

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 890**

51 Int. Cl.:

A61K 47/58	(2007.01) A61K 31/74	(2006.01)
A61K 47/59	(2007.01) A61K 9/06	(2006.01)
A61K 47/60	(2007.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 47/69	(2007.01) A61P 41/00	(2006.01)
A61L 24/00	(2006.01) C08F 220/58	(2006.01)
A61L 24/06	(2006.01) C08F 220/56	(2006.01)
A61L 26/00	(2006.01) C08F 220/28	(2006.01)
A61L 27/16	(2006.01) C08F 220/36	(2006.01)
A61L 27/52	(2006.01) A61K 47/32	(2006.01)
C08F 220/54	(2006.01) A61K 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016** **PCT/AU2016/050653**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017** **WO17015703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016** **E 16829490 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3325527**

54 Título: **Polímero antiséptico y síntesis del mismo**

30 Prioridad:

24.07.2015 AU 2015902943

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

11.10.2024

73 Titular/es:

TRIMPH IP PTY LTD (100.0%)
Suite 5307, Level 53, 19-29 Martin Place
Sydney, NSW 2000, AU

72 Inventor/es:

FATHI, ALI y
DEHGHANI, FARIBA

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 981 890 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polímero antiséptico y síntesis del mismo

5 Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional australiana núm. 2015902943 presentada el 24 de julio de 2015.

10 Campo técnico

La presente invención se refiere a polímeros útiles en aplicaciones biomédicas. En particular, la invención se refiere a un nuevo polímero que comprende hasta cinco unidades monoméricas ajustables en sus proporciones relativas para provocar propiedades clínicas deseadas tales como activación por temperatura, solubilidad en agua, resistencia mecánica, biocompatibilidad y propiedades analgésicas/antiinflamatorias. La incorporación de propiedades analgésicas/antiinflamatorias sostenidas dentro de un polímero biocompatible de este tipo es a la vez un objetivo y una ausencia notable en la técnica.

15 Aunque la presente invención se describirá a continuación con referencia a su modalidad preferida, los expertos en la técnica apreciarán que el alcance de la invención puede llevarse a la práctica de muchas otras formas.

Antecedentes de la invención

25 Cualquier discusión sobre documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente descripción no debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o eran de conocimiento general común en el campo relevante para la presente descripción tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

30 Los hidrogeles se conocen por sus aplicaciones prácticas en los campos de la ingeniería de tejidos, la cicatrización de la herida y la administración de fármacos. Sin embargo, sobre la administración *in vivo* de hidrogeles, las respuestas inmunitarias a cuerpos extraños y la inflamación crónica pueden provocar complicaciones clínicas graves. La adición física de fármacos antisépticos/antiinflamatorios dentro de un hidrogel también puede provocar solo efectos temporales debido a la liberación rápida del fármaco en etapas muy tempranas después de la operación; una vez que se agota la dosis inicial de antiséptico, puede ocurrir fácilmente una infección en el sitio quirúrgico.

35 En consecuencia, un punto de partida apropiado a partir del cual puede evaluarse más completamente la presente invención es la solicitud de patente anterior del propio solicitante, PCT/AU2012/001566 (WO 2013/091001); se realiza una descripción correspondiente en la publicación bibliográfica posterior, *Biomaterials*, 35 (2014), págs. 5425-5435 (en adelante, colectivamente, "P1").

40 P1 tiene como objetivo desarrollar hidrogeles de proteínas de origen natural citocompatibles e inyectables con características de gelificación modificables/ajustables, propiedades mecánicas favorables y estabilidad estructural para aplicaciones de carga. Un copolímero termosensible, metacrilato de poli(metacrilato de N-isopropilacrilamida-copolilactida-metacrilato de 2-hidroxietilo-co-monometil éter de oligo(etilenglicol) ("PNPHO"), se funcionalizó con grupos éster de succinimida mediante la incorporación de un componente monomérico de N-acriloxisuccinimida. Estos grupos éster se aprovecharon para unir covalentemente PNPHO a diferentes proteínas con grupos amino primarios tales como la α -elastina y el colágeno en medios acuosos. La incorporación de elastina mediante la formación de enlaces covalentes con PNPHO promovió a su vez la estabilidad estructural, propiedades mecánicas ventajosas y la proliferación de células vivas dentro de la estructura de los hidrogeles que contienen PNPHO.

50 Los resultados obtenidos en P1 demuestran que las soluciones de elastina-co-PNPHO se inyectaron a través de agujas de calibre fino y se convirtieron en hidrogeles *in situ* a 37 °C en ausencia de cualquier reactivo reticulante. Al alterar el contenido y la composición de PNPHO, el tiempo de gelificación de estos hidrogeles podría ajustarse con precisión dentro del intervalo de 2-15 minutos para garantizar la compatibilidad con los requisitos quirúrgicos. Además, estos hidrogeles exhibieron módulos de compresión en el intervalo de 40-145 kPa, que son sustancialmente más altos que los de los hidrogeles a base de elastina desarrollados anteriormente. Estos hidrogeles fueron altamente estables en el ambiente fisiológico con evidencia de una pérdida de masa de 10 % en peso después de 30 días de incubación en un ambiente simulado.

60 Además, esta clase de hidrogeles era bioabsorbible *in vivo* debido al aumento gradual de la temperatura crítica inferior de la solución del copolímero por encima de 37 °C como resultado de la escisión de la polilactida del copolímero PNPHO. Además, P1 demuestra que más del 80 % de las células encapsuladas en estos hidrogeles permanecieron viables y el número de células encapsuladas aumentó durante un período de al menos cinco días. Estas propiedades únicas marcaron a los hidrogeles de elastina-co-PNPHO como candidatos favorables para una amplia gama de aplicaciones de la ingeniería de tejidos.

Desde una perspectiva de patentabilidad, la diferencia esencial entre P1 y la presente invención es la presencia de una unidad monomérica antiséptica de ácido 2-hidroxi-5-*N*-metacrilamidobenzoico (5-HMA) y/o ácido 2-hidroxi-4-*A*-metacrilaniidobenzoico (4-HMA) en este último. P1 describe un polímero (z.e., "PNPHO") que comprende los otros cuatro monómeros. Sin embargo, es significativo que P1 carezca de cualquier enseñanza de que se debería buscar aumentar el polímero PNPHO con 5-HMA, 4-HMA (o una de sus combinaciones, o incluso cualquier monómero que confiera propiedades antisépticas). Como tal, P1 no proporciona ninguna motivación aparente para que el experto en la técnica busque un polímero PHPHO aumentado con un resto antiséptico, y mucho menos, un resto antiséptico capaz de una liberación sostenida durante un período correspondiente al de la cicatrización de la herida inicial.

Además, se podría argumentar que cualquier conocimiento previo de que tras la administración *in vivo* de hidrogeles, las respuestas inmunitarias a cuerpos extraños y la inflamación crónica pueden conducir a complicaciones clínicas graves, desvía al experto de la presente invención. Con este fin, la inclusión de un resto antiséptico es algo contraria a la intuición porque, como se mencionó anteriormente, se sabe que la adición física de fármacos antisépticos/antiinflamatorios a los hidrogeles provoca solo un efecto temporal debido a la liberación rápida de los fármacos en etapas muy tempranas después de la operación. A partir de esto, el experto probablemente deduciría que un resto que confiera propiedades antisépticas durante el período de curación de una cirugía, aunque deseada, era en gran medida inalcanzable. Como tal, la sabiduría aceptada simplemente identifica el problema; no parece proporcionar ninguna indicación sobre cómo el experto debería tratar de abordarlo. Como tal, la ausencia de un resto antiséptico factible dentro de un portador de hidrogel se ha identificado como un defecto conocido de la técnica.

En el pasado, el ácido salicílico se ha unido químicamente con diferentes monómeros, por ejemplo, ácido 3,5-di(acrililoximetil)salicílico y ácido 3-metil-5-acrililoximetilsalicílico. Sin embargo, en ningún momento se ha proporcionado una clase de hidrogeles termoendurecibles a base de ácido salicílico inyectables con la capacidad de unirse con péptidos naturales y sintéticos. Estas características, junto con las propiedades de biodegradación y el comportamiento adhesivo al tejido harían de cualquier biomaterial de este tipo un candidato adecuado para abordar desafíos clínicos no resueltos.

Además de P1, un artículo de revisión de Ward y Georgiou, titulado "Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications" (*Polymers*, 2011, 3:1215-42) ("P2") puede considerarse relevante como enseñanza de la técnica anterior aproximadamente en 2011. Este documento resume las propiedades, estructura química y aplicaciones de diferentes hidrogeles termosensibles. Como se señaló en P2, los principales componentes y características de algunos de los hidrogeles más notables se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 - Técnica anterior según lo caracterizado por el documento de revisión "P2"

Técnica anterior, caracterizada por P2		Comparación con la presente invención
Material	Características	
Metacrilato de butilo-poli(N-isopropilacrilamida	Dos componentes principales (a) metacrilato de butilo y (b) NIPAAm; comportamiento de transición de fase a aproximadamente 32 °C; y adecuado para la administración de fármacos	Las cinco unidades monoméricas de PAS no se describen ni se enseñan en ninguno de los ejemplos proporcionados en P2. Además, P2 no proporciona ningún indicio o sugerencia de que un polímero, cuando se incorpora dentro de un portador de hidrogel, pueda ser ajustable.
Poli(N-isopropilacrilamida y metacrilato de hidroxietilo	Dos componentes (a) NIPAAm y (b) HEMA; comportamiento de transición de fase a aproximadamente 32 °C; ningún control sobre las propiedades mecánicas; y ningún estudio sobre el comportamiento de degradación del polímero	
Polipéptidos similares a elastina	Un segmento principal (péptidos de elastina); falta de resistencia mecánica; gelificación a aproximadamente 30 °C; y formación de nanopartículas	
Poli(N-isopropilacrilamida)-polilactida-dextrano	Dos componentes (a) NIPAAm y (b) PLA-dextrano; biodegradable; y propiedades mecánicas ajustables	Este copolímero puede formar enlaces amida covalentes con todos los péptidos que tienen grupos amina libre, tales como los RGD sintéticos.

El documento núm. JP H08 119822 describe un polímero que comprende 5-HMA, HEMA, metacrilato de metoxipolietilenglicol y ácido metacrililaminofenilbórico. El documento núm. US5530038 describe un polímero que comprende 5-HMA, HEMA, metacrilato de 2-hidroxi-3-fenoxipropilo y ácido 4-metacrililoxitrimelítico. El documento núm. FR 2629084 describe un polímero que comprende un monómero de indometacina, HEMA, N-vinilpirrolidona y ácido acrílico.

Además, ninguna parte de la literatura de patentes conocida por el solicitante en el momento de la presentación de la solicitud parece describir o enseñar un polímero que contiene antiséptico/analgésico, y mucho menos ninguna forma comercial o aplicación médica de dicho polímero. Ejemplos representativos incluyen: Los documentos núms. US 8,741,317; US 2005/0233003; US 3,290,270; KR 2014093349; CN 201310103994; US 2012/0288564; US 2009/0226519; US 2013/0261212; WO 2014/126537; UA 92027; US 2008/0044476; US 2010/0048473; US 2013/0209532; US 2012/0258068; US 2008/0293827; US 2011/0223230; WO 2001/036000; US 2006/0115457; US 2012/0220691; US 2014/302144; WO 2014/041231; y WO 2014/116187.

Finalmente, ninguna parte de la literatura científica conocida por el solicitante enseña o sugiere un polímero que contiene antiséptico/analgésico. Una muestra representativa incluye: Elvira, y otros, *Polymers*, 1997, 38:4743-50; Elvira, y otros, *J. Mater. Set. Mater. Med.*, 2001;12: 535-42; Zheng, y otros, *Biomaterials*, 2004, 25: 1339-48; Park, y otros, *Macromol. Symp.*, 2007, 249-250: 145-50; Bessa, y otros, *J. Control Release*, 2010, 142:312-8; Chaipinyo, y otros, *J. Orthop. Res.*, 2004, 22: 446-55; Nicodemus y Bryant, *J. Biomech.*, 2008, 41: 1528-36; Eastoe, *Biochem J.*, 1955, 61:589-600; Ouimet, y otros, *Macromol. Biosci.*, 2015, 15:342-50; y Guan, y otros, *Sci. World J.*, 2014, 2014: 1-9.

Un objetivo preferido de la presente invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

También es un objetivo preferido de una forma particularmente preferida de la presente invención proporcionar un polímero para aplicaciones biomédicas que comprenda un resto antiséptico factible/sostenible. Como se identificó anteriormente, los polímeros conocidos de este tipo están limitados por la liberación rápida del resto antiséptico. En consecuencia, una forma preferida de la presente invención busca proporcionar un polímero que comprende unidades monoméricas "ajustables" en sus proporciones relativas para provocar las siguientes propiedades clínicas deseadas: activación por temperatura, solubilidad en agua, resistencia mecánica, biocompatibilidad y propiedades analgésicas/antiinflamatorias. La proporción relativa de cada monómero proporciona la "capacidad de ajuste" del polímero en dependencia de su aplicación específica. Por ejemplo, cuando se desea un efecto antiséptico más pronunciado, se incorpora una mayor proporción del resto antiséptico dentro del polímero. Como se describe más abajo, las modalidades preferidas del polímero de la invención pueden comprender aproximadamente un 5 % en moles de resto antiséptico (5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones); esta cantidad puede variar en dependencia del resultado clínico preciso buscado.

Aunque la invención se describirá con referencia a ejemplos específicos, los expertos en la técnica apreciarán que la invención puede llevarse a la práctica de muchas otras formas.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, se proporciona en la presente descripción un polímero que comprende al menos una unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria que comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico seleccionado de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones; una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA); una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA); una unidad monomérica reactiva a proteína-polisacárido en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS); y una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).

En un segundo aspecto, se proporciona en la presente descripción un método para la síntesis de un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto, dicho método que comprende la polimerización por radicales libres de una cantidad molar predeterminada de un iniciador; con una cantidad molar predeterminada de una unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria que comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico seleccionado de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones; con respectivas cantidades molares predeterminadas de una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA); una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA); una unidad monomérica reactiva a proteínas en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS); y una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).

En un tercer aspecto, en la presente descripción se proporciona un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso en aplicaciones médicas seleccionadas de un sellador quirúrgico, un apósito para la cicatrización de la herida, un relleno, o el soporte para la regeneración de tejidos *in vivo* o el crecimiento celular *in vitro*.

En un cuarto aspecto, se proporciona en la presente descripción un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso en el tratamiento de afecciones médicas que comprenden cánceres, en particular, cáncer de pulmón.

En un quinto aspecto, en la presente descripción se proporciona un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso como un sellador quirúrgico, apósito para la cicatrización de la herida, relleno o un soporte para la regeneración de tejidos *in vivo*.

Definiciones

Con respecto a las definiciones proporcionadas en la presente descripción, a menos que se indique de cualquier otra manera o esté implícito en el contexto, los términos y las frases definidos incluyen los significados proporcionados. A menos que se indique de cualquier otra manera, o sea evidente a partir del contexto, los términos y las frases más abajo no excluyen el significado que el término o la frase ha adquirido por un experto en la técnica pertinente. Las definiciones se proporcionan para ayudar a describir modalidades particulares, y no se destinan a limitar la invención reivindicada, porque el alcance de la invención se limita solo por las reivindicaciones. Además, a menos que se requiera de cualquier otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

A lo largo de la presente descripción, pueden presentarse diversos aspectos y componentes de la invención en un formato de intervalo. El formato de intervalo se incluye por conveniencia y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo describa específicamente todos los posibles subintervalos así como también los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo, a menos que se indique específicamente. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 5 tiene subintervalos específicamente descritos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 5, de 3 a 5, etc., así como también números individuales y parciales dentro del intervalo mencionado, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 5,5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo descrito. Cuando se requieran valores específicos, estos se indicarán en la descripción.

A menos que el contexto lo requiera claramente de cualquier otra manera, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprende", "que comprende" y similares deben interpretarse en un sentido opuesto inclusivo a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "que incluye, pero no se limita a".

Para los propósitos de interpretación de esta descripción, los términos usados en el singular también incluirán el plural y *viceversa*.

Breve descripción de los dibujos

Una modalidad preferida de la invención se describirán ahora, a manera de ejemplo solamente, con referencia a las figuras acompañantes.

La Figura 1 es una representación esquemática del polímero PAS de la presente invención. El monómero termoendurecible se representa como la cadena principal de NIPAAm; el monómero OEGMA soluble en agua se denomina "E"; la resistencia mecánica que confiere al monómero PLA/HEMA se denomina "L"; el monómero NAS reactivo a proteínas se denomina "N"; y el monómero antiséptico 5-HMA se denomina "S". Como se indicó en otra parte, el resto 5-HMA es fácilmente intercambiable o combinable con 4-HMA. El número de cada uno de dichos monómeros en la figura representa su proporción relativa.

La Figura 2 es un espectro de ^1H NMR del polímero PAS, con las respectivas resonancias asignadas como se indica. El espectro confirma fácilmente la incorporación de las cinco unidades monoméricas dentro del polímero, con los protones antisépticos 5-HMA designados "o" apareciendo, de acuerdo con lo esperado, en aproximadamente 1,5 ppm.

La Figura 3 muestra la eficacia biológica del PAS cuando se incorpora dentro de un portador de hidrogel (PASGel). Se muestran los resultados de un estudio preliminar de citocompatibilidad en el que el recuento de células viables aumentó de aproximadamente $6,5 \times 10^3$ en el día "0" a aproximadamente 9×10^3 el día "7"; un aumento aproximado del 50 % en un período de una semana.

La Figura 4 también muestra la eficacia biológica del PAS cuando se incorpora dentro de un portador de hidrogel (PASGel). Se muestran los resultados de un estudio preliminar de recuento de colonias microbianas en el que la muestra de PASGel en el día "21" admitió solo aproximadamente 2×10^8 CFU; esto es aproximadamente un tercio del recuento original (día "1").

La Figura 5 muestra que el PASGel da lugar a propiedades mecánicas ventajosas por medio de las resistencias a la compresión y la tracción (311 ± 47 kPa y 781 ± 116 kPa, respectivamente), así como también las pruebas de adhesión al tejido (970 kPa).

La Figura 6 muestra un esquema del aparato usado para realizar un estudio de viabilidad para determinar si un sistema PASGel puede prevenir la hemorragia en un sujeto. La letra "h" denota la variable para ajustar la presión en el sistema.

Descripción de las modalidades

En la presente descripción se describe una clase de polímeros, a base de polímero de poli(N-isopropilacrilamida-co-N-acriloxisuccinimida-co-metacrilato de 2-hidroxietilo/polilactida-co-metacrilato de monometil éter de oligo(etilenglicol)-co-ácido salicílico), denominado en lo sucesivo "PAS". El polímero PAS comprende derivados de éster metacrílico de

ácido salicílico (5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones) que muestran propiedades analgésicas y antiinflamatorias superiores en comparación con la aspirina.

Además, la estructura molecular del PAS está diseñada con la intención de abordar los requisitos clínicos de un biomaterial para la regeneración de tejidos, la cicatrización de la herida y la administración de fármacos. Estos requisitos son, a grandes rasgos: (a) solubilidad en agua; (b) reactividad a proteína/péptido; (c) un mecanismo de reticulación biológicamente benigno; y (d) biodegradabilidad. Por lo tanto, el polímero PAS descrito incorpora una combinación de tales propiedades, que pueden ajustarse en dependencia de la aplicación clínica precisa a la que se extiende.

Para mejorar las características de solubilidad en agua, PAS incorpora un segmento hidrófilo de etilenglicol (OEGMA) en su estructura molecular. El polímero PAS también puede unirse con proteínas en solución acuosa debido a un segmento de N-acriloxisuccinimida (NAS). La presencia de una fracción térmicamente sensible en la forma de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) puede inducir la formación de hidrogel a la temperatura corporal sin la necesidad de añadir ningún químico o reactivo externo. Además, el polímero PAS es bioabsorbible tras la escisión de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA) del polímero. Finalmente, se proporciona un resto analgésico/antiséptico en la forma de derivados de éster metacrílico de ácido salicílico (5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones). La estructura molecular del polímero PAS y la función de cada segmento se muestran esquemáticamente en la Figura 1. Se apreciará que las proporciones relativas de cada unidad monomérica proporcionan la supuesta capacidad de ajuste del polímero PAS en dependencia de la aplicación clínica a la que se aplicará el polímero PAS.

El solicitante ha descubierto inesperadamente que el polímero PAS, cuando se incorpora dentro de un portador de hidrogel, tiene propiedades fisicoquímicas que pueden ajustarse a una o más necesidades clínicas específicas (por ejemplo, capacidad de respuesta a la temperatura, biocompatibilidad, propiedades mecánicas, *etc.*). En particular, el polímero PAS comprende derivados de éster metacrílico de ácido salicílico (5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones) que ha demostrado mostrar excelentes propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

En consecuencia, en la presente descripción se describe la síntesis de poli(N-isopropilacrilamida-co-N-acriloxisuccinimida-co-2-metacrilato de hidroxietilo/polilactida-co-metacrilato de monometil éter de oligo(etilenglicol)-co-ácido salicílico), denominado en lo sucesivo como PAS. Este polímero tiene el potencial de abordar muchas de las deficiencias actuales asociadas con materiales conocidos, tales como la inflamación crónica, la baja adhesividad al tejido huésped, la baja actividad biológica y el mecanismo de reticulación citotóxico.

En su forma más amplia, la presente descripción se refiere al polímero PAS, *per se*. El polímero PAS comprende unidades monoméricas ajustables en sus proporciones relativas para provocar las siguientes propiedades clínicas deseadas: activación por temperatura, solubilidad en agua, resistencia mecánica, biocompatibilidad y propiedades analgésicas/antiinflamatorias; la proporción relativa de cada monómero proporciona la capacidad de ajuste del polímero PAS en dependencia de su aplicación específica.

En un primer aspecto, se proporciona en la presente descripción un polímero que comprende al menos una unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria que comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico seleccionado de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones;

una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA);
una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA);
una unidad monomérica reactiva a proteína-polisacárido en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS);
y una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).

La unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico (5-HMA o 4-HMA, o una de sus combinaciones).

En una modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, 5-HMA o 4-HMA, o una de sus combinaciones, en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 2 % en moles a aproximadamente 10 % en moles, por ejemplo: aproximadamente 2 % en moles, aproximadamente 3 % en moles, aproximadamente 4 % en moles, aproximadamente 5 % en moles, aproximadamente 6 % en moles, aproximadamente 7 % en moles, aproximadamente 8 % en moles, aproximadamente 9 % en moles o aproximadamente 10 % en moles.

Las unidades monoméricas adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA); una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA); una unidad monomérica reactiva a proteína/polisacárido en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS); y una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).

En una modalidad, las proporciones relativas de cada una de dichas unidades monoméricas permiten ajustar/optimar el polímero resultante para una aplicación clínica definida, en la que determinadas propiedades

físicas/químicas/biológicas se prefieren sobre otras.

En una modalidad, las propiedades antisépticas/analgésicas/antiinflamatorias definidas se prefieren en aplicaciones en las que la inflamación crónica puede conducir a complicaciones clínicas.

En una modalidad, la unidad monomérica soluble en agua, en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA), proporciona una solubilidad en agua definida, que evita de esta manera sustancialmente el uso de solventes orgánicos en la preparación del polímero.

En una modalidad, la unidad monomérica soluble en agua, en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA), proporciona un tiempo de gelificación controlable, para proporcionar a su vez una gelificación relativamente rápida para zonas superficiales/selladores quirúrgicos y/o gelificación relativamente lenta para la regeneración profunda de tejidos. En la presente descripción, se considera "gelificación rápida" la formación de un gel en menos de 1 minuto a 37 °C. En una modalidad, el resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA) proporciona un tiempo de gelificación rápido.

En una modalidad, la unidad monomérica que confiere resistencia mecánica proporciona resistencia mecánica, flexibilidad y elasticidad controlables para ajustar el polímero a los requisitos específicos de una aplicación determinada.

En una modalidad, la unidad monomérica que confiere resistencia mecánica proporciona al polímero un comportamiento adhesivo al tejido, que facilita de esta manera la retención de un depósito de dicho polímero en un sitio de administración.

En una modalidad, la unidad monomérica que confiere resistencia mecánica, en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA), proporciona: propiedades de degradación, en donde el hidrogel es bioabsorbible a través del riñón tras la escisión gradual de PLA; y adhesividad al tejido, para evitar el desplazamiento y la fuga del hidrogel a los tejidos circundantes. La longitud de las unidades PLA puede adaptarse a las aplicaciones. En una modalidad, la unidad PLA/HEMA comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades PLA. Por ejemplo, la unidad PLA/HEMA puede comprender 5 unidades PLA.

En una modalidad, la cantidad de unidad monomérica soluble en agua y la resistencia mecánica que confiere a la unidad monomérica proporcionan un comportamiento de biorresorción controlable.

En una modalidad, la unidad monomérica reactiva a proteínas, en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS), proporciona: reactividad a péptidos por medio de la unión de diferentes péptidos y polisacáridos biológicamente activos al hidrogel para promover la velocidad de la formación de tejidos.

En una modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, NAS, en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 15 % en moles, por ejemplo aproximadamente 10 % en moles, aproximadamente 11 % en moles, aproximadamente 12 % en moles, aproximadamente 13 % en moles, aproximadamente 14 % en moles o aproximadamente 15 % en moles.

En una modalidad, la unidad monomérica termoendurecible, en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm), proporciona: propiedades termoendurecibles por medio de la inducción de la formación de estructura *in situ* a aproximadamente 37 °C.

En otra modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, NIPAAm, en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 60 % en moles a aproximadamente 80 % en moles, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 60 % en moles a aproximadamente 70 % en moles, o un intervalo de aproximadamente 70 % en moles a aproximadamente 80 % en moles. Los valores ilustrativos incluyen aproximadamente 68 % en moles, o aproximadamente 75 % en moles.

En una modalidad, el polímero se disuelve en una solución acuosa con un contenido en masa de 10 mg/ml a 700 mg/ml a 0-35 °C, por ejemplo, el contenido en masa puede estar en un intervalo de 35 mg/ml a 400 mg/ml a 0-35 °C.

En una modalidad, el polímero forma micro o macroestructuras *in situ* al aumentar la temperatura a 37 °C o más.

En una modalidad, la eficacia biológica del polímero puede confirmarse por medio de estudios de citocompatibilidad y recuento de colonias microbianas.

En una modalidad, el polímero tiene un módulo de compresión en un intervalo de aproximadamente 200 kPa a aproximadamente 400 kPa. Por ejemplo, el módulo de compresión puede ser: aproximadamente 200 kPa, aproximadamente 220 kPa, aproximadamente 240 kPa, aproximadamente 260 kPa, aproximadamente 280 kPa, aproximadamente 300 kPa, aproximadamente 320 kPa, aproximadamente 340 kPa, aproximadamente 360 kPa, aproximadamente 380 kPa o aproximadamente 400kPa.

En otra modalidad, el polímero puede tener un módulo de tracción en un intervalo de aproximadamente 500 kPa a aproximadamente 800 kPa. Por ejemplo, el módulo de tracción puede ser: aproximadamente 500 kPa, aproximadamente 520 kPa, aproximadamente 540 kPa, aproximadamente 560 kPa, aproximadamente 580 kPa, aproximadamente 600 kPa, aproximadamente 620 kPa, aproximadamente 640 kPa, aproximadamente 660 kPa, aproximadamente 680 kPa, aproximadamente 700 kPa, aproximadamente 720 kPa, aproximadamente 740 kPa, aproximadamente 760 kPa, aproximadamente 780 kPa o aproximadamente 800 kPa.

En una modalidad, las propiedades mecánicas del hidrogel polimérico, por medio de resistencias a la compresión y a la tracción, son aproximadamente 311 ± 47 kPa y aproximadamente 781 ± 116 kPa, respectivamente.

En otra modalidad, el polímero puede tener una resistencia al cizallamiento de adhesión en un intervalo de aproximadamente 900 kPa a aproximadamente 1200 kPa. Alternativamente, la resistencia al cizallamiento de adhesión puede ser: al menos aproximadamente 900 kPa, al menos aproximadamente 920 kPa, al menos aproximadamente 940 kPa, al menos aproximadamente 960 kPa, al menos aproximadamente 980 kPa, al menos aproximadamente 1000 kPa, al menos aproximadamente 1020 kPa, al menos aproximadamente 1040 kPa, al menos aproximadamente 1060 kPa, al menos aproximadamente 1080 kPa, al menos aproximadamente 1100 kPa, al menos aproximadamente 1120 kPa, al menos aproximadamente 1140 kPa, al menos aproximadamente 1160 kPa, al menos aproximadamente 1180 kPa, o al menos unos 1200 kPa.

En una modalidad, en las pruebas de adhesión al tejido, el polímero puede tener una resistencia al cizallamiento de adhesión de al menos aproximadamente 970 kPa.

En una modalidad, el polímero está representado, esquemáticamente, por la estructura proporcionada en la Figura 1 de las figuras adjuntas.

En una modalidad, el polímero es clínicamente útil. Por ejemplo, el polímero puede usarse como: sellador quirúrgico, apósito para la cicatrización de la herida, relleno y/o un soporte para la regeneración de tejidos *in vivo*.

En una modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, menos de aproximadamente 5 % en moles de OEGMA, para provocar de esta manera la solubilidad en agua. En otra modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, OEGMA en un intervalo de aproximadamente 2 % en moles a aproximadamente 5 % en moles, por ejemplo aproximadamente 2 % en moles, aproximadamente 3 % en moles, aproximadamente 4 % en moles o aproximadamente 5 % en moles.

En una modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, PLA/HEMA en un intervalo de aproximadamente 2 % en moles a aproximadamente 10 % en moles. Por ejemplo, el PLA puede estar presente en una cantidad de: aproximadamente 2 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 3 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 4 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 5 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 6 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 7 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 8 % en moles de PLA/HEMA, aproximadamente 9 % en moles de PLA/HEMA, o aproximadamente 10 % en moles de PLA/HEMA.

En una modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, más de aproximadamente 8 % en moles de PLA/HEMA. En particular, en una modalidad el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, más de aproximadamente 8 % en moles de PLA/HEMA en una modalidad para provocar de esta manera la formación de hidrogel a aproximadamente 37 °C. Por ejemplo, el polímero puede comprender más de aproximadamente 8 % en moles de PLA/HEMA, más de aproximadamente 9 % en moles de PLA/HEMA, más de aproximadamente 10 % en moles de PLA/HEMA, más de aproximadamente 11 % en moles de PLA/HEMA, más de aproximadamente 12 % en moles de PLA/HEMA, más de aproximadamente 13 % en moles de PLA/HEMA, más de aproximadamente 14 % en moles de PLA/HEMA, o más de aproximadamente 15 % en moles de PLA/HEMA.

En una modalidad, el polímero comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, NIPAAm (68 % en moles), NAS (14 % en moles), PLA/HEMA (8 % en moles), OEGMA (5 % en moles) y 5-HMA (5 % en moles). En otra modalidad, se aplicó 4-HMA (5 % en moles) como el resto antiséptico. En otra modalidad, se aplicó una combinación de 5-HMA (2,5 % en moles) y 4-HMA (2,5 % en moles) como el resto antiséptico. Entre otras propiedades, el polímero de estas modalidades es soluble en agua y forma un hidrogel a aproximadamente 37 °C; también provoca propiedades antibacterianas/antisépticas deseadas por medio del componente 5-HMA (o 4-HMA, o una de sus combinaciones).

En una modalidad, el polímero proporciona una administración relativamente segura y efectiva *in vivo* de dicho polímero a un sitio quirúrgico sin complicaciones clínicas por medio de respuestas inmunitarias a cuerpos extraños e inflamación crónica en un sujeto.

En una modalidad, el polímero proporciona un vehículo para prevenir la liberación rápida de los efectos antisépticos/analgésicos/antiinflamatorios de los derivados de éster metacrílico de ácido salicílico, durante un período de aproximadamente 0 días a aproximadamente 270 días o al reducir de esta manera la incidencia basada en el tiempo de infección en un sitio quirúrgico.

En una modalidad, el período de aproximadamente 0 a aproximadamente 270 días es preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 260 días; con mayor preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 240 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 40 a aproximadamente 230 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 220 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 210 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 70 a aproximadamente 200 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 80 a aproximadamente 190 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 90 a aproximadamente 180 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 100 a aproximadamente 170 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 110 a aproximadamente 160 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 110 a aproximadamente 150 días; aún con mayor preferencia de aproximadamente 120 a aproximadamente 140 días; y aún con mayor preferencia aproximadamente 130 días.

Se incluye dentro del período definido de aproximadamente 0 a aproximadamente 270 días: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269 y 270 días, así como también días parciales.

En una modalidad, el polímero se une con péptidos o polisacáridos naturales y sintéticos.

En una modalidad, el polímero comprende además, o es compatible con, una o más células para ayudar en la reparación del tejido biológico. Las células pueden ser células regenerativas, que incluyen, pero no se limitan a: fibroblastos, células endoteliales, células progenitoras o mezclas de las mismas.

En una modalidad, la una o más células están distribuidas de forma relativamente uniforme por todo el polímero.

En una modalidad, el número de la una o más células en el polímero está entre aproximadamente 10^2 y aproximadamente 10^8 células/ml. En otra modalidad, el número de la una o más células en el polímero está entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^5 células/ml.

En un segundo aspecto, se proporciona en la presente descripción un método para la síntesis de un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto, dicho método que comprende la polimerización por radicales libres de una cantidad molar predeterminada de un iniciador; con una cantidad molar predeterminada de una unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria que comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico seleccionado de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones; con respectivas cantidades molares predeterminadas de: una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA); una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA); una unidad monomérica reactiva a proteínas en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS); y una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).

En una modalidad, el método comprende además una etapa de extracción en donde el polímero se precipita en agua a aproximadamente 32 °C para eliminar los monómeros que no han reaccionado y se filtra, para proporcionar de esta manera un polímero PAS crudo.

En una modalidad, el método comprende además una etapa de purificación en donde el polímero precipitado se disuelve en etanol y se vuelve a precipitar en agua a aproximadamente 32 °C, para proporcionar de esta manera un polímero PAS purificado.

En una modalidad, el polímero se seca a presión reducida durante un período de aproximadamente 48 horas a una temperatura de aproximadamente 40 °C antes de su uso.

La unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria es 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones; y, la unidad monomérica soluble en agua es NIPAAm; la unidad monomérica que confiere resistencia mecánica es NAS; la unidad monomérica reactiva a proteínas es PLA/HEMA; y la unidad monomérica termoendurecible es OEGMA.

En una modalidad, la cantidad molar predeterminada de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones es aproximadamente 5 % en moles; y si está presente, la cantidad molar predeterminada de NIPAAm es aproximadamente 68 % en moles; la cantidad molar predeterminada de NAS es aproximadamente 14 % en moles; la cantidad molar predeterminada de PLA/HEMA es aproximadamente 8 % en moles; y la cantidad molar predeterminada

de OEGMA es aproximadamente 5 % en moles. El experto reconocerá esto solo como una modalidad representativa; las proporciones relativas pueden cambiarse en dependencia de la necesidad clínica.

En un tercer aspecto, en la presente descripción se proporciona un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso en aplicaciones médicas. Las aplicaciones médicas pueden incluir el uso como un sellador quirúrgico, un apósito para la cicatrización de la herida, un relleno o el polímero puede usarse para el soporte para la regeneración de tejidos *in vivo* y/o el crecimiento celular *in vitro*.

En un cuarto aspecto, en la presente descripción se proporciona un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso en el tratamiento de afecciones médicas que comprenden cánceres. En una modalidad, los cánceres comprenden cáncer de pulmón; sin embargo, se apreciaría que el polímero descrito en la presente descripción tiene propiedades de sellado quirúrgico y puede ser adecuado con cualquier procedimiento de extirpación de tumores que sea propenso a hemorragia.

En un quinto aspecto, se proporciona en la presente descripción un polímero como se define de acuerdo con el primer aspecto para su uso como sellador quirúrgico, apósito para la cicatrización de la herida, relleno o un soporte para la regeneración de tejidos *in vivo*.

Cada uno de los aspectos de la invención, tal como se identifica en la presente descripción, está vinculado por la característica técnica especial del polímero PAS, *per se*. Así, la invención reside en el polímero PAS, las formas comerciales y los usos del mismo.

Sobre la base de la información de la técnica anterior conocida por el solicitante en el momento de la presentación de la solicitud, la novedad reside en un polímero que comprende la combinación específica de unidades monoméricas definidas por PAS.

Otros aspectos novedosos de la invención podrían incluir: métodos para la síntesis de PAS (formas "ajustadas" genéricas y específicas); PAS para su uso en aplicaciones médicas (por ejemplo, cáncer de pulmón); PAS para su uso en métodos de tratamiento médico (por ejemplo, cáncer de pulmón); un botiquín médico que comprende PAS y un hidrogel compatible (y opcionalmente una jeringa); y PAS cuando se incorpora dentro de un portador de hidrogel (*es decir*, PASGel).

Ejemplos

Se buscó el polímero PAS debido a que el solicitante había identificado deficiencias en la técnica, tales como inflamación crónica, baja adhesividad al tejido huésped, baja actividad biológica y un mecanismo de reticulación citotóxico. El polímero PAS comprende derivados de éster metacrílico de ácido salicílico (5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones) que a su vez presenta propiedades analgésicas y antiinflamatorias. El PAS es soluble en agua debido a la presencia de un segmento hidrófilo de etilenglicol (OEGMA). Este polímero también puede unirse con proteínas en solución acuosa a través de su segmento de N-acriloxisuccinimida (NAS). La presencia de una fracción térmicamente sensible (N-isopropilacrilamida, NIPAAm) induce la formación de hidrogel a la temperatura corporal sin la necesidad de añadir más reactivos. Finalmente, el polímero PAS es bioabsorbible tras la escisión de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA) del polímero.

La presencia de las cinco unidades monoméricas dentro del polímero de la invención se confirma fácilmente mediante ^1H NMR (Figura 2).

Los perfiles biológicos y físicos del polímero PAS pueden demostrarse fácilmente. Por ejemplo, la eficacia biológica del PAS cuando se incorpora dentro de un portador de hidrogel ("PASGel") se ha demostrado mediante estudios preliminares de citocompatibilidad y recuento de colonias microbianas (Figura 3 y Figura 4, respectivamente). Además, las propiedades mecánicas ventajosas fueron evidentes al analizar las resistencias a la compresión y a la tracción del polímero PAS (311 ± 47 kPa y 781 ± 116 kPa, respectivamente), así como también las pruebas de adhesión al tejido (Figura 5).

Tabla 2 - Forma y función de cada unidad monomérica del polímero PAS de la invención

Monómero	Rol/es	Significación
5-HMA, 4-HMA o combinación	Propiedades antiinflamatorias, antisépticas y antimicrobianas.	Suprime la inflamación crónica ya que esta inflamación puede provocar complicaciones clínicas graves.
OEGMA	Solubilidad en agua	Previene el uso de solventes orgánicos en la preparación de hidrogel para mejorar las propiedades biológicas del biomaterial.

5		Tiempo de gelificación controlable	Aborda las necesidades clínicas que están presentes para diferentes aplicaciones, gelificación rápida para zonas superficiales/selladores quirúrgicos y gelificación lenta para la regeneración de tejido profundo.
10	NAS	Reactividad a péptidos	Une diferentes péptidos biológicamente activos a PASGel para promover la señalización celular y la velocidad de la formación de tejidos,
15	NIPAAm	Propiedades termoendurecibles	Preferentemente induce la formación de hidrogel <i>in situ</i> a 37 °C; esto evita el uso de reactivos de reticulación tóxicos
		Inyectabilidad	Administra el hidrogel a diferentes partes del cuerpo de forma mínimamente invasiva.
20	HEMA/PLA	Degradación	Hace que PASGel sea bioabsorbible a través del riñón tras la escisión gradual de PLA
		Adhesión al tejido	Evita el desplazamiento y la fuga del hidrogel a los tejidos circundantes.

Las formas preferidas del polímero PAS, *per se*, pueden residir en PAS sintetizado con una alimentación de NIPAAm (68 % en moles), NAS (14 % en moles), PLA/HEMA (8 % en moles), OEGMA (5 % en moles) y 5-HMA/4-HMA (5 % en moles), en presencia de un iniciador tal como ácido 4,4'-azobis-4-cianoaléxico; se encuentra que esta composición es soluble en agua y formó un hidrogel a 37 °C.

Una distinción inmediata con respecto a la técnica anterior conocida es que, aunque el ácido salicílico se ha unido químicamente anteriormente con diferentes monómeros, por ejemplo, ácido 3,5-di(acrililoximetil)-salicílico; ácido 3-metil-S-acrililoximetil salicílico (ver, por ejemplo, documento núm. US 3,290,270), esta es la primera vez que se ha diseñado una clase de hidrogeles termoendurecibles inyectables a base de ácido salicílico con la capacidad de unirse con péptidos naturales y sintéticos. Estas características, junto con las propiedades de biodegradación y el comportamiento adhesivo al tejido de PASGel, hacen de este biomaterial un candidato adecuado para abordar los desafíos clínicos actualmente no resueltos.

El solicitante ha confirmado la formación de polímero PAS mediante análisis de H NMR. Además, los estudios *in vitro* mostraron la liberación gradual del ácido salicílico y su actividad biológica. Además, el solicitante ha confirmado la citocompatibilidad de PASGel con células de fibroblastos *in vitro*. Los experimentos de caracterización física también confirmaron el rendimiento mecánico adecuado del material desarrollado para la cicatrización de la herida y la ingeniería de tejidos.

Se requiere un estudio de citocompatibilidad *in vivo* con modelos subcutáneos de ratones y se realizará en el corto plazo. También se llevarán a cabo modelos animales más complejos, por ejemplo, hemorragia pulmonar de ovejas, para garantizar la eficacia de esta tecnología.

Síntesis de polímeros PAS y caracterización molecular

La síntesis del polímero PAS dio lugar a varios desafíos inesperados, cada uno de los cuales se abordó de manera inventiva por el solicitante. Por ejemplo, durante la purificación del monómero 5-HMA, la recrystalización de este monómero mediante el uso de agua y metanol requirió una relación de volumen específica de los dos solventes (0,5:2, agua:metanol), para asegurar la completa disolución y la recrystalización del producto.

En segundo lugar, durante la síntesis del polímero PAS, se cambió la relación molar del iniciador (ácido 4,4'-azobis-4-cianoaléxico) en la solución de alimentación para asegurar un grado adecuado de polimerización del polímero PAS. Por último, durante la síntesis del polímero PAS, se usaron cinco monómeros diferentes, cada uno de los cuales presenta desafíos únicos en cuanto a su compatibilidad mutua.

Las cantidades de alimentación de los cinco monómeros se ajustaron para, en una ocasión, sintetizar un polímero soluble en agua. El solicitante descubrió que los polímeros sintetizados con menos del 5 % en moles de OEGMA no eran solubles en agua. Además, los polímeros PAS con más de 8 % en moles de OEGMA no se convirtieron en hidrogel a 37 °C. Por tanto, estas formulaciones de polímero PAS no eran adecuadas para la fabricación de biomateriales inyectables. Al probar múltiples formulaciones, se encontró empíricamente que el PAS se sintetizaba con alimentación de NIPAAm (68 % en moles), NAS (14 % en moles), PLA/HEMA (8 % en moles), OEGMA (5 % en moles) y 5-HMA/4-HMA (5 % en moles) era soluble en agua y formó un hidrogel a 37 °C. Se requieren más estudios para alterar la composición del polímero PAS y ajustar las propiedades fisicoquímicas de PASGel para diferentes aplicaciones biomédicas.

Para la síntesis de PAS, se usaron monómeros disponibles comercialmente, por ejemplo, NIPAAm, NAS y OEGMA y monómeros presintetizados internos, PLA/HEMA y 5-HMA. El método de síntesis de PLA/HEMA se desarrolló por Dijk-Wolthuis, y otros, [Tsanga, Bosch y Dijk-Wolthuis; "A new class of polymerisable dextrans with hydrolysable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer", *Polymer*, 38, 6235-6242, 1997] y se optimizó previamente para la formación de PLA/HEMA con seis longitudes de lactato por molécula de HEMA [Fathi, Mithieux, Wei, Chrzanowski, Valtchev y Weiss; "Elastin based cell-laden injectable hydrogels with tunable gelation, mechanical and biodegradation properties", *Biomaterials* 35(21), 5425-5435, 2014].

Síntesis del monómero 5-HMA (antiséptico)

El método sintético para la preparación de 5-HMA, uno de los monómeros usados en la síntesis del polímero PAS, está adaptado del prescrito por San Roman, y otros, [se muestra un estudio inicial en Elvira y San Roman, "Synthesis and stereochemistry of isomeric methacrylic polymers derived from 4- and 5-aminosalicylic acids", *Polymer*, 38, 4743-4750, 1997; y se describe un estudio de seguimiento en Elvira, Gallardo, Lacroix, Schacht, San Roman, "Incorporation of salicylic acid derivatives to hydrophilic copolymer systems with biomedical applications", *J Mater Sci Mater Med*, 12, 535-542, 2001].

Brevemente, el método de síntesis del monómero 5-HMA se describe inicialmente en la cita de Elvira y San Roman. Luego, durante todo el estudio de seguimiento, este monómero se polimerizó con metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). En la síntesis de la invención del polímero PAS, el solicitante unió 5-HMA con oligo(etilenglicol) (OEGMA), éster de N-acriloxisuccinimida (NAS), N-isopropilacrilamida (NIPAAm) y polilactida (HEMA/PLA). Todos y cada uno de los segmentos de la molécula resultante tienen un papel vital para abordar diferentes requisitos clínicos para la regeneración de tejidos, la administración de fármacos y el uso de PASGel como un sellador quirúrgico. Las funciones de estos diversos monómeros en la síntesis de PASGel se resumen en la Tabla 2.

El 5-HMA se sintetizó mediante amidación selectiva del ácido 2-amino-5-hidroxibenzoico con cloruro de metacrilililo. Para este fin, se añadió una solución de cloruro de metacrilililo al 50 % v/v en tetrahidrofurano (THF), con un régimen de flujo de 0,5 ml/min, a una solución de ácido 2-amino-5-hidroxibenzoico al 10 % p/p en THF. La solución resultante se agitó a 300 rpm y 4 °C bajo una capa de nitrógeno, equipada con un condensador, durante 6 horas. La suspensión de monómero funcionalizado resultante se filtró para eliminar las sales subproducto suspendidas.

La solución transparente resultante se secó con un evaporador giratorio a 40 °C bajo presión reducida, para dar como resultado la formación de una pasta marrón viscosa. La pasta de monómero 5-HMA se disolvió luego en una solución de agua/metanol (relación en volumen de 4:1) y se recrystalizó con una solución de agua/metanol (relación en volumen de 1:2) a 4 °C para eliminar el ácido 2-amino-5-hidroxibenzoico y el cloruro de metacrilililo sin reaccionar. Los monómeros cristalizados de color beige se separaron mediante filtración y el proceso de recrystalización, como se describió anteriormente mediante el uso de agua/metanol, se repitió tres veces para adquirir monómero 5-HMA altamente purificado.

Como se describe en la presente descripción, puede usarse 4-HMA en lugar de 5-HMA o en combinación con él; el efecto antiséptico es prácticamente el mismo, como se muestra en C. Elvira y otros, *Polymer*, 38(18), 4743-4750, 1997.

Síntesis del polímero PAS

El polímero PAS se sintetizó mediante polimerización por radicales libres de NIPAAm (68 % en moles), NAS (14 % en moles), PLA/HEMA (8 % en moles), OEGMA (5 % en moles) y 5-HMA (5 % en moles) en THF a 70 °C mediante el uso de 0,3 % en moles de 4,4'-azobis (ácido 4-cianoalélico) como un iniciador. Después de 24 horas, la solución de polímero resultante se precipitó en agua a 32 °C para eliminar los monómeros sin reaccionar. A continuación, el polímero precipitado se disolvió en etanol y se volvió a precipitar en agua en las mismas condiciones. Luego se secó el polímero resultante a presión reducida a 40 °C durante 48 horas.

En la Figura 2, la presencia de enlaces correspondientes para los cinco segmentos primarios de PAS confirmó la síntesis exitosa del polímero. Pueden sintetizarse diversos polímeros PAS mediante el uso de diferentes cantidades de monómeros de alimentación. Por tanto, el polímero NIPAAm (68 % en moles), NAS (14 % en moles), PLA/HEMA (8 % en moles), OEGMA (5 % en moles) y 5-HMA (5 % en moles) ejemplificado es solo representativo. En particular, 4-HMA (5 % en moles) o una combinación de 5-HMA (por ejemplo, 2,5 % en moles y 4-HMA (por ejemplo, 2,5 % en moles) pueden aplicarse como el resto antiséptico.

Formación de hidrogel peptídico y citocompatibilidad

Se encontró que el polímero PAS sintetizado con un contenido de OEGMA del 5 % en moles era soluble en agua. Para confirmar la reactividad a péptidos del polímero, se usó el péptido sintético GRGDS ((GLY){ARG}{GLY}{ASP}{SER}) como un péptido modelo. GRGDS imita el sitio de unión celular de muchas proteínas adhesivas en la matriz extracelular y provoca el redondeo y el desprendimiento de las células diseminadas. El péptido GRGDS tiene afinidad intermedia por V3 y I1b3, que son las integrinas más implicadas en la función ósea. Se

mezclaron PAS (150 mg/ml) y GRGDS (1 mg/ml) y se dejaron reaccionar durante 8 horas a 4 °C. La solución de PAS-co-GRGDS (PASGel) resultante se convirtió luego en hidrogel con el aumento de la temperatura hasta la temperatura fisiológica (por ejemplo, 37 °C).

5 Para probar las propiedades citocompatibles de PASGel, se encapsularon células de fibroblastos (GM3348) dentro de la estructura de los hidrogeles de PASGel durante hasta 7 días. Los resultados de la Figura 3 confirmaron la citocompatibilidad de los hidrogeles ya que el número de células viables aumentó continuamente durante al menos siete días después del cultivo.

10 La estructura biomolecular única de PASGel permite la administración doble controlada de (a) péptidos biológicamente activos para inducir la señalización celular específica al tejido y (b) ácido salicílico con propiedades antiinflamatorias y antibacterianas comprobadas. El péptido GRGDS se unió químicamente a la estructura molecular PASGel. Se usó un ensayo de Bradford para proteínas para confirmar la formación de enlaces covalentes entre el polímero PAS y los péptidos. Con este fin, inmediatamente después de la formación del hidrogel, los PASGel se lavaron minuciosamente tres veces con solución salina amortiguada con fosfato tibia (PBS) para filtrar los GRGDS sin reaccionar de la estructura PASGel. La concentración del péptido en el medio de lavado se midió mediante el ensayo de Bradford para proteínas para calcular la cantidad de GRGDS unidos covalentemente en PASGels. Estos resultados mostraron que casi el 94 % del GRGDS estaba unido covalentemente a la estructura de PASGel. También se estudió la capacidad del PASGel para administrar y liberar con el tiempo ácido salicílico biológicamente activo.

20 La formación de enlaces químicos permite la administración controlada de compuestos bioactivos *in vivo* pero puede afectar destructivamente la actividad biológica del compuesto. Por tanto, la actividad del ácido salicílico incorporado es de importancia crítica. Con este fin, el solicitante evaluó las propiedades antimicrobianas del 5-HMA/4-HMA incorporado como una indicación para confirmar la liberación gradual del ácido salicílico bioactivo del PASGel.

25 El solicitante comparó las propiedades antimicrobianas de PASGel con PASGel^{neg} (*es decir*, sin ácido salicílico incorporado en polímero PAS) al modificar ligeramente el método de prueba estándar en condiciones de contacto dinámico (ASTME 2149). Brevemente, los hidrogeles de PASGel y PASGel^{neg} se prepararon en condiciones asépticas y se incubaron en PBS esterilizado con filtro durante 21 días. Los resultados preliminares mostraron que las velocidades de degradación generales de PASGel y PASGel^{neg} dentro de este período son casi el 30 % en peso. Las muestras de los medios de incubación en diferentes momentos, por ejemplo, después de 1 día, 7 y 21 días, se usaron para analizar las propiedades antimicrobianas de estos hidrogeles a lo largo del tiempo.

30 Tres colonias de *E. coli* se recogieron con asas de inoculación y luego se añadieron a 3 ml de las soluciones de remojo de PASGel y PASGel^{neg} los días 1, 7 y 21. También se usó PBS esterilizado por filtración para cultivar tres colonias como control. Luego las suspensiones microbianas se incubaron a 37 °C durante 5 horas. Se realizaron diluciones en serie y las suspensiones bacterianas diluidas de 10⁶ y 10⁷ se inocularon en placas de agar nutritivo durante 16 horas y luego se contó el número de colonias para calcular las unidades formadoras de colonias (CFU).

40 Los resultados del recuento de colonias microbianas en la Figura 4 mostraron que no hay diferencias significativas entre el grupo de control y los medios de lavado de las muestras de PASGel y PASGel^{neg} después de 1 día y 7 días de remojo. Sin embargo, los resultados del día 21 confirmaron una disminución tres veces mayor en el número de colonias de PASGel en comparación con las muestras PASGel^{neg} y el control de PBS. Estos resultados confirmaron la actividad biológica del ácido salicílico escindido de la estructura del hidrogel PASGel. Además, la liberación de ácido salicílico a lo largo del tiempo mostró el enlace químico de este compuesto dentro de la estructura del hidrogel PASGel.

Adhesión al tejido

50 En aplicaciones de ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y los apósitos para heridas, la adhesividad al tejido de los biomateriales es de gran importancia para prevenir complicaciones clínicas tales como la fuga de tejido. Para evaluar esta característica de PASGel, el solicitante usó el método estándar ASTM D3164-03 (2014) *ex vivo* con piel de cerdo. Para este análisis, se usaron 100 µl de PASGel para llenar un recipiente de un área de 0,5 x 0,5 cm² para pegar dos trozos de piel de cerdo.

55 La fuerza de alargamiento para separar estos dos trozos de piel se midió con Instron 5943 y alcanza la meseta a 7,5 N. Los resultados en la Figura 5 mostraron que esfuerzo de cizallamiento en PASGel fue de casi 1 MPa. Estos resultados mostraron altas propiedades adhesivas al tejido del PASGel.

Caracterización física

60 En condiciones fisiológicas simuladas, el hidrogel PASGel mostró respectivamente módulos de compresión y tracción de 311 ± 47 kPa y 781 ± 116 kPa. Estos parámetros de rendimiento mecánico son primordiales en comparación con los hidrogeles desarrollados anteriormente o disponibles comercialmente. Por ejemplo, el hidrogel Neocart que se encuentra en una fase de ensayo clínico para la reparación del cartílago posee un módulo de compresión inferior a 10 kPa [Ahmed y Hincke, "Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration" *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 305-329, 2010], en comparación con los selladores quirúrgicos tales como BioGlue [CryoLife: BioGlue® Summary

of Safety and Effectiveness Surgical Adhesive Indications for Use Contraindications', FDA Rep 2013], ProGel [ProGel summary of Safety and Effectiveness Data; FDA Rep 2008:1-26] y Crosseal [Crosseal Summary of Safety and Effectiveness Data; FDA Rep 2010], PASGel es más elástico y mecánicamente más robusto. Ambas prestaciones mecánicas son importantes para el apósito para heridas internas y externas y la regeneración de tejidos.

Viabilidad del uso de PASGel para prevenir la hemorragia

Se llevó a cabo un estudio para ver, entre otros, si PASGel podría usarse potencialmente como:

- un sellador de hemorragias internas, sellador quirúrgico para tejidos profundos; y/o
- un coagulante físico destinado a usarse para prevenir la fuga de sangre mediante el llenado o la contención física de un sitio de defecto.

En la Figura 6 se muestra un esquema del aparato usado para determinar la viabilidad de usar PASGel para prevenir hemorragias. Los solicitantes desarrollaron el aparato para confirmar la viabilidad de usar PASGel para hacer frente físicamente a esta presión sanguínea positiva y al flujo sanguíneo. En este modelo, la presión sanguínea positiva en un sitio interno defectuoso fue de casi 33 mm Hg (= 450 mm H₂O) y el régimen de flujo fue de 3,7 ml/min a 50,3 ml/min (Tondevold y Eliassen, 1982). Se usaron los siguientes parámetros: tubería con un diámetro de 1 cm, el número de Reynolds fue 42 297 (turbulento), se usó una válvula para ajustar los regímenes de flujo y la temperatura de la "cirugía" fue aproximadamente 34 °C.

Se preparó una formulación modelo de PASGel al conjugar un polímero PAS (con la formulación de 75 % de NIPAAm, 3 % en moles de PLA/HEMA con una longitud de lactato de 3, 2 % en moles de OEGMA, 14 % en moles de NAS y 6 % en moles de ácido salicílico) con GRGDS como un péptido modelo). Los resultados que se muestran en la Tabla 3 muestran que en las condiciones más duras (ya sea el régimen de flujo más alto o la presión hidráulica más alta), la formulación PASGel probada puede detener físicamente el flujo de sangre durante casi 5 minutos, tiempo suficiente para la formación natural de coágulos sanguíneos y la hemostasia. Este resultado confirmó el alto potencial del biomaterial desarrollado como apósito para heridas y sellador quirúrgico.

Tabla 3 - La aplicación de PASGel para detener el flujo de sangre simulada a diferentes velocidades de flujo de arena a presión.

Presión	Régimen de flujo (ml/min)	Período sin flujo (min)
99 mm Hg(~1,5 m H ₂ O)	10	>15
99 mm Hg(~1,5 m H ₂ O)	35	~8
99 mm Hg(~1,5 m H ₂ O)	50	~5
33 mm Hg (~0,5 m H ₂ O)	50	~5
76 mm Hg(~1 m H ₂ O)	50	~5
99 mm Hg(~1,5 m H ₂ O)	50	~5

Aplicabilidad industrial

Con respecto a la posible aplicación comercial, la presente invención resulta atractiva como un biomaterial termoendurecible adhesivo disponible en el mercado con propiedades antiinflamatorias intrínsecas. Estas propiedades, a su vez, dan lugar a aplicaciones tales como sellador quirúrgico, apósito para la cicatrización de la herida, relleno y soporte para la regeneración de tejidos in vivo.

Otras formas comerciales de la invención pueden incluir un líquido listo para su uso (PASGel en forma de solución debe almacenarse a 4 °C con una vida útil de 6-12 meses) y polvos de larga duración, en los que el polvo de polímero liofilizado y la solución salina fisiológica se proporcionan por separado. El kit estaría listo para su uso mediante la mezcla de las dos partes durante 4 horas a 4 °C. Este kit puede tener una vida útil más larga (por ejemplo, dos años) y no habría necesidad de condiciones de almacenamiento en frío.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones y/o modificaciones a las modalidades descritas anteriormente.

Por lo tanto, las presentes modalidades deben considerarse en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

REIVINDICACIONES

1. Un polímero que comprende:
 - al menos una unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria que comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico seleccionado de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones;
 - una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA);
 - una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA);
 - una unidad monomérica reactiva a proteína.polisacárido en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS); y
 - una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).
- El polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las propiedades mecánicas del polímero, por medio de resistencias a la compresión y a la tracción obtenidas, están en el intervalo de 200 kPa a 400 kPa y de 500 kPa a 800 kPa, respectivamente, y en donde las pruebas de adhesión al tejido demuestran una resistencia al cizallamiento de adhesión de al menos 970 kPa.
- El polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, menos del 5 % en moles de OEGMA y más del 8 % en moles de PLA/HEMA.
- El polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, en proporciones molares relativas aproximadas, NIPAAm (68 % en moles); NAS (14 % en moles); PLA/HEMA (8 % en moles); OEGMA (5 % en moles); y 5-HMA y/o 4-HMA (5 % en moles).
- El polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que proporciona un vehículo para evitar la liberación rápida de los efectos antisépticos/analgésicos/antiinflamatorios de los derivados de éster metacrílico de ácido salicílico, durante un período de 0 días a 270 días, lo que reduce de esta manera la incidencia basada en el tiempo de infección en un sitio quirúrgico.
- El polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polímero se une con péptidos o polisacáridos naturales y sintéticos.
- El polímero de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además una o más células para ayudar en la reparación del tejido biológico, en donde la una o más células están distribuidas de forma relativamente uniforme por todo el polímero, y en donde el número de la una o más células en el polímero es entre 10^2 y 10^8 células/ml, preferentemente entre 10^3 y 10^5 células/ml.
- Un método para la síntesis de un polímero como se define de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, dicho método comprende la polimerización por radicales libres de una cantidad molar predeterminada de un iniciador; con una cantidad molar predeterminada de una unidad monomérica antiséptica/analgésica/antiinflamatoria que comprende un derivado de éster metacrílico de ácido salicílico seleccionado de 5-HMA, 4-HMA o una de sus combinaciones; con respectivas cantidades molares predeterminadas de: una unidad monomérica soluble en agua en la forma de un resto hidrófilo de etilenglicol (OEGMA); una unidad monomérica que confiere resistencia mecánica en la forma de polilactida-co-acrilato de 2-hidroxietilmetilo (PLA/HEMA); una unidad monomérica reactiva a proteínas en la forma de un resto de N-acriloxisuccinimida (NAS); y una unidad monomérica termoendurecible en la forma de un resto de N-isopropilacrilamida (NIPAAm).
- El método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además una etapa de extracción en donde el polímero se precipita en agua a aproximadamente 32 °C para eliminar los monómeros sin reaccionar y se filtra; y que comprende además una etapa de purificación en donde el polímero precipitado se disuelve en etanol y se vuelve a precipitar en agua a aproximadamente 32 °C.
- El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el polímero se seca a presión reducida durante un período de aproximadamente 48 horas a una temperatura de aproximadamente 40 °C antes de su uso.
- Un polímero como se define de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en una aplicación médica seleccionada de un sellador quirúrgico, un apósito para la cicatrización de la herida, un relleno, o el soporte para la regeneración de tejidos *in vivo* o el crecimiento celular *in vitro*.
- Un polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de afecciones médicas que comprenden cáncer, en particular, cáncer de pulmón.
- El polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como: un sellador quirúrgico, apósito para la cicatrización de la herida, relleno o un soporte para la regeneración de tejidos *in vivo*.

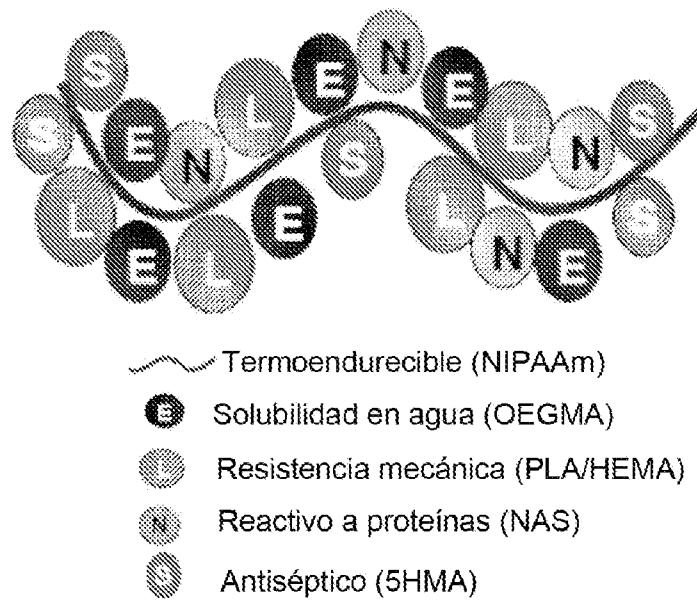
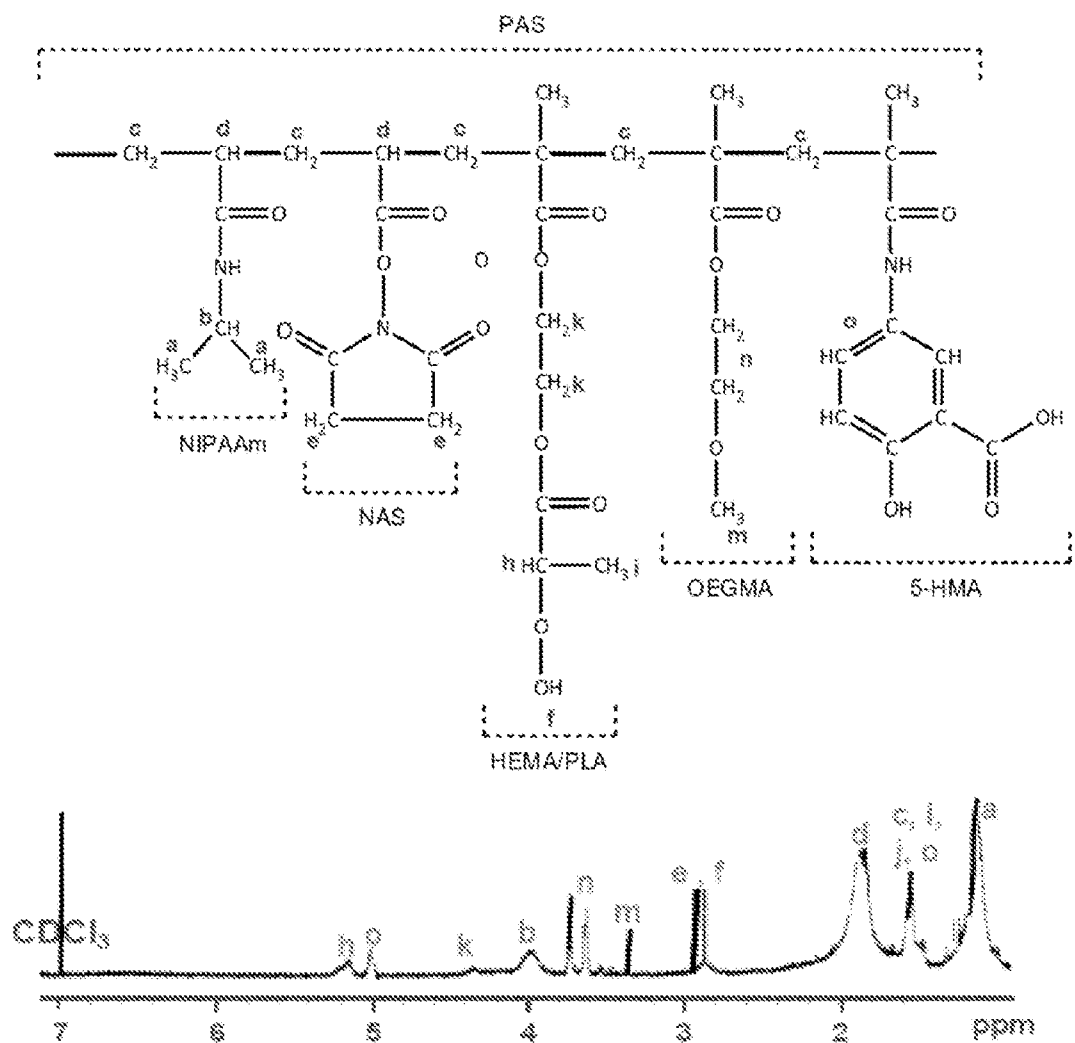


Figura 1



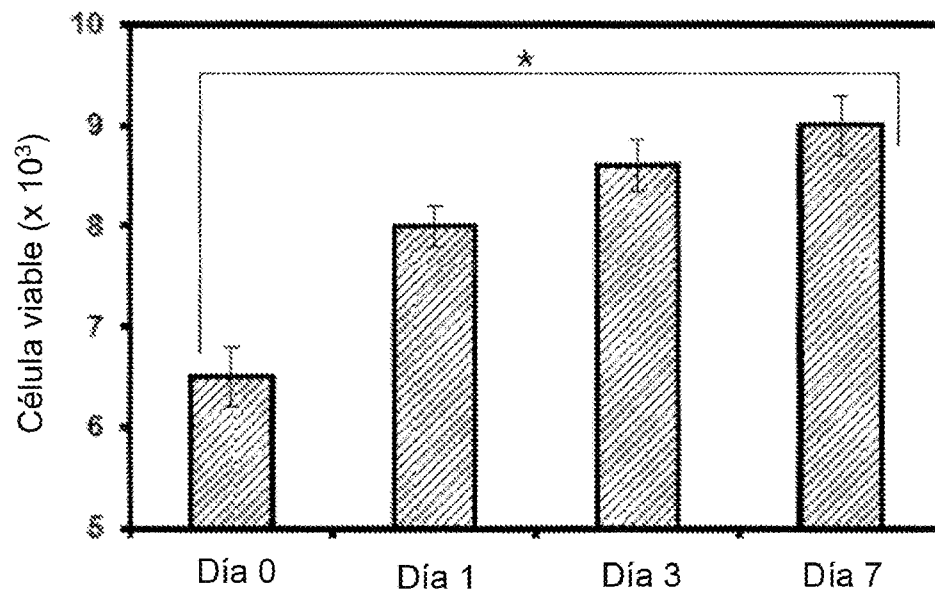


Figura 3

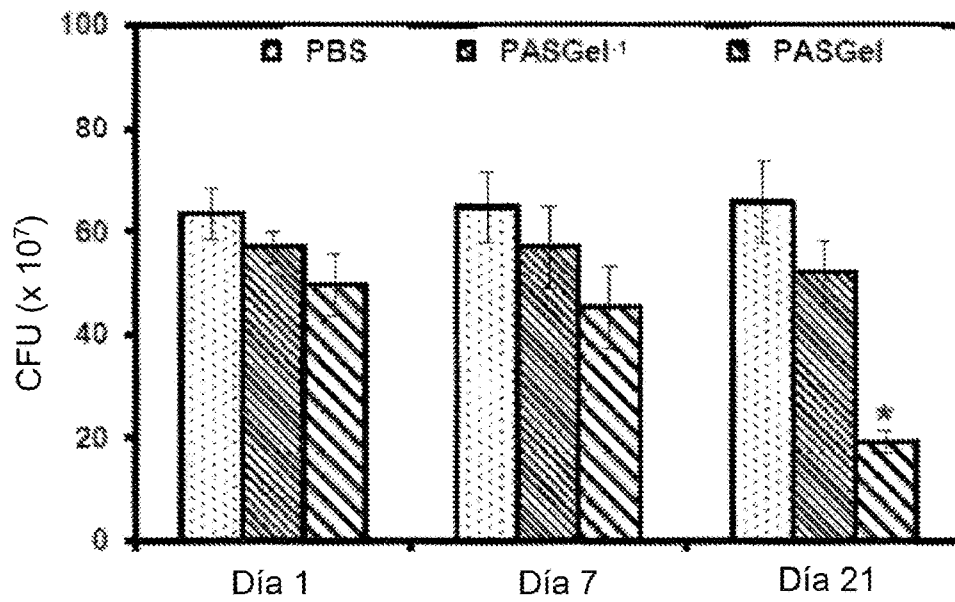


Figura 4

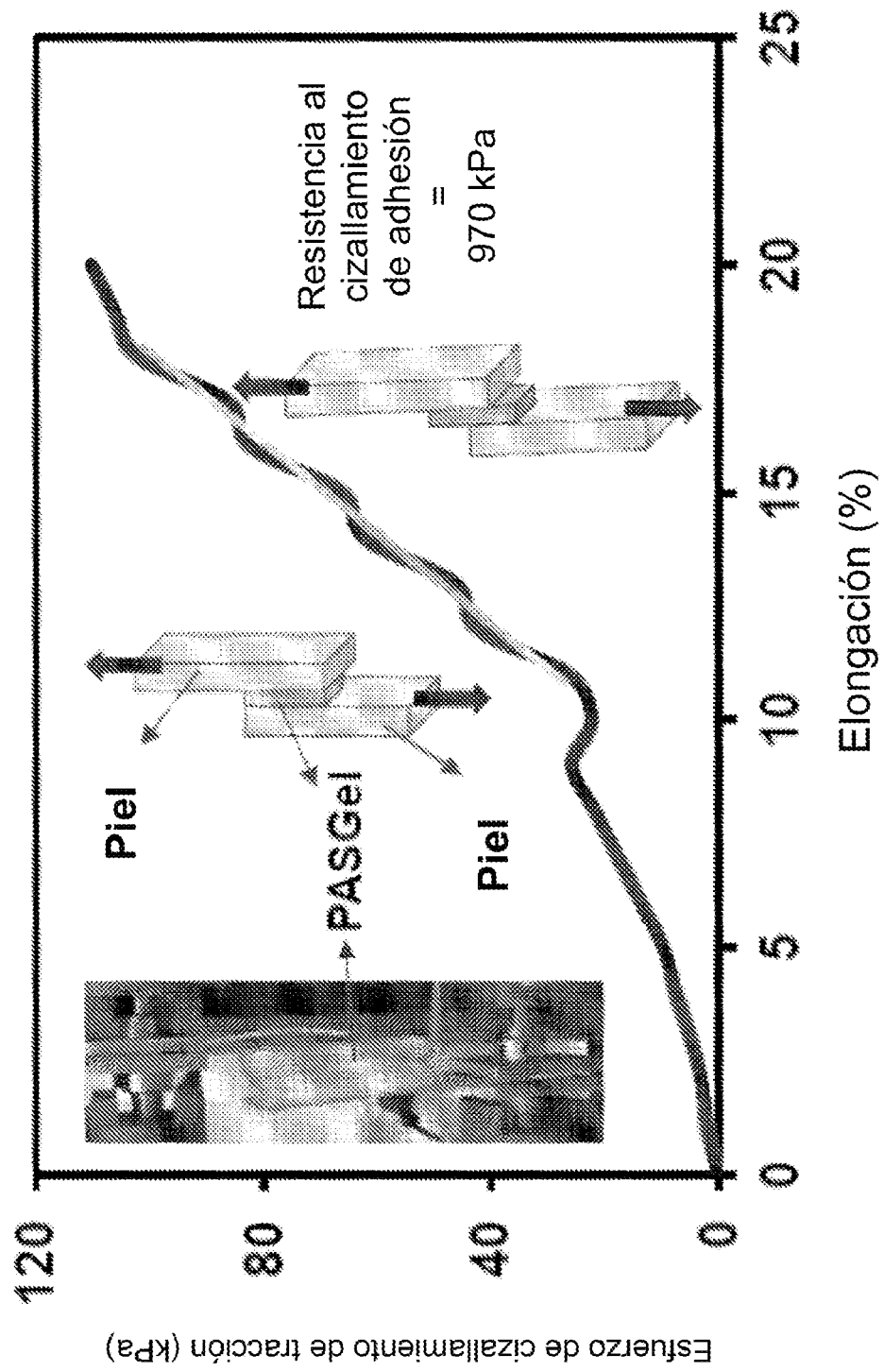


Figura 5

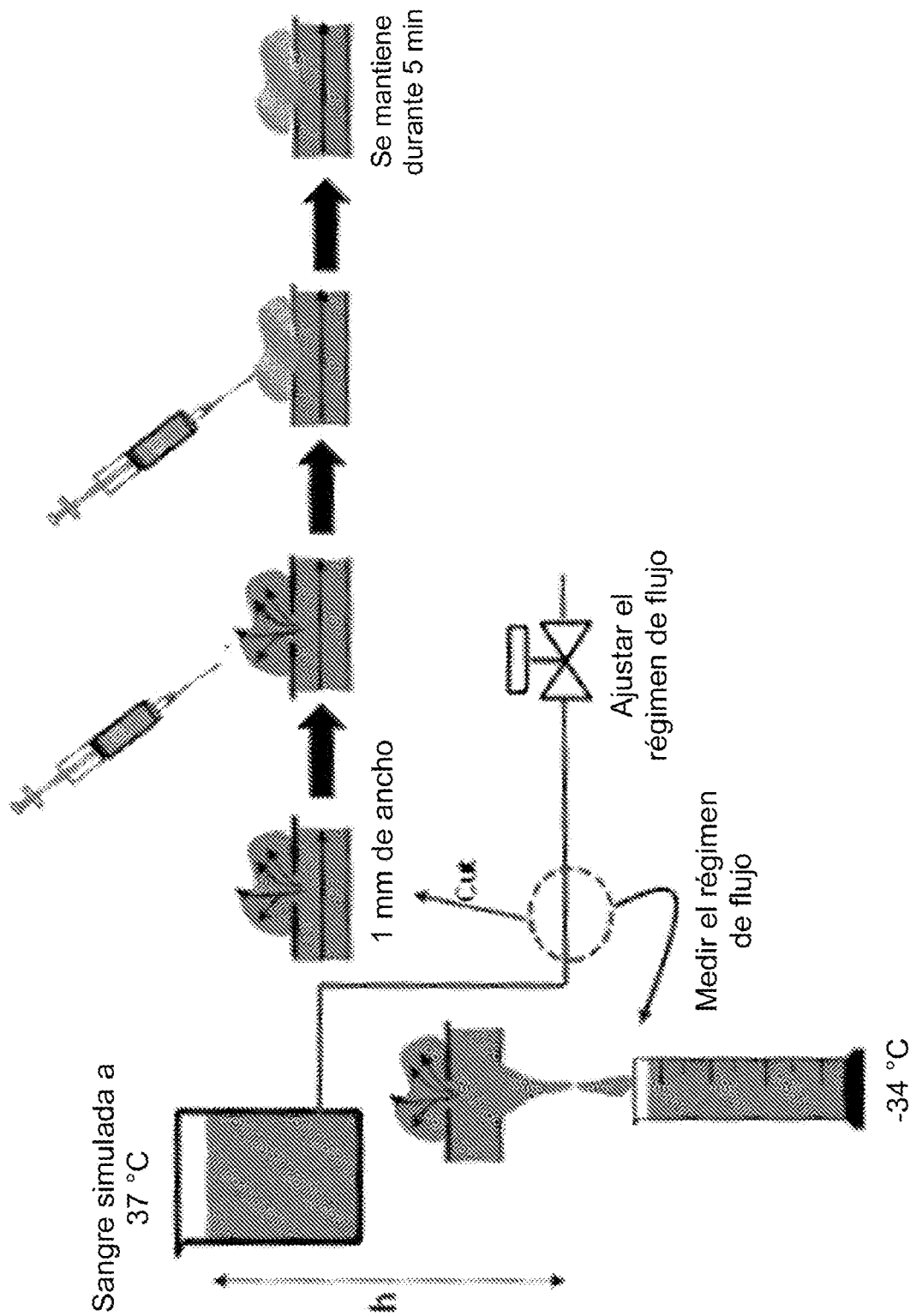


Figura 6