



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 353 840**

(51) Int. Cl.:

C08G 81/00 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98918250 .6**

(96) Fecha de presentación : **17.04.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0975691**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

(54) Título: **Recubrimientos tisulares poliméricos multifuncionales.**

(30) Prioridad: **21.04.1997 US 44733 P**

(73) Titular/es: **California Institute of Technology
1201 East California Boulevard
Mail Code 210-85
Pasadena, California 91125, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.03.2011

(72) Inventor/es: **Hubbell, Jeffrey, A.;
Herbert, Curtis, B. y
Elbert, Donald, L.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.03.2011

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 353 840 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

Recubrimientos tisulares poliméricos multifuncionales.**Antecedentes de la invención**

Esta solicitud se enmarca en general en el área de los materiales poliméricos biocompatibles que se pueden aplicar a superficies biológicas y no biológicas para minimizar las interacciones célula-célula y la adhesión de células o tejidos a las superficies.

Existe la necesidad de materiales, y métodos de uso de éstos, que se puedan utilizar para encapsular células y tejidos o moléculas biológicamente activas que sean biocompatibles y que no provoquen respuestas inmunitarias específicas ni inespecíficas. Un aspecto importante del uso de estos materiales *in vivo* es que se deben aplicar en el transcurso de un procedimiento quirúrgico breve o antes de que el material a encapsular se disperse, se dañe o muera.

A menudo es deseable implantar células exógenas en un paciente, por ejemplo, para producir diversos productos que el paciente es incapaz de preparar. Un ejemplo de esto es la implantación de células de islotes de Langerhans para producir insulina en un paciente diabético. Sin embargo, a menos que se las proteja, las células exógenas son inmediatamente destruidas luego del trasplante. Se han realizado numerosos intentos de encapsulación de células para minimizar los esfuerzos del organismo por destruirlas.

Las células han sido encapsuladas usando el entrecruzamiento iónico de alginato (un polianión) con polilisisina o poliornitina (policatión) (Goosen, et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 27:146 (1985)). Esta técnica ofrece condiciones de encapsulación

relativamente suaves. Las microcápsulas formadas por coacervación de alginato y poli(L-lisina) han demostrado ser immunoprotectoras. No obstante, las cápsulas no permanecen intactas mucho tiempo luego de 5 la implantación, o son rodeadas rápidamente por tejido fibroso.

Se ha informado que la biocompatibilidad de las microcápsulas de alginato-poli(lisina) es mejorada sustancialmente mediante incorporación de un copolímero 10 de injerto de PLL y PEO (óxido de polietileno, por sus siglas en inglés) en la superficie de la microcápsula (Sawhney, et al., *Biomaterials*, 13, 863-870 (1991)). La cadena de PEO es muy soluble en agua y altamente flexible. Las cadenas de PEO tienen una motilidad 15 extremadamente alta en agua y una estructura esencialmente no iónica. La inmovilización del PEO en una superficie se ha llevado a cabo en gran parte mediante síntesis de copolímeros de injerto que tienen cadenas laterales de PEO.

20 Las patentes de los EE.UU. N° 5,573,934 y 5,626,863 para Hubbell et al. dan a conocer materiales tipo hidrogel que comprenden una región soluble en agua como polietilenglicol y una región biodegradable, que contienen varios polímeros biodegradables como 25 poliláctido y poliglicólido, terminados en grupos fotopolimerizables como acrilatos. Estos materiales se pueden aplicar a la superficie de un tejido y polimerizar, por ejemplo, para formar recubrimientos tisulares. Estos materiales se adhieren a las 30 superficies de los tejidos mediante polimerización de los grupos fotopolimerizables en los materiales, luego de que han sido aplicados a la superficie del tejido.

La patente de los Estados Unidos N° 5,627,233

para Hubbell et al. da a conocer materiales poliméricos multifuncionales para usar en la inhibición de la adhesión y el reconocimiento inmunitario entre células y tejidos. Estos materiales comprenden un 5 componente de unión al tejido (policación) y un componente que no es de unión al tejido (poli no-ión). En particular, Hubbell divulga varios copolímeros de PEG/PLL, con pesos moleculares superiores a 300, con estructuras que comprenden copolímeros AB, copolímeros 10 ABA, y copolímeros tipo cepillo. Estos polímeros fueron desarrollados comercialmente para usar como selladores tisulares y para evitar adhesiones quirúrgicas.

Es por lo tanto un objetivo de la presente invención el proporcionar un material polimérico que se 15 pueda aplicar a células y tejidos vivientes, en un lapso muy breve, para proteger las células y los tejidos de las interacciones célula a célula, como la adhesión.

Es otro objetivo de la presente invención el 20 proporcionar un material polimérico que sea biocompatible y resistente a la degradación durante un determinado lapso de tiempo.

Es otro objetivo de la presente invención el proporcionar composiciones para inhibir la adhesión de 25 los tejidos y el contacto entre células dentro del organismo, así como métodos para preparar y usar dichas composiciones.

Resumen de la invención

30 La invención proporciona implantes o dispositivos médicos según se especifican en las reivindicaciones. Además se proporcionan métodos para dar forma a dichos implantes o dispositivos. Dichos implantes o

dispositivos contienen un copolímero de bloques según se especifica en las reivindicaciones. En este documento se dan a conocer copolímeros de bloques o tipo peine de polietilenglicol/polilisina

5 (PEG/PLL) con PLL de alto peso molecular (superior a 1000, más preferentemente superior a 100 000); copolímeros de PEG/PLL en los cuales la PLL es un dendrímero que está unido a un extremo del PEG; y composiciones multicapa que comprenden capas

10 alternantes de materiales poliacatiónicos y polianiónicos. En los dendrímeros PEG/PLL, el peso molecular de la PLL es entre 1000 y 1 000 000, preferentemente mayor de 100 000, más preferentemente, entre 300 000 y 800 000, y el peso

15 molecular del PEG es entre 500 y 2 000 000, más preferentemente entre 5000 y 100 000. Para el PEG de PM 5000, la proporción óptima es entre 1 cadena de PEG por cada 3 a 10, preferentemente por cada 5 a 7, subunidades de lisina. La proporción óptima para un

20 PEG de un peso molecular distinto de 5000 se puede determinar usando experimentación de rutina, por ejemplo, usando los procedimientos indicados en el ejemplo 1. En general, se sintetizan injertos de PEG/PLL en diversas proporciones, por ejemplo, variando

25 las cantidades estequiométricas relativas de cada componente utilizado en una reacción de acoplamiento adecuada, y después puede determinarse su eficacia relativa para evitar un modelo de interacción tipo unión. Un método para hacer esto implica determinar en qué medida proliferan las células sobre una superficie de poliestireno aniónico, ya sea recubierta o sin

30 recubrir con polímeros.

El dendrímero está injertado covalentemente a un extremo de un bloque de PEG. El dendrímero es un dendrímero de lisina que contiene preferentemente entre 16 y 128 grupos amina reactivos, que se

5 correlaciona con un dendrímero de una generación entre generación 4 y generación 7. El peso molecular del PEG es entre 500 y 2 000 000 preferentemente entre 5000 y 100 000.

10 El material polimérico multicapa se forma mediante interacciones iónicas de un polication y un polianión. Preferentemente hay más de cinco capas alternantes, más preferentemente más de diez capas alternantes, y muy preferentemente, más de quince capas alternantes de los

15 materiales policationíco y polianiónico. En una realización preferida, las capas superior y/o inferior se preparan a partir de materiales que contienen un dominio policationíco de unión al tejido y un dominio no iónico que no es de unión al tejido, como los

20 copolímeros de PEG/PLL.

El polímero se aplica en una fase líquida a los tejidos o células que se van a proteger, después de lo cual el tejido adsorbe el material polimérico a través de los dominios de unión. La fase líquida se puede

25 aplicar a tejidos aislados o a tejidos durante una cirugía o mediante un catéter u otro dispositivo menos invasivo.

Los copolímeros de PEG/PLL se pueden usar para inhibir el contacto célula-célula y la adhesión del

30 tejido. El polímero PLL es absorbido por las células o el tejido, y el polímero PEG no es adsorbido por el tejido. Cuando el material polimérico de dos dominios se pone en contacto con una superficie tisular, el o

los dominios de unión al tejido se unen e inmovilizan el o los dominios adjuntos que no son de unión, los cuales generalmente se extienden hacia afuera de la superficie del tejido y bloquean estéricamente la unión

5 de otros tejidos.

Los materiales se pueden aplicar a tejidos aislados o a tejidos durante una cirugía o mediante un catéter u otro dispositivo menos invasivo. Las 10 composiciones son útiles para bloquear la adhesión y el reconocimiento inmunitario y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de muchas enfermedades y trastornos fisiológicos, inclusive la prevención de adhesiones posoperatorias, la protección de vasos sanguíneos dañados contra la trombosis y el 15 engrosamiento de la íntima relacionado con restenosis, y la reducción de la diseminación de metástasis de células tumorales en los tejidos. Los materiales se 20 pueden usar, por ejemplo, como membranas semipermeables, como adhesivos, como soportes tisulares, como obturadores, como barreras para evitar la interacción de un tejido celular con otras célula o tejido y como portadores para especies bioactivas. Una amplia variedad de superficies biológicas y no 25 biológicas, con diferentes geometrías, se pueden recubrir con estos materiales poliméricos.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 A-D son gráficas de la proliferación de fibroblastos de prepucio humano (HFF, por sus siglas 30 en inglés) (células por mm^2) en diversos sustratos recubiertos, en función del número de bicapas de polielectrolíticas. En la figura 1 A, el sustrato es placas de poliestireno para cultivo tisular

transformado en aniónico mediante tratamiento de superficie (TCPS) y los electrolitos son polilisina (PLL) y alginato. En la figura 1 B, el sustrato es TCPS recubierto con gelatina y los electrolitos son 5 PLL y alginato. En la figura 1 C, el sustrato es matriz extracelular de fibroblastos de prepucio humano (HFF ECM, por sus siglas en inglés) y los electrolitos son PLL y alginato. En la figura 1 D, y los electrolitos son polietilenimina (PEI) y ácido poliacrílico 10 (PAA). Los cuadrados representan células proliferadas y los círculos representan células adheridas.

La figura 2 es una gráfica del espesor (Angstroms) de 15 las bicapas polielectrolíticas (PLL/alginato) en función del número de bicapas aplicadas sobre un sustrato de Si/SiO₂ (círculos) y obleas de Si/SiO₂ recubiertas con gelatina (cuadrados).

La figura 3 es una gráfica del número de células 20 proliferadas/mm² después de cuatro horas de incubación en función de la proporción entre lisina y PEG en diversos copolímeros de injerto. Los cuadrados representan copolímeros de mPEG con un peso molecular de 5000 y PLL con un peso molecular de 20 000. Los 25 círculos representan copolímeros de mPEG con un peso molecular de 5000 y PLL con un peso molecular de 375 000.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona implantes o dispositivos 30 médicos según se especifican en las reivindicaciones. Además se proporcionan métodos para dar forma a dichos implantes o dispositivos. Dichos implantes o dispositivos contienen un copolímero de bloques según

se especifica en las reivindicaciones. La invención proporciona además el uso del copolímero de bloques para recubrimiento de una superficie no biológica.

5 **1. Composiciones**

Los materiales son biocompatibles. Los materiales se consideran biocompatibles si el material o bien provoca una respuesta inmunitaria celular o humoral específica reducida o bien no provoca una respuesta inespecífica a 10 un organismo extraño que evite que el material realice la función a la que está destinado, y el material no es tóxico luego de la ingestión o implantación. El material tampoco debe provocar una reacción específica como trombosis en contacto con la sangre.

15 **A. Copolímeros de PEG/PLL.**

1. Composición del polímero

Las definiciones siguientes se aplican a los copolímeros de PEG/PLL descritos en este documento. Los copolímeros de bloques se definen como copolímeros en 20 los cuales un bloque polimérico está unido a uno o más de otros bloques poliméricos. Éstos se diferencian de los copolímeros aleatorios, en que dos o más unidades monoméricas se unen en un orden aleatorio para formar un copolímero. Los copolímeros en cepillo (como en un 25 cepillo para frasco) son copolímeros que tienen un esqueleto de una composición y cerdas de otra. Estos copolímeros también se conocen como copolímeros en peine. Los términos cepillo y peine se usan indistintamente. Los polímeros dendríticos, también 30 conocidos como dendrímeros o copolímeros starburst, son polímeros que contienen una molécula central que se hace reaccionar secuencialmente con monómeros con tres o más grupos reactivos, de modo que en cada paso de

acoplamiento secuencial, el número de grupos reactivos en los extremos del polímero aumenta, habitualmente de manera exponencial. Un dendrón es una subunidad de un dendrímero, la estructura en forma de cono resultante de las reacciones secuenciales que comienzan con un núcleo que contiene sólo un grupo reactivo. Según se usa en este documento, el peso molecular se refiere al peso molecular promedio, a menos que se indique lo contrario. Según se usa en este documento, PEG es una abreviatura de polietilenglicol, también conocido como óxido de polietileno o polioxietileno. La frase "(met)acrílico" se refiere a grupos acrílicos o metacrílicos.

15 **a. Copolímeros de injerto de PEG/PLL de tipo cepillo o peine.**

Los copolímeros de PEG/PLL pueden ser copolímeros en cepillo (como el cepillo de un frasco, con un esqueleto de una composición y cerdas de otra) con un esqueleto de polilisina (PLL) y cerdas de polietilenglicol (PEG). El peso molecular de la PLL es entre 1000 y 1 000 000, preferentemente mayor de 100 000, más preferentemente entre 300 000 y 800 000. El peso molecular del PEG es entre 500 y 2 000 000, más preferentemente entre 5000 y 100 000.

Para el PEG con un PM de 5000, la proporción de injerto óptima es entre 1 cadena de PEG por cada 3 a 10, preferentemente por cada 5 a 7, subunidades de lisina para modelos *in vitro*, y se puede ajustar basándose en la propiedades deseadas para aplicaciones *in vivo*. No obstante, se espera que para un PEG con un peso molecular diferente, la proporción óptima cambie. La optimización de los polímeros se trata, por ejemplo,

en los ejemplos 1 y 2.

Varios polímeros poliacatiónicos de unión al tejido pueden ser sustituidos por PLL, y varios polímeros que no son de unión al tejido pueden ser sustituidos por 5 PEG.

Los bloques poliacatiónicos adecuados incluyen poliaminoácidos naturales y no naturales con una carga positiva neta a pH neutro, polisacáridos cargados positivamente y polímeros sintéticos cargados 10 positivamente. Los bloques poliacatiónicos representativos incluyen unidades monoméricas seleccionadas del grupo que consiste en lisina, histidina, arginina y ornitina. Los polisacáridos cargados positivamente representativos incluyen 15 quitosana, quitina parcialmente desacetylada y derivados de polisacáridos neutros que contienen amina. Los polímeros sintéticos cargados positivamente representativos comprenden polietilenimina, poliamino(met)acrilato, poliaminoestireno, 20 poliaminoetileno, poli(aminoetil)etileno, poliaminoetilestireno y sus derivados N-alquilicos. Los polímeros que no son de unión al tejido adecuados, incluyen óxidos de polialquieno mezclados, que tienen 25 una solubilidad de al menos un gramo/litro en soluciones acuosas, polisacáridos neutros solubles en agua, alcohol polivinílico, poli-N-vinilpirrolidona, poli(met)acrilatos no catiónicos y sus combinaciones pueden ser sustituidas por PEG.

Por ejemplo, un PEG que se hizo reaccionar con una 30 polietilenimina de peso molecular mayor de 10 000 tendrá aproximadamente las mismas propiedades físicas que los copolímeros de PEG/PLL descritos en este documento. Se puede hacer reaccionar polihidroxietil metacrilato con una

proporción estequiométrica adecuada de un reactivo como cloruro de tresilo o tosilo (un activador), que convierte algunos de los grupos hidroxi en grupos salientes. Estos grupos salientes se pueden hacer reaccionar con 5 polímeros poliacidófilos, por ejemplo, poliaminoethyl metacrilato con un peso molecular mayor de 10 000, para obtener un polímero con un alto peso molecular. Una proporción estequiométrica adecuada es un mol de activador por mol de polihidroxietil metacrilato, y un 10 mol de polihidroxietil metacrilato activado por cada 3 a 9, preferentemente por cada 5 a 7 moles de grupos reactivos en el poliaminoethyl metacrilato. Los polímeros catiónicos adecuados son los que, cuando se combinan con un polímero adecuado que no es de unión al 15 tejido, tienen aproximadamente las mismas propiedades físicas que los copolímeros de PEG/PLL que se describen en este documento.

b. Dendrímeros PEG/PLL.

Los dendrímeros PEG/PLL son copolímeros en los que 20 uno o más bloques poliméricos de PEG están covalentemente unidos al punto focal de un dendrímero catiónico, por ejemplo, polilisina dendriméricamente polimerizada, de modo que el dendrímero se propaga desde el PEG. Preferentemente, el PEG está unido al 25 punto central del dendrímero, que crece a partir del PEG según se describe en detalle más adelante. La utilidad particular de la construcción dendrítica es la capacidad para controlar con precisión la masa del copolímero resultante, la relación geométrica entre los 30 bloques poliméricos y el grado de sustitución. Por ejemplo, en los ejemplos que se muestran, existe exactamente un PEG para un número definido de cargas positivas. En contraposición, moléculas injertadas

preformadas de PEG en un esqueleto poliacrítico generalmente dan lugar a un posicionamiento aleatorio de los grupos PEG en el esqueleto.

El dendrímero contiene preferentemente entre 16 5 y 128 grupos amina reactivos, el cual se correlaciona con un dendrímero de una generación entre generación 4 y generación 7. El peso molecular del PEG es entre 500 y 2 000 000 preferentemente entre 5000 y 100 000.

10 Los grupos amina en los copolímeros indicados en los ejemplos son las aminas primarias de los residuos de lisina, pero se pueden usar otros grupos. Por ejemplo, la última "generación" del polímero se puede preparar usando arginina o histidina, que dan lugar a 15 grupo catiónicos guanidino o imidazoilo, respectivamente. Asimismo, se puede proporcionar más de un grupo PEG, por ejemplo, usando como material de partida una molécula pequeña con al menos dos grupos carboxilo y al menos dos grupos amino, por ejemplo, el 20 dipéptido Glu-Lys.

Para todas las realizaciones, el peso molecular y el número de bloques de PEG por bloque de lisina se determina de modo que el copolímero resultante tenga las propiedades tanto de PLL como de PEG. Si la 25 proporción de PEG es demasiado alta, la bioadhesión del polímero se reduce. Si la proporción de PLL es demasiado alta, la capacidad del PEG para minimizar las interacciones célula-célula y la adhesión de los tejidos se reduce. Los polímeros deben tener suficiente carácter de PEG para minimizar las 30 interacciones célula-célula y de tejidos. Los polímeros con muy pocos PEG por PLL son menos adecuados para minimizar estas interacciones. Los polímeros también

deben tener suficiente carácter de PLL para unirse adecuadamente a la superficie de un tejido o una célula. Los polímeros con insuficiente carácter de PLL no se unen adecuadamente a la superficie de un tejido o una célula.

5 Aunque los copolímeros se describen antes con respecto a PEG y PLL, las mismas actividades se pueden obtener a partir de variantes de estos polímeros. Se pueden usar varios polímeros que no son de unión al 10 tejido en lugar de o además de PEG, por ejemplo, óxidos de polialquíleno con una solubilidad de al menos un gramo/litro en soluciones acuosas, como surfactantes no iónicos poloxamer, muchos polisacáridos neutros, comprendidos dextrano, ficoll, y celulosas 15 derivatizadas, alcohol polivinílico, poliacrilatos no catiónicos, como ácido poli(met)acrílico, y sus éster-amidas e hidroxialquilamidas, y combinaciones de éstos. El polímero policatiónico puede ser cualquier 20 policación biológicamente aceptable que proporcione una cantidad y una densidad de cargas catiónicas suficientes para que se adhieran eficazmente a células y tejidos. Una cantidad de compuestos adecuados se listan a continuación en la sección B(1).

La PLL dendrimérica permite la formación de una 25 estructura compacta, con una elevada densidad de carga. Estos dendrones PEG-lisina son eficaces para evitar la proliferación de células cuando son adsorbidos por una superficie aniónica simple y el polímero contiene aproximadamente 8 o más cargas positivas (dendrón de 30 generación 3).

El copolímero puede evitar la hemaglutinación de los glóbulos rojos humanos por una lectina, si, en presencia de un dendrón PEG-lisina a una concentración

en solución acuosa de 1% o mayor, el polímero contiene aproximadamente 32 o más cargas positivas (dendrón de generación 5).

Otros han supuesto que no podría usarse PLL de un peso molecular mayor de 40 000 para sintetizar copolímeros de injerto PLL-PEG (PLL-g-PEG), debido a la toxicidad de la PLL de mayor PM. No obstante, PLL-g-PEG es extremadamente bien tolerado por las células en cultivo, en contraposición a PLL. Los copolímeros PLL-g-PEG con un esqueleto de PLL de PM 375 000 evidencian mayor eficacia en algunos modelos *in vitro*, presumiblemente debido a que son más adsorbidos por las superficies biológicas en comparación con los copolímeros PLL-g-PEG de menor PM. Los copolímeros PLL-g-PEG con esqueletos de PLL de peso molecular 375 000 fueron capaces de evitar la proliferación de fibroblastos sobre superficies que contenían proteínas séricas adsorbidas previamente, y además pueden evitar el reconocimiento de la superficie de los glóbulos rojos por las lectinas. El esqueleto de PLL de PM relativamente alto (mayor de 1000, preferentemente mayor de 100 000) es necesario para obtener estos resultados.

Se pueden preparar otros dendrímeros que no sean a base de lisina y se pretende que estén comprendidos por los dendrímeros PEG/PLL descritos en este documento. Por ejemplo, los dendrímeros pueden incluir grupos poliacidónicos que no sean aminas, por ejemplo, sales de amonio cuaternario. Además, se pueden incluir cationes sintéticos que no sean a base de aminoácidos. También se pueden incorporar en los dendrímeros aminoácidos catiónicos como ornitina.

2. Componentes poliméricos adicionales

Se pueden agregar más dominios, grupos ligantes, y materiales bioactivos a esta estructura básica de dos dominios. Los ejemplos de dominios adecuados incluyen 5 moléculas bioadhesivas, dominios que pueden convertirse de un dominio de unión en un dominio que no es de unión *in vivo*, y dominios que pueden convertirse de un dominio de no unión en un dominio de unión *in vivo*. Los ejemplos de grupos ligantes adecuados incluyen 10 ligamientos biodegradables como ligamientos anhídrido, éster, amida y carbonato. Los ejemplos de materiales bioactivos adecuados incluyen proteínas, polisacáridos, compuestos orgánicos con actividad farmacológica y ácidos nucleicos. Los dominios y/o ligamientos pueden 15 conferir adhesión a tipos particulares de células o moléculas o degradación mediante medios enzimáticos o no enzimáticos. Los dominios pueden ser un tercer tipo de polímero, por ejemplo, un polímero biodegradable como un polianhídrido, un polihidroxiácido o un 20 policarbonato. Cuando sirve para la unión directa, un péptido como RGD, o incluso un aminoácido individual, que se use para marcar un poliaminoácido para la escisión mediante una enzima, se puede incorporar en la estructura del polímero.

25 Los sustituyentes fotopolimerizables, entre ellos acrilatos, diacrilatos, oligoacrilatos, dimetacrilatos u oligometacrilatos, y otros grupos fotopolimerizables biológicamente aceptables, también se pueden agregar a los materiales poliméricos. Éstos se pueden usar para polimerizar aún más el polímero una vez que entra en 30 contacto con el tejido u otras superficies, lo que puede mejorar la adherencia a la superficie.

B. Complejos de polímeros policatiónicos

polianiónicos**1. Polímeros policatiónicos**

El material policatiónico puede ser cualquier polímero policatiónico biocompatible soluble en agua, 5 por ejemplo, cualquier polímero que tenga heterociclos protonados unidos como grupos colgantes. Según se usa en este documento, "soluble en agua" significa que todo el polímero debe ser soluble en soluciones acuosas, como solución salina amortiguada o solución salina 10 amortiguada con pequeñas cantidades de solventes orgánicos agregados como co-solventes, a una temperatura entre 20 y 37 °C. En algunas realizaciones, el material no será suficientemente soluble (definido en este documento como soluble si se 15 disuelve al menos un gramo por litro) en soluciones acuosas *per se* pero se puede disolver injertando el polímero policatiónico con materiales poli no iónicos solubles en agua como polietilenglicol.

Los materiales policatiónicos representativos 20 comprenden poliaminoácidos naturales y no naturales con una carga positiva neta a pH neutro, polisacáridos cargados positivamente y polímeros sintéticos cargados positivamente. Los ejemplos de materiales policatiónicos adecuados abarcan poliaminas que tienen 25 grupos amina en el esqueleto del polímero o en las cadenas laterales del polímero, como poli-L-lisina y otros poliaminoácidos cargados positivamente de aminoácidos naturales o sintéticos o mezclas de aminoácidos, por ejemplo poli(D-lisina), poli(ornitina), 30 poli(arginina) y poli(histidina), y poliaminas no peptídicas como poli(aminoestireno), poli(aminoacrilato), poli(N-metil aminoacrilato), poli(N-ethylaminoacrilato), poli(N,N-dimetil

aminoacrilato), poli(N,N-dietilaminoacrilato), poli(aminometacrilato), poli(N-metil amino-
metacrilato), poli(N-etil aminometacrilato), poli(N,N-dimetil aminometacrilato), poli(N,N-dietil
5 aminometacrilato), poli(etilenimina), polímeros de aminas cuaternarias, como poli(cloruro de N,N,N-trimetilaminoacrilato), poli(cloruro de metilacrilamidopropiltrimetil amonio), y polisacáridos naturales o sintéticos como quitosana. Un material
10 preferido es polilisina. En algunas realizaciones, el material policatiónico está injertado covalentemente en un polímero que no es de unión al tejido, y este material se usa para formar al menos una de las mult capas, preferentemente la capa superior o la capa
15 inferior.

En general, los polímeros deben tener al menos cinco cargas, y el peso molecular del material policatiónico debe ser suficiente para producir el grado deseado de unión a un tejido u otra superficie, tener un peso
20 molecular de al menos 1000 g/mol.

2. Polímeros polianiónicos

El material polianiónico puede ser cualquier polímero polianiónico biocompatible soluble en agua, por ejemplo, cualquier polímero que tenga grupos ácido carboxílico unidos como grupos colgantes. Los materiales adecuados abarcan alginato, carragenina, furcellaran, pectina, xantano, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparan, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de dextrano, ácido
25 poli(met)acrilico, celulosa oxidada, carboximetil celulosa y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contengan grupos carboxilo colgantes, como los que contienen ácido maleico o ácido fumárico
30

en el esqueleto. Los poliaminoácidos de carga predominantemente negativa también son adecuados. Los ejemplos de estos materiales incluyen ácido poliaspártico, ácido poliglutámico y copolímeros de 5 éstos con otros aminoácidos naturales y no naturales. Los materiales polifenólicos como los taninos y las ligninas se pueden usar si son suficientemente biocompatibles. Los materiales preferidos comprenden alginato, pectina, carboximetilcelulosa, heparina y 10 ácido hialurónico.

En general, el peso molecular del material polianiónico debe ser suficiente para producir una fuerte adhesión al material poliacidónico. Las longitudes de los materiales poliacidónicos y 15 polianiónicos que producirán un buen bloqueo de las interacciones adhesivas se pueden determinar mediante experimentación de rutina. Se debe comprender que "buen(o)(a)" es una palabra que debe ser definida por los requisitos de la circunstancia particular 20 disponible, por ejemplo, cuán larga es requerida la unión y cuán completa es requerida una repulsión por la aplicación médica particular.

3. Unión de especies bioactivas

Las especies bioactivas se pueden unir a los 25 extremos de los polímeros, ya sea covalentemente o iónicamente, o mezclando las especies bioactivas con el material polimérico, preferentemente antes de que se aplique a las células o al tejido.

Una amplia variedad de materiales biológicamente 30 activos puede ser encapsulada o incorporada, por ejemplo proteínas como anticuerpos, ligandos de receptores y enzimas, péptidos como péptidos de adhesión, azúcares, oligosacáridos y polisacáridos,

fármacos orgánicos o inorgánicos, ácido nucleicos y células, tejidos, organelos subcelulares u otros componentes subcelulares.

Las especies bioactivas se pueden usar para marcar 5 la adhesión del material polimérico, para realizar una actividad biológica en la interfase material polimérico-tejido, o para efectuar una actividad cuando la especie bioactiva es liberada durante la degradación del material polimérico.

10 Un ejemplo de un ligando adecuado es el pentapéptido Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), que soporta la adhesión de células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos, pero no la adhesión de las plaquetas; o el tetrapéptido Arg-Glu-Asp-Val (REDV), 15 que se ha observado que soporta la adhesión de células endoteliales pero no de las células del músculo liso, los fibroblastos o las plaquetas, según se describe en Hubbell, et al., BioTechnology 9:568-572 (1991). YIGSR, de la laminina, se une a los receptores de las 20 células endoteliales, pero no de las plaquetas. Por consiguiente, se esperaría que la conjugación del oligopéptido YIGSR al extremo del (A)_x y la adsorción del material polimérico por la pared de un vaso dañado bloquee la trombosis en la pared del vaso pero no 25 bloquee la reendotelización de las paredes de los vasos no dañados circundantes. Esta realización hace posible cubrir la pared de un vaso lesionado para evitar la trombosis pero, a través de un ligando de adhesión en el extremo de uno o más de los componentes 30 poliméricos, permitir que vuelvan a multiplicarse las células endoteliales sobre el polímero. Este método también permite la reendotelización de la pared del vaso manteniéndose la no adhesividad a las plaquetas,

permitiendo de este modo la cicatrización y evitando simultáneamente la activación de las plaquetas y la formación de trombos.

4. Formación de multicapas poliméricas

5 Las multicapas poliméricas se pueden formar alternando la aplicación de polianiones y policationes a superficies para formar recubrimientos coacervados. Las capas se pueden usar para encapsular, obturar, sellar o soportar una superficie macroscópica. La 10 aplicación de un recubrimiento multicapa se puede usar para minimizar o evitar la adhesión tisular, minimizar o evitar las adhesiones posoperatorias, evitar la trombosis, evitar la implantación de células cancerosas o mejorar la administración local de agentes 15 bioactivos. Preferentemente, se usan al menos cuatro capas, y más preferentemente, al menos seis capas para formar los recubrimientos.

5. Ensamblaje de complejos con acoplamiento anión-catión

20 Se pueden producir estructuras microscópicas mediante incubación sucesiva de una superficie con soluciones de compuestos poliiónicos. En esta realización, se aplica a una superficie una solución que contiene un polication, el exceso de solución se 25 elimina por lavado de la superficie, y después se aplica a la superficie una solución que contiene un polianión. Este proceso se repite hasta que se obtiene el espesor deseado. Este proceso se denomina en este documento "técnicas multicapa". Si en cada incubación se 30 adsorbe solamente una monocapa de cada polielectrolito, después se pueden fabricar materiales tipo hidrogel electrostáticamente reticulados en una superficie unos pocos micrones a la vez. En otra realización, la

superficie no se enjuaga a fondo entre la aplicación del polícatón y el polianión. Esto da lugar a la formación de estructuras tipo hidrogel más gruesas. Las mult capas tienden a ser relativamente bioinertes sin 5 más tratamiento, y son eficaces para prevenir la proliferación celular sobre la superficie de una matriz extracelular. Se puede usar un aparato equipado con una boquilla de pulverización, por ejemplo, para pulverizar de golpe una capa de un polícatón seguida de una capa 10 de un polianión. Alternativamente, se pueden pulverizar ambos polielectrolitos simultáneamente para crear capas relativamente más gruesas.

6. Espesor y conformación de la capa de polímero

El espesor de la membrana afecta a diversos 15 parámetros, como la permeabilidad selectiva, la rigidez y el tamaño de la membrana. El espesor se puede variar mediante selección de los componentes de la reacción y/o las condiciones de reacción. Cuando se usan capas alternantes de materiales polícatónicos y 20 polianiónicos, el espesor de la capa puede ser controlado ajustando el número de capas y también el grado de enjuague entre capas. Al pulverizar capas, el control del tamaño de la gota y la densidad puede proporcionar recubrimientos del espesor deseado sin 25 requerir necesariamente enjuague entre capas. Adicionalmente, el exceso de material (sin unir) se puede eliminar por otros medios por ejemplo por chorro de aire.

Si el polielectrolito residual de la capa previa 30 es eliminado sustancialmente antes de agregar la capa siguiente, el espesor por capa disminuye. En consecuencia, en una realización preferida, primero se recubre la superficie con un polícatón, se elimina el

exceso de polication enjuagando la superficie, se agrega el polianión, se elimina el exceso y el proceso se repite según sea necesario.

5 Aumentando el número de ciclos, por ejemplo, a 50 o más, se pueden usar sistemas poliméricos para generar películas gruesas, no adhesivas.

II. Síntesis de materiales poliméricos

A. Síntesis de copolímeros de PEG/PLL

El PEG puede ser unido a las α -aminas de los 10 residuos de lisina de la poli(L-lisina) de la manera siguiente. Se puede hacer reaccionar la poli(L-lisina) (PLL) con un PEG con un extremo protegido (es decir, un monometoxi PEG protegido), el hidroxilo terminal del cual ha sido previamente activado con 15 carbonildiimidazol (CDI). La PLL y el PEG activado se pueden mezclar en una solución acuosa amortiguada a pH 9 y dejar que reaccionen durante 48 horas a temperatura ambiente. La cantidad de cadenas de PEG injertadas por cadena de PLL se puede controlar 20 ajustando la proporción de moles de PEG activado agregado por mol de PLL agregada. La reacción puede no completarse, es decir, la relación molar entre PEG y PLL en la mezcla de reacción puede no ser idéntica a la del producto PEG-b-PLL, pero relaciones mayores 25 entre PEG y PLL producirán cantidades mayores de PEG en el producto PEG-b-PLL.

Los dominios catiónicos tienden a ser muy 30 reactivos, y se deben hacer esfuerzos para controlar el grado de adición de PEG a PLL. Ejecutar la reacción en ausencia de agua reduce la desactivación del PEG y permite un mejor control estequiométrico. Por ejemplo, la poli-L-lisina desprotegida se puede disolver en agua y después agregar a dimetilformamida (DMF) para preparar una

solución que sea 5% acuosa. La poli-L-lisina se puede hacer reaccionar con PEG mono activado con CDI en cantidades estequiométricas, seguido de la evaporación del solvente al vacío para producir un copolímero de 5 PEG/PLL. Alternativamente, la poli-L-lisina desprotegida se puede disolver en agua y precipitar agregando NaOH. El polímero precipitado se puede después agregar a DMF anhidra y hacer reaccionar con PEG mono activado con CDI en cantidades estequiométricas, para producir un 10 copolímero $(A)_x \cdot b \cdot (B)_y$. Cuando la reacción se realiza en ausencia de agua, las reacciones laterales que involucran al grupo activado se pueden reducir (es decir, se reduce la desactivación), y a tiempos de reacción prolongados la proporción molar entre PLL y PEG en el polímero producto 15 se asemeja más que en la mezcla de reactantes.

La polimerización de la solución de PLL se puede llevar a cabo usando monómeros que contengan diferentes grupos protectores épsilon, los cuales permiten un control estricto del grado de sustitución de PEG en PLL. Los 20 anhídridos N-carboxi de diversos aminoácidos se pueden sintetizar y polimerizar como copolímeros, como en el ejemplo siguiente. Se pueda hacer reaccionar N,N' -dicarbobenzoxi-L-lisina (Z,Z -lisina) con pentacloruro de fósforo para producir anhídrido α,N -carbobenzoxi- α,N - 25 carboxi-L-lisina. Se puede hacer reaccionar α,N -carbobenzoxi- α,N -tert-butiloxicarbonil-L-lisina (Z,boc -lisina) con metóxido de sodio para producir la sal de sodio de Z,boc -lisina. La sal de sodio de Z,boc -lisina se puede hacer reaccionar con pentacloruro de fósforo 30 para producir anhídrido α,N -tert-butiloxicarbonil- α,N -carboxi-L-lisina. Se puede agregar anhídrido Z,Z -lisina al anhídrido Z,boc -lisina, y los dos monómeros se pueden polimerizar mediante adición de metóxido de sodio como un

iniciador. Se produce un copolímero, poli(α boc-lisina)-co-(α Z-lisina). Los grupos boc se pueden eliminar mediante adición del polímero a ácido trifluoroacético durante quince minutos.

5 La forma salina se puede convertir en la base libre mediante reacción con un reactante como piridina. Las aminas libres del polímero se pueden hacer reaccionar después con PEG activado con CDI en DMF. Después los grupos Z se pueden desproteger agregando el polímero
10 a HBr en ácido acético durante quince minutos, produciendo un copolímero (PEG) x -b-(PLL) y , en el que la proporción entre PEG y PLL en el producto final puede ser controlada mediante la proporción inicial de las lisina protegidas con boc.

15 Puede ser deseable producir versiones del polímero que no tengan estructura en cepillo. No desproteger las aminas épsilon de PLL puede facilitar esto, de modo que los únicos grupos reactivos sean la amina y el carboxilo terminales. Por ejemplo, la reacción de PEG mono
20 activado con CDI con poli α ,N-carbobenzoxy-L-lisina en DMF produce un copolímero (A) x -(B) y . La activación del carboxilo terminal del copolímero (A) x -(B) y con TSU seguido de la reacción con mono-amino PEG en DMF produce un copolímero (A) x -(B) y -(A) z .

25 En algunas realizaciones, puede ser deseable incorporar polímeros biodegradables como poliláctidos, polianhídridos o policarbonatos. Por ejemplo, monometoxi PEG reacciona con d,L-láctido (relación molar 1:3) en xileno en presencia de octato estannoso, a reflujo, durante dieciséis horas para producir un PEG con un grupo terminal que se degrada en agua con el tiempo. El hidroxilo en el extremo del grupo terminal triláctido se puede activar con CDI, el cual después se

puede hacer reaccionar con PLL mediante los métodos indicados antes para producir un copolímero $(A)_x C - b - (B)_y$, un $(A)_x C - (B)_y$ o un $(A)_x C - (B)_y - C(A)_z$. Se pueden usar reacciones químicas de desplazamiento nucleofílico similares para acoplar otros polímeros biodegradables al esqueleto del PEG.

En algunas realizaciones, puede ser deseable incorporar un material polimérico con un esqueleto de no unión el cual se convierte en un esqueleto de unión a través de ligamientos degradables. Por ejemplo, la amina terminal del ácido poliglutámico se puede hacer reaccionar con PEG activado con CDI para producir un copolímero $(A)_x (D)_y - b - (B)_y$. El copolímero se puede disolver en agua a pH 2 y liofilizar para convertir la sal del ácido carboxílico en ácido libre. El polímero se puede disolver en DMF, y los residuos de ácido glutámico activar con TSU. El polímero activado se puede hacer reaccionar con aminoetanol protegido con BOC en DMF durante toda la noche a temperatura ambiente y después desproteger y desalinizar. El producto resultante es inicialmente poliacidónico y de unión, pero se hidroliza a un polianión que no es de unión.

En otras realizaciones puede ser deseable incorporar un material que se convierta en el tiempo de un material que repele las células en otro que no repele las células. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un polipéptido con un hidroxiácido (desprotegido) usando técnicas de síntesis de péptidos para producir un polímero no iónico. Con el paso del tiempo, a medida que el ligamiento amida se degrada, el no ión se convierte de repelente en no repelente.

B. Optimización del material polimérico para aplicaciones individuales.

El comportamiento biológico de estos materiales se puede optimizar alterando la estructura de los polímeros, la proporción entre el número de polímeros de unión al tejido y los polímeros que no son de unión 5 al tejido, y la relación entre la masa de los polímeros de unión al tejido y la de los polímeros que no son de unión.

En algunos casos, los materiales poliméricos que presentan más de una manera de degradarse pueden ser 10 necesarios para lograr resultados diferentes. Por ejemplo, la degradación por hidrólisis no enzimática dependerá fundamentalmente de lo accesible que esté el material polimérico al agua y al pH local. Dado que el pH y la concentración acuosa son similares en muchas 15 partes del organismo, dicho modo de degradación produciría una pérdida en la fuerza repulsiva del polímero que depende principalmente del tiempo. Como otro ejemplo, si la región degradable es sensible a una enzima, cuya actividad no está altamente regulada sino 20 que estaba presente en los líquidos corporales a un nivel más o menos constante, la velocidad de pérdida de la fuerza repulsiva depende fundamentalmente del tiempo. Como otro ejemplo, si la región degradable es sensible a una enzima, cuya actividad está más 25 altamente regulada, la velocidad de pérdida de la fuerza repulsiva dependerá más de la expresión de esa actividad enzimática particular. Por ejemplo, muchos tipos de células expresan las proteasas plasmina o 30 colagenasa durante la migración. La sensibilidad del polímero a la plasmina permite que el polímero sea degradado por células que migran a la superficie, de modo que puedan unirse para recolonizar la superficie. Esto es particularmente útil en la prevención o el

tratamiento de la restenosis.

El comportamiento biológico de estos materiales poliméricos depende de su estructura. Las características específicas del comportamiento biológico abarcan la unión al tejido, la repulsión de tejidos opuestos, la duración de la unión al tejido, la duración de la repulsión de los tejidos opuestos y el modo de pérdida de la unión o la repulsión. Las características específicas de la estructura del material polimérico incluyen el tipo (composición química) del dominio de unión al tejido, el tipo de dominio que no es de unión, la relación entre la masa de los dominios de unión y los dominios que no son de unión, el número de dominios de unión y de dominios que no son de unión, la inclusión de sitios que son particularmente susceptibles a la hidrólisis no enzimática, la inclusión de sitios que son particularmente susceptibles a la hidrólisis enzimática y las inclusiones de sitios con afinidad biológica particular.

C. Método para dar forma a materiales poliméricos.

A los objetos poliméricos se les puede dar una forma deseada mediante técnicas estándar conocidas por los expertos, por ejemplo, utilizando vaciado, moldeado o técnicas de forma sólida libre como técnicas de impresión tridimensional. Por ejemplo se puede usar una máscara para cubrir un área específica de una capa en la cual no se debe agregar un polielectrolito. La forma del objeto puede ser controlada a medida que se agregan las capas subsiguientes.

A los materiales también se les puede dar forma en relación con una estructura de soporte interna o externa. Las estructuras de soporte internas comprenden

redes de cribado de polímeros estables o degradables o metales atóxicos. Las estructuras externas comprenden, por ejemplo, moldear el gel dentro de un cilindro de modo que la superficie interna del cilindro sea
5 revestida con el gel que contiene los materiales biológicos.

III Métodos de uso

Los materiales tienen diversas aplicaciones. Entre ellas el recubrimiento de implantes protésicos como
10 válvulas cardíacas.

Según se define en este documento, "tejido" abarca los tejidos eliminados del organismo y los tejidos presentes en el organismo, pero excluye específicamente las células y los agregados celulares, porque estos
15 pueden ser afectados adversamente por el recubrimiento con materiales poliméricos. Este término también se puede aplicar al tejido tratado, como el tejido de las válvulas cardíacas, vasos sanguíneos y membranas, donde el tejido ya no está vivo y fue fijado químicamente, o
20 un vaso sanguíneo u otros tejidos criopreservados.

Los materiales poliméricos se pueden aplicar directamente mediante aplicación localizada, la aplicación localizada se puede obtener mediante pulverización o inyección de una capa muy fina (generalmente del orden de monocapas de material
25 polimérico) sobre la superficie que se va a recubrir. Los métodos para aplicar los materiales poliméricos de esta manera son conocidos por los expertos.

A. Recubrimiento de superficies no biológicas

30 Los materiales poliméricos se aplican a superficies no biológicas, preferentemente aniónicas, destinadas a ser colocadas en contacto con un ambiente biológico. Dichas superficies comprenden, por ejemplo,

catéteres, prótesis, implantes, injertos vasculares, lentes de contacto, lentes intraoculares, membranas de ultrafiltración y recipientes para materiales biológicos. Además, se pueden tratar placas de cultivo 5 celular o porciones de éstas para minimizar la adhesión de las células a la placa. Las placas de cultivo celular tratadas de esta manera sólo permiten la proliferación de las células en 1 áreas que no están tratadas, cuando las células son células dependientes 10 de anclaje (células que deben ser ancladas a un soporte sólido para proliferar).

Los materiales poliméricos se pueden aplicar al tratamiento de superficies macrocapsulares, como las utilizadas para ultrafiltración, hemodiálisis e 15 inmunoaislamiento no microencapsulado de tejidos animales. La superficie puede estar en forma de una fibra hueca, un módulo en espiral, una lámina plana u otra configuración.

B. Recubrimiento de superficies metálicas y 20 cerámicas

Las superficies metálicas en contacto con líquidos biológicos pueden ser recubiertas con los materiales poliméricos. En ausencia de dicho recubrimiento, esas superficies pueden contaminarse rápidamente por 25 adsorción de una capa de proteína al entrar en contacto con líquidos biológicos. El depósito de material biológico es minimizado por el recubrimiento de superficies con los materiales poliméricos.

Los ejemplos de polímeros solubles en agua que 30 repelen las proteínas incluyen, pero no exclusivamente, polietilenglicol, óxido de polietileno, poli-N-vinilpirrolidona, polihidroxietil metacrilato y ácido poliacrílico. Los polímeros poliacríticos incluyen,

pero no exclusivamente, polilisina, poliarginina y polietilenimina.

Los metales que son pasivados son los que presentan una superficie inerte de un metal aniónico u óxido metálico en agua a pH fisiológico, y se usan para formar conductos para el flujo de líquidos biológicos, o son los que se usan para formar dispositivos que están en contacto con líquidos biológicos, incluso los dispositivos que se implantan en los seres humanos o los animales. Los metales incluyen acero inoxidable y titanio, o superficies con óxidos metálicos como óxido de hierro, óxido de titanio y óxido de silicio. Los metales se tratan con el polímero como una parte de la fabricación del conducto o dispositivo, o se tratan *in situ*, luego del ensamblaje del conducto o dispositivo, o como parte de la operación normal del dispositivo.

El tratamiento se puede aplicar por adsorción de los materiales poliméricos desde una solución líquida o mediante pulverización. También se puede usar la eliminación del polímero del metal a través de un cambio en el pH, u otros medios, como un paso de limpieza como parte de la operación normal del dispositivo que usa esta tecnología, así como la reaplicación de una capa de polímero al metal, que produce una reanudación de las propiedades de repelencia de las proteínas en la superficie metálica tratada.

Las composiciones y métodos descritos en este documento se comprenderán mejor por referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

EJEMPLO 1: EFECTO DE LOS MATERIALES SOBRE LA

PROLIFERACIÓN CELULAR

Se pueden usar diversos métodos para optimizar las propiedades deseadas. Por ejemplo, cuando se usa un copolímero en cepillo PEG-b-PLL para proteger la

5 superficie de un tejido dañado contra la adhesión de células provenientes de la fase líquida en contacto con dicha superficie tisular, el material polimérico se puede optimizar llevando a cabo estudios que usen un modelo de cultivo tisular.

10 Se pueden sembrar fibroblastos en una placa multipocillo tratada con proteínas adsorbidas de un medio de cultivo celular que contenga 10% de suero.

Algunos de los pocillos se pueden recubrir con los copolímeros y otros se pueden dejar sin recubrir.

15 Luego, la superficie se puede sembrar con fibroblastos en medio de cultivo que contenga 10% de suero y controlar la adhesión y la proliferación.

20 Se puede hacer una medición de la fracción de células que se adhieren (F_a) y de la fracción de células que proliferan (F_s) basándose en criterios morfológicos usando microscopia óptica. Dichas mediciones realizadas 4 horas después de la siembra pueden proporcionar medidas útiles de la adhesión y la 25 repulsión.

El efecto de la proliferación celular se localiza en una superficie. Por ejemplo, cuando PEG/PLL prolifera sobre una porción de una superficie, sólo esa porción de la superficie resiste la adhesión celular. Una solución de PEG/PLL se hizo proliferar en aproximadamente medio pocillo de poliestireno para cultivo celular. Después de sembrar el pocillo con fibroblastos, las células proliferaron

en el área sin tratar del pocillo, pero no proliferaron sobre la mitad tratada del mismo. Se observó una transición tajante entre la región tratada y la región sin tratar.

5 Cuando se agregaron fibroblastos de prepucio humano (células HFF) a un pocillo para cultivo tisular recubierto con PEG/PLL, éstos no proliferaron. No obstante, cuando las células se transfirieron a un pocillo sin tratar, la proliferación celular tuvo lugar 10 normalmente sobre la superficie sin tratar.

Los glóbulos rojos se pueden agregar con aglutinina de germen de trigo (AGT). Se evaluó la capacidad de diversos tipos de polímeros de PEG/PLL para minimizar la aglutinación. Se prepararon y evaluaron copolímeros 15 de PEG/PLL con una cadena de PEG de 5 Kd y una cadena de PLL de 375 Kd, con proporciones de injerto de 14, 10.5, 7.5, 7, 5.6, 3.5, 1.75 y 1.25. El polímero de PEG/PLL con una proporción de injerto de 14 aglutina los GR (incluso sin agregado de aglutinina de germen 20 de trigo), el de 10.5 aglutina algunos de los glóbulos rojos, y protege algunos de los glóbulos rojos de la hemaglutinación inducida por la aglutinina de germen de trigo, el de 7.5 forma un complejo, el de 7 impide la aglutinación, el de 5.6 impide la aglutinación, el de 25 3.5 impide ligeramente la aglutinación, y los de 1.75 y 1.25 no tienen efecto sobre la aglutinación. En consecuencia, un rango útil de proporciones de injerto para que estos polímeros minimicen la aglutinación de los glóbulos rojos es entre 3.5 y 10.5.

30 En contraposición, el PEG/PLL con una cadena de PEG de 5 K y una cadena de PLL de 20 KD o bien no tuvo efecto sobre la aglutinación (proporciones de injerto entre 1.75 y 7) o causó aglutinación (proporciones de

injerto de 10.5 y 14). Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Efecto de PEG/PLL sobre la aglutinación de los glóbulos rojos

| Polímero | La mayor conc. de AGT con formación de pelet | La mayor conc. de AGT sin agregados grandes | La mayor conc. de AGT sin agregados pequeños | Comentarios |
|------------|--|---|--|--------------------------------------|
| PBS | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| mPEG 5 K | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| PLL 20 K | Aglut. | Aglut. | Aglut. | Aglut. GR |
| PLL 418 K | Aglut. | Aglut. | Aglut. | Aglut. GR |
| Plu F-68 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/20-1.75 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/20-3.5 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/20-7 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/20-10.5 | 0.514 | 0.171 | Aglut. | Aglut. GR |
| 5/20-14 | Aglut. | Aglut. | Aglut. | Aglut. GR |
| 5/375-1.25 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/375-1.75 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/375-3.5 | 1.54 | 0.514 | 0.514 | Sin efecto |
| 5/375-5.6 | 125 | 125 | 125 | Inhibe ligeramente la aglut. por AGT |
| 5/375-7 | 125 | 125 | 13.9 | Inhibe la aglut. |
| 5/375-7.5 | 125 | 125 | Aglut. | Complejo |
| 5/375-10 | 125 | 125 | 125 | Inhibe la aglut. |
| 5/375-10.5 | 125 | 1.54 | 1.54 | Complejo |
| 5/375-14 | Aglut. | Aglut. | Aglut. | Aglut GR |

con un peso molecular de 5 K. PLL 20 K indica una polilisina con un peso molecular de 20 K, en tanto PLL 418 K especifica que el peso molecular de la PLL es 418 K. Plu F-68 es un surfactante no iónico plurónico 5 específico. 5/20 indica que el polímero contiene un PEG con un peso molecular de 5 K y una PLL con un peso molecular de 20 K. 5/375 indica que el polímero contiene un PEG con un peso molecular de 5 K y una PLL con un peso molecular de 375 K. Los números que siguen a 5/20 10 o 5/375 especifican la proporción de injerto entre PEG y PLL.

Un sustrato de proteína sérica adsorbida se incubó con PEG/PLL 5/20 y PEG/PLL 5/375. Los polímeros con PLL de peso molecular relativamente bajo no produjeron 15 ningún cambio en la respuesta de las células a la superficie. No obstante, la serie de copolímeros con la PLL de mayor peso molecular produjo una reducción significativa en la proliferación celular en el sustrato de proteína sérica adsorbido a medida que se agregaron 20 las moléculas de PEG al esqueleto de PLL. La proliferación celular se eliminó cuando la proporción de injerto fue de 7 o 3.5 y fue significativamente más baja en relación con la PLL de bajo peso molecular cuando la proporción de injerto fue de 10.5. Los 25 resultados se ilustran en la figura 3.

Los datos muestran que los polímeros PLL-g-PEG con un esqueleto de PLL de peso molecular relativamente bajo permiten la proliferación celular y aquellos con un esqueleto de PLL de peso molecular relativamente alto 30 evitan la proliferación celular.

EJEMPLO 2: EVALUACIÓN DE DENDRÍMEROS PEG/PLL

Varias superficies modelo se trataron con los

PEG/PLL, en los que la PLL está en forma de dendrímeros, y después se lavaron con PBS. Después se sembraron fibroblastos en medio que contenía suero, y se contó el número de células proliferadas por 5 milímetro cuadrado a las cuatro horas. Los resultados se muestran en las tablas 2 (a-c). Los resultados muestran que a medida que el número de grupos amina aumenta a 4 o más, el número de células proliferadas disminuye significativamente.

10

Tabla 2: Proliferación celular en TCPS recubierto con dendrímeros de PEG/PLL

| Generación del dendrón (Nº de aminas) | PEG 20 K | PEG 100 K | PEG 5 K |
|--|----------|-----------|-----------|
| -OH (0) | 144 ± 13 | 83 ± 33 | 150 ± 18 |
| Y (1) | 125 ± 22 | 147 ± 21 | 118 ± 37 |
| 1 (2) | 137 ± 33 | 92 ± 39 | 132 +/- 8 |
| 2 (4) | 0 ± 0 | 33 ± 7 | - |
| 3 (8) | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 1 ± 1 |
| 4 (16) | 0 ± 0 | 3 ± 3 | |
| 5 (32) | 0 ± 0 | | - |

En la tabla 2, -OH indica que el polímero es PEG, 15 donde 20 K, 100 K y 5 K representan el peso molecular de los polímeros. Y indica un dendrímero de generación cero, en el cual hay un grupo amino presente.

Los resultados demuestran que, al menos con respecto a las superficies de TCPS, los dendrímeros que 20 tienen entre 4 y 32 grupos amina reducen significativamente la proliferación celular. En todos los casos, la proliferación se redujo a medida que aumentó la generación del dendrímero de PLL.

Se usaron los polímeros para evaluar la inmovilización del PEG en las superficies biológicas a través de la adsorción del bloque poliactiónico. Los dendrones de PEG fueron capaces de evitar la 5 proliferación celular sobre una superficie aniónica simple, lo que indica que había PEG presente en la superficie, sin embargo, los copolímeros no tuvieron efecto sobre la proliferación celular en superficies proteínicas. El tratamiento de los glóbulos rojos con PEG 10 20 K con un dendrón de lisina de quinta generación (32 aminas) fue capaz de impedir la hemaglutinación por una lectina, sin embargo, se encontró que el polímero por sí mismo aglutinaba los glóbulos rojos en ausencia de mezcla.

15 **Ejemplo 3: PROLIFERACIÓN CELULAR SOBRE MULTICAPAS DE POLIELECTROLITOS**

Células HFF en TCPS

Para establecer una línea de base para la proliferación celular en multicapas 20 polielectrolíticas, se formaron multicapas sobre poliestireno para cultivo de tejidos (TCPS) usando 0.1% de PLL (PM 50 000) y 0.15% de alginato, con 4 lavados de PBS luego de cada paso de adsorción, hasta 15 bicapas. En esta superficie, el número de células proliferadas 25 cayó a cero luego de agregar la segunda capa (véase la figura 1 A). Sin embargo, se observaron proliferaciones celulares bastante pobres en los sustratos con 2 a 15 capas, permaneciendo no obstante su número algo constante hasta 15 capas.

30 Células HFF en gelatina

La gelatina se produce desnaturizando colágeno y a menudo se recubren sustratos para cultivo tisular con gelatina para mejorar la unión de las células a un

sustrato. Como una proteína desnaturalizada, se expone una mezcla de residuos hidrófobos e hidrófilos y debería generarse una superficie muy heterogénea en el momento de la adsorción a una superficie.

5 Utilizando 0.1% de PLL y 0.15% de alginato, se formaron estructuras multicapa en los sustratos de poliestireno para cultivo tisular recubiertos con gelatina, con 4 lavados de agua desionizada entre los pasos de adsorción. La adhesión de HFF disminuyó en los 10 sustratos con más capas y se inhibió luego de la formación de diez capas en el sustrato (véase Figura 1 B).

15 Cuando se usaron una polietilenimina y ácido poliacrílico (PEI y PAA) (PM 50 000 para ambos polímeros) en vez de PLL y alginato, el número de células proliferadas disminuyó a medida que el número de capas aumentó. Sin embargo, el grado de disminución de la proliferación celular fue menor que el observado cuando se usaron PLL y alginato. Los resultados se 20 ilustran en la figura 1 D.

Células HFF en HFF ECM

Una matriz extracelular de fibroblastos en una superficie es un buen modelo para la superficie de un tejido dañado. Los fibroblastos depositan fibronectina y 25 colágeno, y muchas otras proteínas, mientras se multiplican en una superficie, creando superficies muy adhesivas para las células, luego que las células son eliminadas con hidróxido de amonio 0.1 N. La presencia de colágeno fibrilar en la superficie aumentaría mucho 30 la rugosidad de la superficie de la capa adsorbida, puesto que la red de fibrillas es suficientemente grande como para ser observada a un aumento de 100x por microscopía de contraste de fases.

Se recubrió una superficie con matriz extracelular de fibroblastos de prepucio humano (HFF ECM). Se preparó un recubrimiento agregando secuencialmente capas alternantes de PLL y alginato, utilizando soluciones de 0.1% de PLL y 0.15% de alginato, y lavando la superficie con 4 lavados de agua desionizada entre pasos de adsorción. La proliferación de células de HFF fue inhibida en gran medida después de la aplicación de 5 capas a la superficie, sin embargo, se encontraron células que habían proliferado poco incluso después de la aplicación de 15 capas. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos con TCPS (véase la Figura 1 C).

Toxicidad

La inhibición de la proliferación celular en las superficies de hidrogel se puede explicar en términos de interacción limitada de las proteínas con la superficie del hidrogel. Idealmente, ninguna otra actividad metabólica de las células debería ser afectada por la superficie, y por lo tanto las células en contacto con la superficie deberían permanecer viables y competentes para la proliferación celular por hasta 24 h. Se sabe que los polímeros son tóxicos para las células a bajas concentraciones, y por lo tanto los efectos podrían ser un resultado de la toxicidad celular. Por consiguiente, se evaluaron la viabilidad y la proliferación celular para células HFF en el sustrato TCPS con 15 bicapas de PLL/alginato luego de una hora. Agregando diacetato de fluoresceína al medio de cultivo celular, las células metabólicamente activas quedaron marcadas con fluoresceína por la función de las esterasas de las células. Se contaron las células marcadas

fluorescentemente y se encontró que 96.3% eran fluorescentes, lo que indica viabilidad y actividad metabólica después de 1 h en la superficie de la multicapa. En ese momento, la proliferación celular 5 había comenzado en las superficies sin tratar y en las superficies con sólo unas pocas bicapas, pero no proliferaron células en la superficie con 15 bicapas.

Después de una hora en un pocillo de TCPS con 15 bicapas de PLL/alginato, las células se pasaron a un 10 nuevo pocillo que era de TCPS sin tratar. Las células se pasaron transfiriendo con pipeta el medio del primer pocillo al segundo pocillo, sin agregado de nuevo medio. Se observó proliferación celular normal y sólo se encontraron células bien proliferadas a las 24 15 horas.

Además, se formó un ensamblaje multicapa utilizando 1% de PLL y 1.5% de alginato, con tiempos de incubación de 15 min y sólo un lavado con PBS, en un pocillo para cultivo tisular inclinado, de modo que 20 sólo se trató la mitad del pocillo. Se formaron dos bicapas y se sembraron células en el pocillo. Las células proliferaron normalmente en el lado sin tratar y proliferaron y migraron hacia arriba hacia el borde de la multicapa. Las células en el lado de la multicapa 25 no proliferaron. Las multicapas formadas utilizando estas condiciones son muy gruesas y por consiguiente la toxicidad debida a la lixiviación del polímero sería más destacable en este sistema. La proliferación de células en el lado sin tratar indicó que la 30 proliferación celular no es inhibida en presencia de multicapas polielectrolíticas por la liberación de un factor tóxico soluble

La presencia de rojo fenol en el medio de cultivo

tisular permite controlar el pH durante un experimento. No se detectó ningún cambio en el color del medio de cultivo tisular en comparación con los sustratos de control.

5

Ejemplo 4: RECUBRIMIENTO DE OBLEAS DE Si/SiO₂ CON POLIELECTROLITOS

Se usaron soluciones que contenían 0.1% de PLL (PM?) y 0.15% de alginato, ambos en PBS a pH 7 en técnicas multicapa para producir estructuras autoensambladas en obleas de Si/SiO₂ y obleas de Si/SiO₂ con gelatina adsorbida. A medida que el número de bicapas aumentó también lo hizo el espesor de la capa. El espesor de las bicapas (medido por elipsometría) como un resultado del número de bicapas se muestra en la figura 2. Los datos elipsométricos con el sistema de PLL y alginato sugieren que el espesor de las capas poliméricas no aumenta linealmente.

Como otra prueba de la formación de estructuras multicapa en un sustrato recubierto con gelatina, se midieron los ángulos de contacto dinámicos a medida que se formaron multicapas en una superficie de vidrio limpia recubierta con gelatina, como un método para detectar cambios en las propiedades químicas de la superficie. Los ángulos de contacto de avance y retroceso para la superficie de vidrio limpia fueron de 13.4 y 11 grados, respectivamente. Después de la adsorción de la gelatina, los ángulos de contacto de avance y retroceso fueron de 46.4 ± 7.0 grados y 17.3 ± 4 grados, respectivamente. Utilizando 0.1% de PLL y 0.15% de alginato en PBS a pH 7, con cuatro lavados de agua desionizada luego de la adsorción de cada capa polielectrolítica, el ángulo de contacto de retroceso

disminuyó gradualmente hasta por debajo de 10 grados, pero el ángulo de contacto de avance cambió de aproximadamente 60 grados luego del depósito de una capa de polilisina a aproximadamente 40 grados luego del 5 depósito de una capa de alginato. En el estado seco, se esperaría que la polilisina fuera algo hidrófoba puesto que la hidrofilicidad de la polilisina proviene principalmente de sus aminas cargadas, que en el estado seco serían neutras o existirían como una sal. Se 10 esperaría que el alginato, que tiene varios grupos hidroxilo fuera más hidrófilo en el estado seco. Estos datos indicaron que la superficie de un sustrato recubierto de gelatina estaba siendo cambiada con cada paso de adsorción de polielectrolito. Después del 15 agregado de cuatro bicapas de polímero, las muestras se tornaron muy humectables, de modo que el agua no se retraería fácilmente de la superficie luego de la eliminación del agua. Se elaboró una muestra con hasta 15 bicapas. En ese punto, para la capa de polilisina, 20 los ángulos de contacto fueron de 80 grados y 7.6 grados, de avance y retroceso, respectivamente, y para la capa de alginato, los ángulos de contacto fueron de 64.2 y 6.98 grados.

Los datos indicaron apareamiento en la progresión 25 del ángulo de contacto de avance de cada sustrato de gelatina, y por consiguiente se analizó el cambio en el ángulo de contacto de avance entre un paso y el siguiente para cada sustrato. Se juzgó la significancia estadística para cada paso de adsorción en comparación 30 con el paso de adsorción previo usando técnicas ANOVA. Después de agregar la tercera capa de alginato, el cambio en el ángulo de contacto entre una capa y la siguiente fue significativo a un nivel de confianza

superior al 99.9%.

Para correlacionar el comportamiento de proliferación celular con el espesor de la multicapa, se elaboraron multicapas de PEI y PAA sobre sustratos de Si/SiO₂, y se midieron los espesores por elipsometría. Se observó un cambio muy pequeño en el espesor entre las capas 1 y 10, sin embargo, se observó un espesor de 120 Angstroms a las 15 capas, con un espesor por capa de 6.7 Angstroms. El espesor a las 15 capas con el sistema de PEI/PAA fue similar al observado con 5 capas en el sistema de PLL/alginato. En ambos casos, el número de células bien proliferadas disminuyó hasta aproximadamente un tercio de la proliferación encontrada en el sustrato de gelatina solo. En consecuencia, existe una correlación entre la proliferación en la superficie y el espesor del recubrimiento polielectrolítico.

Las películas superficiales preparadas utilizando los copolímeros de PEG/PLL y capas alternantes de policationes y polianiones son muy eficaces para recubrir y evitar la proliferación celular incluso sobre las superficies más adhesivas como colágeno tipo 1, gelatina, matriz extracelular de fibroblastos y fibronectina. La elección de polielectrolitos es importante -polilisisina/alginato presenta un crecimiento exponencial del espesor, y es eficaz en estos modelos cuando los espesores de las películas son mayores de aproximadamente 100 nm. En contraposición, cuando las capas se prepararon a partir de polietilenimina/ácido poliacrílico, el espesor de la capa creció linealmente en vez de exponencialmente, originando películas más finas por ciclo de agregado de policación/polianión. El espesor de la capa se correlacionó con el grado de

minimización de la proliferación celular, de modo que fueron necesarias más capas para lograr el mismo resultado visto con las capas de PLL/alginato.

5 **Ejemplo 5: EL ESPESOR DE LAS PELÍCULAS MULTICAPA ES AFECTADO POR LAS CONDICIONES DEL PROCESAMIENTO**

Las multicapas de PLL y alginato tienden a crecer de manera exponencial en vez de lineal. Otras capas 10 poliméricas tienden a crecer de manera más lineal. Se llevaron a cabo una serie de estudios para explicar el comportamiento de los sistemas de PLL/alginato, y para determinar si el fenómeno se podría generalizar a otros polímeros.

15 En la preparación de microcápsulas de PLL y alginato, se pueden generar espesores de pared en el orden de las micras con sólo tres capas de polímero. En ese caso, primero se gelifica el alginato en una microesfera usando Ca^{++} , y las microesferas se colocan 20 en una solución de PLL. Después de lavar, la microesfera se agrega a una solución que contiene alginato, seguido nuevamente de lavado. Después un quelante del calcio disuelve el interior de alginato de la microcápsula y se producen microcápsulas con 25 espesores de pared del orden de micrómetros. Un simple equilibrio de masas conduce a la conclusión de que una masa significativa de PLL debe localizarse en la superficie de la microesfera durante el paso de adsorción, si se asume que los copolímeros no se 30 autoasocian. Esta cantidad de PLL podría localizarse en la superficie de la microesfera de alginato si la PLL o bien difundiera una cierta distancia dentro de la microesfera de alginato durante el paso de adsorción, o

si se formara una capa superficial viscosa rica en PLL que resistiera el lavado, y que después gelificara una vez agregado el alginato.

Con las multicapas de PLL y alginato, se encontró 5 que el espesor de las estructuras multicapa formadas era una función de cuán bien se lavaba la superficie durante la formación de la multicapa, y de la concentración del polímero. Se midió el espesor de un polímero en un sustrato de Si/SiO₂ luego de la formación 10 de una multicapa usando elipsometría. El lavado exhaustivo de los sustratos condujo a un crecimiento por capa en el orden de decenas de angstroms. Sin embargo, en el caso específico de 1% de PLL y 1.5% de alginato, el lavado menos vigoroso condujo al 15 crecimiento de hidrogeles macroscópicos, con espesores de polímero seco en el orden de cientos de angstroms por capa (véase la Tabla 3). Todos los sustratos tratados se tornaron mucho más hidrófilos luego de la adsorción de la segunda capa de polímero y 20 permanecieron transparentes después del secado.

Se usó elipsometría para medir el efecto de las condiciones de lavado sobre el espesor último de los ensamblajes de multicapas polielectrolíticas. El lavado menos vigoroso usando los polielectrolitos de 25 PLL/alginate produjo un aumento de un orden de magnitud en el espesor del polímero sobre el sustrato.

Tabla 3: Espesor de las capas de PLL/Alginato

| Tratamiento | Espesor (A) \pm desv. est. |
|---|------------------------------|
| Capa de óxido | 22.9 \pm 1.6 |
| 1% de PLL, 1.5% de alg (15 min de tratamiento, 1 min de lavado PBS) x 2 | 801.6 \pm 223.4 |

| | |
|--|-------------|
| 1% de PLL, 1.5% de alg (15 min de tratamiento, 30 s de lavado en agua corriente) x 2 | 43.9 ± 1.4 |
| 0,1% de PLL, 0,15% de alg (5 min de tratamiento, 1 min de lavado PBS) x 2 | 80.6 ± 8.2 |
| 2% de PEI, 2% de PAA (15 min, 1 min de lavado PBS) x 2 | 89.8 ± 11.5 |
| 2% de PEI, 2% de PAA (2 min, 3 x 1 min de lavado PBS) x 2 | 59.9 ± 8.8 |

Se pueden preparar estructuras multicapa "gruesas" que sean claras y transparentes. Cuando se coloca 1.4% de alginato en un pocillo pequeño, y se coloca por encima 5 una capa de 1% de PLL, se forma un gel complejo claro en la interfase, que se puede retirar del pocillo con una espátula. Sin embargo, colocar una capa de 0.1% de PLL sobre 1.4% de alginato no produce un gel, solamente un precipitado. La sustitución de PEI por PLL también 10 produce únicamente la formación de un precipitado con 1.4% de alginato. Formar capas de 2% de PEI sobre 2% de PAA de 50 K no produce la formación de un gel complejo, sin embargo, formar capas de 2% de PEI sobre 25% de PAA de 50 K a pH 3, produce la formación de un gel claro. Por lo 15 tanto, mediante la elección adecuada de viscosidades y densidades de carga, se pueden formar geles tridimensionales después de mezclar polielectrolitos, por oposición a la formación de un precipitado o flokulado simple. Los resultados se resumen en la tabla 20 4.

Tabla 4: Efecto de diversos tratamientos sobre la formación de capas de PLL/alginato

| Tratamiento | Polímeros | Resultado: |
|----------------|------------------|------------------|
| Mezcla directa | 1.4% alg, 1% PLL | sólo precipitado |

| | | |
|--|------------------------|------------------------------|
| | 1.4% alg, 0.05% PLL | Sólo precipitado |
| | 2% PAA, 2% PEI | Sólo precipitado |
| | 25% PAA, 2% PEI | Sólo precipitado |
| Disponer en capas una solución de un polímero sobre una solución de un polianión | 1.4% alg, 1% PLL | Gel claro |
| | 1.4% alg, 0.1% PLL | Sólo precipitado |
| | 1.4% alg, 2% PEI | Sólo precipitado |
| | 1.4% alg, 1% PEI | Sólo precipitado |
| | 2% PAA, 2% PEI | Sólo precipitado |
| | 2% PAA, 1% PLL | Sólo precipitado |
| | 25% PAA (pH 3), 2% PEI | Gel claro con bordes turbios |
| | 25% PAA (pH 7), 2% PEI | Gel turbio |
| | 25% PAA, 50% PEI | Gel ligeramente turbio |

HFF ECM, tratada con "multicapas gruesas"

Las condiciones que conducen a la formación de multicapas "gruesas", a juicio de la elipsometría, producen 5 películas superficiales transparentes, claras y muy delgadas en los sustratos, que se pueden observar microscópicamente, y que se pueden retirar del sustrato con una espátula (lo que demuestra una integridad mecánica horizontal significativa), pero que se pliegan sobre sí 10 mismas como si se apartaran de la superficie, formando una masa opaca.

Utilizando 1% de PLL y 1.5% de alginato, con tiempos de incubación de 15 min y un lavado con PBS luego de cada paso de adsorción, se formaron multicapas sobre la 15 superficie de la HFF ECM, y adhesión celular a los sustratos.

Tabla 5: Número de células proliferadas en capas

polielectrolíticas

| Tratamiento | Número de células proliferadas/mm ² (+ D.E.) | |
|------------------|---|----------|
| 1% PLL/1,5% alg, | 0 capa | Monocapa |
| | 1 capa | 0 ± 0 |
| | 2 capas | 0 ± 0 |
| 2% PEI/2% PAA | 0 capa | Monocapa |
| | 1 capa | Monocapa |
| | 2 capas | Monocapa |

Ejemplo 6: PROLIFERACIÓN CELULAR EN UNA SUPERFICIE DE DIÓXIDO DE SILICIO

5 La proliferación celular es indicativa de adsorción de proteínas en una superficie. Se aplicaron varios copolímeros en peine a una superficie de óxido de silicio y se evaluó la proliferación celular en las superficies recubiertas. Los polímeros fueron 10 copolímeros en peine PLL-g-PEG, con proporciones entre PEG y unidades de lisina según se muestra más adelante en la tabla 1. Según se muestra en la tabla 1, recubrir la superficie con varios materiales poliméricos es capaz de evitar la proliferación celular, y por lo 15 tanto puede evitar la adsorción de proteínas.

Tabla 6: Proliferación celular en una superficie de SiO₂

| Copolímero | Número de células proliferadas (célula/mm ²) |
|---|--|
| PLL | 98 ± 27 |
| PLL-g-PEG (PM de PEG 5000, PM de PLL 20 000, 1 PEG por 14 unidades de lisina) | 1 ± 1 |

| | |
|---|-----------|
| PLL-g-PEG (PM de PEG 5000, PM de PLL 20 000, 1 PEG por 10,5 unidades de lisina) | 0.4 ± 0.7 |
| PLL-g-PEG (PM de PEG 5000, PM de PLL 20 000, 1 PEG por 7 unidades de lisina) | 3 ± 5 |
| PLL-g-PEG (PM de PEG 5000, PM de PLL 20 000, 1 PEG por 3,5 unidades de lisina) | 0 ± 0 |
| PLL-g-PEG (PM de PEG 5000, PM de PLL 20 000, 1 PEG por 1,75 unidades de lisina) | 190 ± 156 |
| PEG | 157 ± 70 |

Como se muestra en la tabla 6, los polímeros de PEG/PLL con proporciones de injerto específicas de PEG por subunidades de lisina fueron capaces de evitar la 5 proliferación celular, en tanto que otros polímeros de PEG/PLL con diferentes proporciones de injerto fueron ineficaces.

Ejemplo 7: PROLIFERACIÓN CELULAR EN PELÍCULAS

10 MULTICAPA

Se unieron péptidos a través de sus aminas N-terminales a las cadenas laterales carboxilo del ácido poliacrílico (PM 250 000) (PAA) con tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU). Se preparó PAA activado combinando 200 µl de 20 mg/ml de PAA en DMF anhidra con 40 µl de 50 mg/ml de TSTU y 20 µl de diisopropiletilamina (DIPEA) para obtener una mezcla con 15 61 µmol de residuos de PAA COOH, 6.7 µmol de TSTU y 121 µmol de DIPEA. Se agregó gota a gota una solución de péptido en tampón al PAA activado. La mezcla cruda 20 péptido-PAA se purificó de péptidos sin unir mediante

diálisis. Se liofilizaron las muestras. Este proceso se llevó a cabo según se describe con los péptidos que contienen Arg-Gly-Asp (RGD-), Arg-Asp-Gly (RDG-), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR-), y His-Ala-Val (HAV-).

5 Se elaboraron multicapas polielectrolíticas dentro de pocillos de placas de poliestireno para cultivo tisular de 24 pocillos, adsorbiendo capas alternantes de polietilenimina (PEI) (PM 50 000) y PAA o péptido-PAA. La primera capa de PEI se depositó agregando 0.4
10 ml de PEI (20 mg/ml) en tampón HEPES de pH 10.0 a un pocillo. Después de 2 minutos, el pocillo se enjuagó tres veces con 0.5 ml de PBS durante 2 minutos cada enjuague. La segunda capa se depositó agregando 0.4 ml de PAA (20 mg/ml) en PBS de pH 10.0. Se enjuagó el
15 pocillo y se depositó una segunda capa de PEI y se enjuagó según se describe antes. La capa final se depositó agregando 200 μ l de PBS más 0.1 μ mol de péptido-PAA (donde las concentraciones de péptido-PAA se describen en términos de la cantidad de péptido) o PAA en
20 30 μ l de agua desionizada. Después de 30 minutos, se agregaron 0.4 ml de PAA (20 mg/ml) y los pocillos se enjuagaron después de 5 minutos.

Se sembraron fibroblastos sobre multicapas polielectrolíticas a una densidad de 1000 células/ml².
25 Después de 14 horas de incubación, la multicapas con la capa superior de PAA unida al péptido RGD produjo 12 500 \pm 1500 células proliferadas/cm², en tanto que el control (péptido antisentido péptido RGD unido al PAA produjo 2500 \pm 500 células proliferadas/cm². Los datos
30 demuestran que se pueden colocar péptidos en la superficie de un ensamblaje de multicapas polielectrolíticas.

REIVINDICACIONES

1. Un implante o dispositivo médico que comprende una superficie no biológica destinada a ser colocada en 5 contacto con un ambiente biológico, que comprende un recubrimiento superficial adsorbido en éste, que comprende

un copolímero de bloques que contiene un bloque poliacrítico que comprende o un bloque poliacrítico 10 lineal o un bloque poliacrítico dendrítico con un peso molecular suficiente para proporcionar al menos ocho cargas catiónicas, y al menos un bloque que no es de unión al tejido, donde la superficie no biológica es de material metálico o cerámico o es una superficie de un 15 catéter, prótesis, implante, injerto vascular, lente de contacto, lente intraocular o membrana de ultrafiltración y donde el bloque poliacrítico lineal tiene al menos cinco cargas y un peso molecular de al menos 1000 g/mol.

20

2. El implante o dispositivo de la reivindicación 1, donde el bloque que no es de unión al tejido tiene un peso molecular en exceso de 5000 dalton.

25 3. El implante o dispositivo de la reivindicación 1, donde el bloque que no es de unión al tejido tiene un peso molecular en exceso de 50 000 dalton.

4. El implante o dispositivo de la reivindicación 1, 30 donde el bloque que no es de unión al tejido se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, óxidos de polialquíleno mezclados, con una solubilidad de al menos un gramo/litro en soluciones acuosas,

polisacáridos neutros solubles en agua, alcohol polivinílico, poli-N-vinilpirrolidona, poli(met)acrilatos no catiónicos y sus combinaciones.

5 5. El implante o dispositivo de la reivindicación 1, donde el bloque que no es de unión al tejido comprende polietilenglicol.

10 6. El implante o dispositivo de la reivindicación 1, donde el bloque poliacidónico se selecciona del grupo que consiste en poliaminoácidos naturales y no naturales con carga positiva neta a pH neutro, polisacáridos cargados positivamente y polímeros sintéticos cargados positivamente.

15 7. El implante o dispositivo de la reivindicación 1, donde el bloque poliacidónico comprende unidades monoméricas seleccionadas del grupo que consiste en lisina, histidina, arginina y ornitina.

20 8. El implante o dispositivo de la reivindicación 6, donde el polisacárido cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en quitosana, quitina parcialmente desacetilada y derivados de polisacáridos neutros que contienen amina.

30 9. El implante o dispositivo de la reivindicación 6, donde el polímero sintético cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en polietilenimina, poliamino(met)acrilato, poliaminoestireno, poliaminoetileno, poli(aminoetil)etileno, poliaminoetilestireno y sus derivados N-alquilicos.

10. El implante o dispositivo de la reivindicación 1,
donde el copolímero comprende además un agente
bioactivo.
- 5 11. El implante o dispositivo de la reivindicación
10, donde el agente bioactivo está acoplado
químicamente al copolímero.
12. El implante o dispositivo de la reivindicación 10,
10 donde el agente bioactivo se adhiere a tipos
particulares de células o moléculas.
13. El implante o dispositivo de la reivindicación
1, donde la superficie es cerámica.
- 15 14. El implante o dispositivo de la reivindicación 1,
donde la superficie es aniónica, cuando se la coloca
en un ambiente biológico.
- 20 15. Un método para fabricar el dispositivo o implante
médico de la reivindicación 1 que comprende que el
copolímero de bloques sea adsorbido por la superficie del
dispositivo o implante médico.
- 25 16. El método de la reivindicación 15, donde la
superficie es aniónica, cuando se la coloca en un
ambiente biológico.
17. El método de la reivindicación 15, donde el
30 copolímero se aplica a la superficie mediante adsorción
del copolímero desde una solución que lo contiene.

18. El uso de un copolímero de bloques como el definido en la reivindicación 1 para recubrir una superficie no biológica.

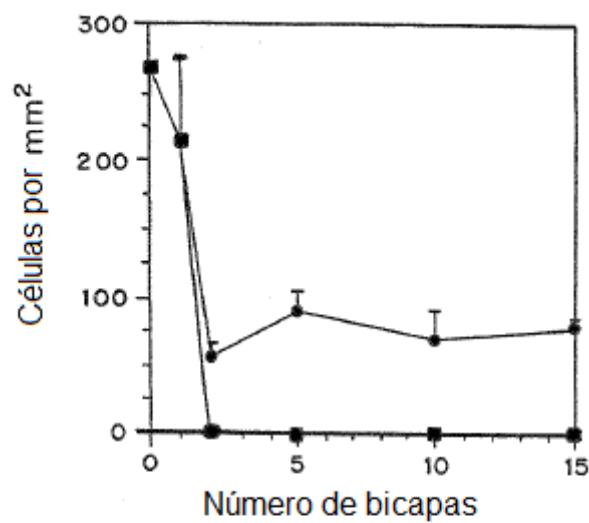


FIG. 1A

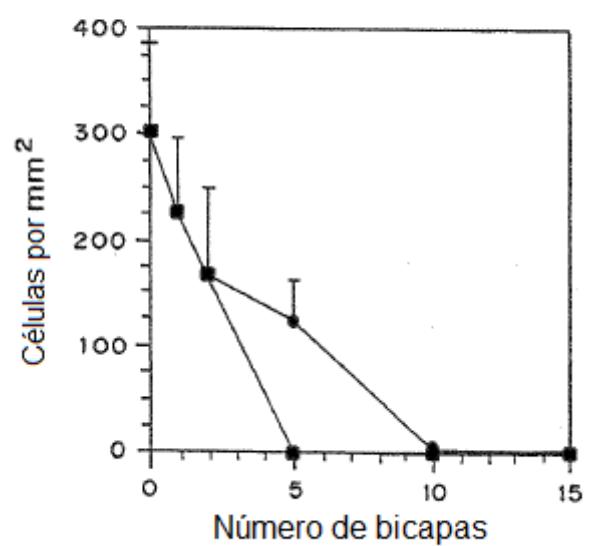
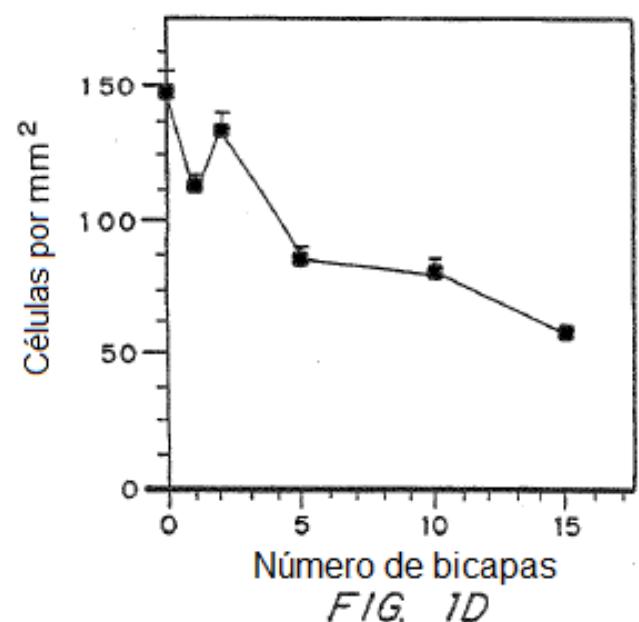
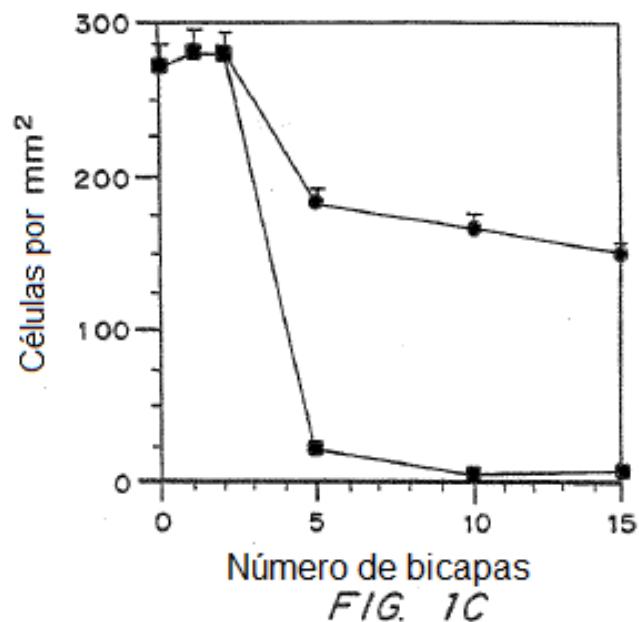


FIG. 1B



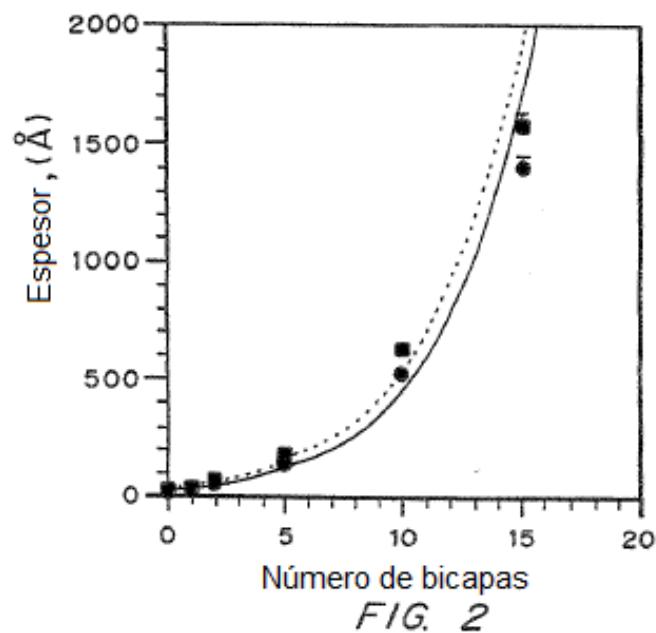


FIG. 2

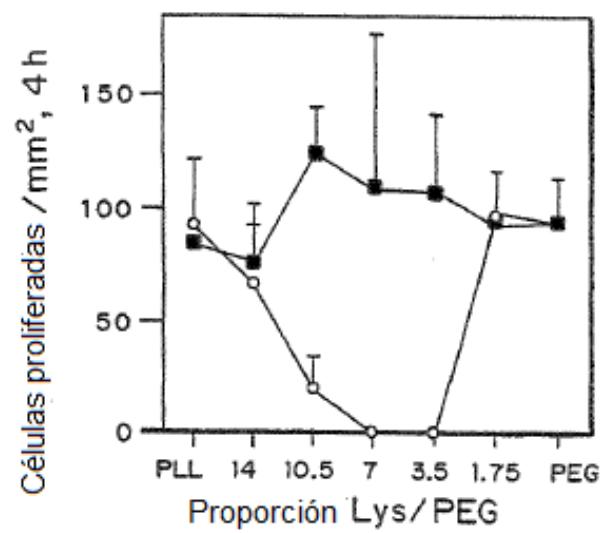


FIG. 3