

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 000**

51 Int. Cl.:

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 47/64 (2007.01)

C08G 65/329 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2001 PCT/US2001/05020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2018 WO01060335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2001 E 01910817 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 1257257**

54 Título: **Procedimiento de producción de sistemas de administración utilizando composiciones poliméricas biodegradables preformadas**

30 Prioridad:

17.02.2000 US 183556 P

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

27.03.2019

73 Titular/es:

**NEOMEND, INC. (100.0%)
272 Jeronimo, Suite 119
Irvine, CA 92618, US**

72 Inventor/es:

**TRUONG, MYHANH, T.;
POURNOOR, KAVEH;
CHOI, HYE-OK;
VELASQUEZ, DAVID, J.;
FERBER, RICHARD, H. y
BERNATCHEZ, STEPHANIE F.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 706 000 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

Procedimiento de producción de sistemas de administración utilizando composiciones poliméricas biodegradables preformadas

5 La presente invención proporciona un procedimiento de producción de un sistema de administración para la administración de un agente activo a un sujeto que comprende proporcionar un objeto preformado que es una proteína reticulada sustancialmente completamente desolvatada, y reconstituir el objeto preformado con un líquido que comprende el agente activo.

10 Antecedentes

15 Se han desarrollado una diversidad de enfoques para permitir la administración de un agente activo, tal como un fármaco, a un sujeto, preferentemente para la liberación mantenida de dicho agente. Dichos sistemas de administración están diseñados normalmente para proteger al agente del entorno antes de su administración, mientras que permiten la liberación controlada del agente en la zona objetivo del sujeto.

20 Una serie de sistemas de liberación controlada convencionales están basados en microestructuras, tales como liposomas, liposomas, microcápsulas, micropartículas y nanopartículas, así como macroestructuras, tales como cilindros, discos y fibras. Normalmente, un agente activo, tal como un fármaco, se mezcla con un polímero y después se conforma para dar la forma deseada.

25 Muchos de dichos sistemas convencionales no se pueden utilizar para formar un implante sólido con la integridad estructural requerida para aplicaciones protésicas. Además, muchos de dichos sistemas no se pueden utilizar para formar artículos que pueden infundirse con un agente activo (por ejemplo, un fármaco) por un médico, por ejemplo, en el momento de la aplicación al sujeto. Además, muchos de estos sistemas incluyen polímeros que no pueden controlarse fácilmente con respecto a la velocidad de biodegradación y/o la velocidad de liberación de cualesquiera agentes activos incorporados.

30 Los hidrogeles (por ejemplo, una clase de polímeros que se hinchan en un medio acuoso pero que no se disuelven en agua) producidos mediante la reticulación de albúmina con derivados de polietilenglicol (PEG) se han estudiado previamente para posibles aplicaciones de administración de fármacos (D'Urso et al., *Biotech. Tech.*, **8**, 71-76 (1994)). Otro enfoque para la administración controlada de fármacos implica la microencapsulación o la formación de microesferas utilizando polímeros bioabsorbibles sintéticos tales como el poli(ácido láctico) y diversos copolímeros de lactida y glicólida. Sin embargo, un inconveniente en el uso de microesferas es que no pueden recubrirse uniformemente y retenerse en la superficie de un sitio quirúrgico o en un tejido dañado o enfermo. Para abordar este problema, se han fabricado membranas que contienen microesferas suspendiendo las microesferas en una solución de un segundo polímero fabricado utilizando un disolvente que es un no disolvente para las microesferas y formando después una película con la mezcla.

40 Por lo tanto, existe la necesidad de otros sistemas de administración, particularmente de uno que incluya una composición polimérica que pueda variarse para proporcionar un intervalo de velocidades de biodegradación y de velocidades de administración. Preferentemente, existe la necesidad de un sistema de administración que incluya una composición polimérica que tenga la integridad estructural suficiente para que sea fácil de manejar.

45 Sumario

50 La presente invención proporciona un procedimiento para producir un sistema de administración para la administración de un agente activo a un sujeto, que comprende las etapas de

proporcionar un objeto preformado que es una proteína reticulada sustancialmente completamente desolvatada que tiene un agente de reticulación de la fórmula:



55 en la que:

X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional;

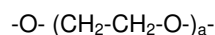
60 LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas $-C(O)-$, $-(CH_2)_bC(O)-$ en la que b es un número entero de 1 a 5, $-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, $-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas $-R-C(O)-$, $-R-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ o $-R-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en las que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxoftalimidilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo; y

n es un número entero de 2 a 10;

con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, -X-I-X- es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



en la que a es un número entero de 20 a 300; y

resolvatar el objeto preformado con un líquido que es o incluye el agente activo.

Otras formas de realización del procedimiento anterior de la presente invención se describen en las reivindicaciones 2 a 10.

En el presente documento también se describe, pero no forma parte de la invención, un objeto preformado para la administración de un agente activo a un sujeto, siendo el objeto preformado albúmina reticulada al menos parcialmente desolvatada que tiene un agente de reticulación de la fórmula:



en la que:

X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional o un enlace;

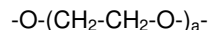
LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas $-C(O)-$, $-(CH_2)_bC(O)-$ en la que b es un número entero de 1 a 5, $-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, $-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas $-R-C(O)-$, $-R-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ o $-R-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxoftalimidilo, nitrofenoxilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo; y

n es un número entero de 2 a 10;

con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, -X-I-X- es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



en la que a es un número entero de 20 a 300.

En el presente documento también se describen, pero que no forman parte de la invención, objetos preformados con un agente activo incorporado en los mismos, que pueden resolvatarse o no, y dichos objetos preformados que tienen un agente activo en los mismos incorporados adicionalmente en una matriz biodegradable secundaria. Otras formas de realización incluyen objetos preformados de otros polímeros biodegradables que tienen un agente activo en los mismos incorporados adicionalmente en una matriz biodegradable secundaria, que es de la química descrita anteriormente para los objetos preformados. También se describen en el presente documento procedimientos de fabricación y procedimientos de administración de un agente activo a un sujeto.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la liberación de 5-fluorouracilo (5-FU) desde tapones preformados de albúmina reticulada con reticulante PEG-(SS)₂.

La figura 2 muestra la liberación de tetraciclina desde un complejo de alginato/fármaco, que se mezcló con la albúmina justo antes de reticularla con el reticulante PEG-SS₂.

La figura 3 muestra la liberación de 5-FU desde tapones de albúmina/PEG-(SS)₂ a los que se añadió el 5-FU con el reticulante durante la fabricación del tapón.

La figura 4 muestra la liberación de 5-FU desde tapones de albúmina/PEG-(SS)₂ con cloruro de calcio añadido.

La figura 5 muestra la liberación de vancomicina desde perlas de albúmina/PEG-(SS)₂ rehidratadas.

La figura 6 muestra el porcentaje en peso de liberación de vancomicina desde perlas de albúmina/PEG-(SS)₂ rehidratadas.

La figura 7 muestra la liberación de cefazolina desde perlas de albúmina/PEG-(SS)₂ rehidratadas.

La figura 8 muestra el porcentaje en peso de liberación de cefazolina desde perlas de albúmina/PEG-(SS)₂ rehidratadas.

La figura 9 muestra el porcentaje de aumento de volumen de perlas poliméricas frente al porcentaje en peso de absorción de agua en un experimento de una única perla.

La figura 10 muestra los perfiles de liberación de tetraciclina desde microesferas.

La figura 11 muestra la liberación de cefazolina desde tapones de albúmina/PEG de 4 brazos.

La figura 12 muestra el porcentaje de TGF-β1 liberado desde varias perlas.

Descripción detallada de formas de realización preferidas

La presente invención proporciona un procedimiento para producir un sistema de administración para la administración un agente activo a un sujeto, tal como se define en las reivindicaciones.

En el presente documento también se describen, pero que no forman parte de la invención, objetos preformados, preferentemente objetos autoportantes preformados, que incluyen una primera composición biodegradable y opcionalmente un agente activo, tal como un fármaco, para su administración a una zona objetivo de un sujeto. Los objetos preformados pueden desolvatarse, al menos parcialmente, (por ejemplo, deshidratarse al menos parcialmente) y subsiguientemente combinarse con un agente activo, o el agente activo puede incluirse en el momento de la preparación de los objetos preformados. Dichos objetos preformados se preparan preferentemente a partir de una composición biodegradable que se usa convencionalmente para unir o sellar tejido mediante aplicación de los materiales de partida (por ejemplo, proteína y agente de reticulación) al tejido y su curado (por ejemplo, reticulación) en presencia del tejido del sujeto. En el presente documento, sin embargo, los objetos preferidos se preparan a partir de la misma composición o una composición similar, se curan (por ejemplo, se reticulan) y después se aplican al tejido del sujeto. Por lo tanto, típicamente no hay interacción de unión entre los objetos preformados y el tejido.

Los objetos preformados preferidos descritos en el presente documento tienen una integridad estructural suficiente como para mantener su forma general y ser autoportantes una vez formados (por ejemplo, curados), siempre que se almacenen en condiciones apropiadas (por ejemplo, en ausencia de humedad si están desolvatados o a una temperatura de aproximadamente 4 °C si están solvatados). El grado de resistencia mecánica, flexibilidad, velocidad de curado y velocidad de biodegradación puede modificarse mediante la elección de los componentes utilizados para fabricar los objetos preformados. Los objetos preformados preferidos descritos en el presente documento incluyen una proteína reticulada. Normalmente se preparan a partir de una solución proteica básica tamponada y un agente de reticulación multifuncional y, normalmente, difuncional. La solución proteica tamponada y el agente de reticulación se obtienen normalmente utilizando materiales disponibles comercialmente, lo que aporta beneficios porque la mayor parte de estos materiales generalmente tienen un historial de seguridad y/o de uso clínico.

Las proteínas adecuadas para su uso en la presente composición incluyen proteínas no inmunogénicas hidrosolubles, preferentemente albúmina (de forma más preferida albúmina sérica, y de la forma más preferida, albúmina sérica humana). Una solución proteica tamponada preferida que se puede usar para preparar los objetos preformados descritos en el presente documento incluye albúmina sérica acuosa concentrada, tamponada a un pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 11,0, en la que la concentración del tampón se encuentra en un intervalo de aproximadamente 0,01 molar a aproximadamente 0,25 molar. Los sistemas tampón adecuados incluyen tampones que son fisiológicamente y/o clínicamente aceptables, tales como los sistemas tampón de carbonato o fosfato conocidos, siempre que el tampón no reaccione adversamente con el agente de reticulación ni lo altere de otra forma. Un sistema tampón preferido es un sistema tampón de carbonato/bicarbonato a un valor de pH de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,5 a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,15 molar.

La albúmina sérica se aísla fácilmente a partir de suero utilizando procesos de aislamiento conocidos. Además, es

posible producir albúmina a partir de células transformadas genéticamente. Véanse, por ejemplo, los informes de Quirk et al., Biotechnology and Applied Biochemistry, **11**, 273-287 (1989), Kalman et al., Nucleic Acids Research, **18**, 6075-6081 (1990), Sleep et al., Biotechnology, **8**, 42-46 (1990), y Sijmons et al., Biotechnology, **8**, 217-221 (1990). La capacidad para producir albúmina recombinante ofrece el beneficio de que la proteína producida mediante este procedimiento estará exenta de patógenos humanos, virus u otros contaminantes que puedan contaminar la albúmina que se aísla directamente a partir de suero humano.

Se ha descubierto que la albúmina sérica no está desnaturalizada cuando se usa en las presentes mezclas tamponadas. Debido a que la albúmina no se desnaturaliza antes de su uso, se cree que la albúmina conserva su conformación natural helicoidal y, por lo tanto, después de reticularla durante el proceso de curado para proporcionar un sólido de tipo gel, los objetos preformados curados conservan la flexibilidad suficiente como para proporcionar una matriz adecuada para el implante, si se desea.

Se pueden utilizar una diversidad de agentes de reticulación adecuados en la presente divulgación. Los agentes de reticulación son multifuncionales, y preferentemente difuncionales. Los agentes de reticulación adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen compuestos de la fórmula:



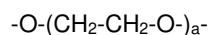
en la que X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional o un enlace, LM es un resto de enlace difuncional, G es un grupo saliente activado, I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo (por ejemplo, etilenglicol, pentaeritrol, trimetilolpropano, aminas multinucleófilas, etc.), y n es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, "-X-I-X-" es "-PEG-" tal como se define en el presente documento.

Los agentes de reticulación que se utilizan en la presente invención se definen en la reivindicación 1.

Los agentes de reticulación preferidos son difuncionales y tienen la fórmula:



en la que -PEG- es un fragmento dirradical representado por la fórmula



en la que a es un número entero de aproximadamente 20 a aproximadamente 300; -LM- es un fragmento dirradical representado por las fórmulas -C(O)-, -(CH₂)_bC(O)- en la que b es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, -C(O)-(CH₂)_c-C(O)- en la que c es un número entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, -C(O)-O-(CH₂)_d-O-C(O)- en la que d es un número entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas -R-C(O)-, -R-C(O)-(CH₂)_c-C(O)- o -R-C(O)-O-(CH₂)_d-O-C(O)- en las que c es un número entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, d es un número entero de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 y R es un polímero o copolímero que tiene de 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona; y -G es un grupo saliente tal como un grupo saliente de succinimidilo, maleimidilo, ftalimidilo, nitrofenilo, imidazolilo o tresilo. En el contexto de un grupo saliente, "succinimidilo" significa N-oxisuccinimidilo, "maleimidilo" significa N-oximaleimidilo, "ftalimidilo" significa N-oxiftalimidilo, "nitrofenilo" significa nitrofenoxilo, "imidazolilo" significa N-oxiimidazolilo y "tresilo" significa (CF₃-CH₂-SO₂-O-).

La porción -PEG- del agente de reticulación está derivada preferentemente de compuestos disponibles comercialmente que tienen un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, preferentemente que tienen un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 4.000. Estos compuestos se han utilizado en diferentes tipos de materiales biomédicos debido a que se ha demostrado que no son tóxicos y se excretan rápidamente del cuerpo cuando el peso molecular es inferior a aproximadamente 30.000.

La porción de grupo saliente, -G, del agente de reticulación es un grupo saliente activado que permite que el agente de reticulación reaccione o se una químicamente a grupos de aminas primarias o secundarias libres de una proteína. Los grupos salientes adecuados incluyen N-oxisuccinimidilo, otras imidas tales como N-oximaleimidilo y N-oxitalimidilo, grupos salientes heterocíclicos tales como N-oxiimidazolilo, o grupos salientes de alquilsulfona fluorados tales como tresilo (CF₃-CH₂-SO₂-O-). Un grupo saliente preferido es el grupo N-oxisuccinimidilo porque los estudios de mutagenicidad, oncogenicidad y teratogenicidad de este grupo sugieren que una cantidad pequeña de este grupo saliente no presenta un riesgo toxicológico local o sistémico.

Los agentes de reticulación pueden prepararse utilizando procesos, métodos o procedimientos de síntesis

conocidos, tales como los procedimientos de los que se informa en las patentes de Estados Unidos Nº 4.101.380 o 4.839.345, el procedimiento descrito en la solicitud internacional con el número de serie PCT/US90/02133 presentada el 19 de abril, 1990, o el procedimiento comunicado por Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7, 175-186 (1984). En resumen, se disuelven polietilenglicol y un anhídrido de ácido adecuado en un disolvente orgánico polar adecuado en presencia de una base y se someten a reflujo durante un período de tiempo suficiente para formar un diácido de diéster de polietilenglicol. El diácido de diéster se hace reaccionar después con un grupo saliente tal como un compuesto de N-hidroxi-imida en un disolvente orgánico polar adecuado en presencia de dicitclohexilcarbodiimida u otros agentes de condensación y se agita a temperatura ambiente para formar el agente de reticulación difuncional deseado.

Alternativamente, pueden disolverse polietilenglicol y un cloruro de ácido dicarboxílico o biscloroformiato adecuado en un disolvente orgánico polar adecuado durante un período de tiempo suficiente para formar el éster de polietilenglicol de cloruro de ácido mixto o el éster de polietilenglicol de cloroformiato mixto. Los ésteres mixtos pueden hacerse reaccionar con un compuesto tal como un compuesto de N-hidroxi-imida en un disolvente orgánico polar adecuado y agitarse a una temperatura elevada durante un período de tiempo suficiente como para formar el agente de reticulación difuncional deseado.

Los objetos preformados pueden prepararse utilizando procedimientos convencionales de reticulación de materiales, tales como proteínas, y procedimientos convencionales de formación de polímeros reticulados en formas, tales como perlas o microesferas, que incluyen técnicas de extrusión, técnicas de secado por pulverización y técnicas de polimerización en emulsión. Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica de la química de polímeros.

Se puede diseñar el tiempo de curado de las presentes composiciones utilizando tampones que tienen diferentes valores de pH para modificar el pH de la proteína. Por ejemplo, variando el pH del tampón es posible modificar el pH de la albúmina y, por lo tanto, cambiar el tiempo de curado de aproximadamente 10 segundos a menos de aproximadamente 10 minutos. En resumen, el mezclado de albúmina sérica acuosa concentrada a un pH superior con el agente de reticulación proporciona los tiempos de curado más rápidos. También se ha descubierto que concentraciones más elevadas de proteína y agente de reticulación proporcionan una matriz curada relativamente más fuerte. No obstante, si las mezclas están demasiado concentradas y la viscosidad se vuelve demasiado alta, la matriz curada resultante se vuelve débil y globular. Además, si la concentración de agente de reticulación es demasiado alta, la matriz curada resultante puede hincharse hasta una medida en la que la resistencia de la matriz en presencia de agua u otros fluidos se reduce.

En la patente de Estados Unidos Nº 5.583.114 (Barrows et al.) se describen composiciones que se utilizan para formar los objetos preformados. En la misma, sin embargo, las composiciones se aplican directamente al tejido y se curan *in situ* para crear una interacción de unión con el tejido. Se utilizan, por ejemplo, para eliminar o reducir sustancialmente el número de suturas que se requieren normalmente al utilizar las prácticas actuales, para fijar injertos de piel y para colocar colgajos de tejidos o colgajos libres durante la cirugía reconstructiva, para cerrar colgajos gingivales en la cirugía periodontal. En todas estas aplicaciones, las composiciones forman una capa fina de adhesivo curado que está encerrada eficazmente entre dos capas adyacentes de tejidos vivos. Alternativamente, se describe que las composiciones se usan como sellantes, por ejemplo, para prevenir fugas de aire asociadas con la cirugía pulmonar o para inhibir o prevenir la hemorragia en otros procedimientos quirúrgicos. Cuando se usa de esta forma, el tejido subyacente puede recubrirse con una capa relativamente gruesa de adhesivo.

Por el contrario, las composiciones descritas en el presente documento se conforman dando objetos antes de ponerse en contacto con el sujeto. Por lo tanto, el término "preformado" se refiere a proporcionar una forma o conformación a la composición polimérica antes de poner en contacto un sujeto con el objeto. Preferentemente, los objetos preformados tienen una forma tridimensional que es autoportante. Por lo tanto, dichos objetos preformados no incluyen películas o capas finas; sin embargo, si la forma es la de un material laminar o capa sobre un soporte para formar un parche, por ejemplo, el objeto preformado tiene un espesor superior a aproximadamente 2 milímetros. Los objetos preformados descritos en el presente documento pueden encontrarse en forma de microestructuras, tales como microcápsulas, micropartículas, nanopartículas y similares, así como de macroestructuras, tales como perlas u otros objetos en forma esférica, cilindros, discos, fibras, láminas, tapones, cintas, cuñas y similares. Las estructuras preferidas son microesferas y perlas. Normalmente, las perlas tienen un diámetro superior a aproximadamente 1 milímetro y las microesferas tienen un diámetro de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1000 micrómetros.

Los objetos preformados pueden desolvatarse, al menos parcialmente, y preferentemente desolvatarse sustancialmente completamente, después de la conformación. En el presente documento, "desolvatado" significa que el disolvente utilizado durante la preparación se elimina del objeto preformado después de la reacción entre la proteína y el reticulante. Típicamente, esto significa que los objetos preformados se deshidratan al menos parcialmente debido a la eliminación de al menos parte del agua incorporada en los objetos preformados en su formación inicial. Se pueden utilizar otros disolventes aparte, o además, de agua durante la preparación de dichos objetos preformados. Significativamente, los objetos preformados preferidos descritos en el presente documento conservan su forma tras la desolvatación y la resolvatación. En la presente invención, el objeto preformado

proporcionado es una proteína reticulada sustancialmente completamente desolvatada.

Una vez que los objetos preformados se encuentran al menos parcialmente desolvatados, es conveniente almacenarlos en un entorno que no permita la resolvatación debido a la humedad atmosférica, por ejemplo. Dichos objetos son deseables porque son fáciles de manejar y se pueden proporcionar a un médico y resolvatarse con un agente activo en el momento de su uso.

Tanto si están desolvatados o no, los objetos preformados pueden incluir un agente activo. Las formas de realización preferidas de los objetos preformados descritos en el presente documento incluyen un agente activo incorporado en los mismos. Tal como se usa en el presente documento, un "agente activo" es uno que es capaz de producir un efecto deseado, ya sea químicamente, farmacológicamente, físicamente o biológicamente. Por lo tanto, un objeto preformado resultante con uno o más agentes activos incorporados en el mismo puede funcionar como un sistema de administración de fármacos, medicamentos u otros agentes activos. Los objetos preformados pueden colocarse en contacto con el tejido, como cuando se implantan en una cavidad corporal o hueco tisular, por ejemplo, en un sujeto, o en el exterior de un sujeto, como en la piel, por ejemplo.

El agente activo puede añadirse durante la formación del objeto preformado, por ejemplo, durante la reacción de la proteína y el reticulante, o subsiguientemente a la misma. Si el agente activo se incorpora al objeto preformado durante la formación, se prefiere que el agente activo no reaccione ni con el agente de reticulación ni con la proteína. En la presente invención, el agente activo se combina con el objeto preformado y desolvatado con un líquido que es, o incluye, un agente activo para formar un objeto preformado resolvatado con el agente activo incorporado en el mismo. Este objeto preformado resolvatado se puede poner en contacto con el sujeto para la administración del agente activo. En los ejemplos, a continuación, se divulgan procedimientos específicos para incorporar agentes activos en los objetos preformados, ya sea durante su formación o subsiguientemente a la misma. El procedimiento de la presente invención comprende resolvar el objeto preformado con un líquido que es, o incluye, el agente activo.

En un aspecto, esto implica resolvar una pluralidad de objetos preformados en forma esférica con una composición acuosa que contiene un agente activo, tal como un agente antibacteriano, e introducir la pluralidad de dichos objetos en un hueco tisular, tal como un absceso o una cavidad ósea desbridada. Por lo tanto, en una forma de realización particular, pueden usarse objetos preformados resolvatados que contienen un agente antibacteriano en el tratamiento de osteomielitis. La osteomielitis es una infección del hueso y su médula ósea y tiene como consecuencia la formación de lesiones óseas. El agente etiológico es habitualmente estafilococos. Es una infección difícil de tratar y erradicar. La práctica actual consiste en antibióticos profilácticos a largo plazo con múltiples desbridamientos quirúrgicos. Después de la cirugía de desbridamiento, el espacio muerto creado por la extracción de tejido osteomielítico se rellena con perlas de cemento óseo de poli(metacrilato de metilo), que no son biodegradables. Aunque dichas perlas son un vehículo probado de antibióticos, están lejos de ser ideales, dado que no se degradan *in vivo* y pueden dar lugar a reacciones de incompatibilidad de tejidos. Por lo tanto, los objetos preformados descritos en el presente documento que contienen uno o más antibióticos pueden usarse en el tratamiento de osteomielitis.

Significativamente, la velocidad de biodegradación de los objetos preformados se puede adaptar para un uso deseado mediante la elección de la proteína, el reticulante y las condiciones de la preparación. Tal como se usa en el presente documento, "biodegradación" se refiere a la conversión de los objetos preformados en productos intermedios o finales menos complejos mediante una diversidad de mecanismos, que incluyen solubilización, hidrólisis, procedimientos enzimáticos y la acción de entidades biológicas, que conducen a una disminución en la integridad del material. Las moléculas poliméricas pueden, pero no necesariamente, descomponerse en fragmentos más pequeños. Dicha biodegradación incluye dentro de su alcance la biorresorción, la bioabsorción o la bioerosión de los objetos preformados. Típicamente, los objetos preformados descritos en el presente documento pueden formularse de forma que se degraden a lo largo de un período de aproximadamente 2 días a aproximadamente 60 días.

La liberación del agente activo tiene lugar normalmente mediante una combinación de erosión del polímero y difusión del agente activo al exterior del polímero. El componente de difusión puede o no seguir la Ley de Fick, mientras que la contribución de la erosión sigue la cinética de degradación. La velocidad de liberación del agente activo se puede adaptar para que se encuentre dentro de un intervalo de aproximadamente varias horas a varios meses, típicamente, hasta aproximadamente 60 días.

El agente activo puede seleccionarse a partir de una amplia diversidad de agentes que proporcionan efectos fisiológicos, farmacológicos o biológicos, que pueden ser terapéuticos o profilácticos, por ejemplo. Los ejemplos incluyen una sustancia, o un precursor metabólico de la misma, que puede mejorar el crecimiento celular, mejorar la regeneración tisular, mejorar la angiogénesis y la vascularización, mejorar la estimulación nerviosa, mejorar el crecimiento óseo, inhibir (por ejemplo, prevenir, reducir o revertir) la infección (por ejemplo, bacteriana o vírica) y/o la inflamación, inhibir el crecimiento de células cancerosas (por ejemplo, tratar una afección maligna existente o evitar la conversión de una afección premaligna en una afección maligna), modificar la respuesta inmunitaria, promover la cicatrización de heridas o promover el ablandamiento y la hidratación del tejido. Dichas sustancias incluyen, pero sin

limitación: agentes antibacterianos, tales como tetraciclina, vancomicina y cefalosporinas; factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento epitelial y el factor de crecimiento de fibroblastos; agentes anticancerosos (por ejemplo, antimetabólicos), tales como 5-fluorouracilo, mitomicina, metotrexato, doxorubicina y cisplatino; anestésicos locales, como lidocaína, bupivacaína, tetracaína, procaína y prilocaína; antisépticos (por ejemplo, clorhexidina); hormonas (por ejemplo, esteroides, insulina); agentes antivíricos; antagonistas narcóticos; modificadores de la respuesta inmunitaria; fármacos oculares (por ejemplo, atropina, pilocarpina y timolol); vacunas y cosmecéuticos. Otros ejemplos específicos se enumeran en las patentes de Estados Unidos N° 5.733.563 (Fortier et al.) y 5.759.563 (Yewey et al.). Pueden incorporarse uno o más de dichos agentes activos en los objetos preformados descritos en el presente documento.

Los objetos preformados descritos en el presente documento, que tienen preferentemente un agente activo incorporado, pueden incorporarse en una matriz biodegradable secundaria. Esta matriz biodegradable secundaria se puede aplicar a un sujeto como un líquido (por ejemplo, microesferas dentro de un líquido) o se puede conformar dando un objeto moldeado (por ejemplo, objetos moldeados preformados, tales como microesferas dentro de un objeto moldeado). Por lo tanto, los objetos preformados pueden incorporarse en la matriz para la administración a un sujeto. La matriz biodegradable secundaria puede ser de la misma química que la de los objetos preformados, preferentemente tal como se ha descrito anteriormente y se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.583.114 (Barrows et al.), o puede ser de otro polímero biodegradable. De forma similar, los objetos preformados incluyen la proteína reticulada descrita anteriormente, o pueden ser de otro polímero biodegradable. Los ejemplos de polímeros biodegradables adecuados para la matriz o para los objetos preformados incluyen los divulgados en Drug Delivery Systems, V.V. Ranade, ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, páginas 78-81, 1996, y Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, M. Chasin, ed., Volume 45 de Drugs and the Pharmaceutical Sciences Series, Marcel Dekker, Inc., NY, 1990. Los ejemplos preferidos de la matriz biodegradable secundaria incluyen poli(fosfoésteres), poli(alfa-hidroxiácidos), polímeros de acrilato y metacrilato hidrófilos, poliésteres de hidroxiprolina, polianhídridos (por ejemplo, poli(lactida-co-glicolida)), policaprolactonas, poli(ortoésteres), polifosfazenos, poli(aminoácidos), polisacáridos y copolímeros de los mismos. Los ejemplos preferidos de los objetos preformados incluyen poli(alfa-hidroxiácidos) (por ejemplo, poli(ácido glicólico), poli(ácido DL-láctico) y poli(ácido L-láctico)), poli(aminoácidos), poli(anhídridos) poli(ortoésteres), poli(fosfacinas), poli(fosfoésteres), polilactonas (por ejemplo, poli(épsilon-caprolactona), poli(delta-valerolactona) y poli(gamma-butirolactona). Los objetos preformados pueden incorporarse en la matriz biodegradable secundaria utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el sellante de tejidos descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.583.114 (Barrows et al.) se puede utilizar como una matriz biodegradable secundaria para administrar objetos preformados incorporados en la misma a un sujeto.

Mediante los ejemplos siguientes se ilustran adicionalmente objetos y ventajas de la presente invención, pero los materiales particulares y las cantidades de los mismos que se mencionan en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no deberán interpretarse indebidamente como limitantes de la presente invención.

EJEMPLOS

Preparación de la solución de albúmina

La albúmina se obtuvo como albúmina sérica humana a una concentración del 25% de Baxter Healthcare (Deerfield, Illinois). Se procesó mediante diálisis (procedimiento A) tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.583.114 (Barrows et al.) o se procesó mediante diafiltración continua (procedimiento B) utilizando una unidad de laboratorio de muestreo MINIKROS para separaciones de flujo tangencial (disponible de Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Domingues, CA) equipada con un módulo de fibra de polisulfona de 680 cm² con un límite de peso molecular de 50.000 (también disponible de Spectrum Laboratories, Inc.). La albúmina obtenida del proceso de Barrows (patente de Estados Unidos N° 5.582.114) (proceso A) se diluyó a una solución al 23% utilizando una solución tampón de carbonato/bicarbonato 0,1 M a pH 10. En el caso de la albúmina obtenida por diafiltración (proceso B), la diafiltración se realizó con un tampón de carbonato/bicarbonato 0,075 M a pH 8,9-9,1. La muestra se concentró al 29%-30% utilizando el equipo de diafiltración. La concentración final de albúmina se determinó mediante valoración de Biuret estándar.

Síntesis de reticulante succinato de polietilenglicol-disuccinimidilo (PEG-SS)₂

Un reactor revestido de vidrio de 30 galones se cargó con 10,9 kg de polietilenglicol (peso molecular 3400), 760 gramos de anhídrido succínico y 4,4 kg de tolueno. Las cargas se mezclaron a 110 °C bajo una manta de nitrógeno durante 6 horas. La mezcla de reacción se enfrió después a 80 grados centígrados. Se añadieron 13,0 kg de etanol absoluto, con agitación. No se añadió calor adicional. La mezcla se agitó hasta que la temperatura se enfrió a 25 °C. Se añadieron 43,8 kg de metil-terc-butil-éter (MtBE) a la mezcla enfriada con agitación y se mezclaron en atmósfera de nitrógeno durante la noche. La mezcla de reacción se centrifugó. El reactor se enjuagó con cuatro porciones adicionales de MtBE. Este enjuague se usó para lavar la torta de centrifugación. La torta de filtro de disuccinato de polietilenglicol se secó a 30 °C al vacío en una secadora-mezcladora durante aproximadamente 19,5 horas. Se recuperaron 10,9 kg de disuccinato de polietilenglicol.

Un reactor revestido de vidrio de 30 galones se cargó con 5,6 kg de disuccinato de polietilenglicol, 540 gramos de N-hidroxisuccinimida, 84 gramos de 4-dimetilaminopiridina y 8,2 kg de acetonitrilo. Las cargas se mezclaron durante 1 hora a temperatura ambiente hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se añadieron 1,3 kg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodimida. La mezcla se agitó a 25 °C en una manta de nitrógeno durante 6 horas. Después se añadieron 39,6 kg de etanol absoluto a la mezcla de reacción con agitación. La mezcla se transfirió a un reactor revestido de vidrio portátil de 75 galones. Se añadieron 80,0 kg de MtBE con agitación. La mezcla se agitó durante la noche con refrigeración en la camisa. La mezcla de reacción se encontraba a 5-7 °C a la mañana siguiente. La mezcla de reacción se centrifugó y el matraz de reacción se enjuagó con cuatro partes de MtBE. Este enjuague se usó para lavar la torta de centrifugación. La torta húmeda centrifugada se añadió a un reactor revestido de vidrio de 30 galones junto con 40 kg de etanol absoluto. Se realizó un mezclado en el reactor durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se centrifugó, el reactor se enjuagó con 40 kg de etanol absoluto y este enjuague se usó para lavar la torta de centrifugación. El reactor se enjuagó después con 40 kg de MtBE y este enjuague se usó para lavar la torta de centrifugación. Aproximadamente la mitad de la torta se transfirió a un secador de tambor y se secó aproximadamente 18 horas a 30 °C al vacío. Se molieron 2,7 kg del producto seco usando refrigeración con nitrógeno líquido. Se recuperaron 2,55 kg de succinato de polietilenglicol-disuccinimidilo, PEG-(SS)₂, de cada mitad de la torta.

La invención reivindicada se demuestra adicionalmente mediante los ejemplos 1, 7, 8 y 15 siguientes.

20 EJEMPLO 1

Liberación de 5-fluorouracilo (5FU) desde un tapón de polímero de albúmina preformado

Se preformaron dos tapones de polímero en una polijeringa modificada de 5 mililitros (ml), en la que el cilindro de la jeringa se cortó para formar un receptáculo cilíndrico abierto, y después mezclando 0,5 ml de solución de albúmina al 29% (obtenida de American Biological Technology, Seguin, TX, o por diafiltración (procedimiento B) tal como se ha descrito anteriormente) y 0,5 ml de 136 mg/ml de reticulante PEG-(SS)₂. Una vez completada la reticulación (15 minutos), se retiraron los tapones de la jeringa y se extrajeron. Los tapones de polímero se secaron al vacío durante 24 horas (h). Los tapones se reconstituyeron con 2 ml de una solución de 5FU (1,04 mg/ml de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), de forma que cada tapón contuvieran un total de 187,6 microgramos (µg), o 165,5 µg de 5FU. Cada tapón se dispuso en un vial separado y se añadieron cinco ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, en el tiempo de muestreo 0 (t₀). Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y se agitaron continuamente. En cada tiempo de muestreo, se retiró todo el contenido del vial y se reemplazó por 5 ml de PBS nuevo. Las muestras se tomaron a 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 24 h. El análisis de 5FU se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión, siguiendo el procedimiento de Bernatchez et al., *Int. J. Pharm.*, **106**, 161-166 (1994). Los datos de la figura 1 muestran que el 5FU se liberó a lo largo de un período de 5 h.

EJEMPLO 2

40 Liberación de tetraciclina desde un tapón de biopolímero

Se añadió ácido algínico (30 mg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 1 ml de tetraciclina a 1,01 mg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El pH de la mezcla se llevó a 6,8 con NaOH 1 N utilizando tiras de pH CloropHast (Fischer Company, Itaska, IL) y luego se dispuso en un desecador de vacío con DRIERITE (WA Hammond Drierite Co., Xenia, OH) para secarla durante 24 h. La película de alginato/tetraciclina resultante se trituró y se mezcló con la solución de albúmina al 30% (procedimiento B) justo antes de disponerla en formas de polijeringa de 5 ml y se reticuló con un volumen equivalente de reticulante PEG-(SS)₂ (136 mg/ml). Cada tapón se dispuso en un vial separado y se añadieron cinco ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, en el tiempo de muestreo 0 (t₀). Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y se agitaron continuamente. En cada tiempo de muestreo, se retiró todo el contenido del vial y se reemplazó por 5 ml de PBS nuevo. Las muestras se tomaron a 1 h, 2 h, 3 h, 5 h y 24 h. Las muestras se analizaron en un HPLC Hewlett Packard (Palo Alto, CA) modelo 1190 con un detector de longitud de onda variable y una columna de fase inversa, LC-8-DB (15,0 cm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 micrómetros) de Supelco Co. (Bellefonte, PA). La fase móvil utilizada para el análisis de HPLC consistió en un tampón de fosfato de amonio 0,05 M (pH 6,8), metanol, acetonitrilo y trietilamina en la proporción de 45:45:10:1. El caudal de la fase móvil fue de 1,0 ml/minuto y la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La tetraciclina era detectable a 280 nm.

Los datos de la figura 2 muestran que aproximadamente el 70% de la tetraciclina se liberó a lo largo de un periodo de 5 h. La cantidad de tetraciclina recogida no se corrigió para las pérdidas debidas a la degradación de la tetraciclina.

EJEMPLO 3

65 Liberación de 5-fluorouracilo desde un tapón fabricado con 5FU mezclado con el reticulante y albúmina

Se disolvieron 136 mg de reticulante PEG-(SS)₂ en 1 ml de una solución de 5-fluorouracilo a 1,04 mg/ml. Esta

solución se mezcló después con 1 ml de solución de albúmina al 30% (véase el ejemplo 2) ya en una forma de 5 ml. El tapón de hidrogel resultante se retiró de la forma después de 15 minutos y se cortó en tres piezas del mismo tamaño (aproximadamente 0,5 cm de espesor). Cada una de las piezas se dispuso en un vial y se añadieron 4 ml de un tampón PBS (pH 7,4) en el tiempo de muestreo 0 (t_0). Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y se agitaron continuamente. En cada tiempo de muestreo, se retiró todo el contenido del vial y se reemplazó por 4 ml de PBS nuevo. Las muestras se tomaron a la 1 h, 2 h, 4 h y 8 h. El 5-fluorouracilo se analizó tal como se describe en el ejemplo 1.

Los datos de la figura 3 muestran que aproximadamente el 55% del 5-fluorouracilo se liberó a lo largo de un período de 8 horas. El resto del 5FU probablemente estaba reticulado formando el polímero y se liberará cuando el polímero se desintegre.

EJEMPLO 4

Liberación de 5-fluorouracilo desde tapones de albúmina que contienen ácido algínico sin calcio añadido

Se mezcló un mililitro de 5-fluorouracilo a 1,04 mg/ml con 30 mg de ácido algínico. El pH de la mezcla se llevó a 6,8 y después se dispuso en un desecador de vacío con DRIERITE para secarla durante 24 h. La película de alginato/5FU resultante se trituró y se mezcló con la solución de albúmina al 30% (véase el ejemplo 2) justo antes de disponerla en las formas de jeringa de 5 ml y se reticuló con un volumen equivalente de reticulante PEG-(SS)₂ (136 mg/ml). Cada tapón se dispuso en un vial separado y se añadieron 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, en el tiempo de muestreo 0 (t_0). Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y se agitaron continuamente. En cada tiempo de muestreo, se retiró todo el contenido del vial y se reemplazó por 5 ml de PBS nuevo. Las muestras se tomaron a 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h y 24 h.

El 5FU se analizó como en el ejemplo 1. Los datos en la figura 4 muestran que aproximadamente el 40% del 5FU se liberó a lo largo de un período de 5 horas.

EJEMPLO 5

Liberación de 5-fluorouracilo desde tapones de albúmina que contienen ácido algínico con calcio añadido

Se mezcló un mililitro de 5-fluorouracilo a 1,04 mg/ml con 30 mg de ácido algínico. El pH de la mezcla se llevó a 6,8 y se añadieron 150 μ l de una solución saturada de cloruro de calcio/agua para gelificar el alginato. El gel se dividió en 3 volúmenes aproximadamente iguales y después se dispuso en un desecador de vacío con DRIERITE para secarlo durante 24 h. Las películas de alginato/Ca/5FU resultantes se trituraron y se mezclaron en una solución de albúmina al 30% (véase el ejemplo 2) justo antes de disponerlas en las formas de 5 ml y se reticularon con un volumen equivalente de reticulante PEG-(SS)₂ (136 mg/ml). Cada uno de los tapones se dispuso en un vial separado y se añadieron cinco ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, en el tiempo de muestreo 0 (t_0). Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y se agitaron continuamente. En cada tiempo de muestreo, se retiró todo el contenido del vial y se reemplazó por 5 ml de PBS nuevo. Las muestras se tomaron a 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h y 24 h.

El 5FU se analizó tal como se describe en el ejemplo 1. Los datos de la figura 4 muestran que aproximadamente el 60% del 5FU se liberó a lo largo de un período de 5 horas.

EJEMPLO 6

Procedimiento para fabricar perlas biodegradables

Las perlas se prepararon a partir de un sistema líquido de dos partes. La parte A era una solución estéril de albúmina al 29% (véase el ejemplo 1) en un tampón de carbonato isotónico (0,075 M) (pH 9). La parte B era una solución de PEG-(SS)₂ a 260 mg/ml, reconstituida en una solución de agua estéril justo antes de su uso. Las soluciones A y B se mezclaron en volúmenes iguales con un sistema de jeringa doble conectado a un cabezal de mezcla estático. Las perlas se prepararon inyectando el líquido en un molde de teflón de 6 pulgadas x 4 pulgadas x 1 pulgada con orificios de 8 mm de diámetro. La mezcla inyectada se dejó curar durante diez minutos en los orificios de 8 mm de diámetro. Las perlas se retiraron del molde de teflón después de diez minutos. Las perlas se pueden utilizar de dos formas diferentes. En un caso, las perlas hidratadas se pueden usar directamente al retirarlas del molde de teflón. En otro caso, las perlas pueden deshidratarse después de retirarlas del molde. El secado se puede realizar al vacío o al aire o de otras formas apropiadas. Es importante indicar que se pueden crear una diversidad de geometrías distintas a perlas esféricas.

EJEMPLO 7

Estudios de liberación de vancomicina *in vitro*

Dos perlas deshidratadas fabricadas a partir del ejemplo 6 se dispusieron en un vial de 4 ml. Se disolvió vancomicina (60 mg, Abbott Laboratories, North Chicago, IL) en 2 ml de agua estéril y se añadió al vial. Las perlas se empaparon durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de 24 horas de empapamiento, las perlas se retiraron y se dispusieron en un frasco de vidrio de 20 ml con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4. La velocidad de liberación de vancomicina se determinó a 37 °C en un baño de agua a temperatura constante. El tampón se intercambiaba cada 24 horas hasta tres semanas. Estas muestras se analizaron para determinar la vancomicina utilizando un espectrofotómetro UV (Beckman, DU640, Fullerton CA). La vancomicina era detectable a 282 nm. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6.

EJEMPLO 8

Liberación de cefazolina *in vitro*

Dos perlas deshidratadas fabricadas a partir del ejemplo 6 se dispusieron en un vial de 4 ml. Se disolvió cefazolina (60 mg, Marsam Pharmaceuticals, Inc., Cherry Hill, NJ) en 2 ml de agua estéril y se añadió al vial. Las perlas se empaparon durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de 24 horas de empapamiento, las perlas se retiraron y se dispusieron en un frasco de vidrio de 20 ml con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4. La velocidad de liberación de cefazolina se determinó a 37 °C en un baño de agua a temperatura constante. El tampón se intercambiaba cada 24 horas hasta tres semanas. Estas muestras se analizaron para determinar la cefazolina utilizando un espectrofotómetro UV (Beckman, DU640, Fullerton CA). La cefazolina absorbe a 272 nm. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8.

EJEMPLO 9

Absorción de agua de perlas rehidratadas en función de la extensión de la reticulación y el volumen de disolvente

Se produjeron perlas como en el ejemplo 6, excepto que se usaron varias formulaciones de reticulante de PEG-(SS)₂. Las perlas fabricadas con una formulación de sellante normal (NS) se fabricaron mezclando 130 mg de PEG-(SS)₂ en 1 ml de agua y 1 ml de albúmina al 29% en tampón de carbonato de pH 9,0. Para perlas con la mitad de la concentración de reticulante (NS*1/2), las perlas contenían 65 mg de PEG-(SS)₂ en 1 ml de agua y 1 ml de albúmina al 29% en tampón de carbonato de pH 9,0. Para perlas con el doble de concentración de reticulante (NS*2), las perlas contenían 260 mg de PEG-(SS)₂ en 1 ml de agua y 1 ml de albúmina al 29% en un tampón de carbonato de pH 9,0. Para perlas con triple concentración de reticulante (NS*3), las perlas contenían 390 mg de PEG-(SS)₂ en 1 ml de agua y 1 ml de albúmina al 29% en un tampón de carbonato de pH 9,0. Se dispusieron tres perlas de cada formulación en un vial de 20 ml pesado previamente. Se pesaron tres mililitros de agua y se añadieron al vial. El mismo experimento se repitió con seis mililitros de agua. La absorción de agua de las perlas se midió a 2, 4, 6, 8 y 24 horas extrayendo las perlas y pesando el agua presente en el vial. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Absorción de agua por perla en función de la reticulación y el volumen

Tiempo (h)	% de absorción de agua por perla						
	(NS*1/2) 3 ml de agua	(NS) 3 ml de agua	(NS*2) 3 ml de agua	(NS*3) 3 ml de agua	(NS) 6 ml de agua	(NS*2) 6 ml de agua	(NS*3) 6 ml de agua
2	11,38	8,15	7,98	8,4	11,13	10,39	11,97
4	16,01	11,89	11,13	11,73	19,27	16,59	17,71
6					26,75	21,61	21,25
8	20,67	15,20	13,90	14,25	31,56	25,63	25,13
24	25,87	18,78	17,54	17,17	34,89	29,65	28,67

EJEMPLO 10

Absorción de agua de perlas rehidratadas en función del diámetro de la perla y la extensión de la reticulación

Se produjeron perlas como en el ejemplo 6. Las perlas con concentraciones de reticulante normales, dobles y triples se fabricaron tal como se describe en el ejemplo 9. Se dispusieron tres perlas de cada formulación en un vial de 20 ml pesado previamente. Se pesaron seis mililitros de agua y se añadieron al vial. La absorción de agua por la perla y el diámetro de la perla se midieron a 2, 4, 6, 8 y 24 horas extrayendo las perlas de los viales y pesando el agua remanente en el frasco. El experimento se repitió con una perla y dos mililitros de agua. El diámetro de la perla se

medió utilizando un comparador óptico Scherr-Tumico (S.T. Industries). Los resultados se muestran en la tabla 2 para múltiples perlas y en la tabla 3 para una única perla. La tabla 4 muestra el porcentaje de aumento de volumen en comparación con el volumen de perlas secas en función del tiempo entre experimentos de una única perla y de múltiples perlas a medida que las perlas secas se rehidratan. La figura 9 representa estos datos con respecto a la absorción de agua para los experimentos de 1 perla. Los experimentos de 3 perlas proporcionaron resultados similares.

Tabla 2

Absorción de agua de múltiples perlas

Tiempo (h)	(NS) 6 ml de agua	(NS*2) 6 ml de agua	(NS*3) 6 ml de agua	(NS) 6 ml de agua	(NS*2) 6 ml de agua	(NS*3) 6 ml de agua
	% de absorción de agua por perla	% de absorción de agua por perla	% de absorción de agua por perla	Diámetro por perla (mm)	Diámetro por perla (mm)	Diámetro por perla (mm)
0	0	0	0	4,35	4,65	4,92
2	11,13	10,39	11,97	6,99	6,98	6,78
4	19,27	16,59	17,71	8,08	7,84	7,64
6	26,75	21,61	21,25	8,73	8,0	8,62
8	31,56	25,63	25,13	9,05	8,8	8,86
24	34,89	29,65	28,67	9,42	8,91	9,13

Tabla 3

Absorción de agua de perlas individuales

Tiempo (h)	(NS) 2 ml de agua	(NS*2) 2 ml de agua	(NS*3) 2 ml de agua	(NS) 2 ml de agua	(NS*2) 2 ml de agua	(NS*3) 2 ml de agua
	% de absorción de agua por perla	% de absorción de agua por perla	% de absorción de agua por perla	Diámetro por perla (mm)	Diámetro por perla (mm)	Diámetro por perla (mm)
0	0	0	0	4,07	4,66	4,93
2	12,87	9,10	12,63	6,9	6,52	6,53
4	19,57	15,68	20,71	8,11	7,5	7,5
6	26,26	20,74	26,26	8,73	8,0	8,47
8	33,47	24,28	28,79	9,07	8,8	8,7
24	41,19	29,84	34,85	9,5	8,91	9,30

Tabla 4

Absorción de agua en un experimento de una única perla/múltiples perlas

Tiempo (h)	(NS) 2 ml de agua (1 perla)	(NS*2) 2 ml de agua (1 perla)	(NS*3) 2 ml de agua (1 perla)	(NS) 6 ml de agua (3 perlas)	(NS*2) 6 ml de agua (3 perlas)	(NS*3) 6 ml de agua (3 perlas)
	% de aumento de volumen	% de aumento de volumen	% de aumento de volumen	% de aumento de volumen	% de aumento de volumen	% de aumento de volumen
2	387	174	132	315	329	163
4	691	317	252	542	379	275
6	887	406	407	710	540	440
8	1007	573	450	804	593	485
24	1172	599	571	918	611	541

EJEMPLO 11

Preparación de microesferas de albúmina reticulada

Se prepararon microesferas mediante un procedimiento en emulsión de agua en aceite de acuerdo con la patente de Estados Unidos N° 5.508.060, con diversas modificaciones. Se utilizó una solución de albúmina sérica humana (HSA) tal como se enseña en el ejemplo 8 de la patente de Estados Unidos N° 5.583.114 (Barrows et al.) y albúmina sérica bovina (BSA), fracción V, se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Se usó PEG-(SS)₂ como agente de reticulación. En general, se agitó aceite de cacahuete (Nabisco Foods, Inc., East Hanover, NJ) a una velocidad predeterminada utilizando un agitador de tipo hélice de tres palas accionado por motor (Motomatic, Electro-Craft, Estados Unidos). Con agitación constante, se añadió gota a gota una solución acuosa de reticulante mezclada con una solución de albúmina con una aguja hipodérmica en el baño de aceite. En otra variación, la solución reticulante se añadió al aceite antes de la adición gota a gota de la solución de albúmina. La proporción en volumen de albúmina:reticulante fue de 1:1 y las concentraciones de reticulante utilizadas fueron de 138 mg/ml y 276 mg/ml. La relación aceite:agua fue de aproximadamente 100:1 y se utilizó un intervalo de 300-500 ml de aceite. Después de agitar durante un período de tiempo predeterminado, las microesferas se recogieron y se lavaron con acetato de etilo, operación seguida de filtración a través de un filtro de celulosa o nailon de 0,44 µm o 1,1 µm.

EJEMPLO 11A

Se utilizó el procedimiento del ejemplo 11 para preparar microesferas con las siguientes modificaciones. Se utilizó albúmina sérica humana (HSA) a una concentración del 27% y un pH de 9,4. La solución de PEG-(SS)₂ se encontraba a una concentración de 138 mg/ml. La solución de PEG-(SS)₂ se añadió al aceite y después la solución de albúmina se añadió gota a gota al aceite agitado a través de una aguja de calibre 27. El aceite se agitó a 1000 rpm durante 15 minutos utilizando un agitador de tipo hélice de tres palas. Después de detener la agitación, la solución se calentó a 85 °C y las microesferas se filtraron y se lavaron como en el ejemplo 11. Durante el calentamiento de la solución, cuando la temperatura del medio alcanzó aproximadamente 45 °C las partículas reticuladas comenzaron a flocular, dando como resultado la formación de copos blancos a partir de la mezcla. Las partículas floculadas se retiraron y las microesferas se recogieron. Un análisis de imagen típico de las microesferas recuperadas a partir de este proceso proporcionó un diámetro medio de 4,22 µm y una distribución de tamaño dentro de un intervalo de 1,0 µm (micrómetros) a 15 µm.

EJEMPLO 11B

Se produjeron microesferas mediante el mismo procedimiento utilizado en el ejemplo 11A, excepto que la velocidad de agitación fue de 1300 rpm y no se aplicó calor a la solución después de agitar. Un análisis de imagen típico de las microesferas recuperadas a partir de este proceso proporcionó un diámetro medio de 3,05 µm y una distribución de tamaño dentro de un intervalo de 1,0 µm a 10 µm.

EJEMPLO 11C

Se produjeron microesferas mediante el mismo procedimiento utilizado en el Ejemplo 11A, excepto que la concentración de reticulante PEG-(SS)₂ fue de 276 mg/ml, la velocidad de agitación fue de 1300 rpm, el tiempo de agitación fue de 20 minutos y no se aplicó calor a la solución después de la agitación. Un análisis de imagen típico de las microesferas recuperadas a partir de este proceso proporcionó un diámetro medio de 5,45 µm y una distribución de tamaño dentro de un intervalo de 0,5 µm a aproximadamente 16 µm. Estas microesferas se usaron en los experimentos de carga de fármacos del ejemplo 12.

EJEMPLO 11D

Se produjeron microesferas mediante el mismo procedimiento utilizado en el ejemplo 11A, excepto que se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) en una solución al 15% y pH 9,17, la velocidad de agitación fue de 1500 rpm, el tiempo de agitación fue de 20 minutos y no se aplicó calor a la solución después de la agitación. Un análisis de imagen típico de las microesferas recuperadas de este proceso proporcionó un diámetro medio de 2,42 µm y una distribución de tamaño dentro de un intervalo de 1,0 µm a 6,0 µm.

EJEMPLO 12

Carga de fármaco de microesferas con tetraciclina *in situ*

Se prepararon microesferas en presencia de clorhidrato de tetraciclina según el procedimiento del ejemplo 11C mezclando 2 ml de solución de HSA con un volumen igual de una solución de reticulante que contiene el fármaco en un baño de aceite. En resumen, la solución de reticulante se preparó añadiendo 552 mg de reticulante PEG-(SS)₂ a 2 ml de solución de tetraciclina (10 mg/ml). La solución de PEG-(SS)₂ que contenía el fármaco se añadió al aceite mientras se agitaba a 1300 rpm. Después de dejar suficiente tiempo para que la solución acuosa formara una

emulsión estable, se añadieron gota a gota 2 ml de albúmina sérica humana (27%, pH 9,4) y la emulsión se agitó durante 20 minutos. Después de lavar con acetato de etilo, las partículas se presentaron como un polvo fino bien separado. El análisis de imagen mostró que las partículas estaban bien separadas y tenían un tamaño pequeño.

5 EJEMPLO 13

Evaluación de liberación de fármaco *in vitro*

Los estudios de liberación de fármaco *in vitro* se llevaron a cabo mediante disponiendo microesferas (véase el ejemplo 11A) en un recipiente de un analizador de liberación prolongada (BIO-DIS, VanKel, Edison, NJ). El recipiente se sumergió en un vaso de vidrio de 200 ml que contenía 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) a una velocidad de agitación de 3 inmersiones por minuto, con un retardo inicial de 5 segundos. La temperatura del baño se mantuvo electrónicamente a 37 °C a lo largo del estudio de liberación. En momentos predeterminados, se extrajo un ml de muestra, operación seguida de una adición de solución nueva al depósito de PBS. La solución de muestra se filtró a través de un filtro de jeringa COSTAR de 0,22 μ m (Corning, Corning, NY) para excluir cualquier partícula. Las determinaciones cuantitativas de clorhidrato de tetraciclina se realizaron utilizando el procedimiento HPLC con detección UV espectrométrica. El aparato utilizado consistía en un inyector (Shimadzu Modelo Sil-9A, Shimadzu, Columbia, MD), un sistema de suministro de disolventes (Waters 625 LC, Millipore Corporation, Milford, MA), un detector de longitud de onda múltiple (Waters 490E, Millipore Corporation, Milford, MA) y un integrador (Waters Millennium, Millipore Corporation, Milford, MA). Las soluciones que contenían el fármaco (20 μ l-150 μ l, ajustadas de forma que se encontraran en el intervalo de detección lineal) se inyectaron en la columna C-18 de fase inversa de Beckman (5 μ m x 4,6 mm x 25 cm (Beckman, Estados Unidos). La fase móvil era una mezcla 80/20 de agua y acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1%. El caudal fue de 1,0 ml/minuto y la longitud de onda UV utilizada fue de 275 nm. La concentración del fármaco se determinó comparando el área bajo el pico del fármaco con la derivada de una curva patrón. Cada muestra se analizó al menos dos veces, y se calculó el promedio de fármaco total liberado.

La figura 10 muestra los perfiles de liberación de clorhidrato de tetraciclina a partir de las microesferas con tres intervalos de tamaño diferentes. El dimensionamiento se llevó a cabo mediante un procedimiento de sedimentación diferencial. Se observó una liberación brusca inicial en las tres preparaciones. No obstante, hubo una influencia significativa del tamaño de partícula en el efecto de liberación brusca. El flujo de fármaco inicial desde las microesferas disminuyó a medida que aumentaba el tamaño de partícula, lo que indica que la fase de liberación brusca inicial dependía principalmente del área superficial de las microesferas.

35 EJEMPLO 14

Liberación de cefazolina desde tapones de polímero de albúmina fabricados con reticulante PEG de 4 brazos

Se preformaron dos tapones de polímero a partir de 0,5 ml de solución de albúmina al 30% (procedimiento B) y 0,5 ml de 110 mg/ml de reticulante éster N-hidroxisuccinimidílico de 4 brazos de succinato de poli(etilenglicol) (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL). Se disolvieron aproximadamente 10 mg de cefazolina sódica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en la albúmina antes de añadir el reticulante para formar los tapones cilíndricos. Cada tapón formado se dispuso en un vial separado y se añadieron 8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 en el tiempo de muestreo (t_0). Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y se agitaron continuamente. En cada tiempo de muestreo se retiró todo el contenido del vial y se reemplazó por ocho ml de PBS nuevo. Las muestras se tomaron a 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas, y aproximadamente cada 24 horas después hasta las 144 horas. Los datos de la figura 11 muestran que aproximadamente el 67% de la cefazolina se liberó a lo largo del periodo de tiempo de las primeras 5 horas y el 95,6% del total de la cefazolina se liberó a lo largo de 144 horas.

La cefazolina se analizó mediante cromatografía líquida de alta presión, siguiendo el procedimiento de Liang et al., *J. Chromatog. B.*, 656, 45-465 (1994). La columna era una columna Waters C-18 (3,9 x 300 mm) comercializada con la denominación comercial MICROBONDAPAK y la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La fase móvil consistió en tampón de fosfato de sodio 0,02 M (pH = 5,0 y metanol (77:23). La longitud de onda utilizada para la detección fue de 270 nm y el caudal de la columna fue de 1,0 ml/min.

EJEMPLO 15

Liberación de TGF- β 1 desde perlas de albúmina preformadas biodegradables

Las perlas se prepararon según el procedimiento descrito en el ejemplo 6 con las siguientes variaciones: dos perlas se prepararon exactamente tal como se describe en el ejemplo 6 y se usaron en su forma hidratada (perlas NS1 y NS2); dos perlas se prepararon exactamente tal como se describe en el ejemplo 6, se deshidrataron y se rehidrataron en agua (perlas NS3 y NS4); dos perlas se prepararon con la adición de 20 μ l de factor de crecimiento recombinate humano β 1 (TGF- β 1, Gibco BRL, Rockville, MD) a 3,75 μ g/ml a la parte B del ejemplo 6 para obtener una concentración final de 25 ng de TGF- β 1 por perla y se utilizaron en su forma hidratada (perlas NS5

y NS6); dos perlas se prepararon exactamente tal como se describe en el ejemplo 6, se deshidrataron y se rehidrataron durante 4 horas en 2 ml de una solución de TGF- β 1 a 50 ng/ml (ya que se observó una absorción del 25% en 4 horas, se incorporaron 25 ng de 100 ng en cada perla NS7 y NS8); dos perlas se prepararon con la parte A del ejemplo 6, que consiste en una solución de albúmina al 23% estéril (procedimiento B) en un tampón de carbonato isotónico (0,075 M) (pH 8,66) y la parte B que consiste en una solución de 65 mg/ml de PEG(SS)₂ (véase el ejemplo 1) reconstituida en agua estéril justo antes de su uso (perlas FS1 y FS2); dos perlas se prepararon con la parte A del ejemplo 6 que consiste en una solución estéril de albúmina al 23% en tampón de carbonato isotónico (0,075 M) (pH 8,66) y la parte B que consiste en una solución a 65 mg/ml de PEG-(SS)₂ (véase el ejemplo 1) reconstituida en agua estéril a la que se añadieron 20 μ l de TGF- β 1 humano recombinante a 3,75 μ g/ml (perlas FS3 y FS4).

Todas las perlas se dispusieron en 4 ml de medio de cultivo celular mínimo esencial de Eagle modificado (American Type Culture Collection, Manassas, VA) que contenía el 10% de suero de bovino fetal (American Type Culture Collection, Manassas, VA) y penicilina/estreptomicina a 100 U/ml (Gibco BRL, Rockville, MD) en pocillos individuales de una placa Petri de 12 pocillos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). La placa se dispuso en una incubadora de cultivo celular (37 °C, 5% de CO₂) durante la duración del experimento. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo (comenzando con t = 0), reemplazando el volumen total del medio de cultivo en cada punto temporal, hasta la degradación completa de las perlas. El medio en cada punto temporal se recogió en un criovial y se almacenó a -20 °C. Los puntos temporales fueron de 0, 24 horas, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, 240 h, 264 h, 289 h, y 330 h para las perlas NS y de 0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h para perlas FS.

Todas las muestras de medio de cultivo se analizaron con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para determinar la concentración de TGF- β 1 (QUANTIKINE para TGF- β 1 humano, R&D Systems, Minneapolis, MN) según las instrucciones del fabricante. Las muestras no requirieron activación ya que el TGF- β 1 medido era activo a partir de una fuente comercial y no fue generado por las células del cultivo. Se generó una curva de dosis-respuesta adicional con la misma fuente de TGF- β 1 utilizada en la fabricación de las perlas y los resultados se calcularon según esta última curva de dosis-respuesta.

Los resultados de la figura 12 muestran que la incorporación del factor de crecimiento en una solución utilizada para la rehidratación de perlas (NS7, NS8) produce una liberación de hasta el 40% del factor de crecimiento incorporado en 2-6 días. La incorporación de TGF- β 1 con el reticulante (NS5, NS6, FS3, FS4) no produce la liberación de cantidades significativas de TGF desde las perlas. Las perlas de control (NS1, NS2, NS3, NS4, FS1, FS2, sin TGF- β 1) se analizaron y no interfirieron con el ensayo.

Los expertos en la materia entenderán fácilmente que la descripción anterior se ha realizado solo con fines ilustrativos y que se pueden contemplar diversas formas de realización sin apartarse del ámbito de la invención.

A continuación, se resumen algunas formas de realización de la presente divulgación, que no forman parte de la invención:

1. Un objeto preformado para la administración de un agente activo a un sujeto, siendo el objeto preformado albúmina reticulada al menos parcialmente desolvatada que tiene un agente de reticulación de la fórmula:



en la que:

X es una porción de cadena de polioxi-etileno difuncional o un enlace;

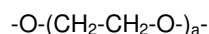
LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas -C(O)-, -(CH₂)_bC(O)- en la que b es un número entero de 1 a 5, -C(O)-(CH₂)_c-C(O)- en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, -C(O)-O-(CH₂)_d-O-C(O)- en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas -R-C(O)-, -R-C(O)-(CH₂)_c-C(O)- o -R-C(O)-O-(CH₂)_d-O-C(O)- en la que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxifalimidilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo; y

n es un número entero de 2 a 10;

con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxi-etileno difuncional, -X-I-X- es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



en la que a es un número entero de 20 a 300.

- 5 2. El objeto preformado del punto 1, en el que la proteína reticulada comprende albúmina sérica reticulada.
3. El objeto preformado del punto 2, en el que la albúmina sérica reticulada comprende albúmina sérica humana reticulada.
- 10 4. El objeto preformado del punto 1, en el que G es N-oxisuccinimidilo.
5. El objeto preformado del punto 1 que comprende además un agente activo incorporado en el mismo.
- 15 6. El objeto preformado del punto 1, en el que el agente activo se selecciona de entre: un agente antibacteriano, un factor de crecimiento, un agente anticanceroso, un anestésico local, un antiséptico, una hormona, un agente antivírico, un antagonista narcótico, un modificador de la respuesta inmunitaria, un fármaco ocular, una vacuna, precursores metabólicos de los mismos y mezclas de los mismos.
- 20 7. El objeto preformado del punto 1 dispersado en una matriz polimérica biodegradable secundaria.
8. El objeto preformado del punto 1 que tiene la forma de una lámina, una bola, una perla, una esfera, un tapón, una fibra, una cinta o una cuña.
- 25 9. El objeto preformado del punto 1 que tiene la forma de una perla que tiene un diámetro superior a aproximadamente 1 milímetro.
10. El objeto preformado del punto 1 que tiene la forma de una microesfera que tiene un diámetro de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1000 micrómetros.
- 30 11. Un objeto preformado para la administración de un agente activo a un sujeto que comprende un agente activo dispersado dentro de una proteína reticulada que tiene un agente de reticulación de la fórmula:



35 en la que:

X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional o un enlace;

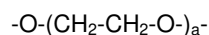
40 LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas $-\text{C}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_b\text{C}(\text{O})-$ en la que b es un número entero de 1 a 5, $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_c-\text{C}(\text{O})-$ en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_d-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas $-\text{R}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{R}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_c-\text{C}(\text{O})-$ o $-\text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_d-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ en la que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

45 G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxifalimidilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

50 I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo; y

n es un número entero de 2 a 10;

55 con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, $-\text{X-I-X}-$ es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



en la que a es un número entero de 20 a 300.

- 60 12. El objeto preformado del punto 11, en el que la proteína reticulada comprende albúmina sérica reticulada.
13. El objeto preformado del punto 12, en el que la albúmina sérica reticulada comprende albúmina sérica humana reticulada.
- 65 14. El objeto preformado del punto 11, en el que G es N-oxisuccinimidilo.

15. El objeto preformado del punto 11 que está al menos parcialmente deshidratado.

16. El objeto preformado del artículo 11, en el que el agente activo se selecciona de entre: un agente antibacteriano, un factor de crecimiento, un agente anticanceroso, un anestésico local, un antiséptico, una hormona, un agente antivírico, un antagonista narcótico, un modificador de la respuesta inmunitaria, un fármaco ocular, una vacuna, precursores metabólicos de los mismos y mezclas de los mismos.

17. El objeto preformado del punto 11 dispersado en una matriz polimérica biodegradable secundaria.

18. El objeto preformado del punto 11 que tiene forma de lámina, una bola, una perla, una esfera, un tapón, una fibra, una cinta o una cuña.

19. El objeto preformado del punto 11, que tiene la forma de una perla que tiene un diámetro superior a aproximadamente 1 milímetro.

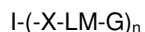
20. El objeto preformado del punto 11 que tiene la forma de una microesfera que tiene un diámetro de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1000 micrómetros.

21. El objeto preformado del punto 11, que es un objeto con forma esférica que está al menos parcialmente deshidratado.

22. Un procedimiento para formar un objeto preformado para la administración de un agente, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar una primera mezcla acuosa que comprende una proteína;

proporcionar una segunda mezcla acuosa que comprende un agente de reticulación de la fórmula:



en la que:

X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional o un enlace;

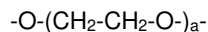
LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas $-C(O)-$, $-(CH_2)_bC(O)-$ en la que b es un número entero de 1 a 5, $-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, $-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas $-R-C(O)-$, $-R-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ o $-R-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxiftalimidilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo; y

n es un número entero de 2 a 10;

con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, $-X-I-X-$ es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



en la que a es un número entero de 20 a 300;

combinar la primera y segunda mezclas acuosas y formar un artículo; y

exponer el artículo a condiciones eficaces para reticular la proteína con el agente de reticulación.

23. Un procedimiento para la administración de un agente activo a un sujeto, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un sujeto con el objeto preformado del punto 5.

24. El procedimiento del punto 23 en el que la puesta en contacto comprende el implante del objeto preformado en el sujeto.

25. El procedimiento del punto 23 en el que la puesta en contacto comprende introducir una pluralidad de objetos

preformados en un hueco tisular dentro del sujeto.

26. Un procedimiento para administrar un agente activo a un sujeto, comprendiendo el procedimiento poner un contacto un sujeto con el objeto preformado del punto 11.

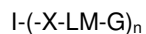
5 27. El procedimiento del punto 26, en el que la puesta en contacto comprende el implante del objeto preformado en el sujeto.

10 28. El procedimiento del punto 26, en el que la puesta en contacto comprende introducir una pluralidad de objetos preformados en un hueco tisular dentro del sujeto.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un sistema de administración para la administración de un agente activo a un sujeto, que comprende las etapas de

proporcionar un objeto preformado que es una proteína reticulada sustancialmente completamente desolvatada que tiene un agente de reticulación de la fórmula:



en la que:

X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional;

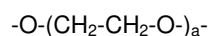
LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas $-C(O)-$, $-(CH_2)_bC(O)-$ en la que b es un número entero de 1 a 5, $-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, $-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas $-R-C(O)-$, $-R-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ o $-R-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en las que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxiftalimidilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo; y

n es un número entero de 2 a 10;

con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, $-X-I-X-$ es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



en la que a es un número entero de 20 a 300; y

resolvatar el objeto preformado con un líquido que es o que incluye el agente activo.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el objeto preformado se encuentra en forma de una microestructura seleccionada de entre microesferas, microcápsulas, micropartículas y nanopartículas, o una macroestructura seleccionada de entre perlas u otros objetos en forma esférica, cilindros, discos, fibras, láminas, tapones, cintas y cuñas.

3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína reticulada comprende albúmina sérica reticulada.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la albúmina sérica reticulada comprende albúmina sérica humana reticulada.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que G es N-oxisuccinimidilo.

6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente activo se selecciona de entre: un agente antibacteriano, un factor de crecimiento, un agente anticanceroso, un anestésico local, un antiséptico, una hormona, un agente antivírico, un antagonista narcótico, un modificador de respuesta inmunitaria, un fármaco ocular, una vacuna, precursores metabólicos de los mismos y mezclas de los mismos.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el objeto preformado está dispersado en una matriz polimérica biodegradable secundaria.

8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el objeto preformado se encuentra en forma de una perla que tiene un diámetro superior a 1 milímetro.

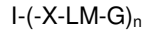
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el objeto preformado se encuentra en forma de una microesfera que tiene un diámetro de 1 micrómetro a 1000 micrómetros.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el objeto preformado se forma mediante el procedimiento que comprende:

proporcionar una primera mezcla acuosa que comprende una proteína;

proporcionar una segunda mezcla acuosa que comprende un agente de reticulación de la fórmula:

5



en la que:

10

X es una porción de cadena de polioxietileno difuncional,

LM es un resto de enlace difuncional representado por las fórmulas $-C(O)-$, $-(CH_2)_bC(O)-$ en la que b es un número entero de 1 a 5, $-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ en la que c es un número entero de 2 a 10 y en la que la porción alifática del radical puede estar saturada o insaturada, $-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en la que d es un número entero de 2 a 10, o un dirradical oligomérico representado por las fórmulas $-R-C(O)-$, $-R-C(O)-(CH_2)_c-C(O)-$ o $-R-C(O)-O-(CH_2)_d-O-C(O)-$ en las que c es un número entero de 2 a 10, d es un número entero de 2 a 10 y R es un polímero o copolímero que tiene 1 a 10 fragmentos monoméricos de lactida, glicólida, carbonato de trimetileno, caprolactona o p-dioxanona;

15

G es un grupo saliente seleccionado del grupo de N-oxisuccinimidilo, N-oximaleimidilo, N-oxifitalimidilo, N-oxiimidazolilo y tresilo;

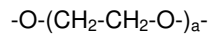
20

I es un resto de enlace multifuncional derivado de un compuesto multinucleófilo, y

n es un número entero de 2 a 10,

25

con la condición de que cuando X sea una porción de cadena de polioxietileno difuncional, $-X-I-X-$ es PEG, que es un fragmento dirradical representado por la fórmula:



30

en la que a es un número entero de 20 a 300;

combinar la primera y segunda mezclas acuosas y formar un artículo; y

35

exponer el artículo a condiciones eficaces para reticular la proteína con el agente de reticulación para formar el objeto preformado.

Fig. 1

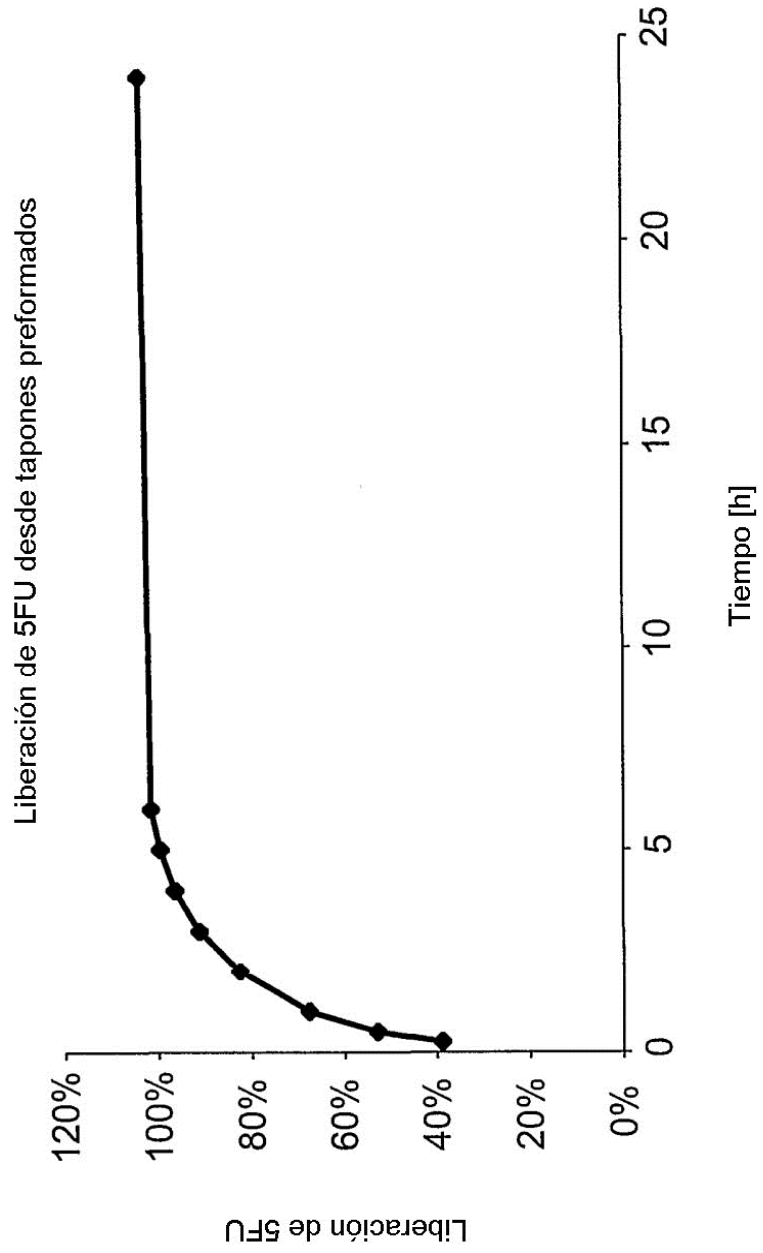


Fig. 2

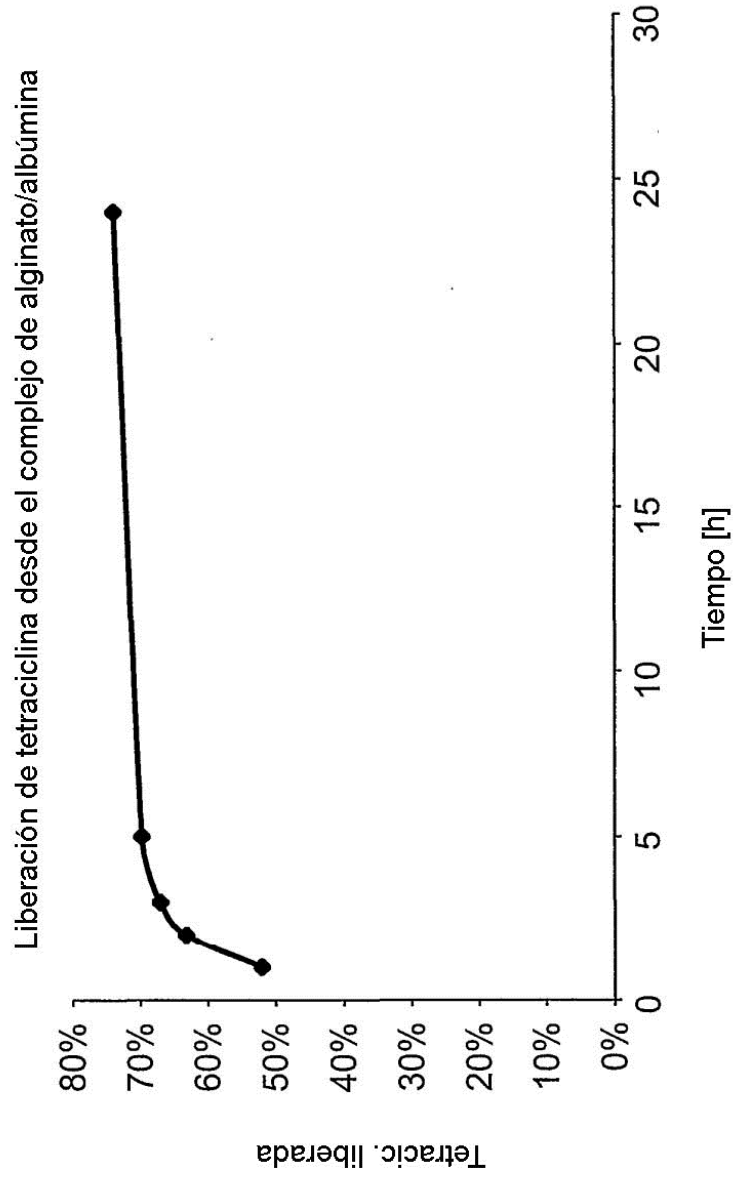


Fig. 3

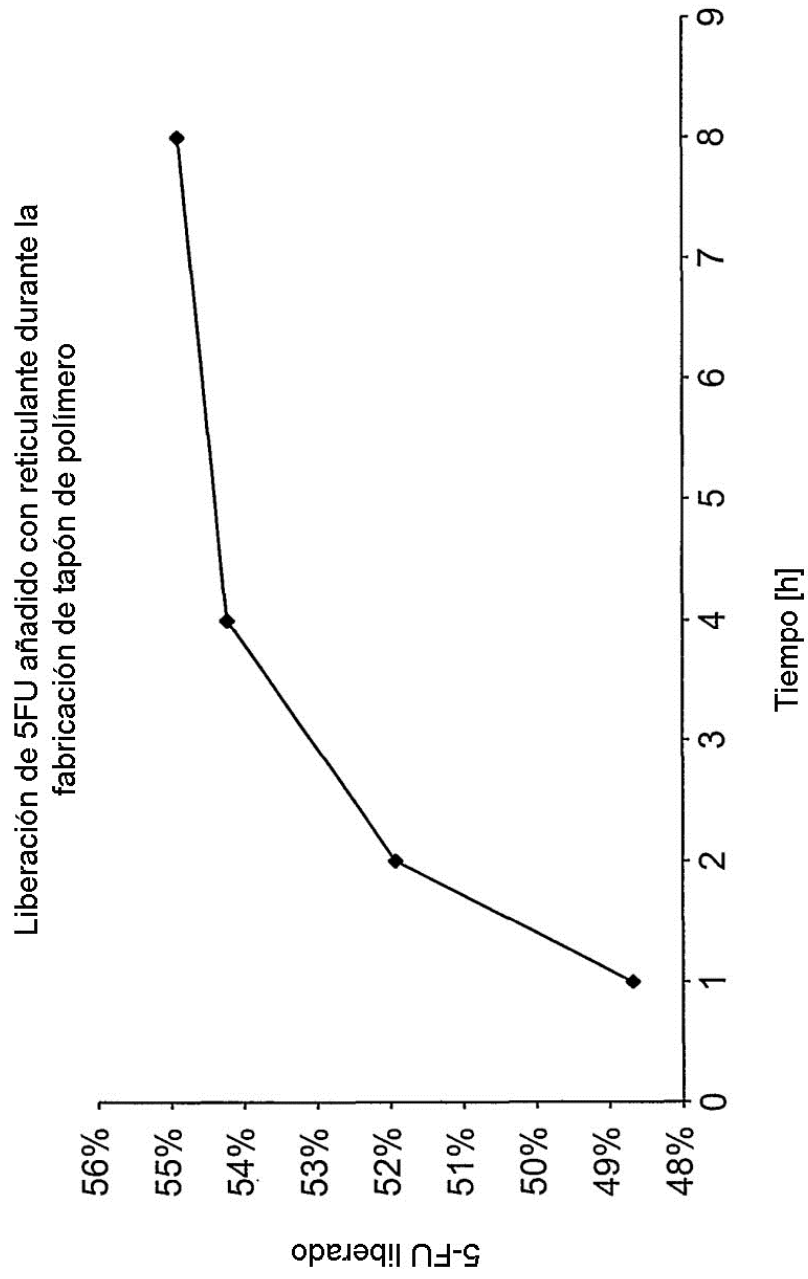
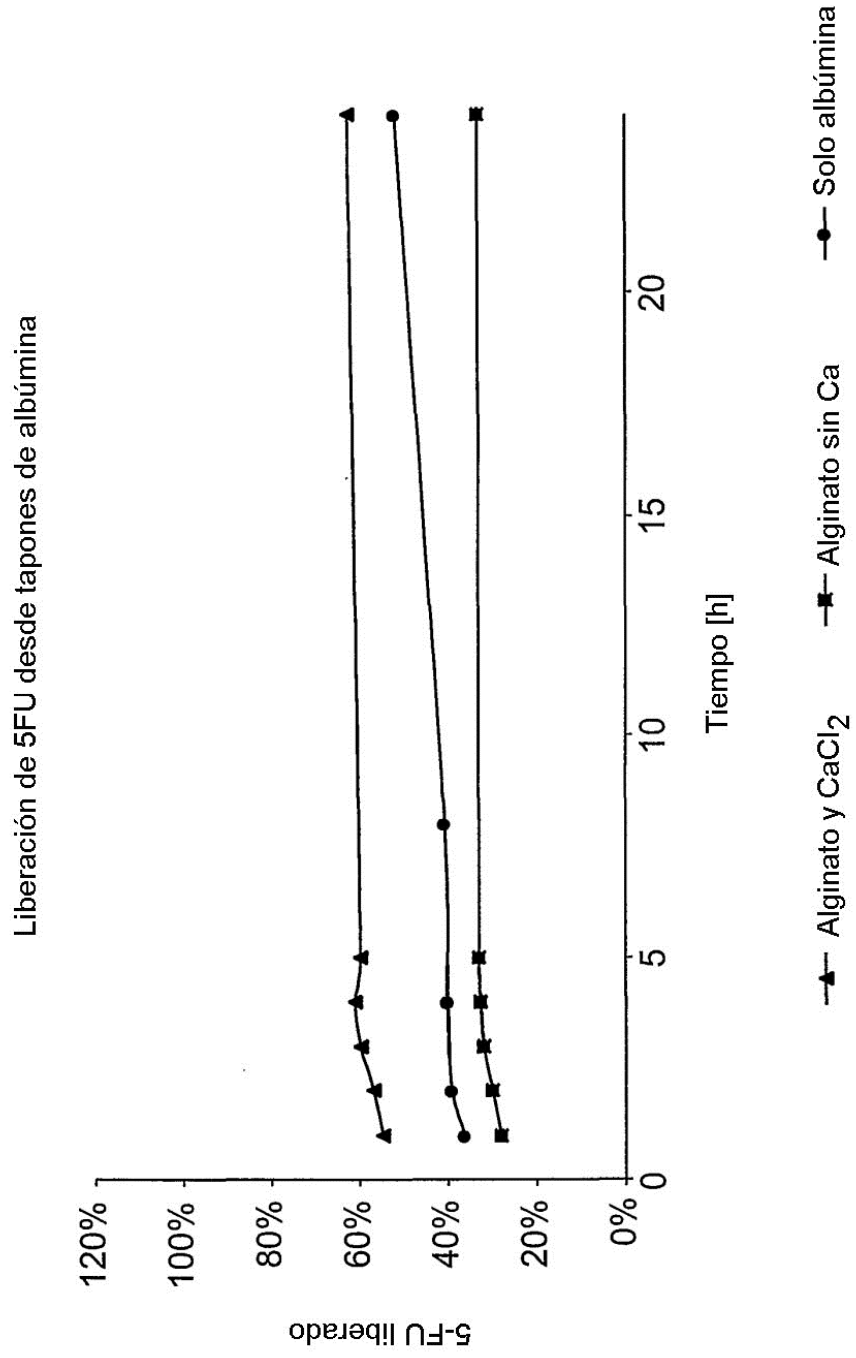


Fig. 4



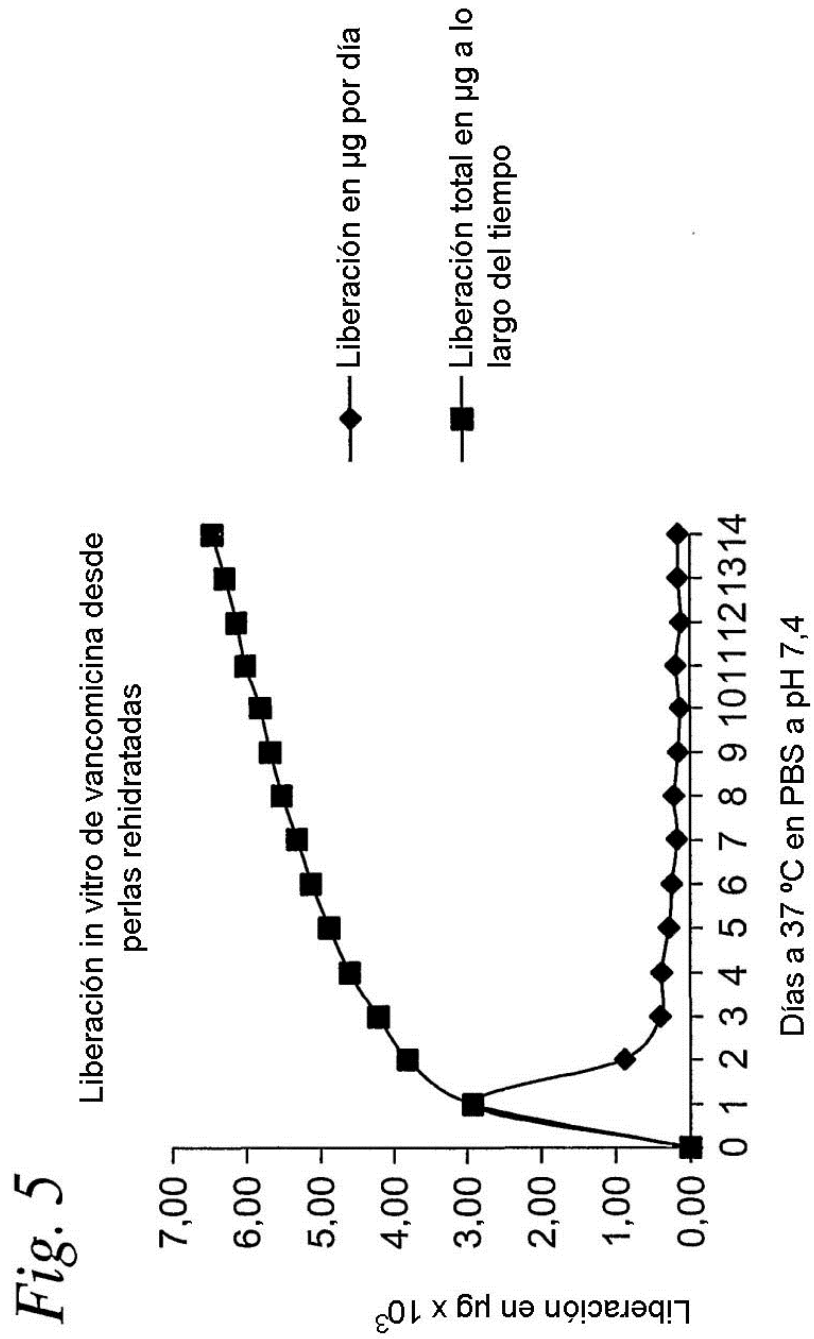


Fig. 6

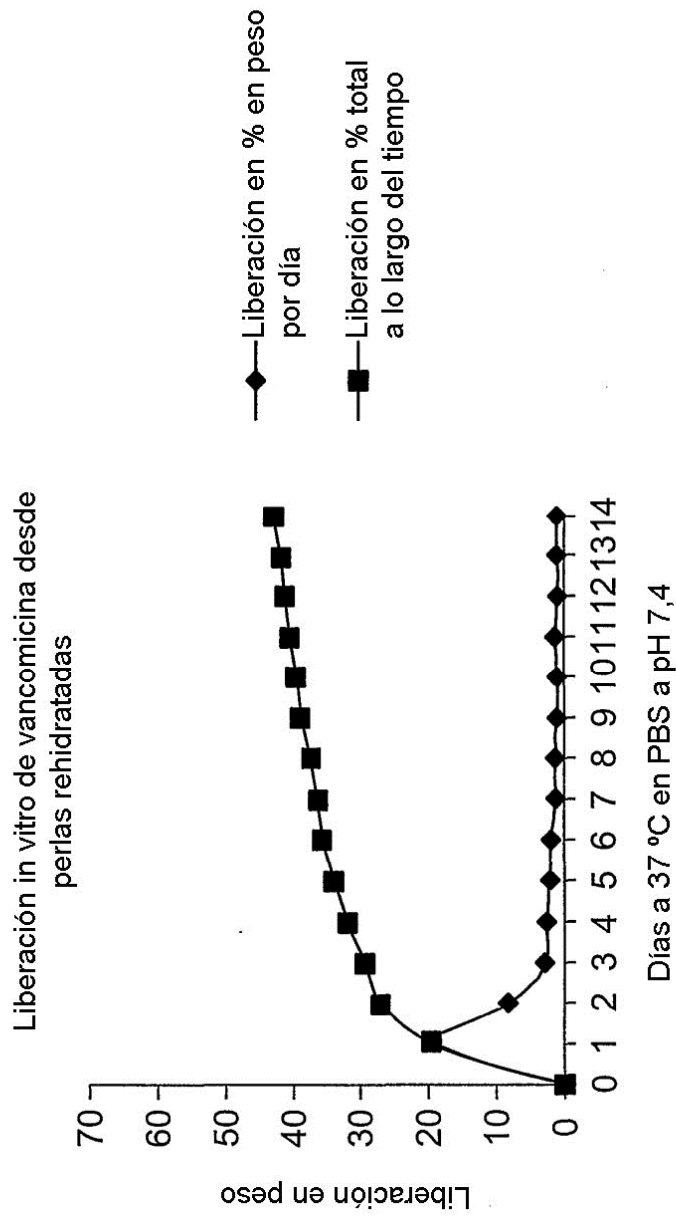


Fig. 7

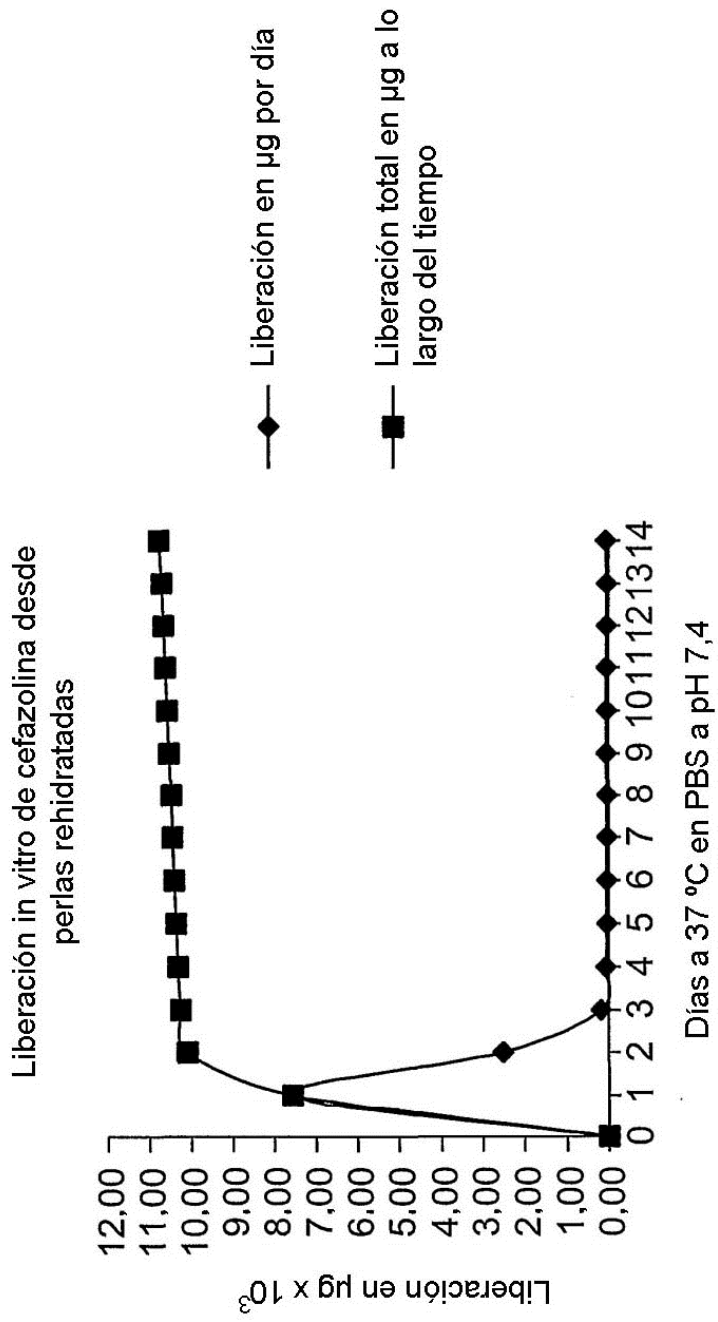


Fig. 8

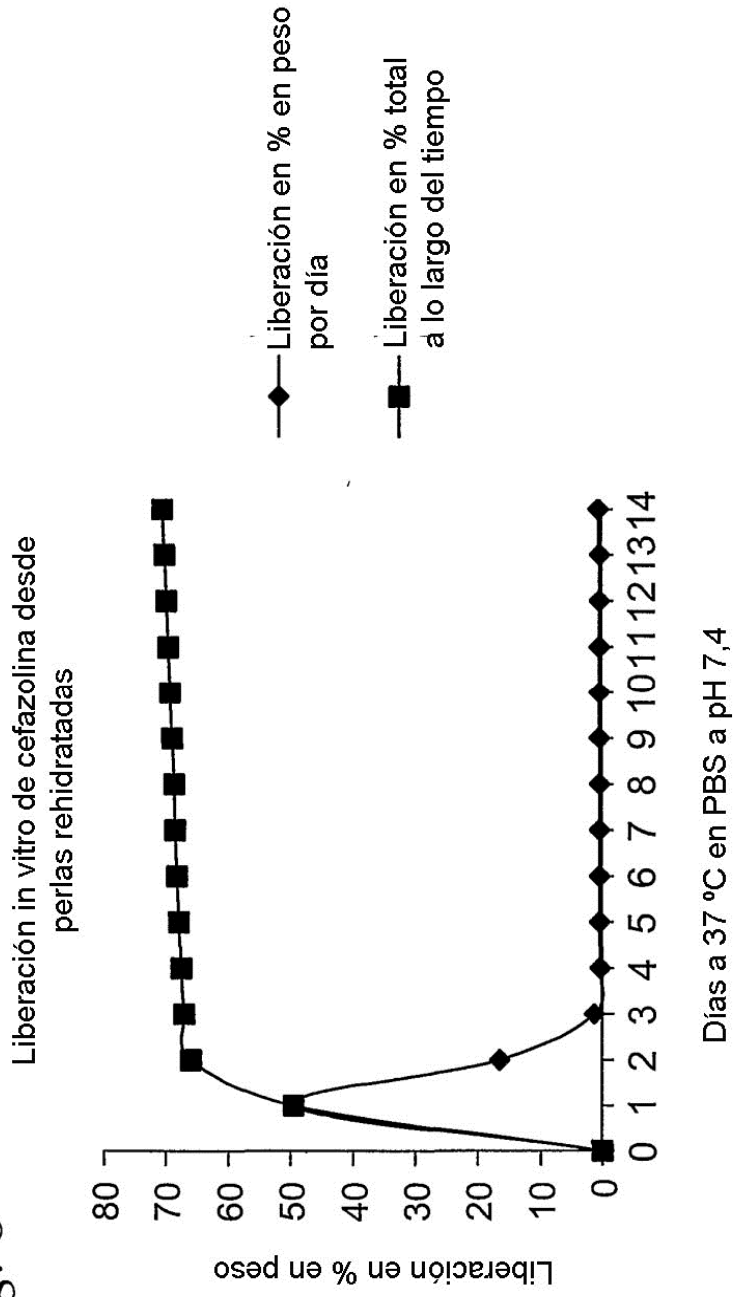


Fig. 9

Porcentaje de aumento de volumen de las perlas frente al porcentaje en peso de absorción de agua (experimento de una única perla) -

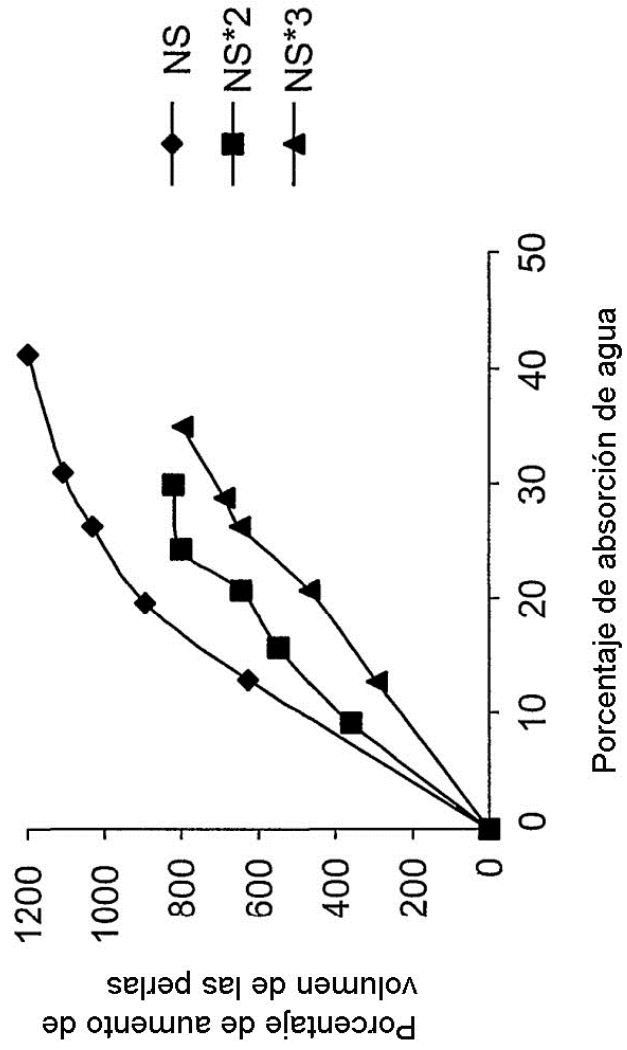


Fig. 10

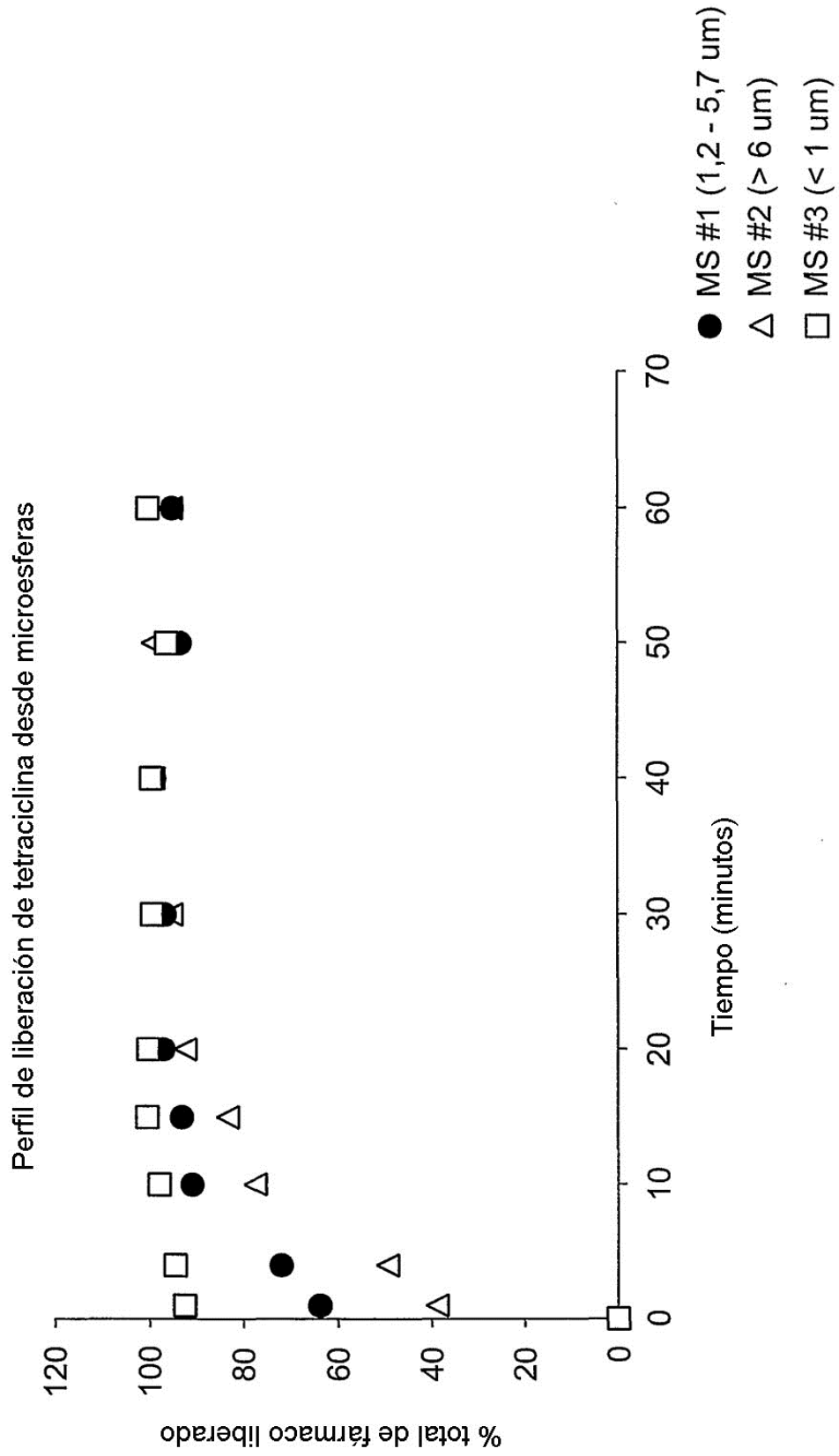


Fig. 11

Liberación de cefazolina desde tapones de polímero de albúmina fabricados con reticulante de PEG de 4 brazos

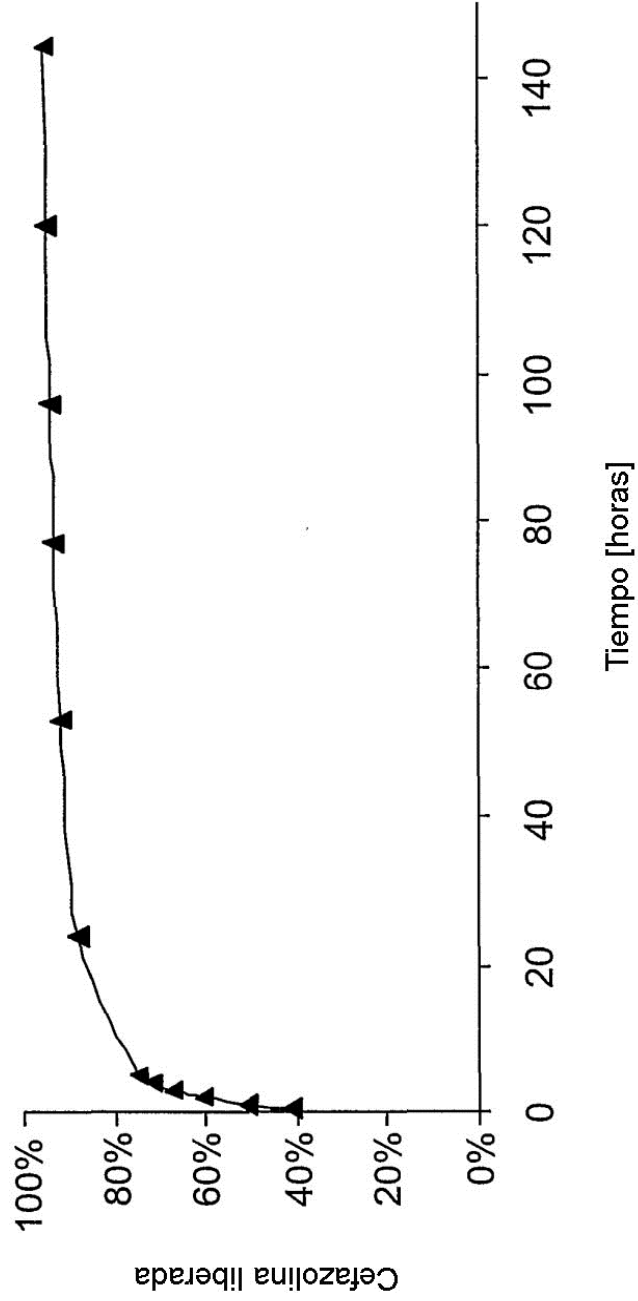


Fig. 12

