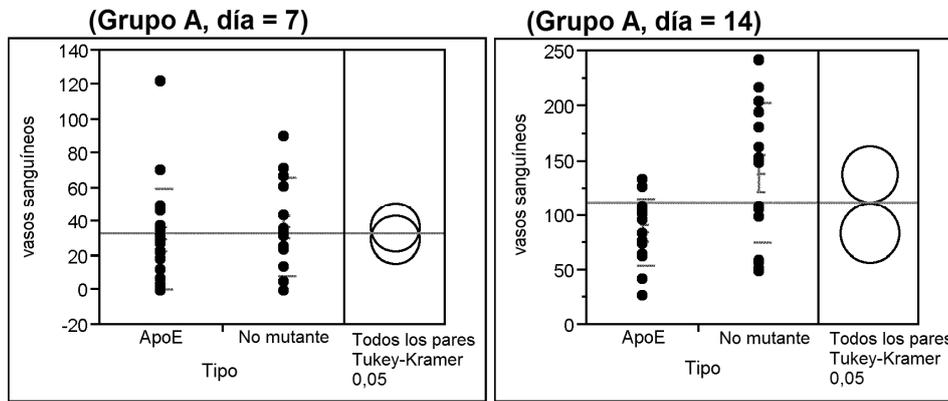
55 Con el fin de evaluar el efecto angiogénico de un dispositivo generador de ERO *in vivo*, se seleccionó el modelo de ratón apoE -/- ya que se ha mostrado que presenta desarrollo alterado de vasos sanguíneos en comparación con el

análogo no mutante de C57 (Couffinhal et al., Circulation, 99, 3188-98 (1999)), y llega a ser un modelo preclínico ampliamente usado para estudiar angiogénesis (Silva et al., Biomaterials, 31(6), 1235-41 (2010)). Se usaron discos estériles del Grupo A y Grupo B como grupos de tratamiento en este estudio, comparando así el efecto de material generador de ERO de forma idéntica.

5 Se implantó por vía subcutánea un disco de cada grupo de tratamiento en el dorso izquierdo y derecho de ratones ApoE^{-/-} y controles no mutantes. Los momentos de tiempo en vida fueron 3, 7 y 14 días. Se dedicaron seis ratones de cada tipo a cada momento de tiempo. Después del sacrificio, se retiró cada implante y se fijó en bloque y se transfirió al laboratorio de histología. Se procesaron tres secciones transversales por disco y se tiñeron con H&E (hematoxilina y eosina) y anticuerpo contra CD31. Entonces, cada sección transversal se evaluó manualmente por un histólogo experimentado para el recuento de vasos sanguíneos dentro de los márgenes del implante bajo 100x aumento óptico y los datos se analizaron por JMP versión 10.2.2 (SAS Institute, Cary, NC). No se observaron vasos sanguíneos entre todos los implantes de 3 días. Se contaron los vasos sanguíneos en los días 7 y 14 entre tanto condiciones como tipos de ratón.

15 En el Grupo A de comparación hubo una diferencia insignificativa en el recuento de vasos sanguíneos observado en el ratón apoE^{-/-} frente al ratón no mutante en el día 7. Sin embargo, esta diferencia del recuento de vasos sanguíneos alcanzó significación estadística en el día 14 como se demuestra a continuación, siendo el recuento de vasos sanguíneos de los ratones apoE^{-/-} más bajo que el de los ratones no mutantes.

JMP Versión 10.2.2 (SAS Institute) Análisis unilateral de vasos sanguíneos (Grupo A)



20 **Medias y desviaciones estándares**

Grupo	(Grupo A, día 7)			(Grupo A, día 14)		
	N	Media	Desv estándar	n	Media	Desv estándar
ApoE	18	29,9444	29,9086	15	84,400	30,2792
no mutante	18	37,2222	29,1539	16	138,938	64,1347

Matriz umbral LSD (valores positivos muestran pares de significa que son significativamente diferentes)

Abs(Dif)-HSD	(Grupo A, día 7)		(Grupo A, día 14)	
	no mutante	ApoE	no mutante	ApoE
no mutante	-20,007	-12,729	-36,659	17,273
ApoE	-12,729	-20,007	17,273	-37,861

Prueba de Levene (equivalencia de la varianza entre grupos, p<0,05 muestran varianzas que no son iguales)

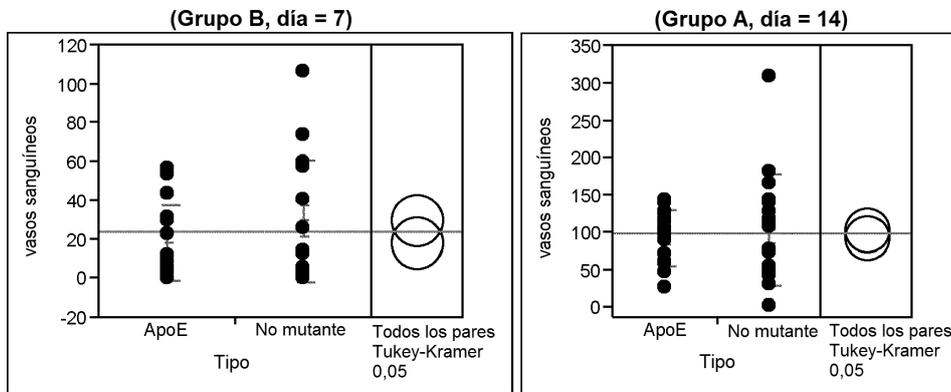
Prueba	(Grupo A, día 7)				(Grupo A, día 14)			
	Relación F	DFNum	DFDen	Valor p	Relación F	DFNum	DFDen	Valor p
Levene	0,1602	1	34	0,6915	12,8584	1	29	0,0012*

Prueba de Welch (medias de la prueba de ANOVA iguales, que permiten desviaciones estándares no iguales, $prob < 0,05$ muestra que los grupos no son estadísticamente iguales)

(Grupo A, día 7)		(Grupo A, día 14)				
n/a		Relación F	DFNum	DFDen	Prueba de la t	Prob > F
		9,3474	1	21,668	3,0573	0,0058*

- 5 En el Grupo B generador de ERO, hubo una diferencia estadísticamente insignificante en el recuento de vasos sanguíneos entre ratones apoE^{-/-} y no mutantes en tanto el día 7 como el día 14, como se demuestra a continuación. Esto parece indicar que la presencia del material del Grupo B generador de ERO en los ratones apoE^{-/-} anuló la diferencia en el recuento de vasos sanguíneos en comparación con ratones no mutantes.

JMP Versión 10.2.2 (SAS Institute) Análisis unilateral de vasos sanguíneos (Grupo B)



10

Medias y desviaciones estándares

(Grupo B, día 7)				(Grupo B, día 14)			
Nivel	n	Media	Desv estándar	Nivel	n	Media	Desv estándar
ApoE	16	18,1250	19,3800	ApoE	17	92,941	37,7814
no mutante	16	29,4375	31,7825	no mutante	17	103,824	74,3297

Matriz umbral LSD (valores **positivos** muestran pares de significa que son significativamente diferentes)

(Grupo B, día 7)			(Grupo B, día 14)		
Abs(Dif)-HSD	no mutante	ApoE	Abs(Dif)-HSD	no mutante	ApoE
no mutante	-19,006	-7,694	no mutante	-41,193	-30,310
ApoE	-7,694	-19,006	ApoE	-30,310	-41,193

- 15 **Prueba de Levene** (equivalencia de la varianza entre grupos, $p < 0,05$ muestran varianzas que no son iguales)

(Grupo B, día 7)					(Grupo B, día 14)				
Prueba	Relación F	DFNum	DFDen	Valor p	Prueba	Relación F	DFNum	DFDen	Valor p
Levene	3,3766	1	30	0,0761	Levene	3,6995	1	32	0,0634

Prueba de Welch (medias de la prueba de ANOVA iguales, que permiten desviaciones estándares no iguales, $prob < 0,05$ muestra que los grupos no son estadísticamente iguales)

(Grupo B, día 7)		(Grupo B, día 14)
n/a		n/a

- 5 Aunque la descripción escrita anterior de la invención permite que un experto haga y use lo que se considera presentemente que es el mejor modo, los expertos habituales entenderán y apreciarán la existencia de variaciones, combinaciones y equivalentes de la realización específica, método y ejemplos en el presente documento. La invención no se debe, por tanto, limitar por la realización y ejemplos anteriormente descritos, sino por todas las realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto biocompatible que permite la generación de especies reactivas oxidativas que comprende:
un primer material polimérico semicristalino hidrolíticamente degradable y
un segundo material polimérico semicristalino hidrolíticamente degradable,
- 5 en el que el primer y segundo materiales tienen diferentes perfiles de generación de especies reactivas oxidativas y en el que al menos uno de dicho primer y segundo materiales poliméricos comprende radicales libres estabilizados;
en el que el material compuesto biocompatible, tras el contacto con medios acuosos, permite la generación multifásica de especies reactivas oxidativas, y
- 10 en el que el primer material polimérico y el segundo material polimérico se someten a diferentes dosis de radiación ionizante, teniendo dichas dosis una tasa de dosis inferior a 50 kGy
2. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 1, en el que el material compuesto biocompatible se configura para proporcionar un estallido inicial de la producción de especies reactivas oxidativas y un periodo sostenido de producción de especies reactivas oxidativas tras el contacto con medios acuosos.
3. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 1,
- 15 en el que el primer material polimérico tiene una tasa de degradación hidrolítica diferente que la del segundo material polimérico.
4. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 1,
en el que el primer material polimérico tiene un grado diferente de cristalinidad que el segundo material polimérico.
5. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 1, en el que el primer y segundo materiales poliméricos comprenden cada uno radicales libres estabilizados.
- 20 6. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 5, en el que el primer material polimérico comprende una cantidad diferente de radicales libres estabilizados que el segundo material polimérico.
7. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dicho primer y segundo materiales poliméricos es bioabsorbible.
- 25 8. El material compuesto biocompatible de la reivindicación 7, en el que el polímero bioabsorbible se selecciona del grupo que consiste en poli(dioxanona), poli(glicolida), poli(lactida) poli(ϵ -caprolactona), poli(anhídridos) tales como poli(ácido sebácico), poli(hidroxicanoatos) tales como poli(3-hidroxiбутirato), copolímeros de cualquiera de estos y sus combinaciones.

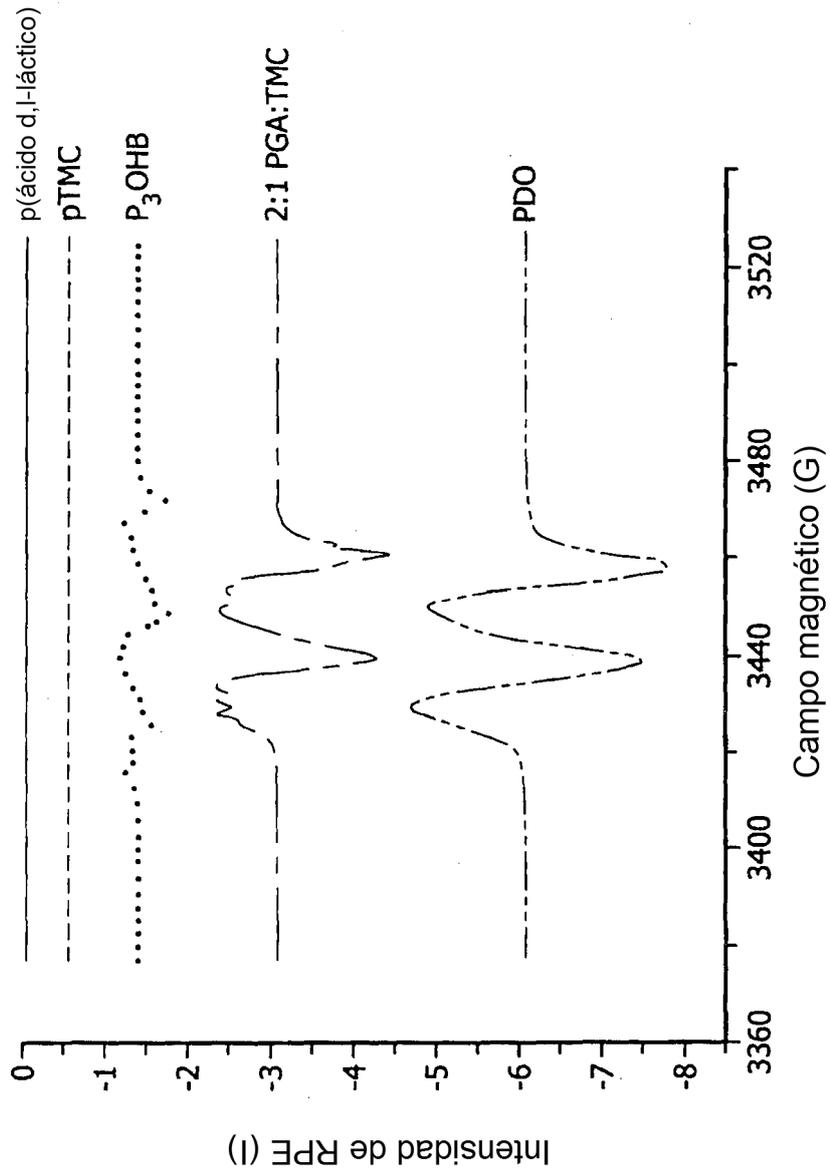


FIG. 1

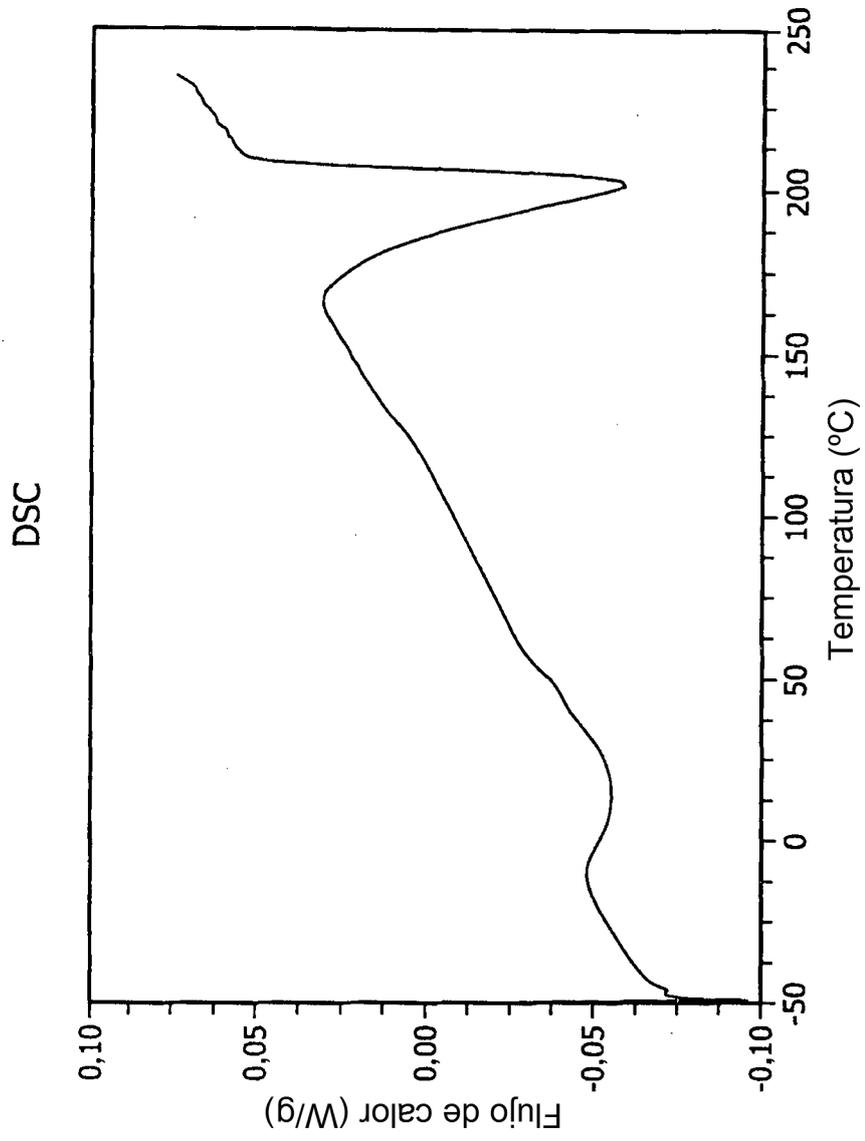


FIG. 2

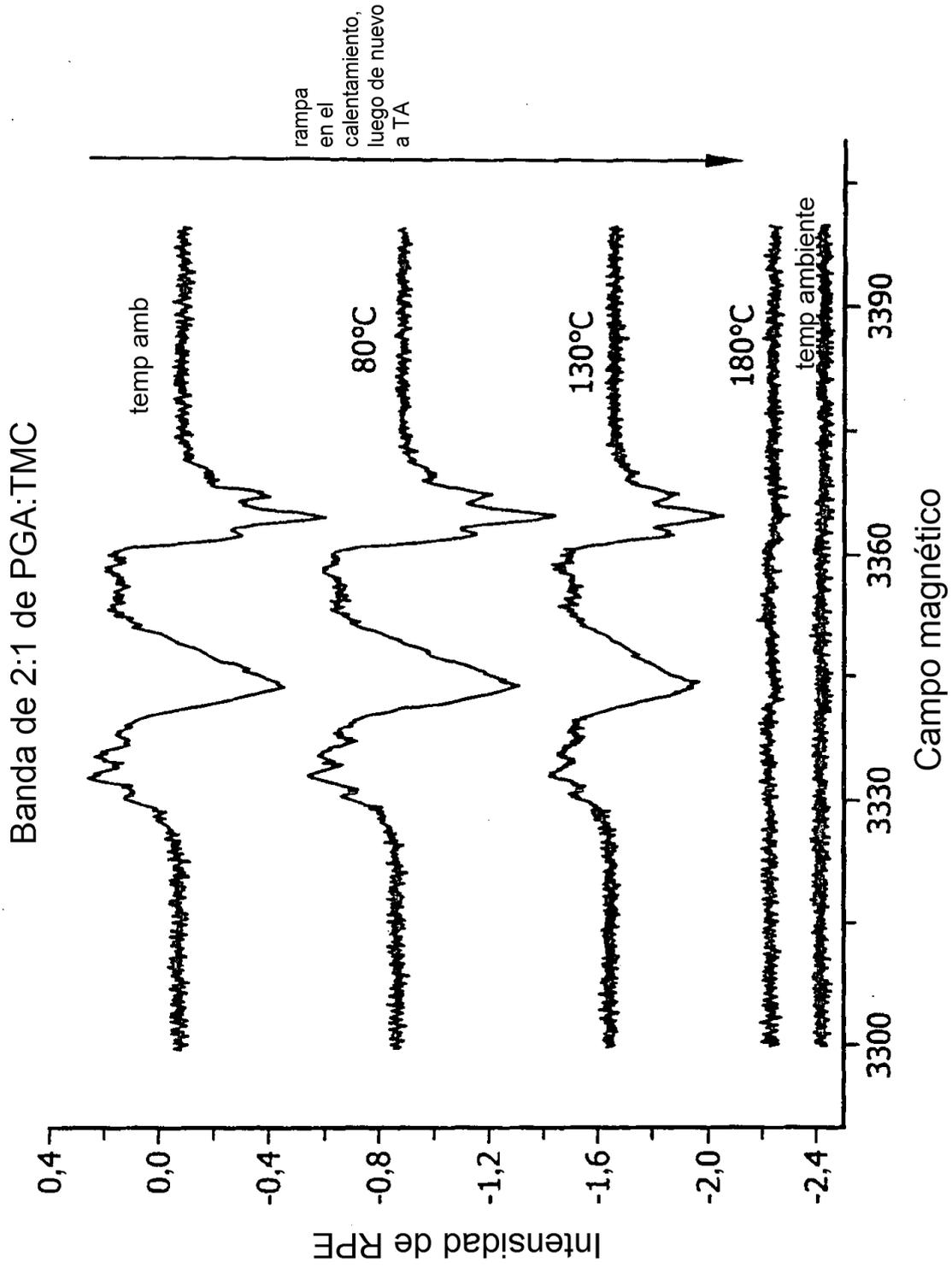


FIG. 3

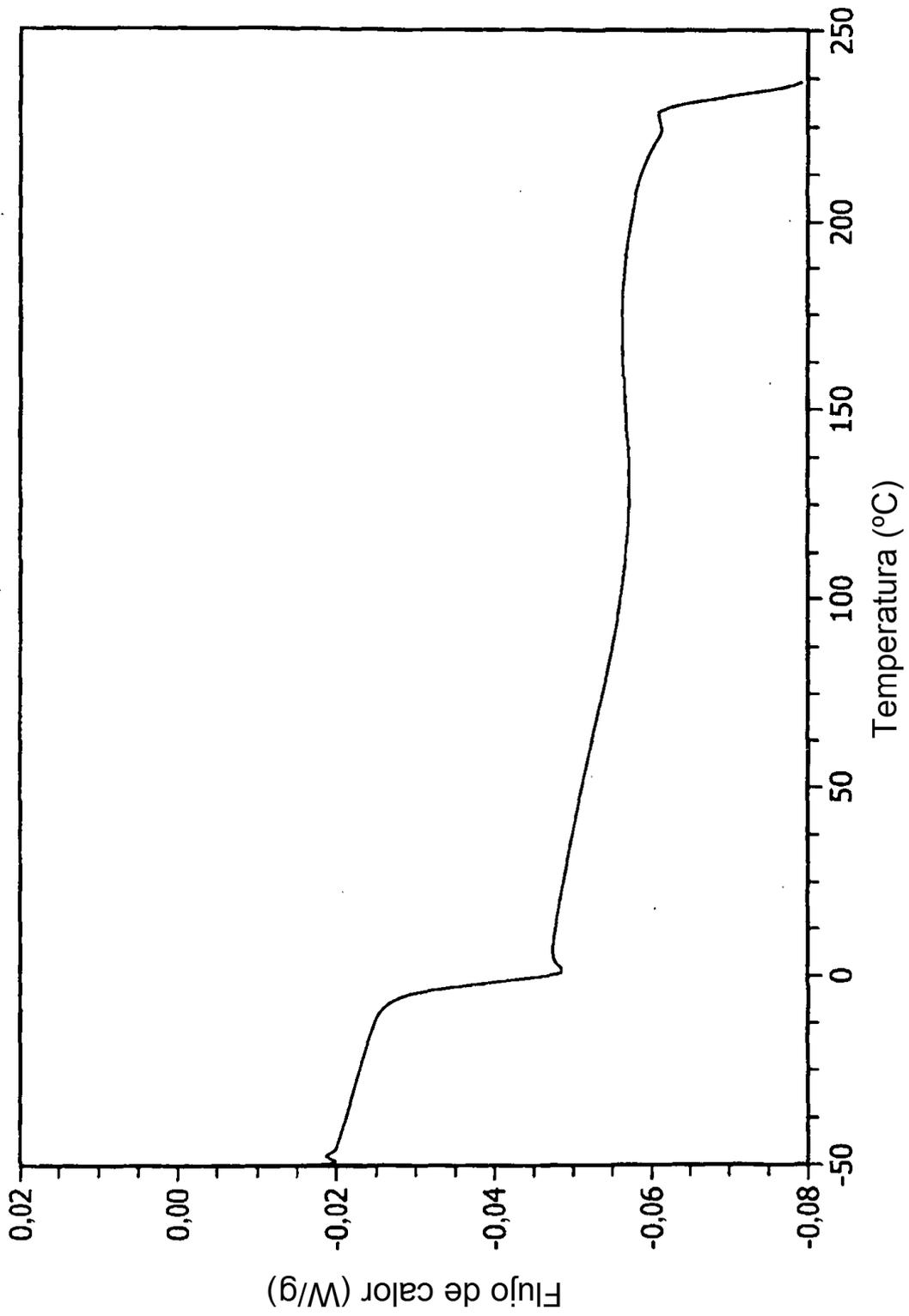


FIG. 4

1:1 de PGA:TMC amorfo

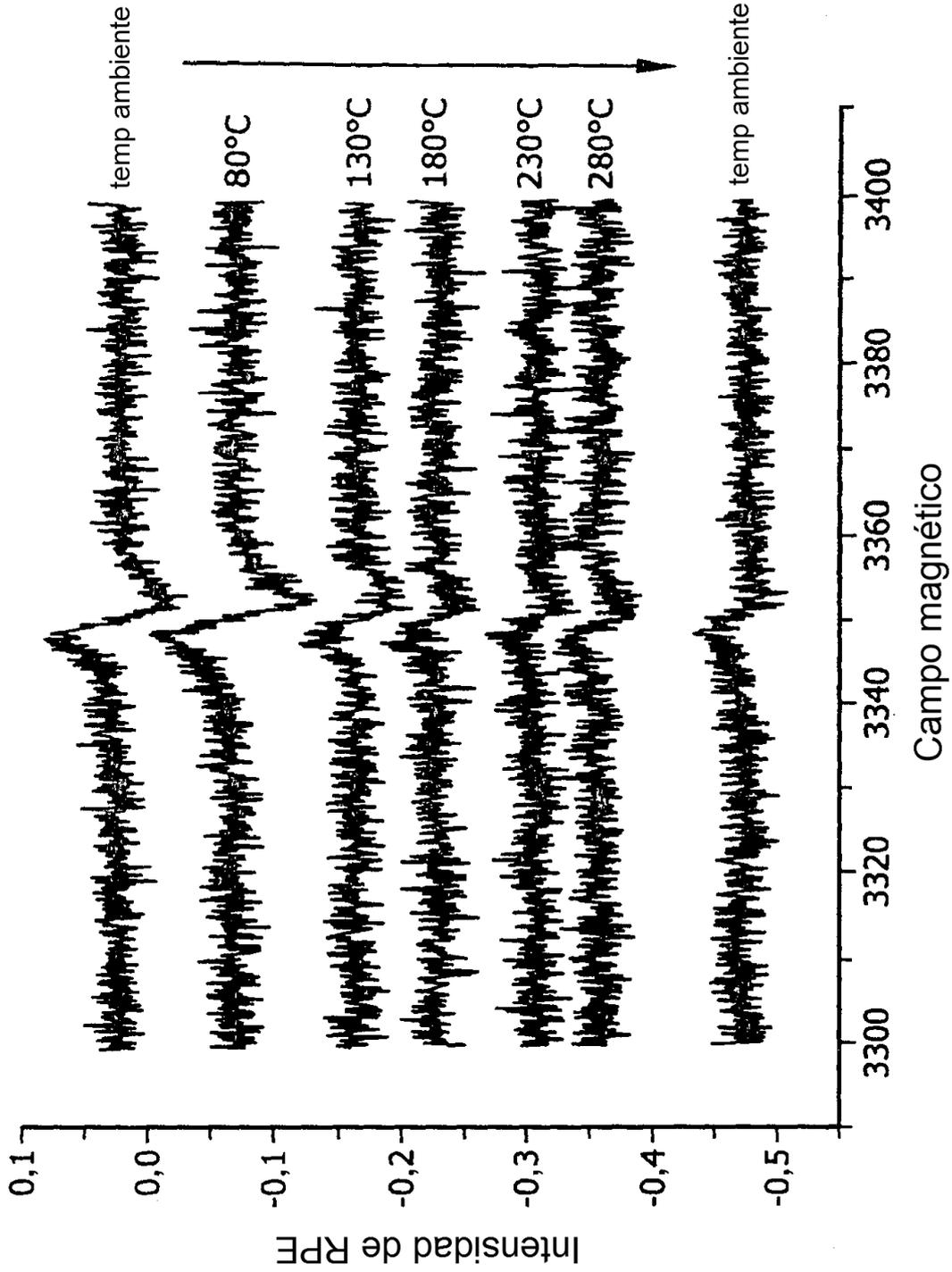


FIG. 5

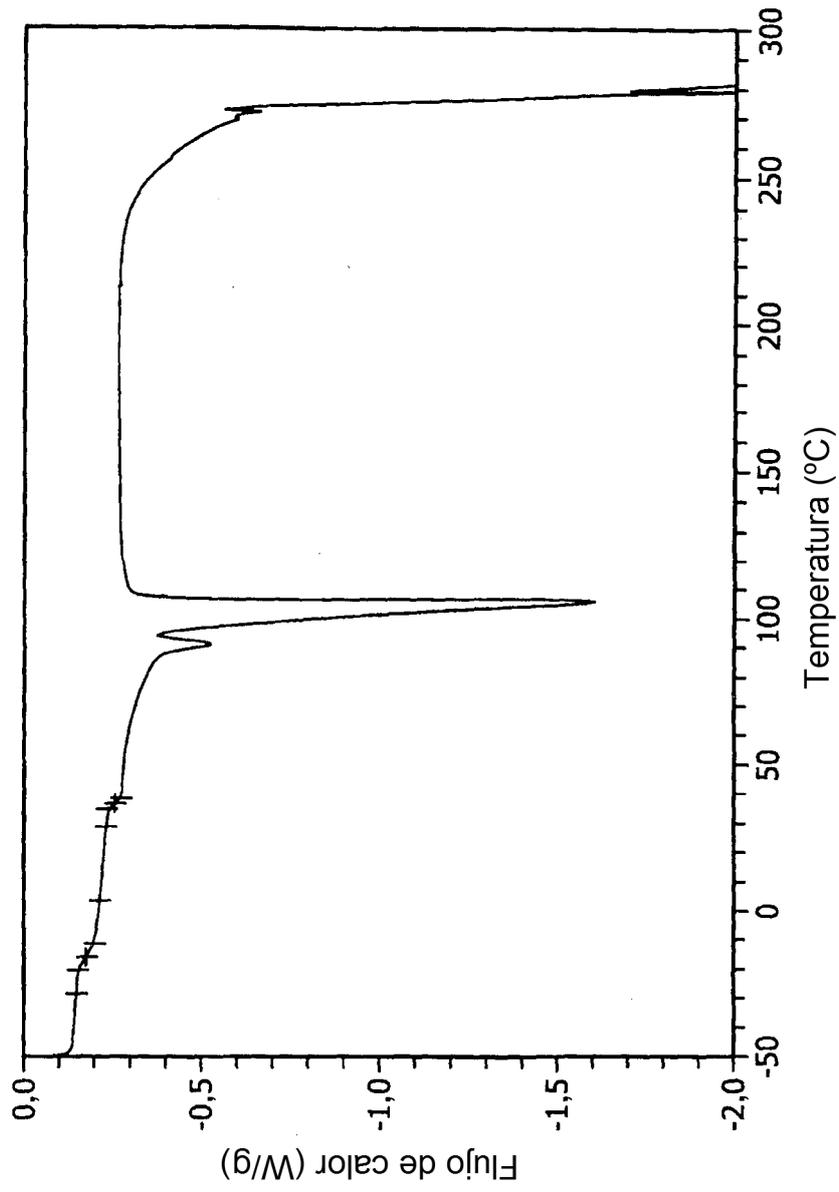


FIG. 6

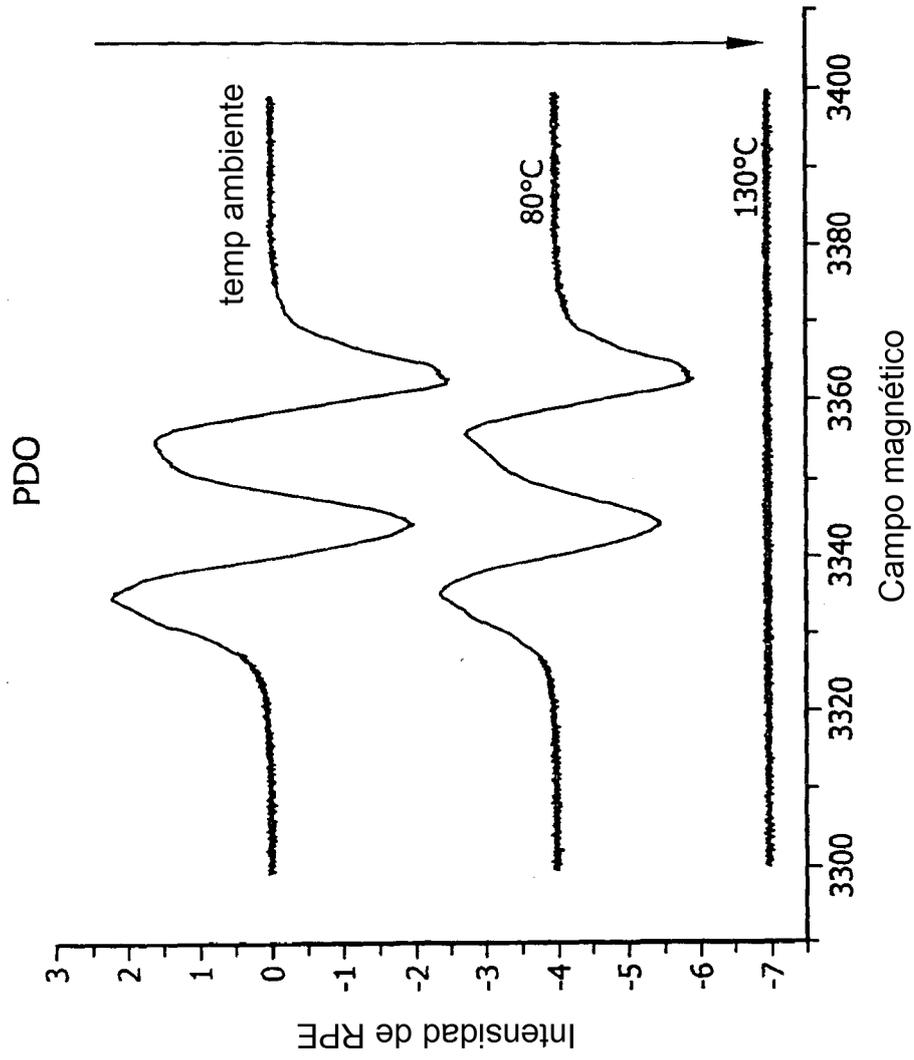


FIG. 7

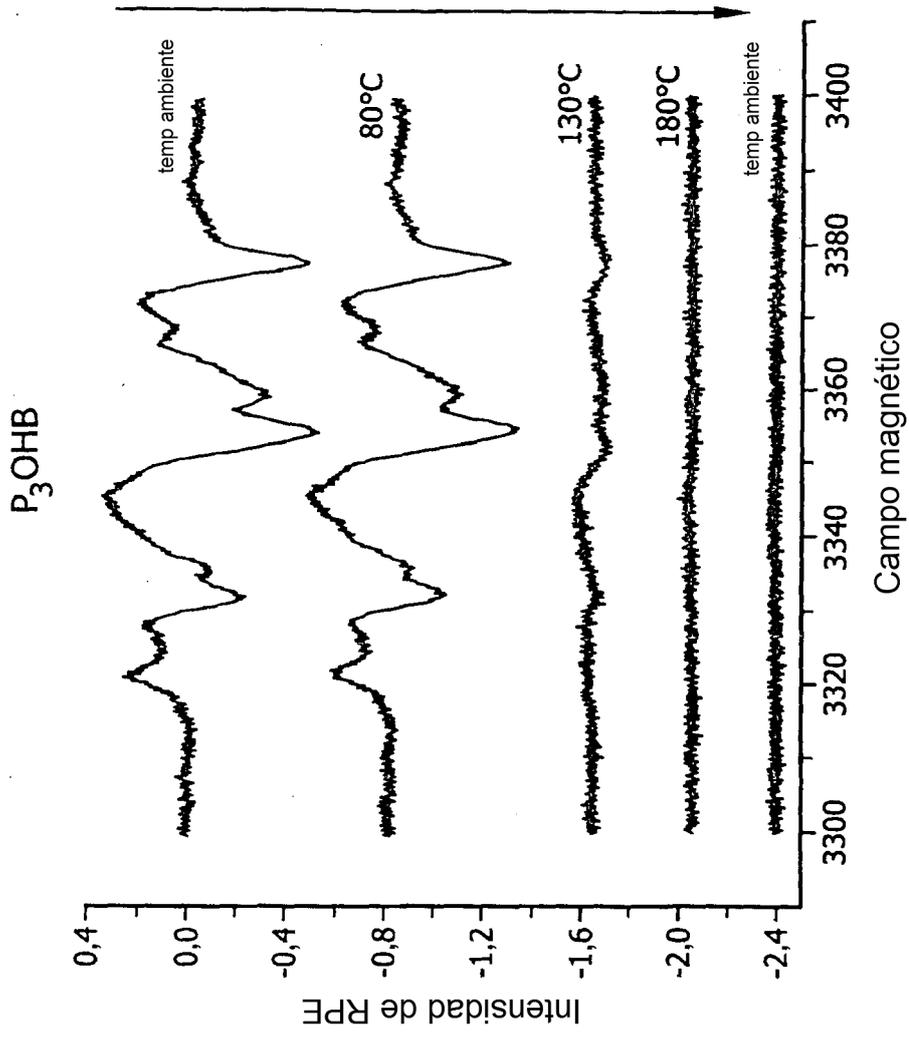


FIG. 8

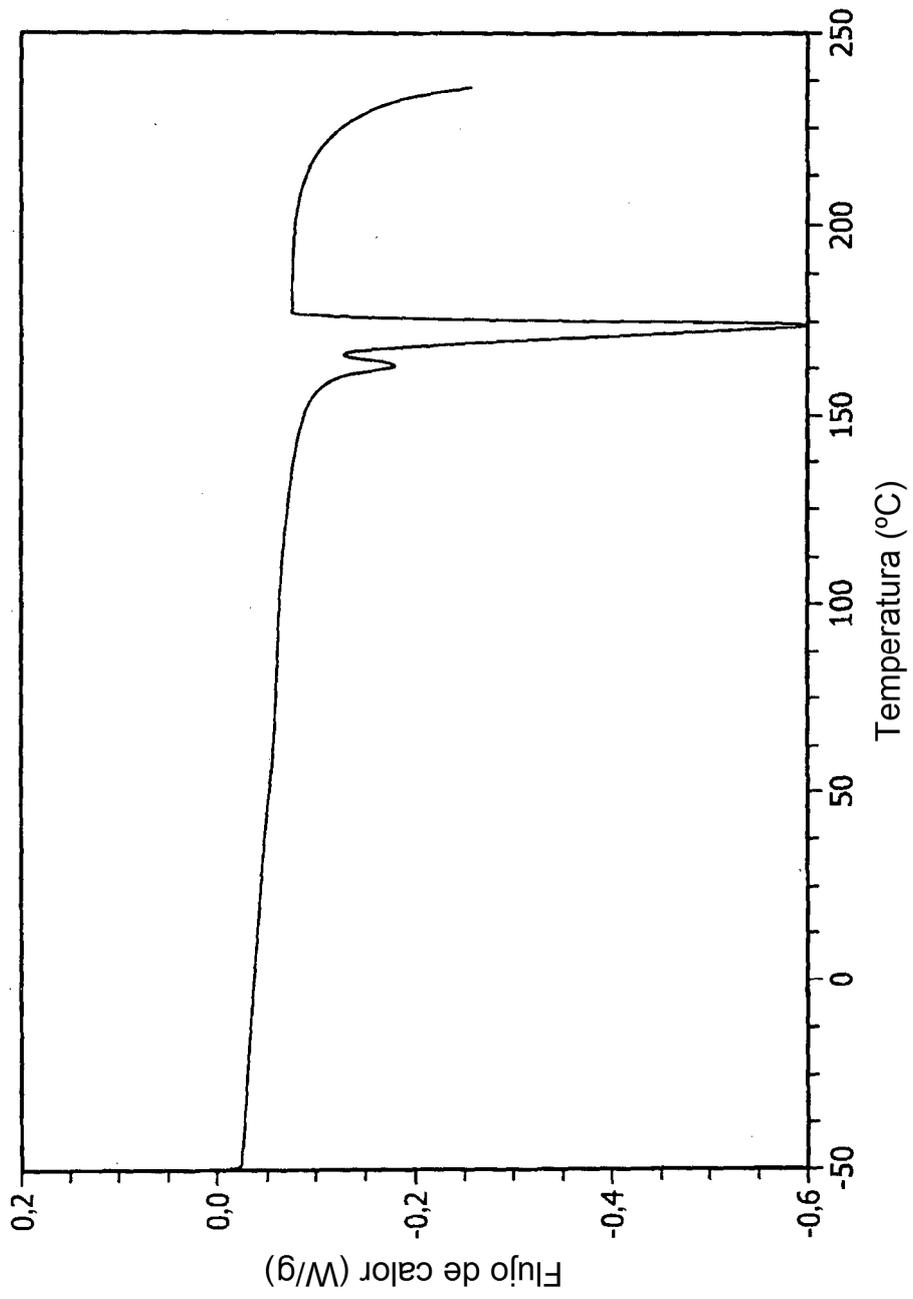


FIG. 9

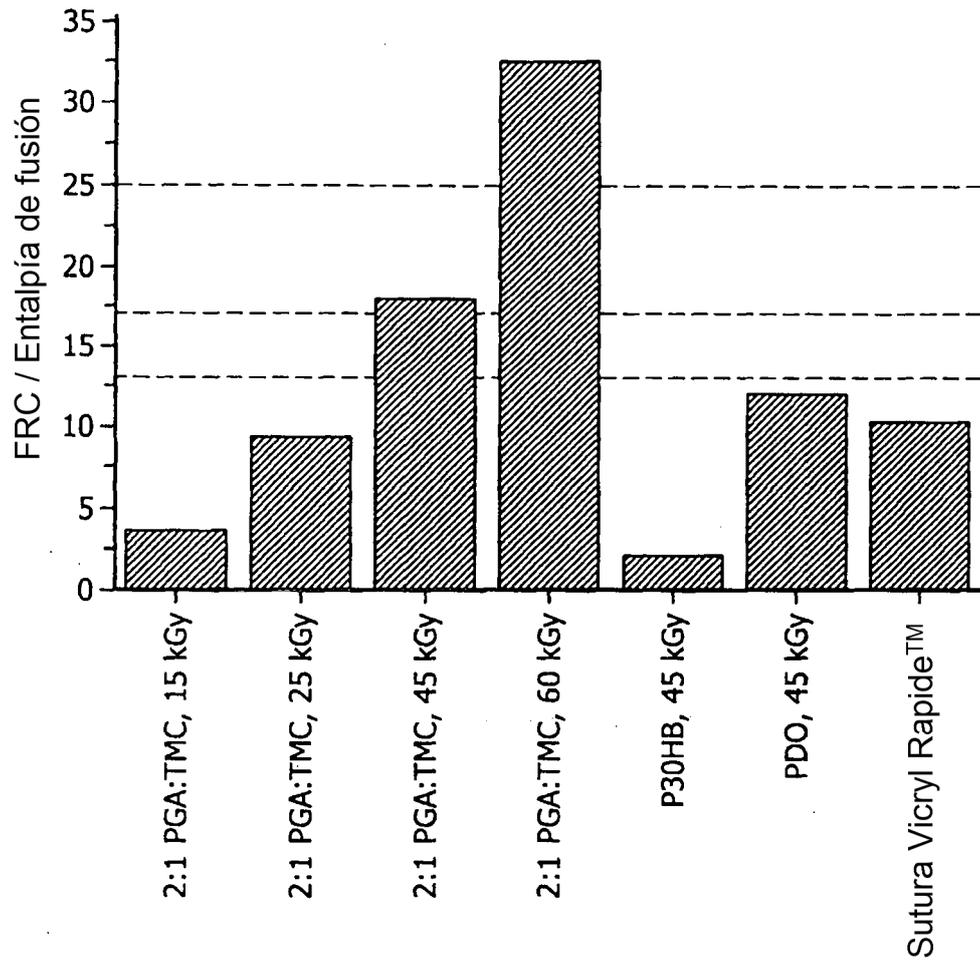


FIG. 10

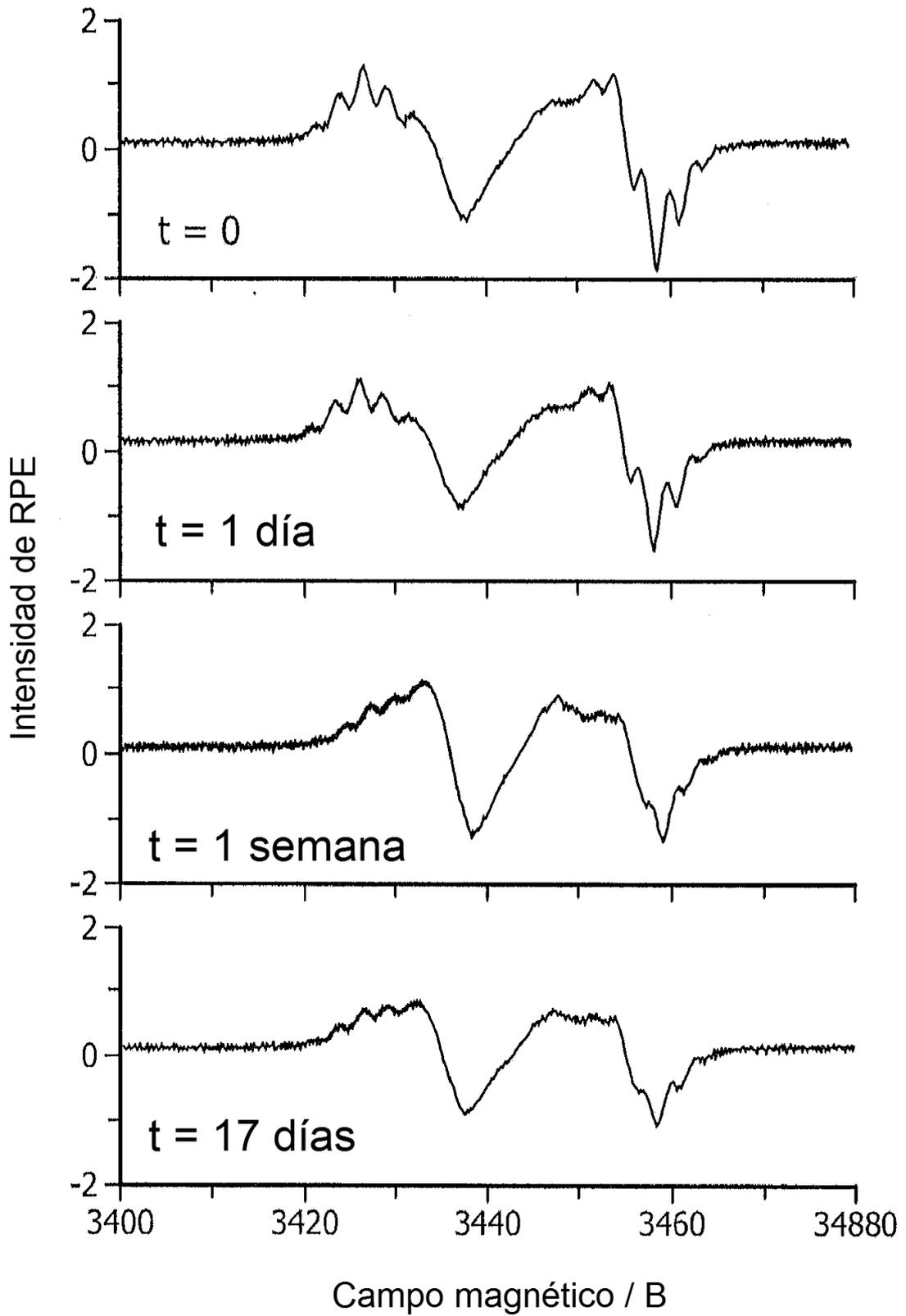


FIG. 11

Línea continua = Pholasin solo.
Línea discontinua = Pholasin y SOD.

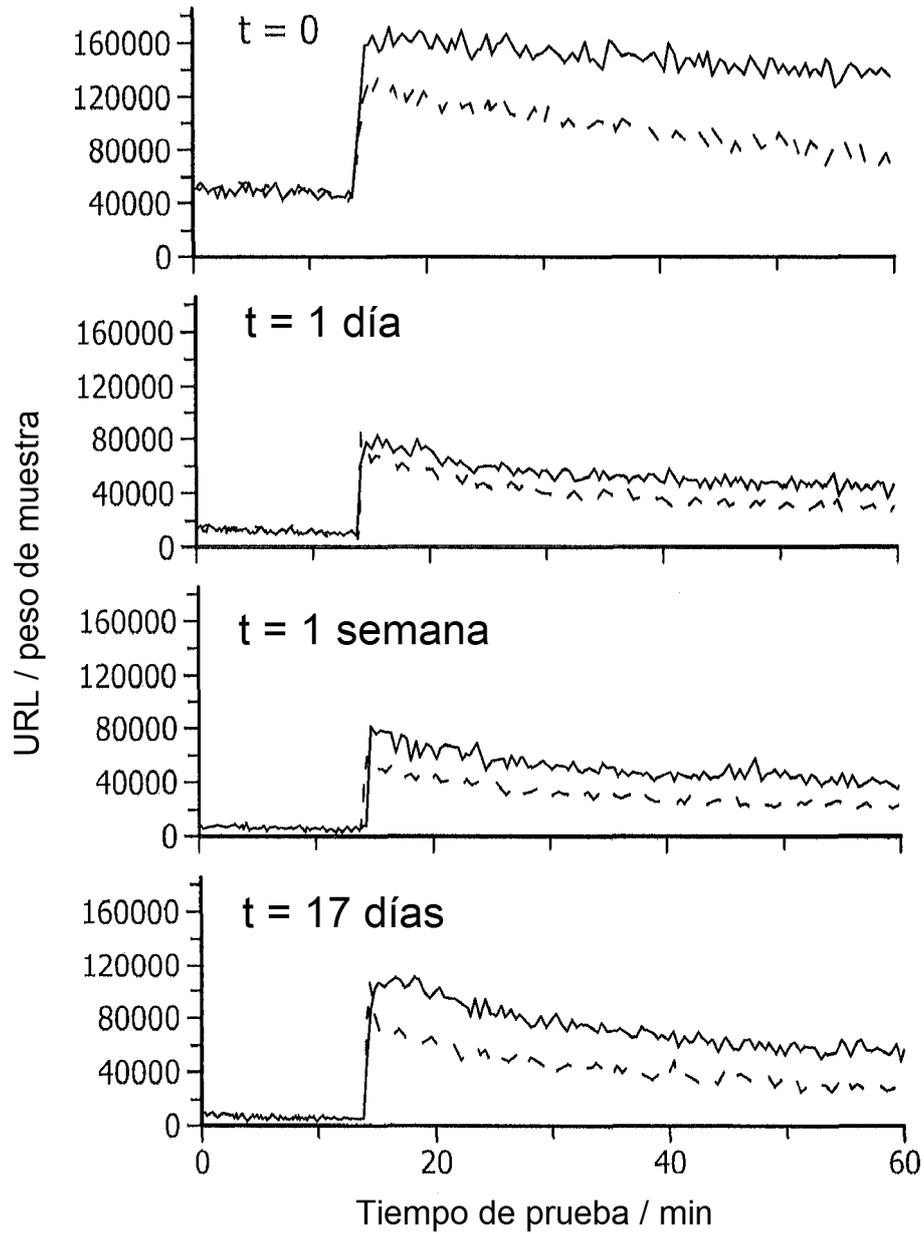


FIG. 12

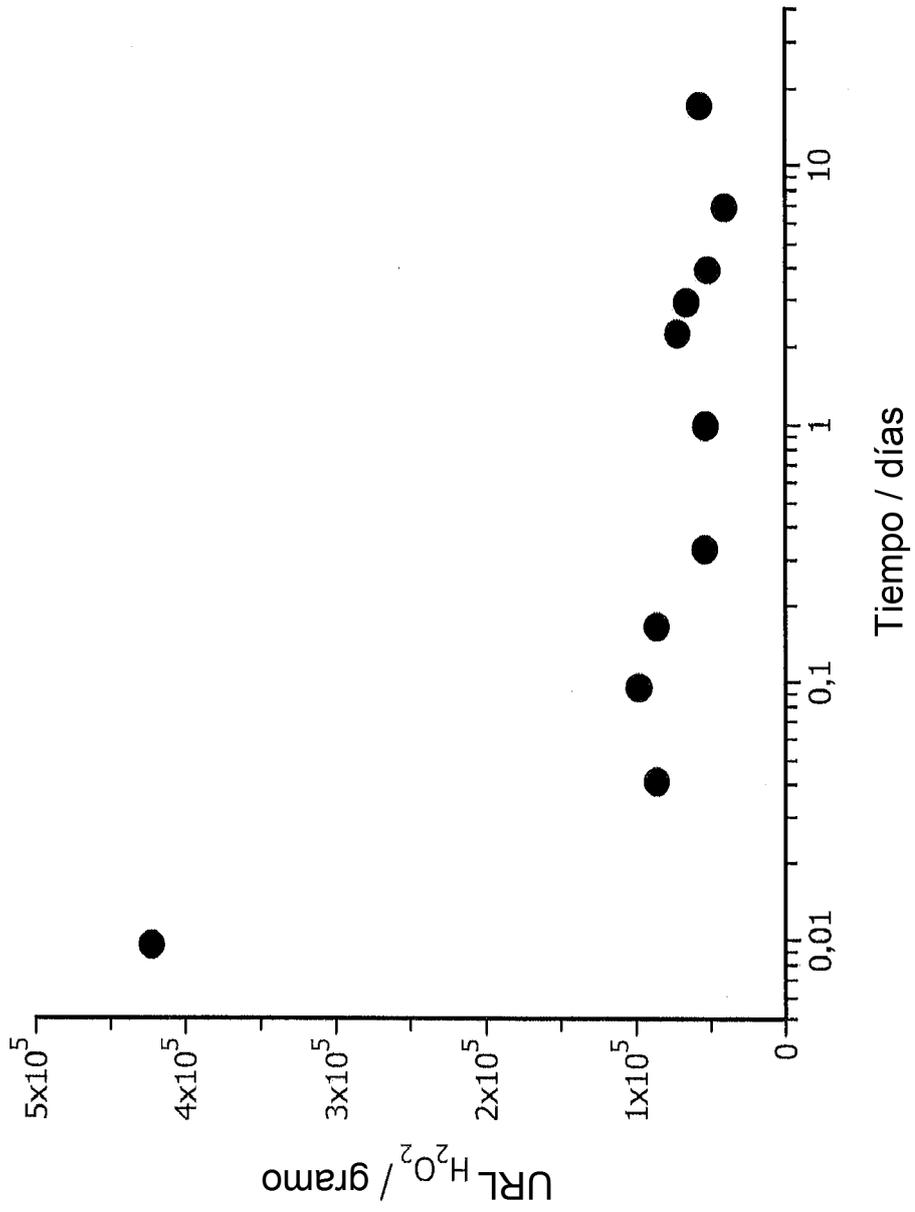


FIG. 13

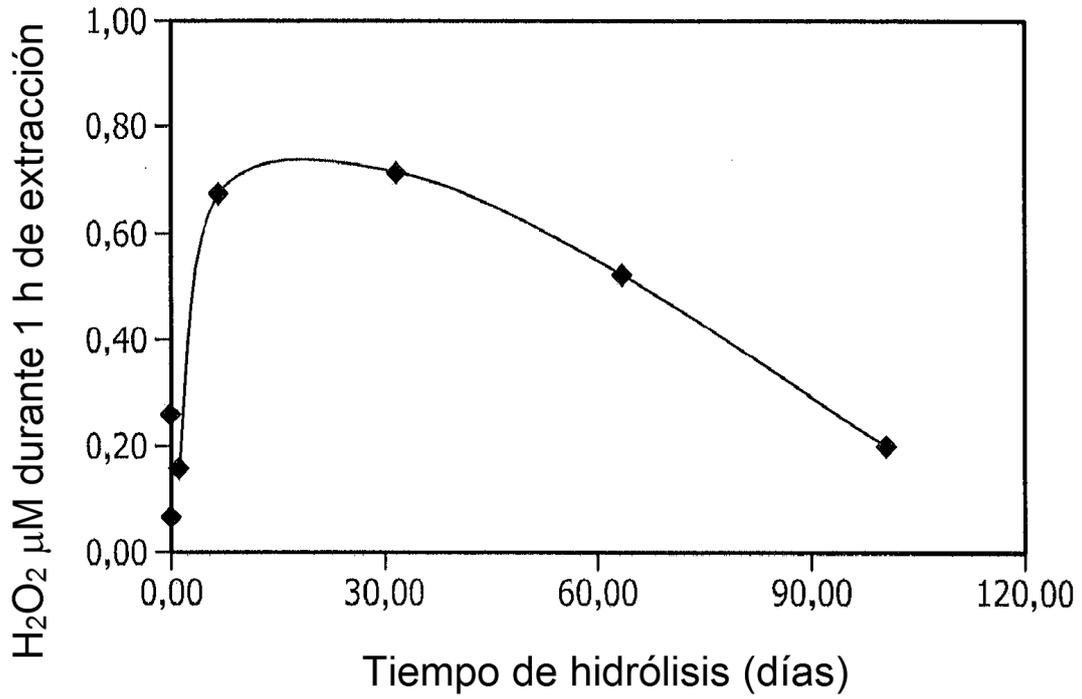


FIG. 13a

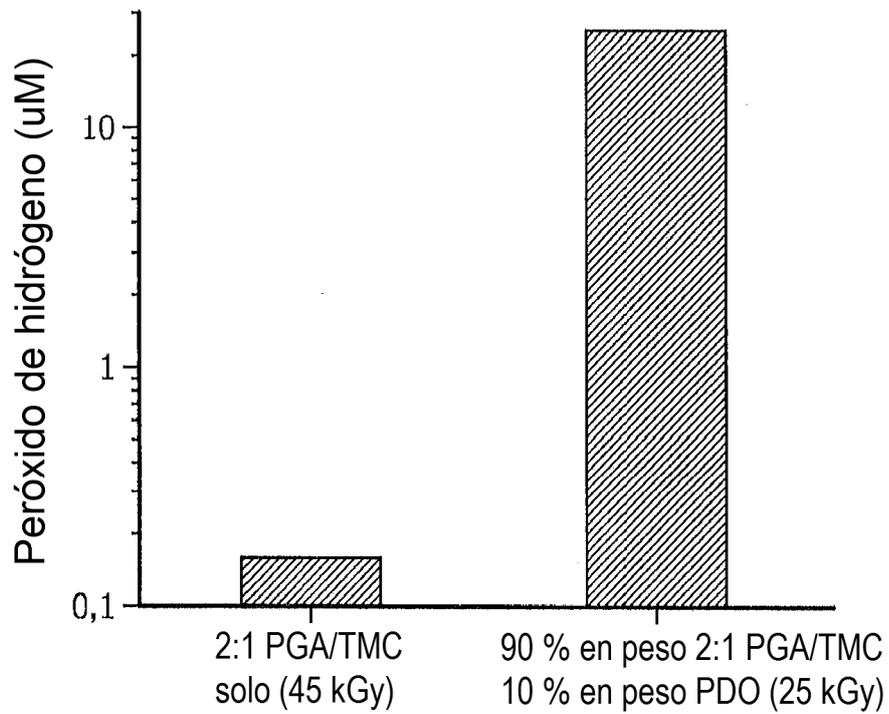


FIG. 13b

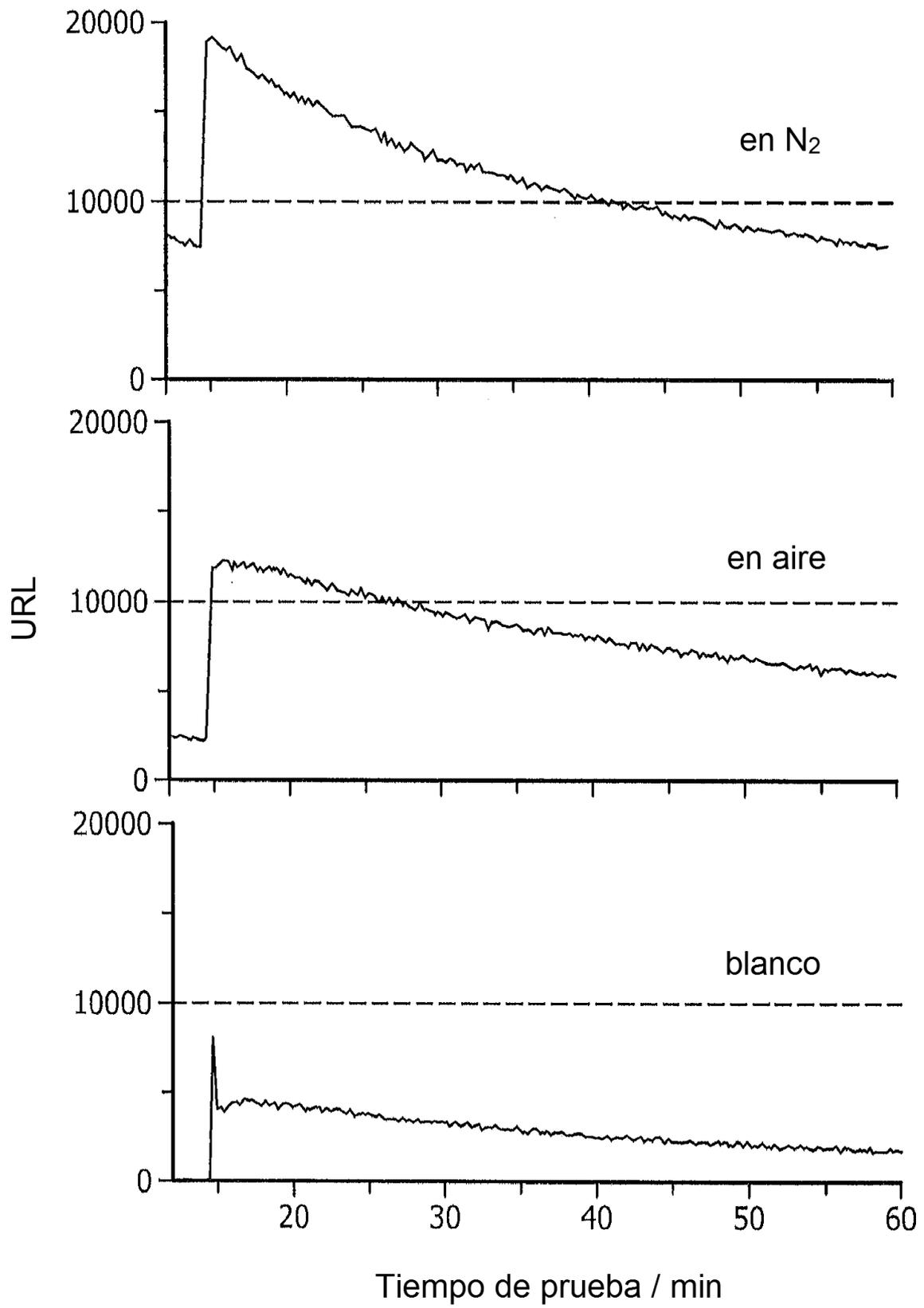


FIG. 14

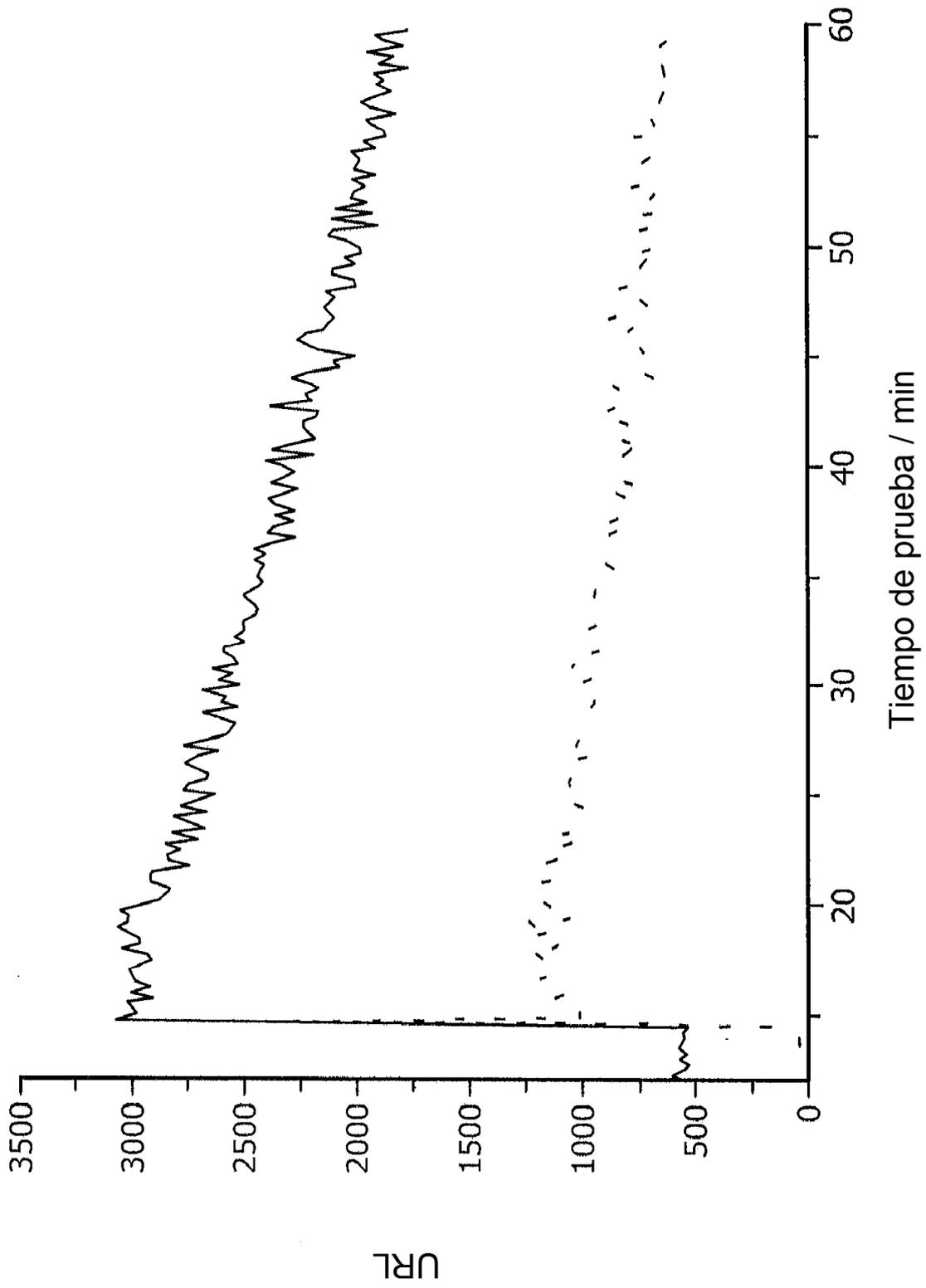


FIG. 15

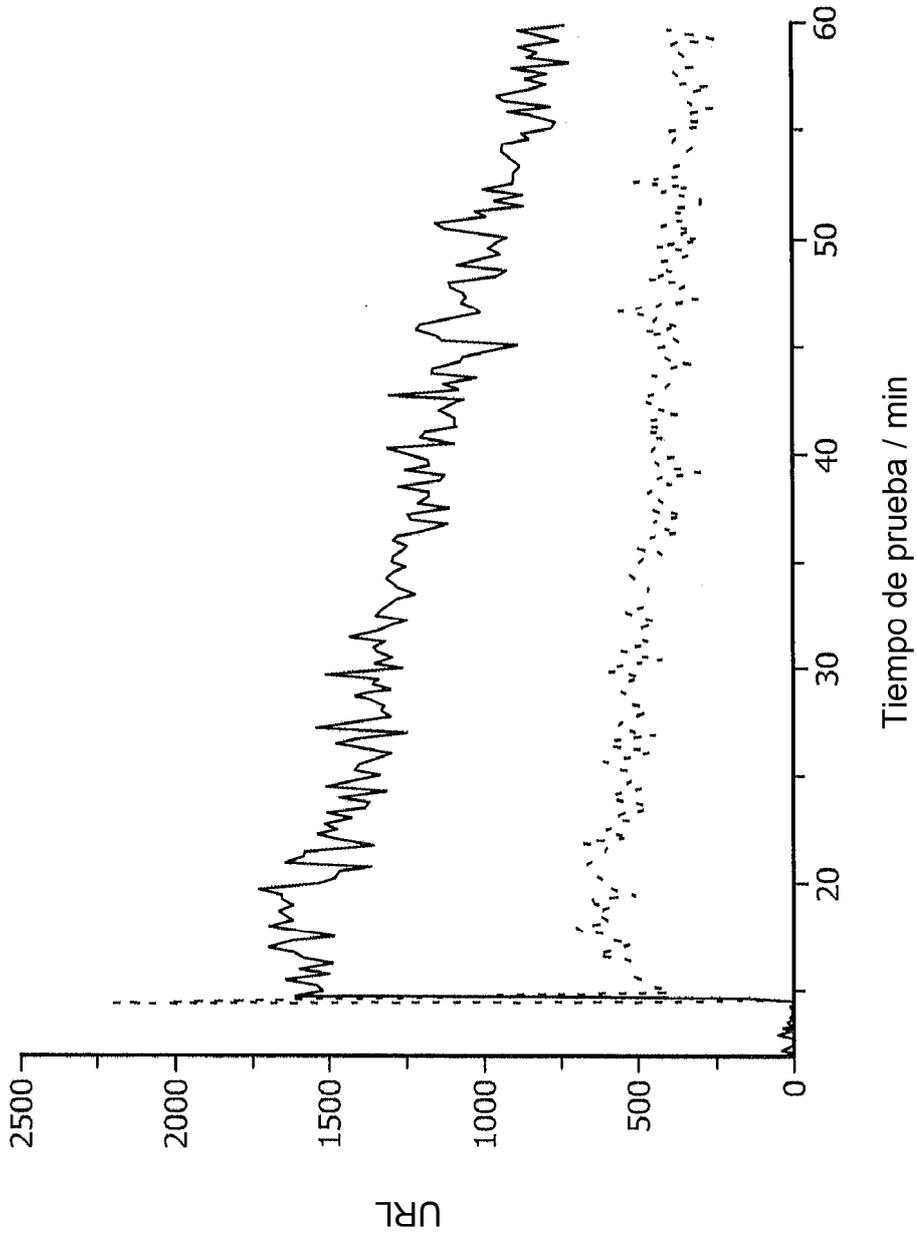


FIG. 16

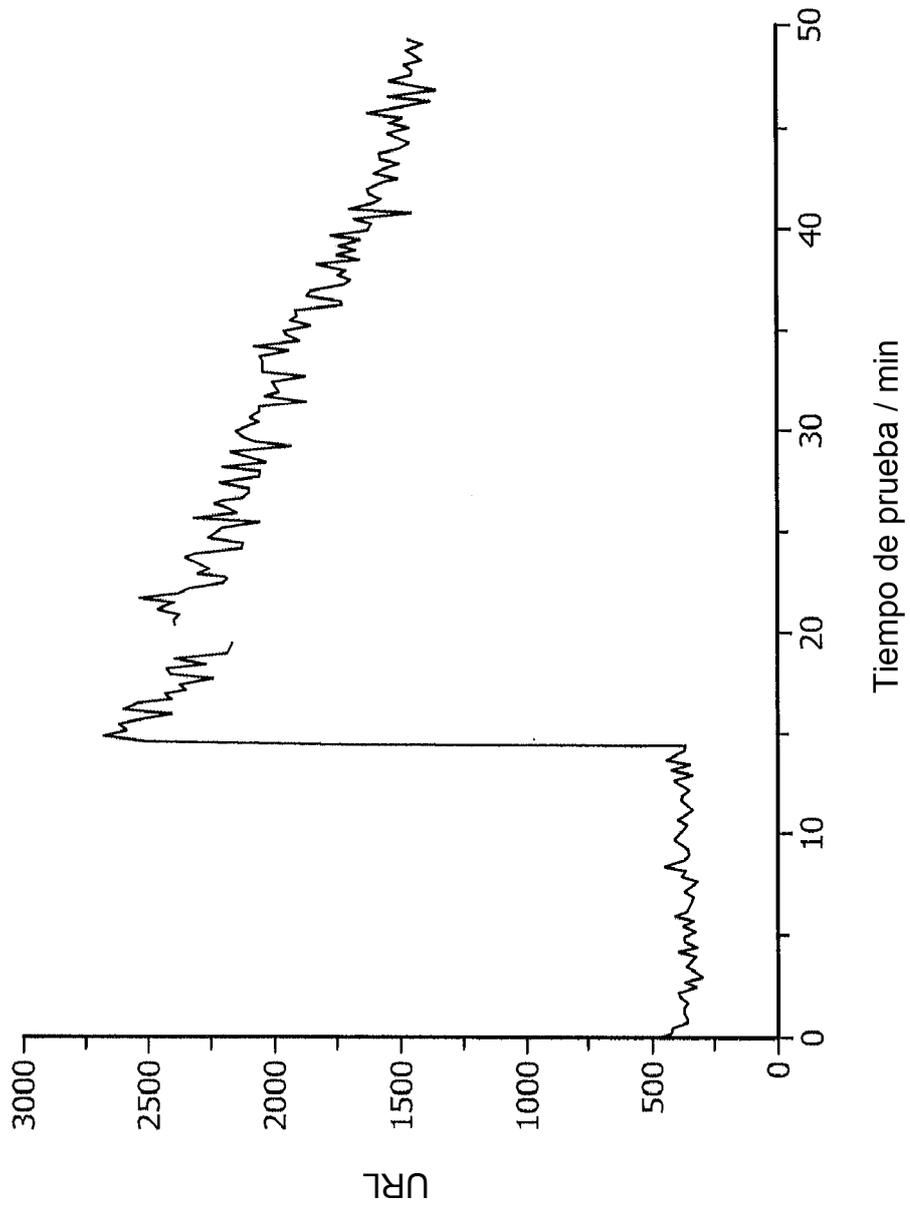


FIG. 17

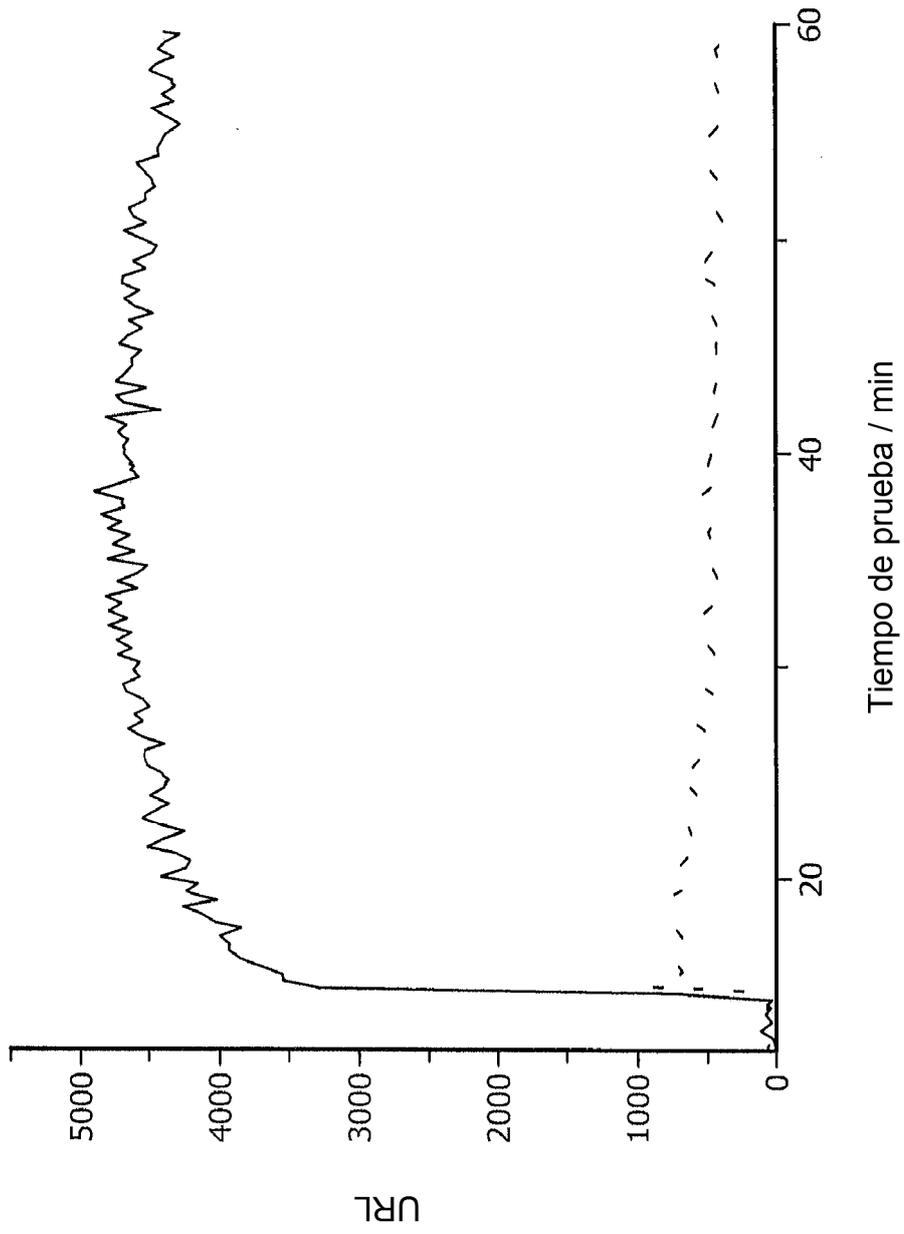


FIG. 18

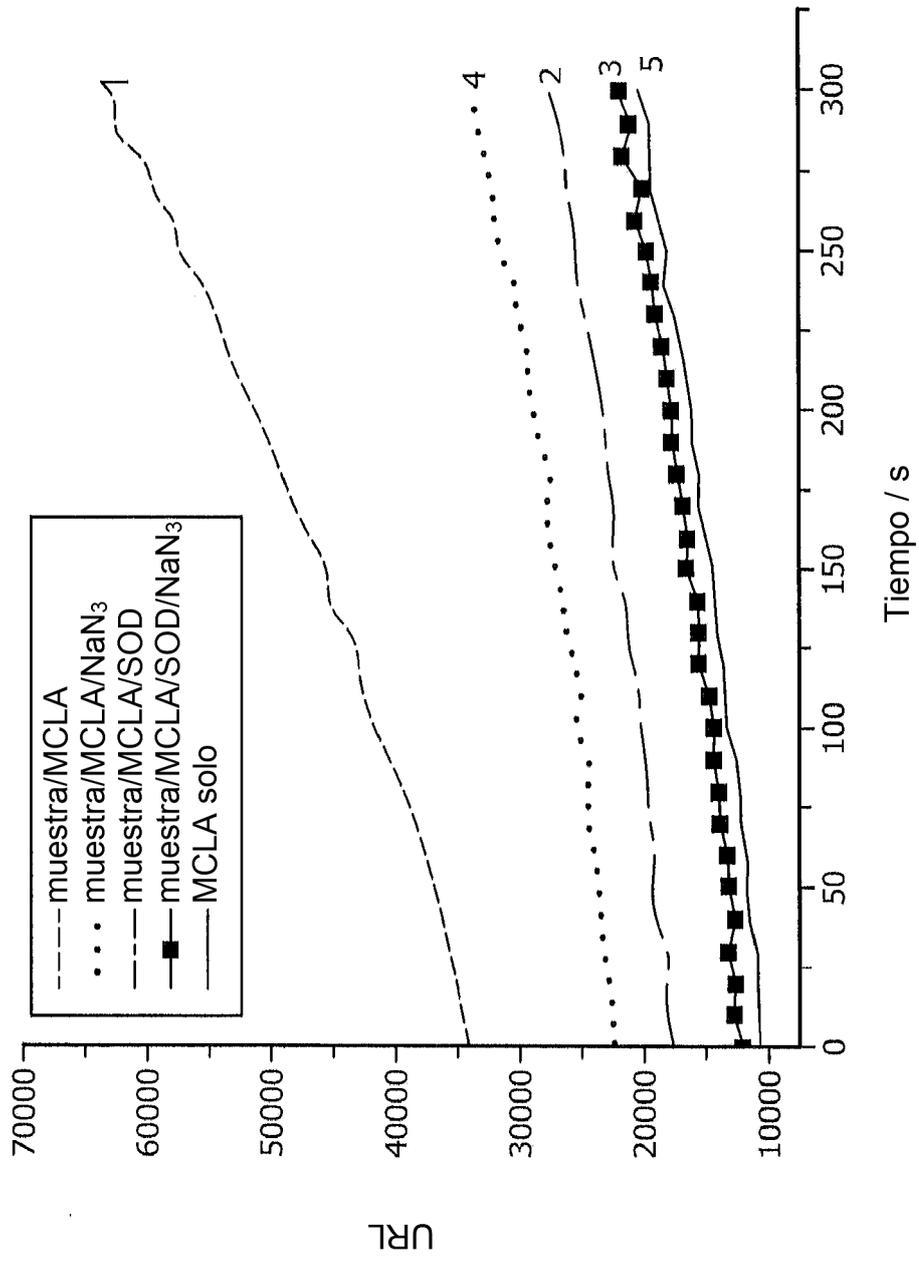


FIG. 19

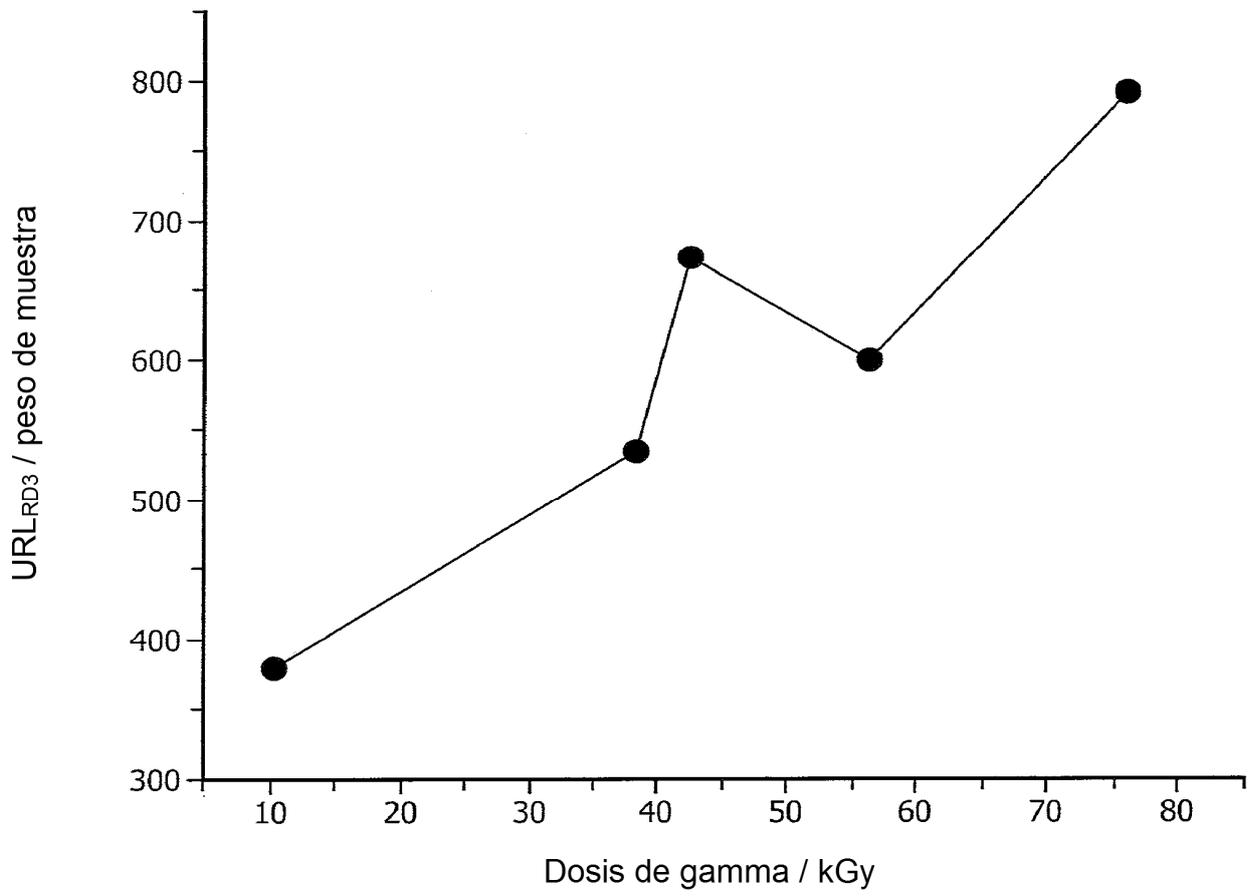


FIG. 20