



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 314 187**

⑤1 Int. Cl.:
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **03711151 .5**
⑨6 Fecha de presentación : **21.02.2003**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1476204**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

⑤4 Título: **Matrices de hidrogel bioactivas inmovilizadas como recubrimientos de superficie.**

③0 Prioridad: **21.02.2002 US 358625 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

⑦3 Titular/es: **Encelle, Inc.**
1800 N. Greene Street
Greenville, North Carolina 27834, US

⑦2 Inventor/es: **Lamberti, Francis, V.;**
Klann, Richard, Chris y
Hill, Ronald, Stewart

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Matrices de hidrogel bioactivas inmovilizadas como recubrimientos de superficie.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a matrices de hidrogel bioactivas reticuladas que son adecuadas para uso como recubrimientos bioactivos inmovilizados para mejorar la integración y el rendimiento de dispositivos médicos.

10 **Antecedentes de la invención**

El reemplazo de tejidos u órganos dañados o enfermos por implantación ha sido, y sigue siendo, un antiguo objetivo de la medicina hacia el que se han realizado enormes progresos. Además, se han hecho también muchos progresos en el campo del tratamiento de pacientes con afecciones médicas a través de la implantación de dispositivos médicos terapéuticos, tales como sensores de glucosa y marcapasos. Sin embargo, uno de los problemas más serios de los dispositivos médicos terapéuticos es la respuesta de curación de heridas provocada por los materiales extraños implantados (Ratner, B.D., "Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems" Journal of Controlled Release 78:211-218 (2002)).

Se define a la biocompatibilidad como la respuesta adecuada del huésped a un material extraño usado para su aplicación proyectada. Biocompatibilidad se refiere también a la interacción entre el material extraño y los tejidos y sistemas fisiológicos del paciente tratado con el material extraño. Se ha invocado a la unión de proteínas y posterior desnaturalización así como a la adhesión y activación celular como determinantes de la biocompatibilidad de un material. Biocompatibilidad también implica que el implante elude los efectos perjudiciales de los diversos sistemas protectores del huésped y permanece funcional durante un período de tiempo significativo. Con respecto a los dispositivos médicos, la biocompatibilidad está determinada en gran medida por el tipo de reacción aguda provocada por la implantación. El grado en que un dispositivo médico se integra con el tejido circundante depende del tipo de respuesta de curación de heridas provocado por el material implantado. Las pruebas *in vitro* diseñadas para evaluar la citotoxicidad o la unión de proteínas se usan de manera rutinaria para medir la biocompatibilidad potencial de un material. En otras palabras, la biocompatibilidad de un material depende de su capacidad para integrarse completamente con el tejido circundante tras la implantación.

La modulación de esta respuesta tisular a un dispositivo médico implantado que comprende un material extraño es fundamental para la implantación exitosa y el rendimiento de tal dispositivo médico. Los sistemas de mamíferos reconocen los materiales extraños, tales como objetos o dispositivos médicos implantados por medio de cirugía. Tras unirse a sitios en estos materiales extraños, tiene lugar una cascada de acontecimientos que dan información a las células inflamatorias para que rodeen tales materiales e inicien una serie de acontecimientos de curación de la herida que en último término llevan a la formación de una cápsula fibrosa avascular que rodea el dispositivo implantado. La formación de una cápsula fibrosa avascular puede limitar gravemente la vida y la utilidad del dispositivo médico implantado, especialmente en situaciones donde el contacto directo con un tejido específico, tal como el tejido vascular, tejido muscular o tejido nervioso es vital para la eficacia del dispositivo.

La investigación anterior ha mostrado que las interacciones específicas entre las células y su matriz extracelular circundante desempeñan un papel importante en la promoción y regulación de los procesos de reparación y reemplazo celular (Hynes, S.O., "Integrins: a family of cell surface receptors" Cell 48:549-554 (1987)). Por consiguiente, ha habido un mayor interés en el trabajo relacionado con polímeros biocompatibles útiles en aplicaciones terapéuticas. Una clase particular de polímeros que han probado ser útiles para tales aplicaciones; incluidos los materiales de las lentillas de contacto, los tendones artificiales, las matrices para fabricación de tejidos y los sistemas de administración de fármacos, son los hidrogeles (Wheeler JC, Woods JA, Cox MJ, Cantrell RW, Watkins FH, Edlich RF.; Evolution of hydrogel polymers as contact lenses, surface coatings, dressings, and drug delivery systems.; J Long Term Eff Med Implants. 1996; 6(3-4):207-17 y Schacht, E., "Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde" Reactive & Functional Polymers 33:109-116 (1997)). Se acepta comúnmente que los hidrogeles son materiales constituidos por una red tridimensional, permanente de polímeros hidrófilos con agua que rellena el espacio entre las cadenas de polímeros, y pueden obtenerse por medio de la copolimerización de monómeros hidrófilos adecuados, por extensión de cadena, y por reticulación de prepolímeros o polímeros hidrófilos.

Los trabajos anteriores han mostrado que una matriz de hidrogel termorreversible, que es líquida a temperaturas cercanas a las temperaturas fisiológicas, provoca la vasculogénesis y modula la curación de heridas en las úlceras dérmicas (Usala AL, Dudek R, Lacy S, Olson J, Penland S, Sutton J, Ziats NP, Hill RS: Induction of fetal-like wound repair mechanisms *in vivo* with a novel matrix scaffolding. Diabetes 50 (Suplemento 2): A488 (2001); y Usala AL, Klann R, Bradfield J, Ray S, Hill RS, De La Sierra D, Usala M, Metzger M, Olson G: Rapid Induction of vasculogenesis and wound healing using a novel injectable connective tissue matrix. Diabetes 49 (Suplemento 1): A395 (2000)). También se ha mostrado que este material bioactivo de hidrogel mejora la curación en respuesta a materiales extraños implantados, demostrando una disminución en el espesor de la cápsula fibrosa circundante y un aumento persistente en el suministro de sangre inmediatamente adyacente a los materiales implantados expuestos a este hidrogel termorreversible (Ravin AG, Olbrich KC, Levin LS, Usala AL, Klitzman B.; Long- and short-term effects of biological hydrogels on capsule microvascular density around implants in rats. J. Biomed Mater Res. 1 de mayo de 2001; 58(3):313-318). Sin embargo, el uso de tal hidrogel bioactivo termorreversible como un biomaterial de recubrimiento para un dispo-

sitivo médico no es práctico para dispositivos que requieren estabilidad tridimensional o térmica. Por consiguiente, ha una necesidad de un material bioactivo que sea estable a las temperaturas corporales y por consiguiente sea adecuado para uso como un recubrimiento para uso con dispositivos médicos, en particular aquellos proyectados para su implantación en mamíferos.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un dispositivo médico recubierto, que comprende un dispositivo médico que tiene una superficie; y una capa de matriz de hidrogel bioactiva que recubre dicha superficie de dicho dispositivo médico y que está inmovilizada en la misma, comprendiendo dicha matriz un componente poliglicano y un componente polipéptido, en el que al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido está unido covalentemente a dicha superficie de dicho dispositivo médico o atrapado dentro de dicha superficie de dicho dispositivo médico, en el que la unión covalente se produce por reacción de un grupo reactivo llevado por al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido con un grupo reactivo llevado por dicha superficie de dicho dispositivo médico, y en el que el atrapamiento se produce por deshinchamiento de una superficie de polímero hinchado de dicho dispositivo médico a través del intercambio de la fase líquida con un líquido que comprende al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido.

El recubrimiento de matriz de hidrogel puede además comprender uno o más agentes potenciadores seleccionados del grupo constituido por aminoácidos polares, análogos de aminoácidos, derivados de aminoácidos, colágeno intacto y quelantes de cationes divalentes.

Las composiciones bioactivas de hidrogel son útiles como una capa que sirve como un componente estructural de un dispositivo médico y como un recubrimiento bioactivo de hidrogel que modula la respuesta de curación de heridas frente a un dispositivo implantado y mejora la integración tisular de un dispositivo médico. Como componente estructural de un dispositivo médico, los biomateriales recubiertos con hidrogel bioactivo pueden diseñarse como un andamiaje de relleno de espacios usado para dirigir la organización tisular y la vascularización de un dispositivo médico. Un ejemplo de uso sería como un dispositivo compuesto de curación de heridas que comprende una barrera microbiana polimérica y un hidrogel bioactivo inmovilizado de espesor suficiente para proporcionar una estructura tridimensional para rellenar vacíos anatómicos tales como los resultantes de la recogida de tejidos del sitio del donante. Como un recubrimiento funcional de un dispositivo médico, se espera que los recubrimientos bioactivos de hidrogel reduzcan la cápsula avascular que rodea un dispositivo implantado y mejore el contacto íntimo entre los tejidos circundantes y los elementos activos del dispositivo y por consiguiente el rendimiento de los dispositivos tales como los sensores de glucosa implantados para el control de ciclo cerrado de la diabetes. Las composiciones son también útiles como recubrimientos bioactivos de hidrogel para órganos artificiales que contienen células tisulares funcionales, y otros dispositivos médicos o implantes activos o pasivos y otros biosensores.

También se proporciona un procedimiento para preparar un sustrato recubierto, tal como un dispositivo médico recubierto. Este procedimiento comprende inmovilizar un primer componente de alto peso molecular en una superficie del sustrato, en el que el primer componente de alto peso molecular se selecciona del grupo constituido por poliglicanos y polipéptidos. El primer componente de alto peso molecular se pone en contacto con un segundo componente de alto peso molecular también seleccionado del grupo constituido por poliglicanos y polipéptidos. La etapa de contacto se produce antes, durante o después de la etapa de inmovilización. Los dos componentes de alto peso molecular forman un recubrimiento de hidrogel bioactivo inmovilizado en la superficie del sustrato. De preferencia, uno de los componentes de alto peso molecular es un poliglicano, tal como dextrano, y el otro es un polipéptido, tal como gelatina.

En una forma de realización de preferencia, la etapa de inmovilización comprende unir de manera covalente al menos uno de los componentes de alto peso molecular a la superficie del sustrato. Uno o más de los componentes de alto peso molecular y/o la superficie pueden modificarse químicamente, tal como por oxidación o aminación, para formar sitios reactivos en los mismos capaces de participar en enlaces covalentes. Los componentes de alto peso molecular pueden modificarse para comprender una pluralidad de grupos reactivos pendientes a lo largo de la estructura central de la molécula o un único grupo reactivo localizado en cada extremo terminal de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito de este modo la invención en términos generales, a continuación se hará referencia a los dibujos acompañantes, que no están necesariamente dibujados a escala, y en los que:

La Figura 1 ilustra la formación de cadenas alfa abiertas derivadas de monómeros de colágeno;

La Figura 2A ilustra el efecto de la asociación de las cadenas alfa con dextrano;

La Figura 2B ilustra el comportamiento de las cadenas alfa sin asociación con el dextrano;

La Figura 3 ilustra el efecto de otros aditivos de la matriz de hidrogel;

La Figura 4A ilustra un poliglicano inmovilizado a una superficie de un dispositivo médico;

La Figura 4B ilustra un poliglicano inmovilizado a una superficie de un dispositivo médico y un polipéptido asociado con el poliglicano para formar un hidrogel;

La Figura 5 ilustra gráficamente el efecto de una matriz de hidrogel para promover la agregación celular;

La Figura 6 ilustra gráficamente el efecto de una matriz de hidrogel a través de la inducción de del factor de crecimiento transformante beta 3;

La Figura 7 ilustra un poliglicano inmovilizado a una superficie de un dispositivo médico a través de un grupo terminal y un polipéptido asociado con el poliglicano para formar un hidrogel;

La Figura 8 ilustra un procedimiento para formar una matriz de hidrogel bioactiva inmovilizada de la presente invención; y

La Figura 9 ilustra una matriz de hidrogel covalentemente reticulada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora más completamente con referencia a partir de aquí a los dibujos acompañantes, en los que se muestran las formas de realización de preferencia de la invención. Esta invención puede, sin embargo, realizarse en muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las formas de realización que se presentan en este documento; más bien, estas formas de realización se proporcionan para que esta descripción sea completa y exhaustiva, y transmita totalmente el ámbito de la invención a los expertos en la técnica. Los mismos números se refieren a los mismos elementos a lo largo de toda la memoria descriptiva.

La formulación de una matriz de hidrogel termorreversible que proporciona un medio de cultivo celular y una composición para preservar la viabilidad celular se enseña por medio de la Patente de EEUU N° 6.231.881, incorporada en este documento en su totalidad por referencia. Además, se proporciona una matriz de hidrogel útil para promover la vascularización en la Patente de EEUU N° 6.261.587, incorporada en este documento en su totalidad por referencia. La matriz de hidrogel termorreversible que se enseña por medio de estas referencias es un gel a temperaturas de almacenamiento y se funde a temperaturas fisiológicas, y comprende una combinación de un componente derivado del colágeno, tal como gelatina, un poliglicano de cadena larga, tal como dextrano, y cantidades eficaces de otros componentes, tales como aminoácidos polares. La matriz de hidrogel termorreversible que se enseña por medio de estas referencias se analiza a continuación con respecto a las Figuras 1-3.

El colágeno es un componente proteico principal de la matriz extracelular de los animales. El colágeno está organizado en una organización fibrilar compleja. Las fibrillas están organizadas en haces que forman las fibras. Las fibrillas están formadas por cinco microfibrillas colocadas en una organización escalonada. Cada microfibrilla es una colección de bastones de colágeno. Cada bastón de colágeno es una triple hélice dextrógira, siendo cada hebra una hélice levógira. Las fibrillas de colágeno están reforzadas por enlaces cruzados covalentes intra e intermoleculares que hacen que los tejidos de los animales maduros sean insolubles en agua fría. Cuando se usan tratamientos adecuados, los bastones de colágeno se extraen y solubilizan manteniendo su conformación como triples hélices. Este es el colágeno desnaturalizado y difiere de la forma nativa del colágeno, pero no se ha sometido a tratamiento térmico o químico suficiente para romper los enlaces intramoleculares covalentes estabilizantes que se encuentran en el colágeno. Cuando se calientan intensamente las disoluciones de colágeno, o cuando se someten tejidos que contienen colágeno nativo a tratamientos químicos o térmicos, se rompen los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes que estabilizan las hélices del colágeno, y las moléculas adoptan una conformación desordenada. Al romper estos enlaces de hidrógeno, los grupos amina y ácido carboxílico polares están disponibles para unirse a grupos polares de otras fuentes o a sí mismos. Este material es la gelatina y es hidrosoluble a 40-45°C.

Como se indicó anteriormente, la gelatina es una forma de colágeno desnaturalizado, y se obtiene por la hidrólisis parcial del colágeno derivado de la piel, tejido conectivo blanco o huesos de animales. La gelatina puede obtenerse de un precursor tratado con ácido o de un precursor tratado con álcali. La gelatina derivada de un precursor tratado con ácido se conoce como Tipo A, y la gelatina derivada de un precursor tratado con álcali se conoce como Tipo B. Los cambios en la estructura macromolecular asociados con la degradación del colágeno son básicamente los mismos para la hidrólisis parcial térmica y para la química. En el caso de la degradación térmica y catalizada por ácido, la escisión hidrolítica predomina dentro de las cadenas individuales de colágeno. En la hidrólisis alcalina, predomina la escisión de entrecruzamientos inter e intramoleculares.

La Figura 1 ilustra la escisión hidrolítica del tropocolágeno 10, que forma cadenas de gelatina alfa polares 15 individuales. El calentamiento del tropocolágeno 10 rompe los enlaces de hidrógeno que contienen fuertemente los monómeros de triple hebra en el colágeno maduro.

Las Figuras 2A-2B ilustran la estabilización del andamiaje de la matriz monomérica por la introducción de un poliglicano de cadena larga, tal como el dextrano 20. Como se representa en la Figura 2A, el dextrano 20 sirve para mantener abierta la gelatina 15, que se ha calentado previamente, al interferir con la predisposición natural de la gelatina 15 para plegarse sobre sí misma y formar enlaces de hidrógeno entre sus grupos polares. En ausencia del dextrano 20, como se muestra en la Figura 2B, cuando la gelatina 15 comience a enfriarse, formará enlaces de

hidrógeno entre los grupos amino y ácido carboxílico dentro de la parte lineal del monómero y se plegará sobre sí misma, limitando de esta manera los sitios disponibles para la unión celular.

La matriz termorreversible contiene un poliglicano, tal como dextrano, en una concentración terapéuticamente eficaz que varía desde, por ejemplo, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mM, de preferencia desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,1 mM. En una forma de realización, el dextrano está presente en una concentración de aproximadamente 0,09 mM.

La matriz termorreversible también contiene gelatina, en una concentración terapéuticamente eficaz que varía desde, por ejemplo, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 40 mM, de preferencia desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 30 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 1 hasta 5 mM. De manera ventajosa, la concentración de gelatina es de aproximadamente 1,6 mM.

Para aumentar la unión celular, debe añadirse colágeno intacto en pequeñas cantidades a la matriz termorreversible para proporcionar una estructura adicional para las células contenidas en la matriz. La concentración final de colágeno intacto es desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 5 mM, de preferencia desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 2 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,5 mM. En una forma de realización, la concentración de colágeno intacto es de aproximadamente 0,11 mM.

La matriz termorreversible puede contener además una cantidad eficaz de aminoácidos polares, que se definen comúnmente para incluir tirosina, cisteína, serina, treonina, asparragina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina. Para la aplicación en la presente invención, los aminoácidos se seleccionan de preferencia del grupo constituido por cisteína, arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y sus mezclas, o sus derivados o análogos. Se entiende por aminoácido a todos los alfa aminoácidos que se presentan en la naturaleza en sus dos formas estereoisoméricas, D y L, y sus análogos y derivados. Un análogo se define como una sustitución de un átomo o grupo funcional en el aminoácido con un átomo o grupo funcional diferente que tiene por lo general características similares. Un derivado se define como un aminoácido que tiene otra molécula o átomo unido a él. Los derivados pueden incluir, por ejemplo, la acetilación de un grupo amino, la aminación de un grupo carboxilo o la oxidación de los residuos azufre de dos moléculas de cisteína para formar la cistina. La concentración total de todos los aminoácidos polares es generalmente de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente de 150 mM, de preferencia desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 65 mM, y de más preferencia desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 40 mM.

Ventajosamente, los aminoácidos polares añadidos comprenden L-cisteína, ácido L-glutámico, L-lisina y L-arginina. La concentración final del ácido L-glutámico es por lo general de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 60 mM, de preferencia desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 mM. En una forma de realización, la concentración de ácido L-glutámico es de aproximadamente 15 mM. La concentración final de L-lisina es generalmente de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 30 mM, de preferencia desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mM. En una forma de realización, la concentración de L-lisina es de aproximadamente 5,0 mM. La concentración final de L-arginina es generalmente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 40 mM, de preferencia desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 30 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 mM. En una forma de realización, la concentración final de arginina es de aproximadamente 10 mM. La concentración final de L-cisteína, que proporciona enlaces disulfuro, es generalmente de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 μ M, de preferencia desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 μ M, de mayor preferencia desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 μ M. En una forma de realización, la concentración final de cisteína es de aproximadamente 20 μ M.

La matriz termorreversible está basada de preferencia en un tampón fisiológicamente compatible, siendo una de las formas de realización el Medio 199, una disolución de nutrientes común usada para el cultivo *in vitro* de diversos tipos celulares de mamífero (disponible comercialmente de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), que se suplementa además con aditivos y cantidades adicionales de algunos componentes del medio, tales como cantidades suplementarias de aminoácidos polares como se describió anteriormente.

Ventajosamente, puede añadirse aminoguanidina a esta formulación; sin embargo, otros análogos de L-arginina pueden también utilizarse en la presente invención, tales como N-monometil L-arginina, N-nitro-L-arginina o D-arginina. La concentración final de aminoguanidina es generalmente de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 μ M, de preferencia desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 μ M, de mayor preferencia desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 μ M. En una forma de realización, la concentración final es de aproximadamente 20 μ M.

Además, la matriz puede incluir uno o más quelantes de cationes bivalentes, que aumentan la rigidez de la matriz al formar complejos coordinados con cualquier ion metálico bivalente presente. La formación de tales complejos da lugar a la rigidez aumentada de la matriz al eliminar la inhibición de los enlaces de hidrógeno entre -NH₂ y -COOH causada por la presencia de los iones metálicos bivalentes. Un ejemplo de preferencia de un quelante de cationes bivalentes que es útil en la presente invención es el ácido etilenediaminetetraacético (EDTA) o una sal del mismo. El intervalo

de concentraciones para el quelante de cationes bivalentes, tal como EDTA, es generalmente desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mM, de preferencia desde 1 hasta aproximadamente 8 mM, de mayor preferencia desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 mM. En una forma de realización, el EDTA está presente en una concentración de aproximadamente 4 mM.

La Figura 3 ilustra el efecto de los aminoácidos polares y de L-cisteína añadidos para estabilizar las unidades 25, formadas por la gelatina 15 y el dextrano 20, al unir los sitios polares expuestos del monómero a, por ejemplo, los grupos amina de la arginina o los grupos ácido carboxílico del ácido glutámico. Además, los enlaces disulfuro pueden formarse entre moléculas de L-cisteína (formando de esta manera cistina), que a su vez forman enlaces de hidrógeno a la gelatina 15.

Las características mecánicas y térmicas del hidrogel termorreversible descrito anteriormente están determinadas en gran medida por las características termomecánicas de uno de sus componentes importantes, la gelatina. Las matrices basadas en gelatina típicamente están fundidas a las temperaturas cercanas a las temperaturas fisiológicas y por consiguiente no pueden esperarse que tengan la durabilidad indispensable y las propiedades mecánicas cuando sea necesario para la implantación como dispositivo médico en ciertas aplicaciones. Por consiguiente, es imprescindible estabilizar estos geles a través de una diversidad de interacciones intermoleculares incluidos los enlaces de hidrógeno, los enlaces electrostáticos o mediados por aminoácidos polares, enlaces hidrófobos y enlaces covalentes. Aunque no se desea estar ligado por la teoría, se cree que los tipos de mecanismos de enlaces descritos anteriormente en asociación con un poliglicano estabilizan los polipéptidos tales como la gelatina. Por ejemplo, según se analiza más detalladamente a continuación, los grupos polares cargados positivamente de las cadenas alfa derivadas del colágeno pueden entonces asociarse con los grupos hidroxilo cargados negativamente de las unidades repetidas de glucosa que se encuentran, por ejemplo, en el dextrano. La gelatina y el dextrano forman un hidrogel bioactivo compuesto que contiene estructuras macromoleculares de tipo proteoglicano.

A diferencia de la matriz termorreversible de la técnica anterior analizada anteriormente, la presente invención proporciona composiciones estabilizadas que comprenden una matriz bioactiva inmovilizada que puede usarse, por ejemplo, como un recubrimiento para que los dispositivos médicos implantados modulen la curación de heridas localizada alrededor de un dispositivo médico implantado, o para producir una respuesta vasculogénica localizada y fomentar la integración tisular con el dispositivo implantado. La presente invención también está dirigida a un procedimiento para fabricar un recubrimiento o una película bioactiva inmovilizada de material de andamiaje celular directamente en una superficie del sustrato, tal como la superficie de un dispositivo médico. La presente invención proporciona un andamiaje para la unión de células que soporta el inicio de una serie de rutas de señales celulares y modula la curación de heridas y la cascada inflamatoria aguda localizadas en respuesta al material extraño implantado. Por "bioactivo" se entiende la capacidad de facilitar o de dificultar una respuesta celular o tisular de un huésped hacia los materiales implantados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la inducción de la vasculogénesis, la inhibición de la formación de una respuesta de cuerpo extraño, la reorganización controlada del tejido alrededor de un dispositivo médico o material implantado, la promoción de la adhesión celular, o la regeneración de características anatómicas específicas tales como clavijas y rebordes reticulares dérmicos durante la curación dérmica. El término "estabilizado" o "estable" tiene la intención de referirse a las composiciones de materiales que son hinchables en agua, poco solubles, sólidos o semisólidos a la temperatura fisiológica (es decir, aproximadamente 37°C) y en los líquidos fisiológicos (por ejemplo, líquidos corporales acuosos que tienen un pH fisiológico de aproximadamente 7,4), que permanecen presentes en el huésped durante el tiempo suficiente para alcanzar la respuesta prevista.

No se cree que el recubrimiento de matriz bioactiva inmovilizado ni reticulado afecte las propiedades químicas o intrínsecas del material del sustrato subyacente (por ejemplo, un dispositivo médico). A diferencia de los dispositivos o hidrogeles de la técnica anterior, se cree que la presente invención modula la respuesta aguda de un animal huésped hacia los materiales poliméricos usados típicamente para la fabricación de dispositivos médicos, no al cambiar las propiedades del material, sino más bien al cambiar la respuesta tisular localizada hacia el material implantado.

Los recubrimientos bioactivos de la invención pueden aplicarse a una superficie de cualquier sustrato donde tales recubrimientos serían útiles. En particular, los sustratos adecuados incluyen los dispositivos médicos. Por dispositivo médico se intenta incluir cualquier dispositivo, activo o pasivo en naturaleza, que puede insertarse o implantarse en un organismo huésped, tal como un mamífero. El término "dispositivo médico" tiene la intención de abarcar además cualquier dispositivo o material natural o sintético, incluidos los ácidos nucleicos, que se use terapéuticamente *in vivo*, tal como por implantación en un ser humano o animal, o *ex vivo* para proporcionar beneficios terapéuticos, ya sea proyectado para ser un implante permanente o un implante temporario. Tales dispositivos incluyen pero no se limitan a catéteres, arterias artificiales, órganos artificiales, dispositivos médicos que contienen células de tejidos desarrollados por ingeniería o fragmentos aislados de tejidos o células derivadas de fuentes naturales o desarrollados por ingeniería genética, reemplazos de ligamentos, reemplazos de huesos, sensores de glucosa, marcapasos coronarios, bandas gástricas, monitores, laringes artificiales, prótesis (tales como testicular, de esófago, traqueal, y de trompas de Falopio), estimuladores cerebrales, marcapasos de la vejiga, estimuladores de la vejiga, desviaciones, stents, tubos, desfibriladores, cardioversores, válvulas cardíacas, reemplazos articulares, dispositivos de fijación, implantes oculares, implantes cocleares, implantes de mamas, neuroestimuladores, estimuladores del crecimiento óseo, injertos vasculares, estimuladores musculares, dispositivos de asistencia ventricular izquierda, sensores de presión, estimuladores del nervio vago, sistemas de administración de fármacos, suturas, grapas, materiales de andamiaje celular, dispositivos médicos activos o pasivos que comprenden geles, pastas o sólidos y similares y biorreactores *ex vivo* para el hígado, el riñón u otros dispositivos de soporte para órganos. Los biorreactores *ex vivo* son externos al cuerpo del paciente

y se utilizan temporalmente para proporcionar la función metabólica en espera del trasplante del órgano o de otra intervención terapéutica. Cualquier objeto extraño que se coloque en el cuerpo, o en contacto con tejidos o líquidos del cuerpo ya sea por un período de tiempo o permanentemente, puede beneficiarse de la presente invención.

5 El dispositivo médico de la presente invención puede ser rígido o flexible, sólido, fibrilar o tejido y puede derivar de materiales que se presentan en la naturaleza o puede construirse a partir de materiales sintéticos. Los ejemplos de materiales de construcción incluyen acrilatos, copolímeros de ácidos poliglicólico-poliláctico, polihidroxibutiratos, poliésteres (tales como Dacron®), politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), vidrio bioactivo, materiales cerámicos (tales como hidroxiapatitas), materiales coralinos, tejidos procesados (tales como hueso desmineralizado), policarbonato, copolímeros de poliuretano/policarbonato, metales (tales como titanio), y sus mezclas, compuestos o submonta-
10 jes. Los vidrios bioactivos por lo general contienen dióxido de silicio (SiO₂) como un formador de red y se caracterizan por su capacidad para unirse firmemente al tejido vivo. Los ejemplos de vidrios bioactivos disponibles comercialmente y sus fabricantes incluyen Bioglass® (American Biomaterials Corp., EEUU, 45% de silicio, 24% de óxido de calcio (CaO), 24,5% de óxido disódico (Na₂O) y 6% de pirofosfato (P₂O₅)), Consil® (Xeipon Ltd., RU), NovaBone® (American Biomaterials Corp.), Biogran® (Orthovita, EEUU), PerioGlass® (Block Drug Co., EEUU) y Ceravital® (E.Pfeil & H. Bromer, Alemania). Corglaes® (Giltech Ltd., Ayr, RU) representa otra familia de vidrios bioactivos que contienen pirofosfato en lugar de dióxido de silicio como formador de red. Estos vidrios contienen 42-49 mol% de P₂O₅, el resto como 10-40 mol% como CaO y Na₂O.

20 El término “submontaje” tiene la intención de abarcar múltiples piezas de construcción del dispositivo, en el que las piezas individuales del dispositivo están construidas del mismo o de diferentes materiales. El término “compuesto” tiene la intención de abarcar dispositivos que comprenden diferentes materiales activos o pasivos, presentes para cumplir los requerimientos específicos de diseño para el dispositivo médico proyectado.

25 La presente invención proporciona un recubrimiento o capa de matriz bioactiva estabilizada que cubre una superficie expuesta del dispositivo médico u otro sustrato y que está inmovilizada en la misma. Como la presente invención es útil como un recubrimiento para cualquier parte de un dispositivo médico que pueda tener contacto con los tejidos o líquidos del cuerpo, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, temporalmente y permanentemente, el término “superficie expuesta” tiene la intención de abarcar cualquiera de tales superficies de un dispositivo médico que esté expuesta a contacto breve o
30 prolongado con los tejidos o líquidos del cuerpo. La palabra “superficie” según se usa en toda la memoria descriptiva en referencia a un dispositivo médico u otro sustrato tiene la intención por consiguiente de abarcar, en particular, cualquier superficie de un dispositivo médico colocado operativamente para la exposición a los tejidos o líquidos del cuerpo.

35 La capa de la matriz está formada por al menos dos componentes de alto peso molecular. Los componentes de alto peso molecular de la matriz bioactiva de hidrogel se seleccionan del grupo constituido por poliglicanos de alto peso molecular, polipéptidos de alto peso molecular y sus combinaciones. Por poliglicano de alto peso molecular se entiende cualquier polisacárido constituido por más de aproximadamente 10 residuos de monosacárido unidos el uno al otro por enlaces glucosídicos. El poliglicano puede estar constituido por los mismos residuos de monosacárido, o
40 diversos residuos de monosacárido o derivados de residuos de monosacárido. El dextrano, un polisacárido de preferencia, comprende típicamente cadenas lineales de residuos D-glucosa unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, frecuentemente con ramificaciones $\alpha(1\rightarrow2)$ o $\alpha(1\rightarrow3)$. El dextrano nativo, producido por una serie de especies de bacterias de la familia Lactobacillaceae, es una mezcla polidispersa de componentes.

45 El componente poliglicano de preferencia tiene un intervalo de peso molecular desde aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 8.000.000 Da, de más preferencia desde aproximadamente 20.000 hasta aproximadamente 1.000.000 Da. A menos que se indique de otra manera, el peso molecular se expresa en este documento como peso molecular promedio en número (M_n), que se define como $\frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$, en la que N_i es el número de moléculas de polímero
50 (o el número de moles esas moléculas) que tienen peso molecular M_i .

Cualquier polisacárido, incluidos los glicosaminoglicanos (GAG) o glucosaminoglicanos, con viscosidad, masa molecular y otras propiedades deseables adecuadas puede utilizarse en la presente invención. Por glicosaminoglicano se entiende cualquier glicano (es decir, polisacárido) que comprenda una cadena de polisacárido no ramificada con una unidad de repetición de disacárido, uno de las cuales es siempre un amino azúcar. Estos compuestos como clase
55 llevan una alta carga negativa, son fuertemente hidrófilos y comúnmente se los denomina mucopolisacáridos. Este grupo de polisacáridos incluye la heparina, el sulfato de heparano, el sulfato de condroitina, el sulfato de dermatano, el sulfato de keratano y el ácido hialurónico. Estos GAG se encuentran predominantemente en las superficies de la célula y en la matriz extracelular. Por glucosaminoglicano se entiende cualquier glicano (es decir, polisacárido) que contenga predominantemente derivados de monosacárido en los que un grupo alcohólico del hidroxilo se ha reemplazado por un grupo amino u otro grupo funcional tal como sulfato o fosfato. Un ejemplo de un glucosaminoglicano es poli-N-acetil glucosaminoglicano, denominado comúnmente chitosano. Los polisacáridos ejemplares que pueden ser útiles en la presente invención incluyen el dextrano, el heparano, la heparina, el ácido hialurónico, el alginato, la agarosa, el carragenano, la amilopectina, la amilosa, el glicógeno, el almidón, la celulosa, la quitina, el chitosano y diversos
65 polisacáridos sulfatados tales como el sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, sulfato de dermatano o sulfato de keratano.

Por polipéptido de alto peso molecular se entiende cualquier polipéptido derivado de tejidos o producido sintéticamente, tales como colágenos o gelatinas derivadas del colágeno. Aunque la gelatina derivada del colágeno es el componente polipeptídico de alto peso molecular de preferencia, pueden usarse otros componentes análogos a la gelatina caracterizados por una estructura central que comprende secuencias de aminoácidos que tienen grupos polares capaces de interactuar con otras moléculas. Por ejemplo, podrían usarse la queratina, la decorina, el agregano, las glicoproteínas (incluidos los proteoglicanos), y similares para producir el componente polipeptídico. En una forma de realización, el componente polipeptídico es gelatina de porcino del colágeno parcialmente hidrolizado derivado de tejido de la piel. Podrían utilizarse también los polipéptidos derivados de otros tipos de tejido. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los extractos tisulares de arterias, cuerdas vocales, pleura, tráquea, bronquios, tabiques alveolares pulmonares, ligamentos, cartílago auricular o fascia abdominal; la red reticular del hígado; la membrana basal del riñón; o el neurilema, la aracnoides, la duramadre o la piamadre del sistema nervioso. También pueden usarse polipéptidos purificados incluidos, pero no limitados a, laminina, nidogeno, fibulina y fibrilina o mezclas de proteínas tales como las descritas por la Patente de EEUU N° 6.264.992 y la Patente de EEUU N° 4.829.000, extractos de caldo de cultivo celular como se describe en la Patente de EEUU N° 6.284.284, tejidos submucosos tales como los descritos en la Patente de EEUU N° 6.264.992, o productos genéticos tales como los descritos por la Patente de EEUU N° 6.303.765. Otro ejemplo de un polipéptido de alto peso molecular adecuado es una proteína de fusión formada por medio de la incorporación por ingeniería genética de especies reactivas conocidas en una proteína. El componente polipeptídico tiene de preferencia un intervalo de peso molecular de desde aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 3.000.000 Da, de más preferencia desde aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 300.000 Da.

En una forma de realización de preferencia, la gelatina y el dextrano son componentes de la matriz bioactiva de la presente invención. Para facilitar la descripción de la invención, los términos “gelatina” y “dextrano” se utilizan en toda la memoria descriptiva con la comprensión de que están contempladas por la presente invención diversas alternativas como se describió anteriormente, tales como otros componentes poliglicano y polipéptido previstos fácilmente por los expertos en la técnica.

La Figura 4A ilustra una forma de realización de la presente invención en la que un componente de alto peso molecular de la matriz (20), tal como un polisacárido (por ejemplo, dextrano), se inmoviliza a una superficie expuesta (30) de un dispositivo médico (60). En esta forma de realización, el componente de alto peso molecular (20) se une a la superficie expuesta (30) a través de una pluralidad de enlaces covalentes (40), tales como enlaces peptídicos, entre la superficie expuesta (30) del dispositivo médico (60) y grupos reactivos pendientes a lo largo de la cadena del componente de alto peso molecular (20). De esta manera, un componente de alto peso molecular de la matriz, tal como dextrano o gelatina, puede unirse covalentemente a una superficie expuesta (30) de un dispositivo médico (60) para formar un recubrimiento inmovilizado.

En esta forma de realización particular, la superficie del dispositivo médico primero debe activarse. La activación superficial de materiales sintéticos es muy conocida por los expertos en la técnica de modificación de superficies. Por ejemplo, los procedimientos de activación superficial se usan comúnmente para la inmovilización de biomacromoléculas durante la preparación de medios para la cromatografía de afinidad. Las técnicas comunes de modificación de superficies se resumen en *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, Dean y col., IRL Press, 1985 ISBN 0-904147-71-1, que se incorpora en su totalidad por referencia. Otros procedimientos para preparar superficies sintéticas o derivadas de la naturaleza para posterior reacción con especies macromoleculares en disolución son muy conocidos por los expertos en la técnica.

En una forma de realización, los grupos amina reactivos se forman en la superficie. Por ejemplo, cintas de poli(etileno-co-propileno) (Teflon®) y láminas de poli(tereftalato de etileno) (PET) perfluoradas pueden recubrirse con finas capas de polímero de amina desde un vapor de “monómero” de aminas volátiles usando una descarga luminiscente de radiofrecuencia. La densidad de la capa de aminas formada puede variarse seleccionando aminas volátiles adecuadas. En un estudio particular, se prepararon películas de baja densidad de aminas usando n-heptilamina, mientras que se prepararon películas de alta densidad de aminas usando alilamina (Véase, Kingshott y col., “Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins” *Biomaterials* 23:2043-2056 (2002)). Los grupos carboxilo del dextrano o de la gelatina activados reaccionan con los grupos amina disponibles de la superficie, para formar una base de Schiff que puede posteriormente reducirse usando borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio para formar enlaces peptídicos. De esta manera se inmoviliza el componente de alto peso molecular en la superficie del dispositivo médico por medio de enlaces covalentes entre ellos.

El extensión y la uniformidad de la cobertura superficial por los componentes de alto peso molecular inmovilizados pueden variarse usando parámetros de reacción bien conocidos por los expertos en la técnica. De manera similar, variando la concentración de la especie reactiva en la disolución sobre una superficie activada, puede controlarse el espesor del hidrogel bioactivo inmovilizado. Por ejemplo, puede ser deseable una capa de hidrogel bioactiva uniforme para una mejor función a largo plazo de un biosensor de glucosa implantado, donde la función prevista del dispositivo requiere el equilibrio rápido entre el entorno tisular local y la interfase del sensor para el funcionamiento óptimo. Tales procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En otro ejemplo, pueden ser deseables capas de hidrogel bioactivas relativamente gruesas para los dispositivos médicos que requieren gran integración tisular para el funcionamiento óptimo. Los andamiajes celulares o los dispositivos para aumentar el volumen tisular para la reparación y la regeneración de esfínteres son ejemplos de tales dispositivos médicos que pueden beneficiarse de un diseño compuesto por un sustrato subyacente recubierto con una capa de recubrimiento del hidrogel bioactivo para proporcio-

nar el soporte estructural y mecánico al tejido mientras fomenta la integración tisular y la regeneración localizada del tejido. Usando los procedimientos resumidos anteriormente, pueden construirse recubrimientos de hidrogel bioactivos que varían en espesor desde aproximadamente 10^{-4} hasta aproximadamente 10 cm.

El componente inmovilizado de dextrano o gelatina puede usarse como un molde sobre el que puede construirse un material de andamiaje celular similar a la matriz de hidrogel termorreversible descrita anteriormente. Por ejemplo, puede añadirse al menos un componente de alto peso molecular adicional (por ejemplo, gelatina), y al menos un agente mejorador al componente inmovilizado de alto peso molecular (por ejemplo, dextrano) para formar una matriz de hidrogel bioactiva inmovilizada en la superficie del dispositivo médico. Las cantidades relativas de los diversos ingredientes del hidrogel pueden variarse para obtener una amplia gama de propiedades terapéuticas y biomecánicas deseables. En una forma de realización, se usan las mismas concentraciones que las usadas en la formulación de la matriz termorreversible analizada anteriormente.

Por “agente mejorador” o “agente estabilizante” se entiende cualquier compuesto añadido a la matriz de hidrogel, además de los dos componentes de alto peso molecular, que mejora la matriz de hidrogel proporcionando más estabilidad o ventajas funcionales. Los agentes mejoradores adecuados, que se mezclan con los componentes de alto peso molecular y se dispersan dentro de la matriz de hidrogel, incluyen muchos de los aditivos descritos anteriormente con respecto a la matriz termorreversible analizada anteriormente. El agente mejorador puede incluir cualquier compuesto, especialmente compuestos polares, que, cuando se incorporan en la matriz reticulada del hidrogel, mejoran la matriz de hidrogel al proporcionar más estabilidad o ventajas funcionales.

Los agentes mejoradores de preferencia para uso con la matriz reticulada de hidrogel estabilizada incluyen los aminoácidos polares, los análogos de aminoácidos, los derivados de aminoácidos, el colágeno intacto y quelantes de cationes bivalentes, tales como el EDTA o sus sales. Los aminoácidos polares tienen la intención de incluir la tirosina, cisteína, serina, treonina, asparragina, glutamina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos polares de preferencia son L-cisteína, ácido L-glutámico, L-lisina y L-arginina. Las concentraciones adecuadas de cada agente mejorador particular son las mismas que se indicaron anteriormente con respecto a la matriz de hidrogel termorreversible. Los aminoácidos polares, el EDTA y sus mezclas, son los agentes mejoradores de preferencia. Los agentes mejoradores pueden añadirse a la composición de la matriz antes, durante o después de la inmovilización de un componente de alto peso molecular a la superficie del dispositivo médico.

Los agentes mejoradores son particularmente importantes en la matriz de hidrogel bioactiva reticulada estabilizada por las propiedades inherentes que promueven dentro de la matriz. La matriz de hidrogel exhibe una bioactividad intrínseca que será más evidente a través de las otras formas de realización que se describen a continuación en este documento. Se cree que la bioactividad intrínseca es una función de la estereoquímica única de las macromoléculas reticuladas en presencia de los aminoácidos polares mejoradores y reforzadores, así como de otros agentes mejoradores.

Por ejemplo, se ha observado la agregación de los fibroblastos humanos expuestos a los hidrogeles bioactivos, mientras que no se observa agregación cuando los fibroblastos se exponen a los componentes individuales del hidrogel bioactivo. Los resultados de numerosos (más de cincuenta) experimentos controlados han mostrado que los fibroblastos de piel humana neonatal normal forman agregados multicelulares cuando se exponen a la formulación de hidrogel termorreversible completa a 37°C, mientras que no se demuestra tal actividad de agregación celular usando formulaciones en las que no se forma el copolímero bioactivo. Las células agregadas forman grupos de células firmemente yuxtapuestas con procesos citoplásmicos conectados, mientras que las células tratadas con las formulaciones que carecen del copolímero permanecen redondas y sin de las proyecciones de superficie. Según se muestra en la Figura 5, en una muestra de fibroblastos humanos expuestos a un hidrogel bioactivo que comprende dextrano y gelatina, al menos el 80% de las células presentes estaban en un estado agregado mientras que menos del 20% de las células presentes permanecían como células únicas. Se observó el efecto opuesto en las muestras donde los fibroblastos humanos se expusieron al monómero de colágeno solo, carbohidrato solo, o se dejaron sin tratamiento. En las muestras expuestas al monómero de colágeno solo, aproximadamente el 75% de las células permanecieron en una configuración de célula única mientras que sólo aproximadamente el 25% de las células estaban en un estado agregado. Se observó casi el mismo efecto en las muestras expuestas al carbohidrato solo. En las muestras que se dejaron sin tratamiento, aproximadamente el 60% de las células permanecieron en un estado de célula única mientras que sólo aproximadamente el 40% de las células estaban en un estado agregado.

En una forma de realización de preferencia, se inmoviliza el dextrano en una superficie expuesta del dispositivo y se añade gelatina, formando de este modo un copolímero con el dextrano por medio de enlaces de hidrógeno e interacciones polares. Esta forma de realización se muestra en la Figura 4B donde el dextrano (20), que tiene gelatina (15) asociada con el mismo, se inmoviliza a una superficie expuesta (30) de un dispositivo médico (60). Estas interacciones pueden a continuación estabilizarse más a través de enlaces covalentes posteriores mediados por especies reactivas añadidas (es decir, agentes mejoradores). El producto terminado es un hidrogel bioactivo estabilizado que funciona como un andamiaje para la unión de células que tiene un efecto localizado en las respuestas celulares, mejorando de este modo el rendimiento del dispositivo médico a largo plazo.

Uno de tales efectos en la respuesta celular se ilustra en la Figura 6, que proporciona una representación gráfica de los resultados de un estudio de expresión génica en los fibroblastos de piel humana neonatal normal. Ese estudio demostró una inducción marcada del factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3) tras la exposición al hidrogel.

La expresión de este gen está asociada con la curación de heridas sin cicatriz como las que se ven durante el desarrollo fetal. En cambio, en las mismas células, no se indujo el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), que tiene un papel fundamental en la formación de cicatrices durante la curación de heridas en adultos, por la exposición al hidrogel reflejando la capacidad del hidrogel para facilitar un carácter específico de respuesta en una población de células del tejido.

En esta forma de realización, en la que el dextrano se inmoviliza en la superficie y se añade gelatina, el dextrano, que contiene predominantemente grupos hidroxilo relativamente no reactivos, necesita activación para convertir los grupos hidroxilo en grupos aldehído más reactivos adecuados para entrecruzar con la superficie. Esto debe hacerse antes de contactar la superficie del dispositivo médico, que previamente ha sufrido la modificación de la superficie, tal como por el procedimiento descrito anteriormente para formar grupos amino reactivos. Por ejemplo, el dextrano, u otro componente poliglicano, puede modificarse, tal como por medio de oxidación, para entrecruzar con la superficie modificada del dispositivo médico. Una reacción conocida para oxidar polisacáridos es la oxidación con peryodato. El procedimiento básico de reacción que utiliza química de peryodato es bien conocido y apreciado por los expertos en la técnica. La oxidación con peryodato está descrita en general en *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, Dean, y col., IRL Press, 1985 ISBN0-904147-71-1. La oxidación del dextrano por medio del uso de química basada en peryodato está descrita en las Patentes de EEUU N° 3.947.352 y 6.011.008, que se incorporan en este documento en su totalidad por referencia.

En la oxidación con peryodato, las matrices hidrófilas pueden activarse mediante la oxidación de los grupos diol vecinos. Con una superficie celulósica, u otra superficie de polisacáridos, esto se lleva a cabo generalmente a través del tratamiento con una disolución acuosa de una sal de ácido peryódico, tal como peryodato de sodio (NaIO_4), que oxida los dioles de azúcares para generar grupos aldehído reactivos (por ejemplo, residuos dialdehído). Este procedimiento es una alternativa rápida, conveniente a otros procedimientos de oxidación conocidos, tales como los que usan bromuro de cianógeno. Los materiales activados por la oxidación con peryodato pueden almacenarse a 4°C durante varios días sin pérdida apreciable de actividad. Este procedimiento puede usarse para preparar superficies de biomateriales activados adecuadas para unir polipéptidos o para preparar polisacáridos solubles activados para unir a superficies que contienen grupos amina primaria.

Los materiales oxidados con peryodato, tales como dextrano, reaccionan rápidamente con materiales que contienen grupos amino, tal como una superficie activada de un dispositivo médico o un polipéptido, produciendo un material entrecruzado a través de la formación de enlaces de base de Schiff. Una base de Schiff es un nombre usado comúnmente para referirse a la imina formada por la reacción de una amina primaria con un aldehído o cetona. Los grupos aldehído formados en la superficie celulósica reaccionan con la mayoría de las aminas primarias entre valores de pH desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6. Los enlaces de base de Schiff se forman entre los residuos dialdehído en la superficie celulósica y los grupos amino libres en el polipéptido o la superficie activada del dispositivo médico. Posteriormente el producto entrecruzado puede estabilizarse (es decir, formación de enlaces amina estables) mediante la reducción con un borohidruro, tal como borohidruro de sodio (NaBH_4) o cianoborohidruro (NaBH_3CN). Los grupos aldehído residuales pueden consumirse con etanolamina. Pueden usarse otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para proporcionar grupos reactivos en uno de los componentes de alto peso molecular de la matriz.

Los recubrimientos inmovilizados de matriz de hidrogel de la presente invención son biomiméticos, lo que significa que la capa de recubrimiento imita o estimula un procedimiento o producto biológico. Se han usado algunos procedimientos biomiméticos durante varios años, tales como la síntesis artificial de vitaminas y antibióticos. Más recientemente, se han propuesto otras aplicaciones biomiméticas, que incluyen anticuerpos nano robóticos que buscan y destruyen las bacterias que causan la enfermedad, órganos artificiales, brazos, piernas, manos y pies artificiales y diversos dispositivos electrónicos. Los materiales biomiméticos de andamiaje de la presente invención pueden dar recubrimientos de superficie terapéuticamente útiles que son estables a aproximadamente 37°C, o a la temperatura corporal.

Una vez que un componente de alto peso molecular, tal como dextrano o gelatina, se ha entrecruzado de manera covalente a la superficie del dispositivo médico, puede añadirse el segundo componente de alto peso molecular. Los dos componentes de alto peso molecular, uno que está entrecruzado de manera covalente a la superficie del dispositivo médico, interactúan a través de enlaces de hidrógeno y de atracciones polares, formando de esta manera un copolímero estabilizado. Además, puede añadirse al menos un agente mejorador, como se describió anteriormente, para estabilizar más la matriz de hidrogel.

El dextrano o la gelatina pueden inmovilizarse a la superficie del dispositivo médico de una manera análoga a una cadena, o pendiente, como se muestra en las Figuras 4A y 4B. Este enfoque puede ser útil para el desarrollo de sensores de glucosa u otros dispositivos permanentes que requieren la mayor integración con los tejidos blandos para su funcionamiento y biocompatibilidad a largo plazo. Esta configuración puede también ser útil para el crecimiento guiado de tejidos o como un medio para modular el crecimiento celular y la estructura dentro de una construcción de tejido tridimensional obtenida por ingeniería tal como un dispositivo proyectado para funcionar como un hígado o riñón artificial. El uso de un material de carga biodegradable permite fabricar construcciones por ingeniería para administrar fármacos de manera controlada con liberación prolongada de un agente farmacéutico a un lecho vascular inducido, o el desarrollo de crecimiento guiado de tejidos para aplicaciones de aumento de volumen.

En otra forma de realización, el dextrano 20 (o el componente de gelatina) puede unirse a la superficie por medio de un enlace peptídico en un extremo terminal de la cadena de dextrano, como se muestra en la Figura 7. Como con la forma de realización mostrada en la Figura 4, la superficie (30) del dispositivo (60) debe activarse usando procedimientos comunes de modificación de superficie como se resumió anteriormente. Un experto en la técnica entenderá fácilmente los parámetros necesarios para inmovilizar el dextrano en un extremo terminal. (Véase por ejemplo, Larm, O. y col., "A New Non-Thrombogenic Surface Prepared By Selective Covalent Binding Of Heparin Via A Modified Reducing Terminal Residue" *Biomater Med Dev Artif Organs* 11:161-73 (1983)). Un experto en la técnica también entenderá fácilmente los procedimientos para inmovilizar otras macromoléculas tales como polipéptidos a través de un extremo terminal. (Véase por ejemplo, Gregorius, K. y col., "*In Situ* Deprotection: A Method For Covalent Immobilization Of Peptides With Well-Defined Orientation For Use In Solid Phase Immunoassays Such As Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" *Anal Biochem* 299:94-91 (2001), y Olbrich K.C. y col., "Surfaces Modified With Covalently-Immobilized Adhesive Peptides Affect Fibroblast Population Motility" *Biomaterials* 17:144-153 (1996)). Los expertos en la técnica reconocerán además que la activación de la superficie de los sustratos puede alcanzar el mismo objetivo de inmovilizar uno de los dos componentes de alto peso molecular sobre una superficie sin necesidad de modificar las macromoléculas nativas. Por ejemplo, la inmovilización a la superficie de proteínas a sustratos insolubles de PVA se ha descrito previamente (Véase, Manecke G. and Vogt, H.G., *J Solid Phase Biochem* 4(233) (1979)).

La inmovilización de dextrano que se produce a través de los grupos terminales activados forma dextrano inmovilizado con "extremos hacia afuera", o "superficies análogas a cepillos" como se muestra en la Figura 7. Aquí, el monómero de gelatina (15) puede formarse a continuación alrededor del dextrano inmovilizado (20) para producir una estructura biomimética (80) diseñada para facilitar la activación de rutas de señales celulares similares a las encontradas durante el desarrollo embrionario. Esta configuración puede dar lugar a una superficie más análoga al hidrogel y puede proporcionar una superficie "más suave" para el crecimiento celular guiado. Como con la configuración pendiente, tanto las superficies permanentes como las biodegradables pueden modificarse de esta manera. La extensión del recubrimiento de la superficie por el dextrano depende del peso molecular del dextrano y del grado de ramificación del dextrano.

La Figura 8 ilustra aún otra forma de realización, según la que la gelatina se inmoviliza a la superficie del dispositivo médico. La gelatina con sus aminos primarias reactivas nativas distribuidas a lo largo de la estructura central del polipéptido puede inmovilizarse a dos superficies que contienen grupos aldehído. Las superficies activadas pueden formarse usando tratamiento de descarga luminiscente de radiofrecuencia de superficies poliméricas en presencia de oxígeno u otras especies reactivas oxidativas. Este tratamiento de superficie forma aldehídos y otras especies reactivas en la superficie del material tratado, que pueden reaccionar posteriormente con la gelatina e inmovilizarla directamente. La gelatina puede también formar enlaces, tal como enlaces peptídicos, con la superficie del dispositivo en forma pendiente o sólo en un extremo terminal de la cadena de gelatina. La gelatina se inmoviliza o ancla a una superficie de un dispositivo médico a temperatura ambiente como se muestra en la Etapa 1 de la Figura 8. A continuación, se añade el dextrano y se eleva la temperatura para alterar la estructura cuaternaria de la gelatina para romper los enlaces de hidrógeno intramoleculares estabilizados térmicamente produciendo una conformación del polipéptido más abierta como se muestra en la Etapa 2. Para la Etapa 2, la temperatura de la superficie debe elevarse hasta al menos desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 90°C, de preferencia desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 60°C. Diversas especies reactivas que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos polares y derivados de aminoácidos como se describieron anteriormente también se añaden y se dejan reaccionar en esta etapa. La disminución de la temperatura puede ayudar además a las interacciones intermoleculares de manera que el dextrano comienza a interactuar con la gelatina como se muestra en la Etapa 3. Durante la Etapa 3, pueden añadirse a la matriz otros componentes, tales como aminoácidos polares. Finalmente, en la Etapa 4, la superficie está una vez más a temperatura ambiente y se forma un recubrimiento de matriz bioactiva estabilizada sobre la superficie. La matriz resultante es una matriz de hidrogel bioactiva de gelatina/dextrano fuertemente unida. Posteriormente las etapas posteriores del procedimiento pueden incluir el lavado para eliminar las especies reactivas en exceso del hidrogel estabilizado. Típicamente, la temperatura de la superficie del dispositivo médico varía desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 60°C durante las etapas anteriormente descritas. El intervalo de pH para la formación del copolímero, como se describió anteriormente, está dentro del intervalo fisiológico, de preferencia entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, de más preferencia entre aproximadamente 7 y aproximadamente 7,6.

Otro procedimiento útil para inmovilizar macromoléculas, tal como gelatina o dextrano, a una superficie es por medio de un procedimiento mecánico. Por ejemplo, un polímero termoplástico sintético puede hincharse parcialmente en presencia de un líquido que contiene un disolvente de polímeros dispersado en agua. La adición de las macromoléculas a este líquido permite que los solutos añadidos queden atrapados dentro de la superficie hinchada, abierta, del polímero. Al cambiar rápidamente la fase líquida que rodea el polímero hinchado, el polímero se deshinch, atrapando los solutos macromoleculares añadidos dentro de la superficie del polímero.

En aún otra forma de realización, los hidrogeles bioactivos pueden formarse directamente usando electrooxidación. En este procedimiento, se coloca un hidrogel termorreversible fundido una celda electrolítica que contiene dos electrodos conductores. Se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos, y las especies oxidables en disolución (es decir los grupos funcionales tales como hidroxilos y aminos) se oxidan directamente en el ánodo. Los compuestos oxidados reactivos resultantes se condensan en la superficie del ánodo para formar un recubrimiento de hidrogel insoluble en agua. De esta manera, por ejemplo, las mallas de titanio que comúnmente se usan para cirugía de reconstrucción craneofacial puede recubrirse con un hidrogel bioactivo inmovilizado para dirigir la organización y vascularización tisular en el sitio del implante.

En la técnica se conocen otros procedimientos para inmovilizar macromoléculas e incluyen los procedimientos descritos en las siguientes referencias, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad: (i) Puleo D.A. y col., "A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy" *Biomaterials*, 23:2079-2087 (2002) (ii) Kong, U. y col., "Durable Surface Modification of Poly(tetrafluoroethylene) by Low Pressure H₂O Plasma Treatment Followed by Acrylic Acid Graft Polymerization" *Coll Surf B: Biointerface* 24:63-71 (2002); (iii) Chandy, T. y col., "Use of Plasma Glow for Surface Engineering Biomolecules to Enhance Blood Compatibility of Dacron and PTFE Vascular Prostheses" *Biomaterials* 21:699-712 (2000); (iv) Bos, G.W. y col., "Proliferation of Endothelial Cells on Surface-Immobilized Albumin-Heparin Conjugate Loaded with Basic Fibroblast Growth Factor" *J Biomed Mater Res* 44:330-340 (1999); (v) Ayhan F. y col., "Optimization of Urease[sic] Immobilization onto Non-Porous HEMA Incorporated Poly(EGDMA) Microbeads and estimation of kinetic parameters" *Biores Technol* 81:131-40 (2002); (vi) Massia S.P. y col., "Surface Immobilized Dextrano Limits Cell Adhesion and Spreading" *Biomaterials* 21:2253-2261 (2000); (vii) Barie, N. y col., "Covalent Photo-Linker Mediated Immobilization Of An Intermediate Dextrano Layer To Polymer-Coated Surfaces For Biosensing Applications" *Bios Bioelect* 13:855-860 (1998); (viii) Chevolot, Y., y col., "Immobilization On Polystyrene Of Diazirine Derivatives Of Mono- And Disaccharides: Biological Activities Of Modified Surfaces" *Bioorganic & Med Chem* 9:2943-53 (2001); (ix) Tsai, C.C. y col., "Effects Of Heparin Immobilization On The Surface Characteristics Of A Biological Tissue Fixed With A Naturally Occurring Crosslinking Agent (Genipin) An *In Vitro* Study" *Biomaterials* 22:523-33 (2001); (x) Ito, Y., "Micropattern Immobilization Of Polysaccharide" *JBioinorg Chem* 79:88-81 (2000); (xi) Massia, S.P. y col., "Immobilized rgd Peptides On Surface-Grafted Dextrano Promote Biospecific Cell Attachment" *J Biomed Mater Res* 56:390-399 (2001); y (xii) Dai L., y col., "Biomedical Coatings By Covalent Immobilization Of Polysaccharides Onto Gas-Plasma-Activated Polymer Surfaces" *Surf Interface Anal* 29:46-55 (2000).

En aún otra forma de realización de la presente invención, los dos componentes de alto peso molecular del recubrimiento de superficie de la matriz de hidrogel pueden estar entrecruzados. Como cuando se entrecruza el dextrano u otro poliglicano, a la superficie modificada del dispositivo médico, el dextrano debe también modificarse primero para que se entrecruce con el componente de gelatina. Por ejemplo, la oxidación parcial del dextrano usando metaperyodato de sodio produce un dextrano polialdehídico que puede inmovilizarse sobre superficies derivatizadas con aminos. La inmovilización del dextrano en presencia de cianoborohidruro de sodio catalíticamente reduce la base de Schiff formada al enlace amida covalente más estable. El sustrato recubierto de dextrano inmovilizado puede a continuación lavarse para eliminar los reactivos en exceso y puede tratarse con metaperyodato de sodio para formar otros aldehídos. Este dextrano polialdehídico anclado puede a continuación entrecruzarse con otro componente de alto peso molecular, tal como la gelatina.

La presencia del entrecruzamiento entre los dos componentes de alto peso molecular del recubrimiento de hidrogel se ilustra en la Figura 9. Como se muestra, además de estar unido de manera covalente a la superficie expuesta del dispositivo médico, el dextrano (20) puede estar entrecruzado covalentemente a la gelatina (15) por medio de enlaces (70), formando de este modo una red entrecruzada (50). Los enlaces (70) son el resultado de la reacción de grupos funcionales en la gelatina (15) con grupos funcionales en el dextrano (20), o son el resultado de la reacción de una molécula entrecruzadora bifuncional con ambos, el dextrano (20) y la gelatina (15). Un procedimiento para entrecruzar gelatina y dextrano es modificar las moléculas de dextrano (20), tal como mediante oxidación, para formar grupos funcionales adecuados para que se unan covalentemente a la gelatina (15). El dextrano se modifica, tal como por oxidación y se estabiliza por medio de enlaces covalentes a la gelatina (15), formando de este modo una red entrecruzada (50).

Como se indicó anteriormente, la oxidación con peryodato es un ejemplo de una reacción conocida para oxidar polisacáridos que puede también usarse en esta forma de realización de la presente invención además de otras formas de realización descritas previamente. El esquema de reacción puede llevarse a cabo como anteriormente, oxidando los dioles de azúcares del poliglicano, formando de este modo grupos aldehído reactivos. En esta forma de realización, los enlaces de la base de Schiff se forman entre los grupos aldehído reactivos y los grupos amino libres en el componente polipéptido de la matriz de hidrogel. El producto entrecruzado puede a continuación estabilizarse (es decir, formación de enlaces amina estables) mediante la reducción con un borohidruro, tal como borohidruro de sodio (NaBH₄) o cianoborohidruro (NaBH₃CN), y los grupos aldehído residuales pueden consumirse con etanolamina.

Como un procedimiento alternativo para formar los recubrimientos de hidrogel entrecruzados, puede usarse un agente entrecruzador multifuncional como un resto reactivo que une de manera covalente las cadenas de gelatina y de dextrano. Tales agentes entrecruzadores bifuncionales pueden incluir glutaraldehído, epóxidos (por ejemplo bis-oxiranos), dextrano oxidado, hidrazida de p-azidobenzofilo, éster de N-[α -maleimidoacetoxi]succinimida, p-azidofenil glioxal monohidrato, Bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED), bis[sulfosuccinimidil]suberato, ditiobis[succinimidil] propionato, disuccinimidil suberato, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, triacrilato de trimetilpropano (20) etoxilado y otros reactivos entrecruzadores bifuncionales conocidos por los expertos en la técnica.

En una forma de realización, se añade 1,5 ml de una disolución de Bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro (BASED) 0,5 mg/ml en sulfóxido de dimetilo (DMSO), a un recipiente envuelto en papel de aluminio que contiene 15 ml de hidrogel líquido termorreversible como se describió anteriormente. El entrecruzamiento inespecífico fotoactivado del hidrogel termorreversible se produce tras la exposición de la mezcla reactiva a luz de longitud de onda larga, tal como la proporcionada por la exposición continua a una bombilla de 550 vatios (foco usado en fotografía). Los tiempos de exposición mayores demostraron mejores entrecruzamientos.

En otra forma de realización utilizando un agente entrecruzador, pueden usarse materiales poliacrilados, tales como el triacrilato de trimetilpropano (20) etoxilado, como un agente de entrecruzamiento inespecífico fotoactivado. Los componentes de una mezcla de reacción ejemplar podrían incluir hidrogel termorreversible mantenido a 39 °C, monómeros de poliacrilato, tales como triacrilato de trimetilpropano (20) etoxilado, un fotoiniciador, tal como eosina Y, agentes catalíticos, tales como 1-vinil-2-pirrolidinona, y trietanolamina. La exposición continua de esta mezcla reactiva a luz de longitud de onda larga (> 498 nm) podría producir una red de hidrogel entrecruzada.

En otra forma de realización de la presente invención, ambos componentes de alto peso molecular se entrecruzan a la superficie del dispositivo médico. En esta forma de realización, la superficie del dispositivo médico debe activarse antes de poner en contacto los componentes de alto peso molecular. Por ejemplo, los bis-oxiranos, tales como el diglicidoxi 1,4-butanediol éter reaccionan fácilmente con biomateriales que contienen hidroxilo o amino a pH alcalino para dar derivados que poseen una larga cadena hidrófila, oxirano reactivo (epóxido), que, a su vez, puede hacerse reaccionar con aminas, hidroxilos y otros nucleófilos. Los ligandos acoplados al oxirano se usan extensamente y son extremadamente estables y el uso de un reactivo bis-oxirano de cadena larga introduce una larga molécula espaciadora hidrófila entre los componentes del hidrogel inmovilizado y la superficie del biomaterial que puede ser deseable en ciertas aplicaciones.

En otra forma de realización, los componentes de alto peso molecular pueden modificarse para formar grupos reactivos capaces de reaccionar con los grupos reactivos de la superficie activada del dispositivo médico antes de contactar la superficie del dispositivo médico. Esta forma de realización no está restringida por el orden en que los componentes de alto peso molecular se ponen en contacto con la superficie del dispositivo médico. En una forma de realización de preferencia, la superficie del dispositivo médico se activa, tal como por medio de descarga luminiscente de radiofrecuencia en presencia de amina que contiene vapores para formar grupos amino reactivos en la misma, y se añade dextrano modificado, tal como dextrano oxidado. El dextrano se entrecruza de manera covalente a la superficie del dispositivo médico a través de los grupos polialdehído del dextrano anclado.

En otra forma de realización de la presente invención, la superficie del dispositivo médico y los dos componentes de alto peso molecular se entrecruzan todos unos con otros, en la que el poliglicano se entrecruza de manera covalente a la superficie del dispositivo médico, el polipéptido se entrecruza de manera covalente a la superficie del dispositivo médico, y el poliglicano y el polipéptido se entrecruzan el uno con el otro. Un experto en la técnica podrían prever diversos procedimientos para llevar a cabo esta forma de realización para recubrir un dispositivo médico. Un procedimiento posible podría comprender el recubrimiento de un dispositivo médico polimérico a través de radiación o injerto con haz de electrones (Véase, Muzykewicz K.J. y col., "Platelet adhesion and contact activation time tests on HEMA coated cellulose acetate membranes" J Biomed Mater Res. 9(5):487-99 (1975) y Venkataraman S. y col., "The reactivity of alpha-chymotrypsin immobilized on radiation-grafted hydrogel surfaces" J. Biomed Mater Res. 11(1):111-23 (1977)).

El hidrogel bioactivo entrecruzado estabilizado puede usarse para promover la regeneración tisular específica de un sitio, incluida la vasculogénesis, en el área circundante a un dispositivo médico implantado con el hidrogel bioactivo entrecruzado estabilizado inmovilizado en el mismo. Se conoce en la técnica el uso de colágeno, gelatina o dextrano intactos como vehículo para mantener y administrar factores de crecimiento y similares en procedimientos diseñados para promover el crecimiento tisular. (Véase, por ejemplo, Kawai, K. y col., "Accelerated tissue Regeneration Through Incorporation of Basic Fibroblast Growth Factor-Impregnated Gelatin Microspheres into Artificial Dermis" Biomaterials 21:489-499 (2000); y Wissink, M.J.B. y col., "Binding and Release of Basic Fibroblast Growth Factor from Heparinized Collagen Matrices" Biomaterials 22:2291-2299 (2001)). En contraste, la actividad intrínseca del hidrogel entrecruzado estabilizado de la presente invención es suficiente para provocar una secuencia específica de respuestas biológicas, tal como la promoción de la regeneración de tejidos y la vasculogénesis, sin la adición de fármacos exógenos o factores de crecimiento. De hecho, la matriz de hidrogel bioactivo de la presente invención puede estar sustancialmente libre, incluso completamente libre, de fármacos exógenos o factores de crecimiento cuando se usa para vascularización o regeneración de tejidos. Este hidrogel intrínsecamente bioactivo, como resultado de su estructura única, proporciona un andamiaje para la unión de células que modula la actividad celular posterior, tal como la regeneración tisular y la vasculogénesis.

El hidrogel entrecruzado estabilizado se comporta de manera similar cuando se usa en otros aspectos de la regeneración tisular. El hidrogel proporciona un entramado estructural estabilizado que facilita la retención y la multiplicación de las células en áreas con daño tisular. Esto se debe en parte a la bioactividad intrínseca del hidrogel, que promueve el proceso regenerativo. Esto es especialmente útil en aplicaciones donde el éxito o el funcionamiento de un dispositivo médico implantado depende de su integración con el tejido circundante. La bioactividad intrínseca del hidrogel entrecruzado inmovilizado a la superficie del dispositivo médico no sólo reduce la incidencia de rechazo por el huésped que da como resultado la respuesta inflamatoria, respuesta inmune, etc., sino que también aumenta la regeneración tisular y la curación en el sitio que circunda al dispositivo implantado.

El recubrimiento de superficie de la matriz de hidrogel bioactivo inmovilizada utilizado en cada una de las formas de realización descritas en este documento puede estar comprendido únicamente por los dos componentes de alto peso molecular. De preferencia, cada una de las formas de realización descritas en este documento incorpora componentes adicionales tales como los agentes mejoradores utilizados en las formas de realización de preferencia descritas anteriormente. La Tabla 1 presenta a continuación una lista de los componentes de preferencia presentes dentro de los recubrimientos de superficie de la matriz de hidrogel bioactivo inmovilizada de la presente invención junto con las

concentraciones adecuadas así como las concentraciones de preferencia para cada componente. Nótese que las concentraciones enumeradas en la Tabla 1 para gelatina y dextrano podrían también ser adecuadas para los componentes poliglicano y polipéptido alternativos.

TABLA 1

Componente	Intervalo de concentración	Concentración de preferencia
Ácido L-glutámico	2 hasta 60 mM	15 mM
L-lisina	0,5 hasta 30 mM	5 mM
Arginina	1 hasta 40 mM	10 mM
Gelatina	0,01 hasta 40 mM	2 mM
L-cisteína	5 hasta 500 μ M	20 μ M
EDTA	0,01 hasta 10 mM	4 mM
Dextrano	0,01 hasta 10 mM	0,1 mM

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona numerosos beneficios que incluyen provocar la vascularización en un sitio localizado, modulando la respuesta localizada de curación de heridas y proporcionando medios adecuados para desarrollar un dispositivo de implantación de células recuperable para tratamientos basados en células. Otros beneficios pueden incluir los siguientes: cicatrización reducida asociada con la degradación de materiales de suturas biodegradables; mejora del rendimiento y de la función a largo plazo de sensores extravasculares tales como sensores de glucosa usados de manera rutinaria para sistemas de administración de insulina; mejora en la tasa de curación, durabilidad y propiedades mecánicas alrededor de los implantes estructurales tales como articulaciones y tendones artificiales; dolor reducido y complicaciones asociadas que surgen de las adherencias postquirúrgicas especialmente durante heridas abdominales o en la columna vertebral; y mejora de la integración entre los tejidos naturales y las estructuras implantadas (es decir, dientes, hidroxiapatita porosa o materiales cerámicos para reparación ósea).

Parte experimental

La presente invención se ilustra más completamente por medio de los siguientes ejemplos, que se presentan para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitación de la misma.

Ejemplo 1

Un vaso de precipitados con un volumen interno de 50 ml se equipó con dos electrodos de cobre con una separación de 2,5 cm. El vaso de precipitados se llenó con una disolución acuosa del hidrogel termorreversible líquido que contenía dextrano y gelatina. Se aplicó una diferencia de potencial de 18 V a través de la celda. Un complejo de hidrogel constituido por la formulación de hidrogel termorreversible entrecruzada de manera covalentemente se formó inmediatamente en la superficie del ánodo, y el espesor de la película aumentó con el transcurso del tiempo. El hidrogel estéril era insoluble en agua a 37°C, se adhirió al sustrato subyacente y se ajustó a la superficie del metal anódico.

Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente la utilidad de este procedimiento para producir recubrimientos de hidrogel adherentes en sustratos metálicos tales como mallas de titanio usadas para cirugía reconstructiva. Se espera que tales recubrimientos de hidrogel bioactivos mejoren la vascularidad y la integración ósea del implante.

Ejemplo 2

Las superficies de biomateriales activados adecuadas para tener la matriz de hidrogel entrecruzada a la misma pueden prepararse por medio de copolimerización de monómeros que contienen grupos bifuncionales, uno de los cuales se protege. Por ejemplo, el monómero metacrilato de glicidilo puede copolimerizarse usando iniciación de radicales libres con otros acrilatos para formar hidrogeles, y películas de hidrogel. Las películas de hidrogel de poli(2-hidroxietil metacrilato-co-glicidil metacrilato) poli(HEMA-GMA) pueden prepararse mediante fotopolimerización iniciada por UV con α,α' -azoisobutironitrilo (AIBN) como un iniciador, de preferencia bajo una atmósfera inerte a 25°C. El contenido de epóxido de las películas de hidrogel puede variarse al variar la proporción relativa de HEMA a GMA. Por ejemplo, pueden prepararse películas con una alta densidad de epóxidos mezclando 0,2 ml de HEMA, 0,8 ml de GMA, 1 ml de alcohol isopropílico, 10 mg de AIBN (como un iniciador de la polimerización), y 3,0 ml de

ES 2 314 187 T3

tampón de fosfato 0,1 M (pH = 7,0). La mezcla resultante se agita y se equilibra a 25°C durante 15 minutos en un baño de agua termostatzado. A continuación puede verterse la mezcla en el molde y exponerse a radiación ultravioleta de onda larga durante 20 minutos. Tras la polimerización, las películas poli(HEMA-GMA) pueden lavarse pueden varias veces con agua destilada y cortarse en piezas circulares con una punch de biopsia. Los discos de películas poli(HEMA-GMA) que llevan grupos funcionales epoxi (10 g de peso húmedo, diámetro = 1,0 cm) formados como se describió anteriormente se equilibran en tampón de fosfato (50 mM, pH = 8,0) durante 2 horas, y se transfieren a un recipiente que tiene el hidrogel termorreversible que se mantiene a 39°C. La inmovilización del hidrogel termorreversible a la superficie de la película del biomaterial puede llevarse a cabo a 39°C con agitación frecuente. Las películas poli(HEMA-GMA) recubiertas con un hidrogel termorreversible pueden retirarse y lavarse para eliminar los materiales de hidrogel unidos de manera no covalente.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico recubierto que comprende:

un dispositivo médico que tiene una superficie; y

una capa de matriz de hidrogel bioactiva que recubre dicha superficie de dicho dispositivo médico y que está inmovilizada sobre la misma, comprendiendo dicha matriz un componente poliglicano y un componente polipéptido, en el que al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido está unido covalentemente a dicha superficie de dicho dispositivo médico o atrapado dentro de dicha superficie de dicho dispositivo médico, en el que la unión covalente se produce por reacción de un grupo reactivo llevado por al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido con un grupo reactivo llevado por dicha superficie de dicho dispositivo médico, y en el que el atrapamiento se produce por deshinchamiento de una superficie de polímero hinchado de dicho dispositivo médico a través del intercambio de la fase líquida con un líquido que comprende al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido.

2. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que sólo uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido está unido a dicha superficie de dicho dispositivo médico o atrapado dentro de dicha superficie de dicho dispositivo médico.

3. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido están ambos unidos a dicha superficie de dicho dispositivo médico o atrapados dentro de dicha superficie de dicho dispositivo médico.

4. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo médico se selecciona del grupo constituido por dispositivos médicos activos y dispositivos médicos pasivos.

5. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo médico se selecciona del grupo constituido por biorreactores *ex vivo* para el hígado, riñón u otros sistemas de soporte de órganos, catéteres, arterias artificiales, órganos artificiales, dispositivos que contienen fragmentos de tejidos, dispositivos que contienen células, reemplazos de ligamentos, reemplazos de huesos, sensores de glucosa, marcapasos coronarios, bandas gástricas, monitores, laringes artificiales, prótesis, estimuladores cerebrales, marcapasos de vejiga, derivaciones, stents, tubos, desfibriladores, cardioversores, válvulas cardíacas, reemplazos de articulaciones, dispositivos de fijación, implantes oculares, implantes cocleares, implantes de mama, neuroestimuladores, estimuladores de crecimiento óseo, injertos vasculares, estimuladores musculares, dispositivos de asistencia ventricular izquierda, sensores de presión, estimuladores del nervio vago, sistemas de administración de fármacos, suturas, grapas y materiales de andamiaje celular.

6. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicha superficie de dicho dispositivo médico está construida de un material seleccionado del grupo constituido por acrilatos, copolímeros de ácidos poliglicólico-poliláctico, polihidroxibutiratos, poliésteres, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), vidrio bioactivo, materiales cerámicos, materiales coralinos, tejidos procesados, policarbonato, copolímeros de poliuretano/policarbonato, metales, y sus mezclas, compuestos o submontajes.

7. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido está unido de manera covalente a dicha superficie de dicho dispositivo médico.

8. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que al menos uno de dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido está atrapado dentro de dicha superficie de dicho dispositivo médico.

9. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente poliglicano es un polisacárido o un polisacárido sulfatado.

10. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 9, en el que dicho componente poliglicano es un polisacárido que comprende más de aproximadamente 10 residuos de monosacárido unidos unos a otros por enlaces glicosídicos.

11. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 9, en el que dicho polisacárido se selecciona del grupo constituido por glicosaminoglicanos y glucosaminoglicanos.

12. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 9, en el que dicho polisacárido se selecciona del grupo constituido por dextrano, heparano, heparina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenano, amilopectina, amilosa, glicógeno, almidón, celulosa y quitina.

13. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 9, en el que dicho polisacárido sulfatado se selecciona del grupo constituido por sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, sulfato de dermatano y sulfato de keratano.

ES 2 314 187 T3

14. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente poliglicano tiene un peso molecular en el intervalo desde 2.000 hasta 8.000.000 Da.

5 15. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente poliglicano tiene un peso molecular en el intervalo desde 20.000 hasta 1.000.000 Da.

16. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente polipéptido es un polipéptido sintético o derivado de tejido.

10 17. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 16, en el que dicho componente polipéptido es un polipéptido derivado de tejido seleccionado del grupo constituido por colágenos, gelatinas, keratina, decorina, agregano y glicoproteínas.

15 18. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 16, en el que dicho componente polipéptido deriva de tejido seleccionado del grupo constituido por tejidos submucosos, arterias, cuerdas vocales, pleura, traquea, bronquios, tabiques alveolares pulmonares, ligamentos, cartílago auricular, fascia abdominal, hígado, riñón, neurilema, aracnoides, duramadre y piamadre.

20 19. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 16, en el que dicho componente polipéptido se selecciona del grupo constituido por laminina, nidogeno, fibulina y fibrilina.

20. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente polipéptido tiene un peso molecular en el intervalo desde 3.000 hasta 3.000.000 Da.

25 21. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente polipéptido tiene un peso molecular en el intervalo desde 30.000 hasta 300.000 Da.

22. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente poliglicano es dextrano y dicho componente polipéptido es gelatina.

30 23. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 22, en el que dicho dextrano está presente en una concentración de 0,01 hasta 10 mM.

35 24. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 22, en el que dicha gelatina está presente en una concentración de 0,01 hasta 40 mM.

40 25. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicha matriz de hidrogel comprende además al menos un agente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes, y sus combinaciones.

26. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 25, en el que dicho al menos un agente comprende al menos un aminoácido polar seleccionado del grupo constituido por tirosina, cisteína, serina, treonina, asparragina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, y sus mezclas.

45 27. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 26, en el que dichos aminoácidos polares están presentes en una concentración de 3 hasta 150 mM.

28. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 26, en el que dichos aminoácidos polares se seleccionan del grupo constituido por ácido L-glutámico, L-lisina, L-arginina, L-cisteína, y sus mezclas.

50 29. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 28, en el que dicho ácido L-glutámico está presente en una concentración de 2 hasta 60 mM.

55 30. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 28, en el que dicha L-lisina está presente en una concentración de 0,5 hasta 30 mM.

31. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 289, en el que dicha L-arginina está presente en una concentración de 1 hasta 40 mM

60 32. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 28, en el que dicha L-cisteína está presente en una concentración de 5 hasta 500 PM.

33. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 25, en el que dicho al menos un agente comprende un quelante de cationes divalentes.

65 34. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 33, en el que dicho quelante de cationes divalentes es ácido etilendiaminotetraacético o una sal del mismo.

35. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 34, en el que dicho ácido etilendiaminotetraacético está presente en una concentración de 0,01 hasta 10 mM.

36. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicho componente poliglicano y dicho componente polipéptido están unidos uno al otro de manera covalente.

37. El dispositivo médico recubierto de la reivindicación 1, en el que dicha capa de matriz tiene un espesor de 10^{-4} cm hasta 10 cm.

38. Un procedimiento para preparar un dispositivo médico recubierto, que comprende las etapas de:

proporcionar un primer componente de alto peso molecular seleccionado del grupo constituido por poliglicanos y polipéptidos;

proporcionar un dispositivo médico que tenga una superficie;

inmovilizar el primer componente de alto peso molecular en la superficie del dispositivo médico uniendo de manera covalente el primer componente de alto peso molecular a la superficie del dispositivo médico o atrapando el primer componente de alto peso molecular dentro de la superficie del dispositivo médico, en el que la unión covalente se produce al reaccionar un grupo reactivo llevado por el primer componente de alto peso molecular con un grupo reactivo llevado por la superficie del dispositivo médico, y en el que el atrapamiento se produce por deshinchamiento de una superficie de polímero hinchado de dicho dispositivo médico a través del intercambio de la fase líquida con un líquido que comprende dicho primer componente de alto peso molecular; y

poner en contacto el primer componente de alto peso molecular con un segundo componente de alto peso molecular seleccionado del grupo constituido por poliglicanos y polipéptidos, produciéndose dicha etapa de contacto antes, durante o después de dicha etapa de inmovilización, formando de esta manera un recubrimiento de hidrogel bioactivo inmovilizado en la superficie del dispositivo médico, en el que uno de entre el primer y el segundo componente de alto peso molecular es un poliglicano y el otro es un polipéptido.

39. El procedimiento de la Reivindicación 38, que además comprende, previo a dicha etapa de inmovilización, modificar químicamente el primer componente de alto peso molecular para formar sitios reactivos en el mismo capaces de participar en enlaces covalentes.

40. El procedimiento de la Reivindicación 39, en el que dicha etapa de modificación comprende oxidar el primer componente de alto peso molecular.

41. El procedimiento de la Reivindicación 40, en el que dicha etapa de modificación comprende tratar el primer componente de alto peso molecular con una sal de ácido peryódico.

42. El procedimiento de la Reivindicación 38, que además comprende modificar la superficie del dispositivo médico para formar sitios reactivos en la misma capaces de participar en enlaces covalentes previo a dicha etapa de inmovilización.

43. El procedimiento de la Reivindicación 42, en el que dicha etapa de modificación comprende formar una pluralidad de grupos amina reactivo en la superficie del dispositivo médico.

44. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que el dispositivo médico se selecciona del grupo constituido por dispositivos médicos activos y dispositivos médicos pasivos.

45. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que el dispositivo médico se selecciona del grupo constituido por biorreactores *ex vivo* para el hígado, riñón u otros sistemas de soporte de órganos, catéteres, arterias artificiales, órganos artificiales, dispositivos que contienen fragmentos de tejidos, dispositivos que contienen células, reemplazos de ligamentos, reemplazos de huesos, sensores de glucosa, marcapasos coronarios, bandas gástricas, monitores, laringes artificiales, prótesis, estimuladores cerebrales, marcapasos de vejiga, derivaciones, stents, tubos, desfibriladores, cardioversores, válvulas cardíacas, reemplazos de articulaciones, dispositivos de fijación, implantes oculares, implantes cocleares, implantes de mama, neuroestimuladores, estimuladores de crecimiento óseo, injertos vasculares, estimuladores musculares, dispositivos de asistencia ventricular izquierda, sensores de presión, estimuladores del nervio vago, sistemas de administración de fármacos, suturas, grapas y materiales de andamiaje celular.

46. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que la superficie del dispositivo médico se construye de un material seleccionado del grupo constituido por acrilatos, copolímeros de ácidos poliglicólico-poliláctico, polihidroxibutiratos, poliésteres, politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), vidrio bioactivo, materiales cerámicos, materiales coralinos, tejidos procesados, policarbonato, copolímeros de poliuretano/policarbonato, metales, y sus mezclas, compuestos o submontajes.

47. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que el primer componente de alto peso molecular es un poliglicano y el segundo componente de alto peso molecular es un polipéptido.

ES 2 314 187 T3

48. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el poliglicano es un polisacárido o un polisacárido sulfatado.

49. El procedimiento de la Reivindicación 48, en el que el polisacárido se selecciona del grupo constituido por dextrano, heparano, heparina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenano, amilopectina, amilosa, glicógeno, almidón, celulosa y quitina.

50. El procedimiento de la Reivindicación 48, en el que el polisacárido sulfatado se selecciona del grupo constituido por sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dextrano, sulfato de dermatano y sulfato de keratano.

51. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el poliglicano tiene un peso molecular en el intervalo desde 2.000 hasta 8.000.000 Da.

52. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el polipéptido es un polipéptido sintético o derivado de tejido.

53. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el polipéptido es un polipéptido derivado de tejido seleccionado del grupo constituido por colágenos, gelatinas, keratina, decorina, agrecano y glicoproteínas.

54. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el polipéptido deriva de tejido seleccionado del grupo constituido por tejidos submucosos, arterias, cuerdas vocales, pleura, traquea, bronquios, tabiques alveolares pulmonares, ligamentos, cartílago auricular, fascia abdominal, hígado, riñón, neurilema, aracnoides, duramadre y piamadre.

55. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el polipéptido tiene un peso molecular en el intervalo desde 3.000 hasta 3.000.000 Da.

56. El procedimiento de la Reivindicación 47, en el que el poliglicano es dextrano y el polipéptido es gelatina.

57. El procedimiento de la Reivindicación 38, que además comprende contactar el primer componente de alto peso molecular con al menos un agente, produciéndose dicha etapa de contacto antes, durante o después de dicha etapa de inmovilización, siendo el agente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes, y sus combinaciones.

58. El procedimiento de la Reivindicación 57, en el que el al menos un agente comprende al menos un aminoácido polar seleccionado del grupo constituido por tirosina, cisteína, serina, treonina, asparragina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, y sus mezclas.

59. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que el primer componente de alto peso molecular comprende una pluralidad de grupos reactivos pendientes.

60. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que el primer componente de alto peso molecular comprende un grupo reactivo localizado en el extremo terminal del mismo.

61. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que dicha etapa de inmovilización comprende hacer reaccionar grupos carboxilo del primer componente de alto peso molecular con grupos amina en la superficie del dispositivo médico.

62. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que dicha etapa de inmovilización comprende unir de manera covalente el primer componente de alto peso molecular a la superficie del dispositivo médico.

63. El procedimiento de la Reivindicación 38, en el que dicha etapa de inmovilización comprende atrapar el primer componente de alto peso molecular dentro de la superficie del dispositivo médico.

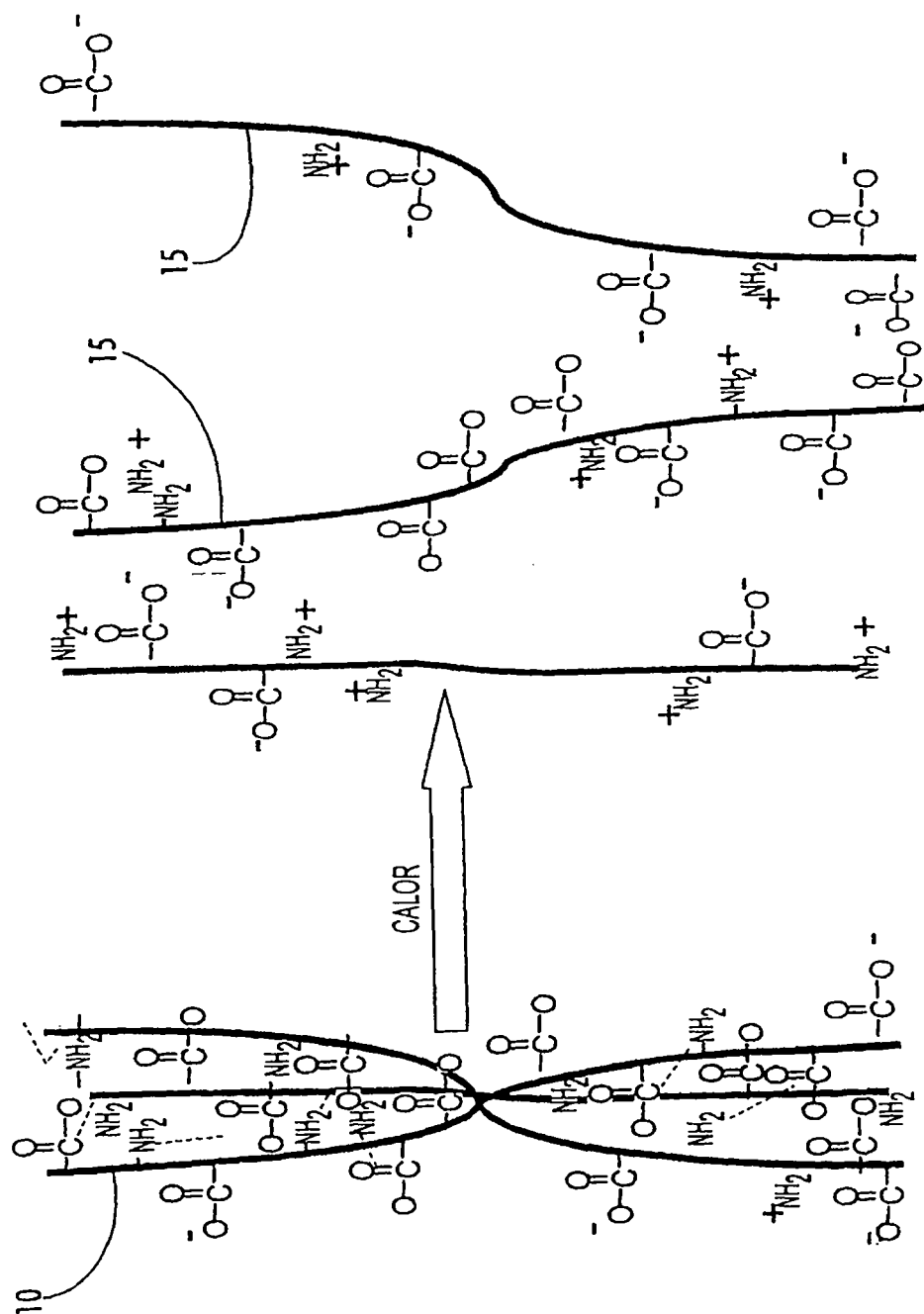
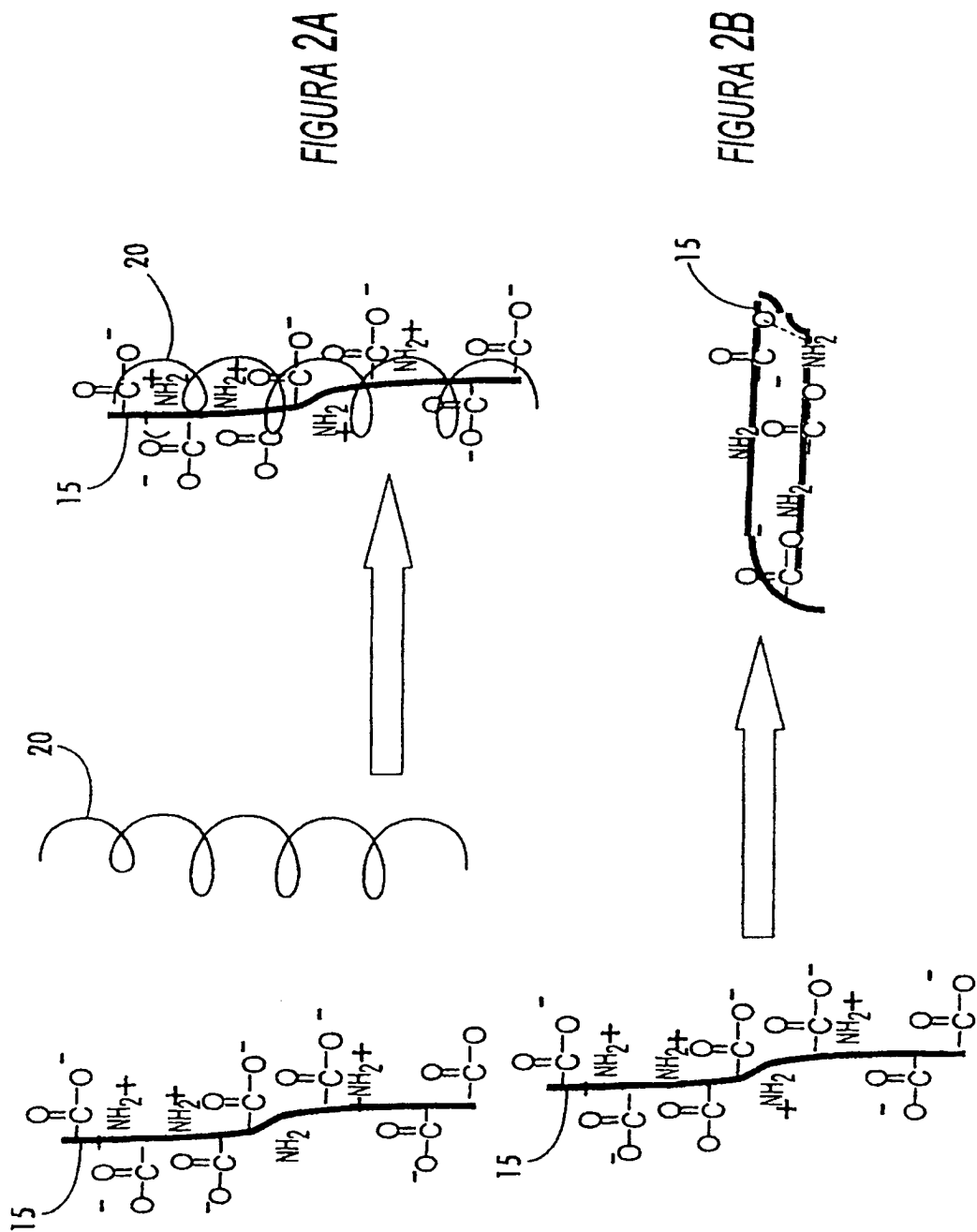


FIGURA 1



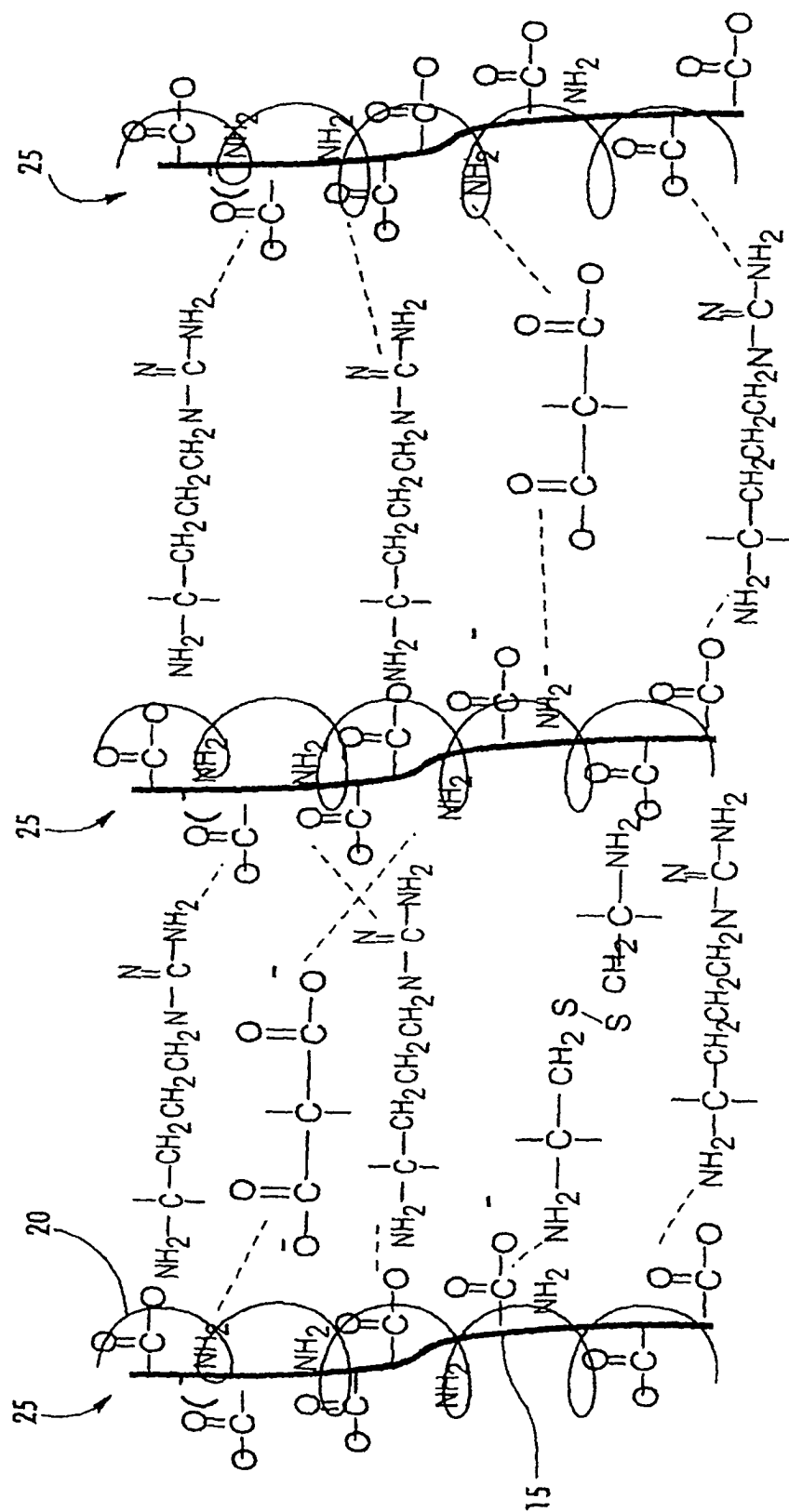
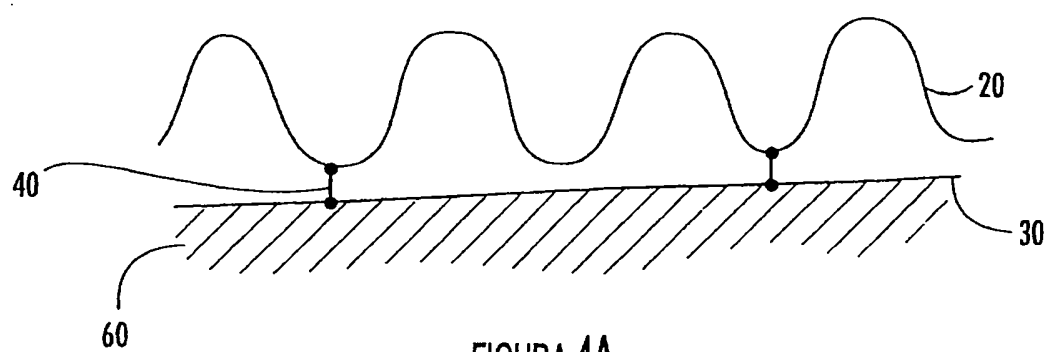
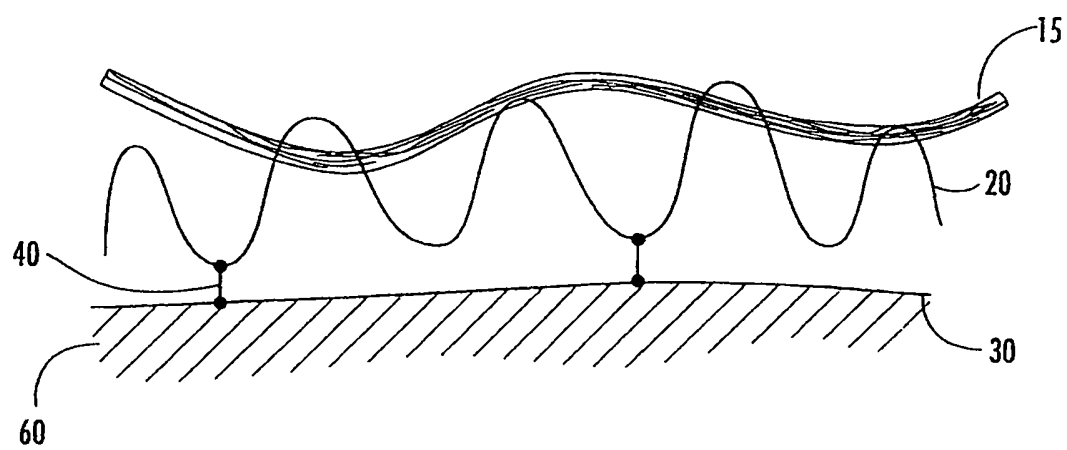


FIGURA 3



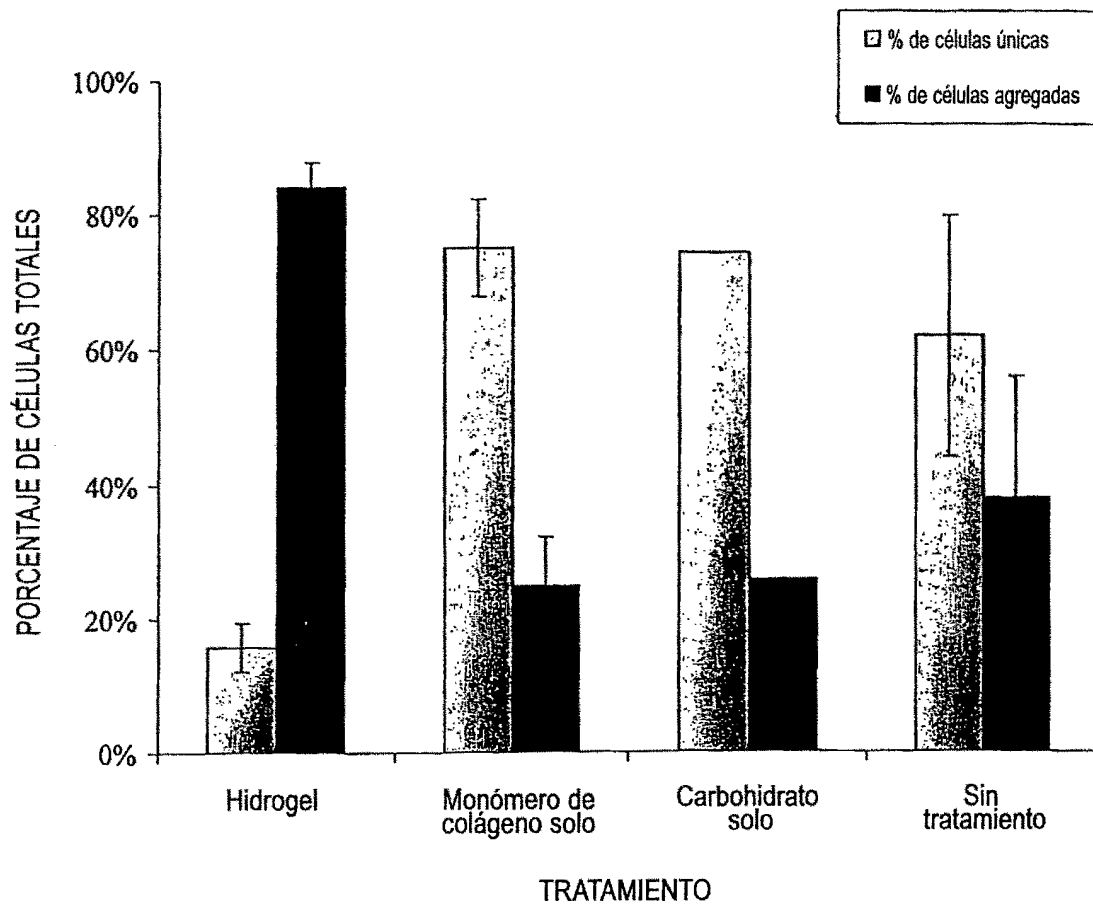


FIGURA 5

Expresión de TGF- β 3 en fibroblastos de piel humana durante el tiempo
tras el tratamiento con hidrogel o medio libre de suero

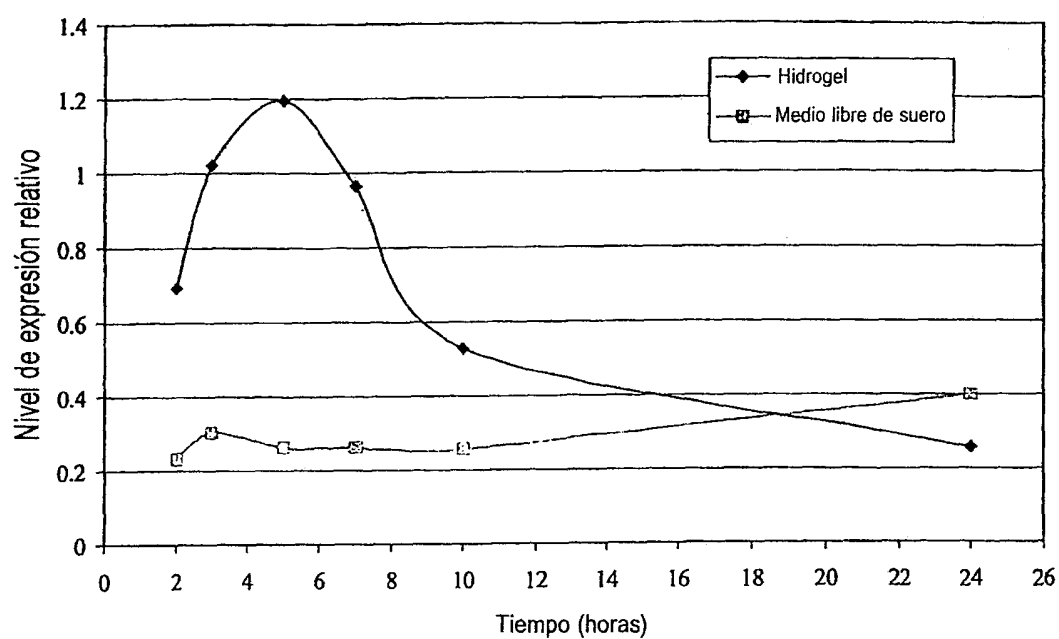


FIGURA 6

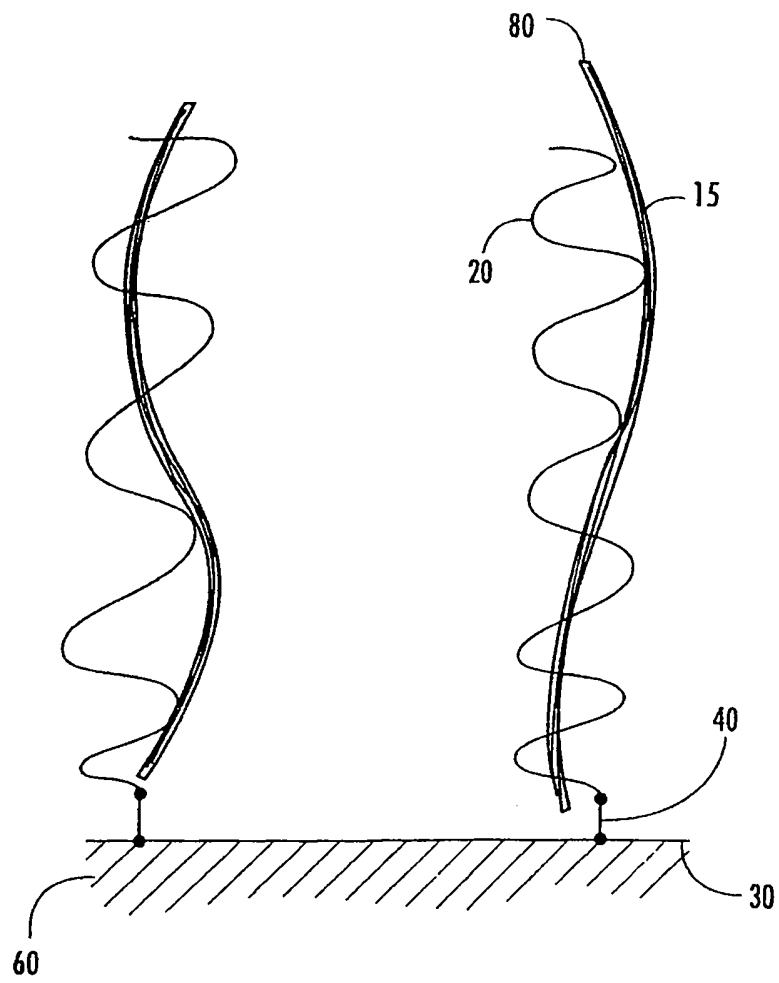


FIGURA 7

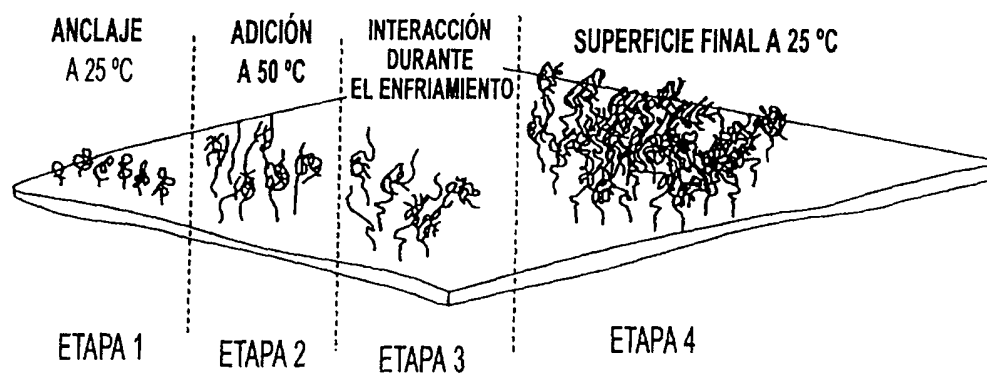


FIGURA 8

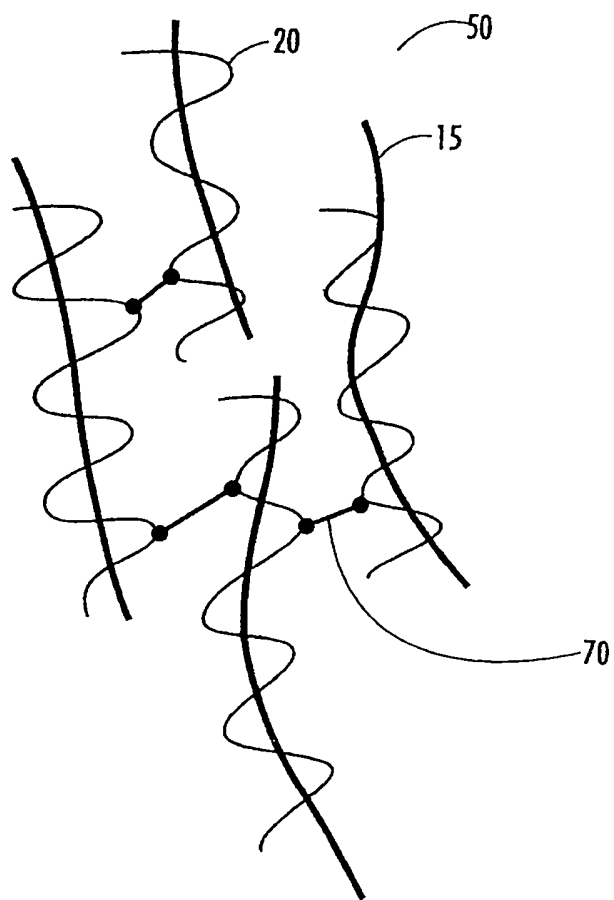


FIGURA 9