

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2000.08.28	(73) Titular(es): ANGIODEVICE INTERNATIONAL GMBH BUNDESPLATZ 1 6304 ZUG CH
(30) Prioridade(s): 1999.08.27 US 151273	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.08.26	(72) Inventor(es): DONALD G. WALLACE GEORGE H. CHU JACQUELINE ANNE SCHROEDER US US US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.02.22 103/2012	(74) Mandatário: FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE ATAYDE AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO BIOCAMPATÍVEL DE POLÍMEROS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE, GERALMENTE, A COMPOSIÇÕES DE POLÍMEROS SINTÉTICOS QUE FORMAM REDES INTERPENETRANTES DE POLÍMEROS. NUMA MODALIDADE PREFERIDA, AS COMPOSIÇÕES COMPREENDEM DOIS POLÍMEROS SINTÉTICOS MULTIFUNCIONALMENTE ACTIVADOS, JUNTAMENTE COM UM INTENSIFICADOR DA FORÇA DE TRACÇÃO. TAIS COMPOSIÇÕES FORMAM MATRIZES QUE EXIBEM FORÇAS COESIVAS SUPERIORES E, EM MUITOS CASOS, PODEM SERVIR COMO SUBSTITUIÇÕES ADEQUADAS PARA MEIOS CIRÚRGICOS DE LIGAÇÃO DE TECIDOS, TAIS COMO SUTURAS E AGRAFOS CLÍNICOS.

RESUMO

<u>EPÍGRAFE:</u>	<u>"DISPOSITIVO BIOCOMPATÍVEL DE POLÍMEROS"</u>
------------------	---

A presente invenção refere-se, geralmente, a composições de polímeros sintéticos que formam redes interpenetrantes de polímeros. Numa modalidade preferida, as composições compreendem dois polímeros sintéticos multifuncionalmente activados, juntamente com um intensificador da força de tracção. Tais composições formam matrizes que exibem forças coesivas superiores e, em muitos casos, podem servir como substituições adequadas para meios cirúrgicos de ligação de tecidos, tais como suturas e agraços clínicos.

DESCRIÇÃO

<u>EPÍGRAFE:</u>	<u>"DISPOSITIVO BIOCOMPATÍVEL DE POLÍMEROS"</u>
------------------	---

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se geralmente a composições de polímeros sintéticos que formam redes de polímero interpenetrantes quando administradas aos tecidos. Tais composições são particularmente bem adequadas para uso numa variedade de aplicações médicas, quando a força física do material administrado é importante. Por exemplo, as composições da presente invenção, que são destinadas a serem utilizadas para unir os tecidos são suficientemente fortes para fornecer um substituto eficaz de outros meios cirúrgicos de fixação, tais como suturas e agrafos clínicos.

O uso de composições poliméricas em engenharia dos tecidos é agora amplamente reconhecida, particularmente aquelas que consistem em polímeros sintéticos. Em contraste com muitas composições naturalmente derivadas, as composições de polímeros sintéticas podem ser formuladas para exibir características físicas pré-determinadas, tais como a resistência do gel, bem como características biológicas, tais como a degradabilidade.

Numa variedade de aplicações da engenharia de tecidos, é desejável utilizar composições que podem ser administradas como líquidos, mas, que subsequentemente, formam hidrogéis no local da administração. É mais conveniente utilizar tais composições formadoras de hidrogel in situ uma vez que as mesmas podem ser administradas como líquidos a partir de uma

variedade de dispositivos diferentes, e são mais adaptáveis para administração em qualquer local, uma vez que elas não são pré-formadas. Têm sido descritos muitos mecanismos diferentes os quais podem ser usados para promover a formação de hidrogel in situ. Por exemplo, misturas fotoactiváveis de pré-polímeros de co-poliéster e de polietilenoglicol, solúveis em água, têm sido descritos como criadores de barreiras de hidrogel, bem como matrizes de libertação da fármaco. Numa outra abordagem, foram concebidos copolímeros de bloco de Pluronic e Poloxamer, os quais são solúveis em água fria, mas formam hidrogéis insolúveis que aderem aos tecidos à temperatura do corpo (Leach et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 162:1317-1319 (1990)). Cianoacrilatos polimerizáveis também têm sido descritos para uso como adesivos de tecidos (Ellis, et al., J. Otolaryngol. 19:68-72 (1990)). Ainda noutra abordagem, foram descritas duas composições de polímeros sintéticos de dois componentes, as quais, quando misturadas conjuntamente, formam ligações covalentes uma com a outra, bem assim como com as superfícies expostas dos tecidos (PCT WO 97/22371). Numa abordagem semelhante envolvendo uma composição de dois componentes, tem sido descrita como uma mistura de proteína e um agente de reticulação bifuncional para uso como um adesivo de tecido (Patente dos EUA No. 5.583.114).

Noutras aplicações da engenharia de tecidos, não é necessário ou desejado que as composições estejam sob a forma líquida, quando administradas. De facto, pode ser vantajoso, nalgumas circunstâncias, aplicar composições que são implantes sólidos gelatinosos, pastosos, ou mesmo pré-formados, uma vez que estas formas tendem a permanecer no lugar após a administração mais prontamente do que as formulações líquidas.

Para muitas aplicações da engenharia de tecidos, é importante que as composições sejam capazes de formar uma

matriz, após a administração, que seja suficientemente forte para suportar as forças biológicas e físicas, às quais será submetida, durante um período de tempo suficientemente longo para cumprir o seu objectivo pretendido. A força é particularmente importante quando as composições são utilizadas como um substituto parcial ou total das suturas. Além disso, para aplicações em que a aderência aos tecidos é importante, é necessário que as formulações tenham a força adesiva adequada. O Cianoacrilato é um adesivo altamente eficaz, que forma uma matriz forte, mas é demasiado tóxico para ser usado internamente e portanto não é aprovado para tais usos. Deste modo, é um objectivo da presente invenção proporcionar composições que formem vedantes clínicos de elevada resistência que não sejam tóxicos.

A presente invenção refere-se a um dispositivo de polímero biocompatível para utilização no tratamento de tecidos que compreendem uma esponja de colagénio ou folha impregnada com um pó de polietilenoglicol reactivo, de dois componentes, em que o referido pó reactivo compreende ainda um primeiro polietilenoglicol que possui múltiplos grupos nucleofílicos e um segundo polietilenoglicol que possui múltiplos grupos electrofílicos, em que o pó de polietilenoglicol permanece não reactivo até contactar com um tampão de pH elevado.

As modalidades preferidas estão definidas nas reivindicações dependentes.

Um aspecto da presente invenção é a inclusão do intensificador da resistência à tracção, que pode ser composto por uma variedade de compostos capazes de formar uma estrutura com as características apropriadas, como descrito neste documento. Tais compostos incluem, *inter alia*, Vicryl, lã de vidro, plásticos e fibras.

Os grupos funcionais, X e Y podem ser qualquer par de radicais reactivos que formam uma ligação covalente, Z, sob as condições apropriadas, tais como sulfidrilo, succinimidilo, acrilato e amino, que forma, em qualquer ordem particular, éter, éster ou dissulfureto.

A fim de intensificar ou enfraquecer a biodegradação da rede interpenetrante de polímero, o núcleo de polímero sintético pode adicionalmente compreender um extensor de cadeia. Por exemplo, metades ácido alfa-hidroxi, poli (lactona), poli (orthocarbonato) e poli (fosfoéster) podem servir para aumentar a biodegradabilidade. Além disso, o extensor de cadeia pode ser um substrato da enzima.

Num outro aspecto da presente invenção, a composição compreende ainda componentes opcionais, tais como proteínas, antibióticos, factores de crescimento e agentes hemostáticos.

Numa forma de realização preferida da invenção, o componente opcional está presente sob a forma de uma nanofibra rígida, tal como a formada por colagénio metilado.

Em ainda outro aspecto da invenção, X e Y são cada um 4 ou superior para fornecer uma reticulação mais eficiente.

Numa forma de realização, a composição da presente invenção compreende um par de óxidos de polialquileno reactivos, uma nanofibra rígida, tal como colagénio metilado, e um intensificador da resistência à tracção.

Outros aspectos da presente invenção são descritos neste documento.

A Figura 1 mostra a estrutura de polímeros lineares e ramificados com ligações biodegradáveis ("O") e grupos funcionais ("R") ligados aos mesmos.

A Figura 2a mostra a estrutura de penta-eritritol tetraquis (propionato de tri mercapto, "PESH-P").

A Figura 2b mostra a estrutura de acrilato de tetra, penta-eritritol ("PETA").

A Figura 2c ilustra a estrutura de T403, que se acopla a COH102 ou acrilatos.

A Figura 3 representa a formação da ligação entre PESH-P e PETA.

A Figura 4a mostra a estrutura de poli óxido de tetrametileno di-amina, que acopla a COH102 ou acrilatos.

A Figura 4b ilustra a estrutura de polipropileno de óxido de di-acrilato, que acopla a tióis ou grupos amino.

A Figura 4c ilustra a estrutura de polipropileno de óxido de di-amino, que acopla a COH102 ou acrilatos.

A Figura 5 representa os resultados do Exemplo 3.

A Figura 6 representa o aparelho utilizado para os ensaios de falha de cisalhamento do Exemplo 5.

As Figuras 7 e 8 mostram os esquemas sintéticos do Exemplo 6.

A Figura 9 representa a estrutura da COH102 (9a) COH206(9b).

A Figura 10 representa os tipos de dispositivos que são úteis para medir a resistência à tracção.

A Figura 11 mostra a estrutura de um braço 4-vinil-sulfona derivado de PEG.

A Figura 12 representa a formação de uma amida e um éster de carboxil ligado ao conjugado de PEG de succinimidil-glutaril-PEG mais amino-PEG.

A Figura 13 ilustra a formação de um conjugado de PEG ligado ao tioéster de succinimidil-PEG e tiol-PEG.

A Figura 14 mostra as estruturas de HEMA (hidroxi-etil-metacrilato), MMA (metil-metacrilato), mono-2-(acriloxi) etilo succinato e 2-amino-etil metacrilato.

A Figura 15 descreve um dispositivo que é útil para testar a resistência ao rebentamento de uma membrana de colagénio.

A Figura 16 representa um dispositivo (um modelo de artéria carótida pressurizado) que é útil para testar a resistência ao rebentamento de um defeito de fenda de artéria reparado.

A Figura 17 ilustra a formação de uma ligação tioéter a partir da reacção de tiol com acrilato.

A Figura 18 mostra a estrutura de TPETA (tri-metilol propano etoxilato de tri-acrilato).

A Figura 19 mostra a estrutura de TMPE-SH (tri-metilol propano etoxilato de tri-tiol).

A Figura 20 mostra a estrutura de TPT-SH (tri-metilol propano tris (3-mercaptopropionato).

A Figura 21 mostra a estrutura de glicerol-di-metacrilato.

A Figura 22 mostra a estrutura de poli-hidroxietilmetacrilato-co-metacrilato de aminoetil-co-mono-2-succinato de etilo (acriloxi).

A presente invenção refere-se a composições de polímeros sintéticos que de acordo com uma forma de realização, formam uma rede interpenetrante de polímero quando administrada a um

local de tecido. Dentro de um período curto (menos de 3 minutos) depois de ter sido administrada, a composição forma uma rede que se desenvolve com alta resistência ("tracção") coesiva, a qual contempla que a matriz tem uma resistência à tracção de pelo menos 10% e mais preferivelmente 20% da de cianoacrilato. Numa forma de realização preferida, tais redes exibem uma resistência à tracção superior a 60 N / cm². As composições preferidas são concebidas para se tornar fixas no local por meios mecânicos e / ou químicos para selar tecidos em conjunto que se separaram, como resultado de vários estados de doença ou procedimentos cirúrgicos. Assim, as composições que formam redes com as forças adesivas >50 mm Hg (6,6610³Pa) (ou seja, a pressão de rebentamento necessária para separar o adesivo e criar um vazamento(LEAK)) são preferidas para aplicações quando for desejada uma forte adesão dos tecidos.

Numa outra concretização, a presente invenção refere-se a matrizes pré-formadas sob a forma de folhas secas, que podem ser aplicadas mais rapidamente do que um líquido pulverizado (para cirurgia aberta). A obtenção de forças de rompimento muito elevadas, em curtos espaços de tempo (30 seg), pode também permitir a utilização de folhas activas em locais que devem ser ensaiados logo após a aplicação (30 seg. versus 3 min.).

Ainda noutra concretização, a presente invenção compreende as esponjas de colagénio activadas e folhas, na forma descrita nos Exemplos 4 e 5 abaixo.

Definições

As definições seguintes são fornecidas para descrever ainda vários aspectos das formas de realização preferidas da presente invenção.

O termo "gel" refere-se ao estado da matéria entre o líquido e o sólido. Como tal, um "gel" tem algumas das propriedades de um líquido (isto é, a forma é resiliente e deformável) e algumas das propriedades de um sólido (isto é, a forma é suficientemente distinta de forma a manter as três dimensões sobre uma superfície bidimensional). Por conseguinte, "tempo de gelificação", também aqui referido como "o tempo de gel", refere-se ao tempo que uma composição leva a tornar-se não escoável sob ligeira tensão. Isto é geralmente exibido como a obtenção de uma resistência de gel, expressa como módulo de elasticidade, G' , de maior do que, ou igual a 10^2 dinaes / cm^2 (10 Pa), em menos de 1 minuto.

O termo "força coesiva" refere-se à capacidade das composições da presente invenção de permanecerem intactas, i.e., não se romperem, rasgarem, ou partirem, quando sujeitas a tensões físicas ou condições ambientais. A força coesiva é medida aqui como uma função de "resistência à tracção".

O termo "força adesiva" refere-se à capacidade das composições da presente invenção de serem capazes de permanecerem ligadas aos tecidos no local da administração, quando sujeitas a tensões físicas ou condições ambientais.

O termo "polímero" refere-se a uma molécula que consiste em radicais químicos individuais, que podem ser iguais ou diferentes, mas são, de preferência os mesmos, que são unidos uns aos outros. Tal como aqui utilizado, o termo "polímero" refere-se a radicais químicos individuais que são unidos de ponta a ponta para formar uma molécula linear, bem como radicais químicos individuais juntos sob a forma de uma ramificação (por exemplo, uma estrutura "multi-braços" ou em "forma de estrela").

O termo "biocompatível" refere-se à capacidade das composições da presente invenção de serem aplicadas em

tecidos, sem induzir inflamação significativa e fibrose ou outras respostas adversas dos tecidos.

O termo "polímero sintético" refere-se a polímeros que não são de ocorrência natural e que são produzidos por síntese química ou recombinante. Como tal, as proteínas que ocorrem naturalmente, tais como o colagénio e polissacáridos de ocorrência natural, tais como ácido hialurónico são especificamente excluídos. Proteínas, tais como colagénio sintético, e hidratos de carbono tais como o ácido hialurónico sintético, e seus derivados, estão incluídos.

O termo "polímeros sintéticos activados" refere-se a polímeros sintéticos que foram ou têm sido quimicamente modificados para ter, pelo menos, um grupo funcional (por exemplo, um grupo sulfidrilo) que é capaz de reagir com um parceiro de reacção correspondente (por exemplo, um grupo sulfidrilo reactivo) para formar uma ligação covalente. O termo "multifuncionalmente activado", ou "multifuncional", refere-se a polímeros sintéticos com dois ou mais grupos funcionais (geralmente nucleofílico ou eletrofílico). Tipos de polímeros sintéticos multifuncionalmente activados incluem polímeros di-funcionalmente activados, tri-funcionalmente activados, tetra-funcionalmente activados, e polímeros activados em forma de estrela (que tem quatro ou mais grupos funcionais).

O termo "vedante clínico" refere-se a composições que se tornam fixas no local por meio de processos mecânicos e/ou químicos para vedar tecidos conjuntamente que se tenham separado, como resultado de vários estados de doença ou procedimentos cirúrgicos. Por exemplo, vedantes clínicos podem ser usados para preencher os espaços vazios em tecidos duros, para unir tecidos vasculares e outros tecidos moles, para proporcionar uma barreira mecânica para promover a hemostase,

e para evitar aderências de tecido ao manter uma superfície do tecido sem contactar com e aderir a outra superfície do tecido.

O termo "rede interpenetrante de polímero" ("IPN") destina-se a descrever a matriz que é formada a partir de um polímero reactivo ou polímeros tais como PEG, ou monómeros que são polimerizados, a qual exhibe um peso molecular infinito, e inclui um co-reagente de um tipo diferente, tal como uma fibra de alta resistência à tracção, que interpenetra dentro da rede do polímero PEG para formar duas redes contínuas através de toda a rede. Ver Sperling, LH et al., "Morphology and Mechanical Behavior of Interpenetrating Polymer Networks", in Polymer Networks, A.J. Chompff and S. Newman, ed., Plenum Press, New York, New York (1971), pgs. 435-449.

O termo "enchimento" é usado para se referir a agentes de volume, compostos orgânicos pequenos, polímeros, fibras, resinas, e semelhantes, que são adicionados a composições químicas por uma variedade de razões, sendo as mais pertinentes para a presente invenção a de aumentar a força de tracção.

Componentes da composição

As composições da presente invenção são composições de dois componentes, cada um dos quais compreende um diferente polímero sintético multi-funcionalmente activado, de tal forma que os polímeros irão reagir um com o outro no local de administração, para formar uma IPN. Como tal, eles podem ser facilmente administrados separadamente.

Tais composições podem ser geralmente representadas pela Fórmula I como se segue:



O Composto₁ tem múltiplos ($m \geq 2$) grupos funcionais (X) que reagem com o composto₂, o qual tem múltiplos ($n \geq 2$) grupos funcionais (Y), de tal forma que, quando os grupos funcionais de X e Y entram em contacto sob condições apropriadas, é formada uma ligação covalente Z. Assim, os grupos funcionais X e Y também podem ser referidos como "parceiros de reacção" um do outro, e podem ser colectivamente referidos como um "par de reacção". Como representado na Fórmula I apenas para fins de ilustração, existe apenas uma ligação formada entre o composto₁ e o composto₂. No entanto, quando $m+n \geq 5$, e as razões adequadas dos dois componentes são utilizadas, como descrito neste documento, os dois compostos formam múltiplas ligações, um com o outro, resultando numa matriz de polímero tridimensional. De preferência, ambos os compostos contêm quatro ou mais grupos funcionais, visto que tal multifuncionalidade resulta numa matriz de gel com uma maior força de coesão total. Numa forma de realização particularmente preferida, cada um dos compostos é tetrafuncionalmente activado.

Noutra forma de realização preferida, os compostos têm, cada um, 12 grupos funcionais. Tais compostos são formados a partir da reacção de um primeiro polímero tetrafuncionalmente activada com um segundo polímero tetrafuncionalmente activado, em que os grupos funcionais de cada um dos dois compostos são um par de reacção, e reagem em conjunto para formar polímeros funcionalmente activados de "12-braços". Um exemplo de um tal composto de "12-braços" é o dodeca-sulfidrilo-PEG, 50.000 mol, em peso, que é construído a partir de um núcleo tetrafuncional de éster de succinimida PEG, acoplado a quatro moléculas de PEG-sulfidrilo tetra-funcionais (exteriores). Tais polímeros variam em tamanho desde mais de 10.000 mol, em

peso para mais que 100.000 mol, em peso, dependendo do peso molecular dos materiais iniciais do polímero tetra-funcionalmente activado.

Outros tipos de polímeros multifuncionais podem ser facilmente sintetizado usando síntese de rotina. No entanto, deve-se ter cuidado para produzir produtos multi-braços com comprimentos de braço consistentes para evitar o impedimento estereo dos grupos funcionais. Consequentemente, os polímeros activados que são adequados para utilização na presente invenção podem ter uma variedade de formas e configurações geométricas.

Núcleo do Polímero

Como descrito acima, cada um dos compostos tem múltiplos grupos funcionais, X e Y. O restante não-reactivo do composto é considerado como sendo o seu "núcleo". No entanto, para a maioria das aplicações, é preferível que ambos os compostos tenham o mesmo ou um núcleo de polímero diferente.

Um polímero hidrofílico sintético, particularmente preferido para certas aplicações é um polietilenoglicol (PEG) tendo um peso molecular dentro da gama de cerca de 100 a cerca de 100.000 mol, em peso, mais preferivelmente cerca de 1.000 a cerca de 20.000 mol, em peso. Mais preferencialmente ainda, quando o núcleo do polímero é o polietilenoglicol, tem geralmente um peso molecular dentro da gama de cerca de 7.500 a cerca de 20.000 mol. em peso. Mais preferivelmente, o polietilenoglicol tem um peso molecular de, aproximadamente 10.000 mol. em peso.

Óxidos de polialquileno multifuncionalmente activados, tais como polietilenoglicol, estão disponíveis comercialmente, e são também facilmente preparados utilizando métodos conhecidos. Por exemplo, ver Capítulo 22 de Poly(ethylene

Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. Milton Harris, ed, Plenum Press, NY (1992.); e Shearwater Polymers, Inc. Catalog, Polyethylene Glycol Derivatives, Huntsville, Alabama (1997-1998). Para utilização como vedante de tecidos, a combinação exemplar de polímeros activados é como se segue: PEG tetrafuncional, pentaeritritol poli (etileno glicol) éter tetra-succinimidil glutarato (10.000 peso mol.); e PEG tetrafuncional, pentaeritritol poli (etileno glicol) éter tetra-sulfidril (10.000. mol em peso). Em ambos os casos, estes PEGs de "quatro-braços" são formados por etoxilação de pentaeritritol, em que cada uma das quatro cadeias é de, aproximadamente, 2.500 mol em peso e, em seguida, derivatizados para introduzir os grupos funcionais em cada um dos quatro braços. São também preferidos os compostos semelhantes aos análogos de poli(etilenoglicol), polimerizados a partir de di-glicerol em vez de pentaeritritol.

Outras moléculas radialmente ramificados, tais como glicerol ou lactitol, podem ser utilizada para construir materiais formadores de gel. As estruturas desejadas podem ser imiscíveis com água e de baixo peso molecular (350 a cerca de 12.000 mol em peso) de modo a permanecerem líquidas. São também contempladas as estruturas formadoras de gel, com um peso molecular mais elevado. É preferível que tais composições sejam miscíveis em água ou dispersáveis em água para serem compatíveis com a utilização da água como o meio líquido para a libertação.

Intensificador da Resistência à Tracção

A fim de aumentar a força da matriz, é geralmente desejável adicionar á composição um "intensificador de resistência à tracção". Tais intensificadores de resistência à tracção compreendem, preferivelmente, fibras de alta

resistência à tracção, com tamanho de micron, de preferência 5 a 40 microns de diâmetro, e 20 a 5000 microns de comprimento, geralmente com temperaturas de transição de vidro bem acima dos 37°C.

Intensificadores de resistência à tracção adequados, para utilização na presente invenção incluem, *inter alia*, fibras de colagénio, e fibras de polilactídeo e poliglicólido, bem como outros intensificadores de resistência à tracção orgânicos e intensificadores da resistência à tracção inorgânicos. Um intensificador da resistência à tracção particularmente útil é o Vicryl (poliglicólido:poliláctido, 90:10). É bem conhecida a utilização de intensificadores de resistência à tracção, que fazem parte da categoria mais ampla dos "enchimentos". Por exemplo, "gomas de silicone", quando cruzadas com peróxidos, são fracas e caseosas, com resistências à tracção na ordem de apenas 34 N/cm². Quando adequadamente combinado com enchimentos de reforço, a resistência à tracção destas gomas podem aumentar tanto como 50 vezes. Lichtenwalner, H.K. and Sprung, M.N., in Mark, H.F., Gaylord, N.G., e Bikales, N.M., Eds., Encyclopedia of Polymer Science and Technology, vol. 12, p. 535, John Wiley, New York, 1970.

Intensificadores de resistência à tracção adequados são os que possuem uma inerente resistência à tracção elevada e também podem interagir por ligações covalentes ou não-covalentes com a rede de gel polimerizada. O intensificador de elevada resistência à tracção inerente deve ligar-se ao gel, quer mecânica ou covalentemente, a fim de proporcionar o suporte de tracção. As resistências à tracção de suturas reabsorvíveis de poliglicólido são cerca de 89.000 N/cm²; A das fibras de colágeno é de 5000-10.000 N/cm² (Hayashi, T., in Biomedical Applic. of Polym. Mater., Tsuruta, T. et al., Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993).

Grupos Reactivos e Ligação da Matriz

Na presente invenção, a ligação, Z, compreende uma ligação covalente que é formada quando os grupos funcionais, X e Y, são feitos reagir em conjunto. Os grupos funcionais podem ser sulfidrílo, succinimidílo, acrilato, amino, etc. Por conseguinte, a ligação pode ser um éster, um éter, um dissulfureto, ou semelhante. Outros grupos funcionais, a sua reactividade e as ligações formadas a partir dos mesmos, são bem conhecidos na literatura científica. Por exemplo, ver Bodanszky, M., Principles of Peptide Synthesis, 2ª ed., Páginas 21 a 37, Springer-Verlog, Berlim (1993); e Lundbland, RL., Chemical Reagents for Protein Modifications, 2ª ed., Capítulo 6, CRC Press, Boca Raton, Florida (1991). Outros exemplos de pares de grupos funcionais incluem, inter alia, sulfidrílo/ acrilato, sulfidrílo/ succinimidílo, amino/ succinimidílo e amino/ acrilato.

Além dos compostos reactivos sulfidrílo, que formam ligações tioéster, vários outros compostos podem ser utilizados os quais formam outros tipos de ligações. Por exemplo, compostos que contêm derivados de imidato de metilo formam ligações imido-tioéster com os grupos sulfidrílo. Alternativamente, podem ser utilizados grupos reactivos sulfidrílo os quais formam ligações dissulfureto com grupos sulfidrílo, tais como dissulfureto de orto piridílo, 3-nitro-2-piridenossulfenilo, ácido 2-nitro-5-tiocianobenzóico, 5,5'-ditio-bis (2 - ácido nitrobenzóico), os derivados de metano-tiosulfato, e dissulfuretos de 2,4-dinitrofenilcisteínílo . Em tais casos, os reagentes auxiliares, tais como o peróxido de hidrogénio ou o éster de di-terc-butilo do ácido azodicarboxílico, podem ser utilizados para facilitar a formação da ligação dissulfureto.

No entanto, uma outra classe de grupos sulfidrilo reactivos formam ligações tioéter com grupos sulfidrilo. Tais grupos incluem, inter alia, iodoacetamida, N-etilmaleimida e outras maleimidas, incluindo dextrano maleimidas, mono-bromo-bimano e compostos relacionados, vinilsulfonas, epóxidos, os derivados de O-metil-isoureia, etilenoiminas, aziridinas, e 4-(aminossulfonil) - 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole.

Extensores de cadeia

Os grupos funcionais podem ser directamente ligados ao núcleo composto, ou podem ser indirectamente ligados através de um extensor de cadeia. Tais extensores de cadeia são bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, PCT WO 97/22371, que descreve "grupos de ligação" que seriam apropriados para uso como extensores de cadeia nas composições da presente invenção. Extensores de cadeia são úteis para evitar problemas de impedimento estereo que são por vezes associados com a formação de ligações directas entre moléculas. Alternativamente, extensores de cadeia podem ser usados para ligar vários compostos multifuncionalmente activados, em conjunto, para produzir moléculas maiores. Numa forma de realização particularmente preferida, o extensor de cadeia pode também ser usado para alterar as propriedades de degradação das composições após a administração e formação do gel resultante. Por exemplo, podem ser incorporados extensores de cadeia, num ou em ambos os polímeros multifuncionalmente activados para promover a hidrólise, para desencorajar a hidrólise, ou para proporcionar um local para a degradação enzimática. Extensores de cadeia podem também activar ou suprimir a actividade de grupos sulfidrilo e sulfidrilo-

reactivos. Por exemplo, seria esperado que grupos de remoção de electrões dentro de um ou dois carbonos do grupo sulfidrilo diminuíssem a sua eficácia no acoplamento, devido a uma diminuição de nucleofilicidade. Prevvia-se que o carbono de ligação dupla e o carbono de carbonilo produzia este efeito. São previstos grupos próximos dos volumosos para cada um dos parceiros para diminuir as taxas de acoplamento, devido ao impedimento estereo. Seria previsto que os grupos de remoção de electrões, adjacentes ao carbonilo reactivo de glutaril-N-hidroxissuccinimidilo tornassem este carbono de carbonilo ainda mais reactivo com o parceiro de sulfidrilo.

Extensores de cadeia podem fornecer locais para a degradação, ou seja, sites hidrolisáveis. Exemplos de extensores de cadeia hidrolisáveis incluem, inter alia, ácidos alfa-hidróxi tais como o ácido láctico e ácido glicólico; poli(lactonas), tais como caprolactona, valerolactona, gama butil-lactona e p-dioxanona; poli(aminoácidos); poli(anidridos) tais como glutarato e succinato; poli(ortoésteres); poli(ortocarbonatos) tal como carbonato de trimetileno, e poli(fosfoésteres). Exemplos de extensores de cadeia não-degradáveis incluem, inter alia, succinimida, ácido propiónico e carboximetilato. Ver, por exemplo, o PCT WO 99/07417. Exemplos de extensores de cadeia enzimaticamente degradáveis incluem Leu-Gly-Pro-Ala, que é degradado pela collagenase, e Gly-Pro-Lys, que é degradado pela plasmina.

Outros princípios gerais que devem ser considerados na concepção das composições da presente invenção são como se seguem: se estão para ser utilizadas estruturas de peso molecular mais elevado, elas têm, de preferência, ligações biodegradáveis, como descrito acima, de forma a que não são gerados fragmentos maiores do que 20.000 mol. em peso, durante a reabsorção no corpo. Além disso, para promover a

miscibilidade na água e/ou a solubilidade, pode ser desejado adicionar carga eléctrica suficiente ou hidrofiliicidade. Tais grupos hidrofílicos podem ser facilmente introduzidos utilizando síntese química conhecida, desde que eles não dêem origem a géis que incham mais do que 3-5 vezes, ou que têm baixa resistência à tracção. Em particular, os segmentos de polialcoxi podem enfraquecer a resistência do gel.

Constituintes da Composição Opcionais

Além do(s) composto(s) polimérico funcionalmente activado(s) e do intensificador de resistência à tracção, as composições da presente invenção podem também conter outros compostos, que podem ser incluídos num ou em ambos os componentes das composições de dois componentes, ou podem ser administrados separadamente. Numa forma de realização, estes compostos podem tornar-se covalentemente incorporados no próprio IPN, tornando-se reticulados com um ou ambos os compostos funcionalmente activados depois de serem misturados entre si. Numa outra forma de realização, tal como seria o caso se o composto fosse não reactivo com cada um dos compostos funcionalmente activados, o composto pode ser administrado de tal forma que se torna fisicamente ou ionicamente associado com os compostos formadores de matriz após a mistura, e assim tornam-se parte da própria matriz.

Os compostos adicionais que podem ser adicionados são os glicosaminoglicanos e as proteínas. Glicosaminoglicanos adequados incluem, inter alia, ácido hialurónico, quitina, sulfato de condroitina A, B, ou C, sulfato de queratina, queratosulfato e heparina, e seus derivados. Numa outra concretização, podem ser adicionadas proteínas para uma

variedade de fins. Por exemplo, o colagénio pode melhorar a biocompatibilidade da matriz, incluindo a colonização potencial por células, a promoção da cura, etc. O colagénio e quaisquer proteínas contendo grupos amino contribuiriam também para a integridade estrutural da matriz, tornando-se reticulados com a mesma, juntamente com os outros componentes da matriz. Em particular, se forem utilizados ésteres de PEG-succinimidil, as ligações amida formadas com colagénio serão mais estáveis à degradação hidrolítica do que as ligações formadas pela reacção de ésteres de succinimidilo e sulfidrilos.

As Proteínas adequadas incluem, inter alia, colagénio, fibronectina, gelatina e albumina, bem como fragmentos peptídicos destes. O colagénio é particularmente preferido, o qual se pode encontrar sob a forma de colagénio não fibrilar, microfibrilar ou fibrilar. Os Tipos I e III de colagénio isolado a partir de cório de bovino ou de placenta humana, ou preparados por métodos de ADN recombinante, são adequados. Ver PCT WO 90/05755 para uma descrição de colagénios adequados e derivados de colagénio. Deve ser entendido que, quando se adiciona colagénio à composição, é importante ajustar a concentração dos outros componentes da composição para evitar a precipitação.

Constituintes adicionais que podem ser adicionados à composição incluem antibióticos, factores de crescimento, proteínas hemostáticas (tais como a trombina, a fibrina, fibrinogénio, os factores sanguíneos, etc), células, genes, DNA, etc.

Nanofibras rígidas Opcionais

Os componentes da composição opcionais acima mencionados podem ser adicionados às IPNs da presente invenção numa

variedade de formas que são bem conhecidos pelos peritos na área. Por exemplo, o DNA pode ser adicionado sob a forma de ADN genómico, oligonucleótidos, polinucleótidos, dinucleótidos e assim por diante. Da mesma forma, os constituintes proteináceos podem ser adicionados como polipéptidos, proteínas nativas, proteínas sintéticas, fragmentos de proteína, etc

Uma estrutura particularmente preferida para adição às IPN da presente invenção é uma nanofibra. Muitos dos componentes acima mencionados opcionais, e, especialmente, o colagénio metilado, podem ser facilmente formados numa tal estrutura. O termo "nanofibra" pretende significar uma fibra que é normalmente inferior a um micron de comprimento. Em alguns casos, estas fibras são tão pequenas que o colagénio nesta forma é considerado como sendo essencialmente "não fibrilar". Em qualquer caso, quando incorporado numa IPN consistindo num polímero flexível, com uma temperatura de transição vítrea relativamente baixa (menos de zero), tal como o PEG, uma nanofibra rígida com uma temperatura de transição vítrea relativamente elevada (acima de 25°C), confere resistência adicional.

Embora o colagénio seja um bom exemplo de uma nanofibra rígida, porque é formado a partir de três cadeias polipeptídicas, numa tripla hélice mantida junta por ligações de hidrogénio, outros polímeros podem ser igualmente adequados. Por exemplo, os derivados de outros biopolímeros que têm a forma de bastonete, tais como tubulina e queratina podem ser fabricados sob a forma de nanofibras rígidas. Desde que a estrutura seja um polímero em forma de bastonete, em escala nanométrica, que é compatível com a água e tem, de preferência, grupos polares e, mais preferencialmente, grupos amino, na sua superfície, a nanofibra rígida pode ser feita de

uma variedade de diferentes materiais. Ver, por exemplo, Liu, G., et al. "Diblock Copolymer Nanofibers", *Macromolecules* 29:5508-5510 (1996).

Formulação da Composição

Ambos os componentes são libertados no local como pós, para serem misturados com o tampão no local de administração.

Numa concretização alternativa, ambos os componentes podem ser misturados em conjunto num único meio aquoso no qual são ambos não reactivos, ou seja, tal como num tampão de pH baixo. Depois disso, eles podem ser pulverizados sobre o local do tecido, juntamente com um tampão de pH elevado, após o que irão reagir rapidamente e formar um gel.

A concentração dos compostos reactivos em cada um dos componentes da composição depende necessariamente um número de factores. Por exemplo, se os componentes da composição são, cada um, PEGs de 4 braços (i.e. composições PEG-PEG), uma concentração de 20-25%, em peso, em cada um dos dois componentes antes da mistura resulta num gel, após a mistura, com um módulo elástico, G' , de cerca de 10^5 - 10^6 dynes/cm², (10^4 - 10^5 Pa), o qual é adequado para utilização como vedante cirúrgico. Utilizando colagénio metilado e PEG succinimidilo de 4 braços, as concentrações de 2-4% e 0,2-0,4%, respectivamente, resultam em géis com forças coesivas que são comparáveis aos géis PEG-PEG de 10-15%. Utilizando albumina como um dos componentes, as concentrações de 30% ou mais atingem uma força coesiva semelhante. A concentração adequada do composto, e outros ingredientes opcionais, em cada componente, e, assim, a concentração relativa dos componentes da matriz na matriz de gel final, pode ser facilmente optimizada para alcançar o tempo de gelificação desejado e força do gel utilizando experimentação de rotina. Utilizando

os PEGs preferidos de quatro braços, acima descritos, o polímero sintético está geralmente presente numa concentração de 2 a 50% (p/v), e mais preferivelmente 10-25%. No entanto, para algumas aplicações que requerem matrizes de alta resistência, onde a fluidez das composições não é crucial, é desejável utilizar PEG a concentrações mais elevadas, tais como 50% a 70%, mais preferivelmente 60%.

Os componentes líquidos das composições da presente invenção são, cada um, separadamente, preparados por adição do polímero sintético activado (na forma seca ou como uma solução concentrada), num meio líquido. Os meios líquidos adequados incluem soluções tampão aquosas, tais como fosfato de sódio monobásico/fosfato de sódio dibásico, carbonato de sódio/bicarbonato de sódio, glutamato ou acetato, a uma concentração de 0,5 a 300mM. Em geral, o PEG de sulfidrilo reactivo é preparado em água ou num tampão diluído, com um pH entre cerca de 5 a 6. Os tampões com pKs entre cerca de 8 a 10,5 para preparação do componente sulfidrilo-PEG são úteis para alcançar o tempo de gelificação rápida das composições que contêm misturas de sulfidrilo-PEG/SG-PEG. Estas incluem carbonato, borato e AMPSO (3 - [(1,1-dimetil-2-hidroxietil) amino]2-hidroxi-propano-ácido sulfónico). Em contraste, usando uma combinação de maleimidilo PEG e sulfidrilo-PEG, é preferível um pH de cerca de 5 a 9 para o meio líquido utilizado para preparar o PEG sulfidrilo. Uma composição particularmente preferida para aplicações hemostáticas, para locais de tecidos com sangramento activo, compreende uma mistura de maleimidilo e PEG succinimidil como o primeiro componente, e PEG sulfidrilo como o segundo componente. Tais composições produzem géis com biodegradabilidade melhorada e tempos de gel superiores quando comparadas com composições com apenas maleimidilo PEG ou succinimicilo PEG sozinho.

O pH da solução tampão aquosa, que é usada para cada um dos dois (ou mais) componentes da composição deve ser ajustada utilizando otimização de rotina para atingir um pH final que é favorável à gelificação rápida, sem causar gelificação instantânea que interfere com o processo de libertação. Por exemplo, tanto o amino PEG como PEG sulfidrílo precisam de um pH básico para melhorar a nucleofilicidade. Os efeitos do pH no tempo de gel são discutidos abaixo nos Exemplos.

Resistência do Gel

As composições da presente invenção são formuladas para exibir resistência coesiva superior. Isto geralmente significa que elas apresentam, pelo menos, 10% e de preferência 20% da força de ruptura de cianoacrilato, "Supercola".

Formulação exemplar feita a partir de colágeno COH102/206/metilado mais lã de vidro ou Vicryl.

A adição de colagénio metilado a formulações PEG, tais como COH102/COH206, descrito abaixo no Exemplo 2, endurece grandemente o gel e permite-lhe resistir ao inchaço em tampão salino ou água. Porque o gel não incha, ele continua a ter resistência à tracção inerente suficiente para permanecer ligado a enchimentos fibrosos, tais como a lã de vidro, fios de Vicryl, ou fios de sutura de seda.

A combinação de COH102/COH206 e colágeno metilado pode ser considerada como "uma rede interpenetrante de polímeros". Isto acontece porque o colagénio metilado e os reagentes PEG existem como uma solução homogênea transparente antes da gelificação a um pH 4-5. A capacidade do PEG e do colagénio derivado de coexistir em solução em conjunto foi uma

descoberta muito inesperada. No ponto de gelificação (desencadeada por elevação do pH), o COH102 e o COH206 reagem através dos seus respectivos grupos reactivos para formar ligações tio-éter. Esta ligação dá origem a uma rede de peso molecular infinito, que é uma característica dos géis de polímero. O COH102 e o COH206 foram géis sózinhos, mas esses géis são comparativamente fracos. Quando o colagénio metilado está presente, os grupos amino no colagénio podem também reagir com COH102, formando ligações amida e resultando num gel de três vias de PEG e de colagénio, que é ligado covalentemente a uma rede.

A adição do colagénio metilado cria um gel que é suficientemente robusto para suportar os enchimentos fibrosos. Se o gel não é suficientemente forte para manter o enchimento fibroso, este puxa-o para fora sob cargas de tracção, e a elevada resistência à tracção não é alcançada. A Tabela 12 abaixo mostra que, quando outras moléculas ou partículas poliméricas são substituídas por colágeno metilado, o desempenho das ligações diminui. Assim, o colagénio metilado, sendo uma molécula relativamente rígida, pode conferir resistência melhorada ao hidrogel de PEG relativamente diluído. Os polímeros flexíveis, tais como ácido hialurónico, polilisina, e quitosano, embora tenham um peso molecular relativamente elevado e criam soluções relativamente viscosas, aparentemente não têm a mesma rigidez e são, portanto, menos capazes de absorver tensões de tracção e passar estas tensões para fora do enchimento fibroso.

Relativamente aos polímeros, o PEG é uma cadeia de polímero flexível que tem uma baixa temperatura de transição vítrea (temperatura à qual o polímero é flexível, em vez de como borracha e rígido); o colagénio metilado tem uma temperatura de transição vítrea mais elevada (isto é, o

colagénio metilado perde a sua rigidez, torna-se flexível, em cerca de 33-35 graus C, temperatura à qual ele "funde" para formar gelatina, uma molécula de cadeia flexível). Porque se forma uma rede interpenetrante de polímero (IPN) entre um polímero (PEG) de baixa temperatura de transição vítrea e um polímero de alta temperatura de transição vítrea (colagénio metilado), o resultado é um reforço do primeiro mediante este último. Se se tenta reforçar PEG com um outro polímero flexível (tal como o ácido hialurónico), que também tem uma baixa temperatura de transição de vidro (isto é, é flexível, a temperaturas de interesse), não se consegue alcançar o reforço. (Ver, por exemplo, Sperling, LH, Huelck, V., e Thomas, DA, "Morphology and mechanical behavior of interpenetrating polymer networks", in Polymer Networks, Structural and Mechanical Properties, eds. A.J, Chomppff, S. Newman, Plenum Press, NY, 1971, p. 435).

A força de ligação reforçada da formulação final é aparentemente dependente de vários factores: 1) os reagentes PEG COH102 e COH206 ligam-se covalentemente para formar um hidrogel; esse gel também exhibe excelente ligação aos tecidos, aparentemente porque o éster de succinimidilo do COH102, que se pode ligar a grupos amino nos tecidos (ver Tabela 14); 2) o colagénio metilado forma uma rede interpenetrante de polímeros com a rede de gel PEG, reforçando-a; e 3) a passagem das cargas de tracção para os enchimentos fibrosos, tais como fibras polilactide/glicólido ou fibras de vidro. Assim, a adição dos enchimentos fibrosos é fundamental para alcançar o nível final desejado de resistência à tracção do gel.

É previsto que outros derivados de colagénio que permanecem solúveis (moleculares, não fibrillar) a um pH de 4-7, possam também conferir as mesmas propriedades desejadas. Por exemplo, outros ésteres de grupos carboxilo de colagénio,

tais como colagénio etilado, propilado, ou benzilado pode também funcionar como colagénio metilado. O colagénio fibroso é menos desejado; porque forma domínios em forma de esferas, domínios aglomerados no gel e não conferem resistência à tracção melhorada. Os derivados de colagénio que não são solúveis a um pH de 4, ou que não podem conter grupos amino livres, reactivos, tais como colagénio succinilado, também não são preferidos, porque não proporcionam as propriedades desejadas. Os polímeros sintéticos que exibem rigidez são quase exclusivamente insolúveis em água, estruturas cristalinas que existiriam como grumos de escala micron e não formam a rede íntima interpenetrante com o hidrogel de PEG que é necessária.

Uso e Administração

Ainda outra forma de fornecer as composições da presente invenção consiste em preparar os dois componentes reactivos (ou o único componente reactivo no caso de componentes contendo sulfidrilo que são concebidos para formar ligações dissulfureto), na forma inactiva como pó. Tais composições podem então ser activadas após a aplicação no local de tecido, ou imediatamente antes, mediante a aplicação de um activador. Numa forma de realização, o activador é uma solução tampão com um pH que vai activar a composição uma vez misturado com a mesma. Ver Exemplo 7 para uma descrição de uma composição de PEG contendo sulfidrilo, que é mantida a um pH baixo até à administração, sendo depois misturada com um tampão de pH elevado, no local de aplicação, para iniciar a gelificação.

Ainda uma outra forma de fornecer as composições consiste em preparar folhas pré-formadas, e aplicar as mesmas como tal no local de administração (ver exemplos).

As composições da presente invenção podem ser usadas numa variedade de diferentes aplicações farmacêuticas. Em geral, as composições aqui descritas podem ser adaptadas para utilização em qualquer aplicação a engenharia de tecidos, em que as matrizes de gel sintéticos estão actualmente a ser utilizadas. Por exemplo, as composições da presente invenção são úteis como vedantes de tecidos, no aumento dos tecidos, na reparação de tecidos, como agentes hemostáticos, na prevenção de aderências de tecidos, no fornecimento de modificações de superfície, e em aplicações de libertação de fármaco/célula/gene. Um perito na arte pode facilmente determinar o protocolo de administração adequada para utilizar com qualquer composição, tendo uma resistência de gel conhecida e um tempo de gelificação baseado nos princípios aqui descritos e nos princípios científicos bem conhecidos. Uma descrição mais detalhada de várias aplicações específicas é dada abaixo:

Vedantes e Adesivos de tecido

Numa aplicação preferencial, as composições aqui descritas podem ser utilizadas para situações clínicas que requerem um revestimento ou camada de vedação para impedir a fuga de gases, líquidos ou sólidos. O método implica a aplicação de ambos os componentes no tecido danificado ou órgão a vedar 1) tecidos vasculares e ou outros tecidos ou órgãos para interromper ou minimizar o fluxo de sangue, 2) o tecido do tórax, para parar ou minimizar a fuga de ar, 3) do tracto gastrointestinal ou tecido pancreático para parar ou minimizar o vazamento dos conteúdos fecais ou dos tecidos; 4) da bexiga ou ureteres para interromper ou minimizar as fugas de urina, 5) dura mater para interromper ou minimizar as fugas de CSF

(fluido cerebrospinal; e 6) o tecido da pele ou da serosa para parar a fuga de fluido seroso.

Estas composições também podem ser utilizadas para adesão de tecidos em conjunto, tais como pequenos vasos, nervos ou de tecido dérmico. O material pode ser usado 1) através da sua aplicação à superfície de um tecido e, em seguida, um segundo tecido pode ser rapidamente pressionado contra o primeiro tecido, ou 2), colocando os tecidos numa estreita justaposição e, em seguida, aplicar o material. Além disso, as composições podem ser usadas para encher os espaços em tecidos moles e duros, os quais são criados por doença ou cirurgia.

As aderências cirúrgicas

Uma aplicação preferida consiste num método de reduzir a formação de aderências após um procedimento cirúrgico num paciente. O método implica a aplicação do material no tecido danificado ou órgão, quer por pulverização de ambos os componentes em conjunto ou por aplicação de componentes anteriormente misturados ou de um implante sólido pré-formado. Os componentes irão reagir em conjunto para formar uma matriz forte sobre a superfície do tecido. Os procedimentos clínicos incluem indicações ginecológicas, neurocirúrgicas, abdominais, cardíacas e ortopédicas.

Libertação de fármacos

Uma aplicação preferida consiste num método de aplicação local uma substância biologicamente activa a pacientes. A substância activa pode ser liberta em conjunto com os dois componentes, de tal forma que o material pode formar in situ, ou pode fazer parte de um implante pré-formado. A substância activa pode ser libertada quer por meio de processos de

difusão controlada ou pode ser covalentemente ligada aos componentes de tal forma que irá ser libertada à medida que o hidrogel resultante se degrada.

As substâncias biologicamente activas podem ser qualquer uma de uma variedade de materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo proteínas, hidratos de carbono, e ácidos nucleicos. Exemplos específicos incluem enzimas, antibióticos, agentes antineoplásicos, citocinas, anestésicos locais, hormonas, agentes antiangiogénicos, anticorpos, neurotransmissores, fármacos psicoactivos, fármacos que afectam os órgãos reprodutivos, e oligonucleotídeos terapêuticos.

Modificação de implantes

Uma aplicação preferida é um método de aplicação de revestimentos para implantes para afectar as propriedades de superfície de implantes ou para ajudar os implantes a aderirem às superfícies de tecidos. Um revestimento dos componentes pode ser aplicado a 1) enxertos vasculares, stents para minimizar ou impedir a fuga de sangue ou fluido seroso a partir destes dispositivos, 2) cateteres ou implantes mamários para reduzir ou parar a fibrose excessiva, 3) pensos ou redes artificiais para minimizar a fibrose excessiva e para ajudar os implantes a aderirem a superfícies dos tecidos.

Libertação de Células ou Genes

Uma aplicação preferida das composições consiste em encapsular e, assim, libertar células ou genes, a qual inclui material a partir de fontes naturais ou DNA sintético, RNA e as suas respectivas formas anti-sense, num local desejado. As células podem incluir células estaminais mesenquimais, células

epiteliais e células neuroectodérmicas. As células podem ser tanto de origem alogénica ou xenogénica.

EXEMPLOS

Exemplo 1 (Referência)

Preparação de uma Composição Vedante de Tecidos Baseada em Penta-eritritol de dois Componentes

Penta-eritritol tetraquis (3-mercaptopropionato), peso mol. 489 ("PESH-P", Fig. 2a), 1,08 g, e penta-eritritol tetraacrilato, peso mol. 352 ("PETA", Fig. 2b), 1,0 g, são misturados em conjunto na presença de 5 a 10 ug de um polioxipropileno tri-amina ("T403", Fig. 2c, Jeffamine, Texaco Chemical Co., Houston, Texas.), que serve como uma base.

Todas as espécies reactivas são líquidas. O PESH-P e o PETA não são miscíveis em água. Por conseguinte, o PETA é aquecido a cerca de 40 °C para formar um líquido antes de se misturar com PESH-P e T403. Dentro de 1 a 5 minutos após a mistura, dependendo do nível de T403, começa a gelificação. A ligação formada entre PESH-P e PETA é mostrado na fig. 3. O gel é deixado a curar durante várias horas, seguido por uma hora de hidratação, a 37 °C. Em seguida, a resistência à tracção do gel é de 0,88 +/- 0,3 MPa. Quando tais géis são deixados em solução salina fisiológica, pH 6,7, são estáveis durante mais de 40 dias, e apenas incham cerca de 20%. Dados sobre a força de ruptura mostram apenas uma adesão moderada ao pó-de-pele (hide grindate). Isto seria de esperar, uma vez que não há nenhuma ligação química de sulfidrilo ou acrilato à proteína utilizando misturas PETA-P/PESH. Em três testes de força de ruptura, foram observadas pressões de ruptura de 20-40 mmHg ($2,67 \cdot 10^3$ - $5,33 \cdot 10^3$ Pa).

Exemplo 2

Resistência à tracção de várias composições

Materiais e Métodos:

Poliétileno glicol Penta-eritritol de éter de de tetra-
tiol, 10.000 mol. em peso. ("COH206"), penta-eritritol de
poliétileno glicol éter tetra succinimidil-glutarato, 10.000
mol. em peso. ("COH102"), e penta-eritritol de
poliétilenoglicol éter tetra amino, 10.000 mol. em peso.
("COH204") foram adquiridos à Shearwater Polymers, Inc.
(Huntsville, Alabama.) Cianoacrilato, "Super Cola", que foi
comprado num estabelecimento comercial. Gelatina, 70-100
Bloom, foi adquirido na Sigma (Saint Louis, Missouri). Sulfo-
etileno-glicol bis succinimidil succinato ("S-EGS"), dimetil
suberimide ("DMS"), e dissuccinimidil glutarato ("DSG")
foram adquiridos à Pierce Chemical Company, Rockford,
Illinois. Poliétileno glicol ("PEG") 200 mol. em peso. di-
acrilato ("PEG-di-acrilato de"); PEG, 1000 mol. em peso. di-
metacrilato ("PEG-di-metacrilato"), e 2-hidroxi-etil
metacrilato ("HEMA") foram adquiridos à Polysciences, Inc.,
Warrington, Pennsylvania. O polipropileno ("OPP"), 540 mol. em
peso. di-acrilato ("PPO-di-acrilato de"); PPO, 230 mol. em
peso. bis-2-aminopropil éter ("PPO-di-amino 230"); PPO, 2000
mol. em peso. bis-2-aminopropil éter ("PPO-di-amino 2000");
politetrahydrofurano bis (3-aminopropil) ("PTMO"), 350 mol. em
peso. ("PTMO 350"); PTMO, 1.100 mol. em peso. ("PTMO 1100");
PESH-P, 489 mol. em peso.; Mol, PETA 352. em peso.; e potássio
meta bissulfito foram adquiridos da Aldrich Chemical Company,
Milwaukee, Wisconsin. Persulfato de amónio foi adquirido a
partir de Biorad, Inc., Richmond Califórnia. Colagénio
metilado foi preparado a partir de colagénio purificado de

cório de bovino, na sequência de um método modificado a partir da Patente dos Estados Unidos No. 4,164,559 (Ver Exemplo 7). As estruturas de PTMO (também denominadas de óxido de politetrametileno di-amina), PPO di-acrilato e PPO di-amina são mostrados na FIG 4a, 4b e 4c, respectivamente.

Os géis foram preparados como se segue:

a. COH102/COH206: 100 mg COH102 foram dissolvidos em 400 µL de 0,5 mM de fosfato de sódio, pH 6,0. 100 mg COH206 foram dissolvidos em 400 µL de fosfato de sódio 300 mM, pH 7,5. As duas soluções foram misturadas num copo e vertidas para um molde de, aproximadamente, 8 X 0,5 X 0,5 cm. A gelificação ocorreu em 2-3 minutos. A amostra foi deixada à temperatura ambiente até secar. A matriz seca foi removida do molde, e hidratada a 37 °C durante uma hora antes do teste de resistência à tracção.

b. COH102/COH204: A amostra foi preparada como descrito em a, excepto no facto de o COH204 ser substituído por COH206..

c. PETA/PESH-P: A amostra foi preparada como descrito no Exemplo 1.

d. Géis de gelatina: 20% de gelatina em tampão de fosfato de sódio/carbonato sódio, pH 9,6, foi misturada com compostos diferentes como indicado abaixo e descrito em a., assumindo 10-20 moles de moles amino activo por mole de gelatina, e utilizando os níveis estequiométricos do outro composto.

e. COH102/PPO-di-amino 2000/PEG-di-acrilato: 615 mg COH102 foi dissolvido em 923 µL de etanol, e misturado

com 246 μ L de PPO-di-amino 2000 e 246 μ L de PEG-di-acrilato, tal como descrito em a.

f. PETA/PPO-di-amino 230/PPO-di-amino 2000:500 μ L de PETA, 630 μ L PPO-di-amino 230 e 150 μ L de PPO-di-amino 2.000 são misturados em conjunto, como descrito em a.

g. COH102/PTMO: O gel foi preparado como descrito em e, com PTMO 1.100 substituído pelo PPO-di-amino 2.000.

h. Cianoacrilato: A cola foi extrudida sobre água e imediatamente endurecida.

i. HEMA: 1,3 ml HEMA e 64 μ L de PEG-di-acrilato foram dissolvidos em 600 μ L de tampão de fosfato de sódio 150 mM, pH 7,4, e misturou-se com 40 mg de persulfato de amônio em água a 100 μ L. A mistura foi aquecida a 60-80 °C durante 4 horas.

j. COH102/COH206/colagénio metilado: 25 mg de colagénio metilado, 100 mg de COH102, e 100 mg de COH206 foram dissolvidos em 1 ml de fosfato de sódio 0,5 mM, pH 6,0.

Medições das forças de tração

As extremidades dos géis secos foram fixas e, em seguida, as regiões centrais de todas as amostras foram rehidratadas durante aproximadamente 1 hora em tampão de solução salina fisiológica, pH 6,7, a 37 °C antes do teste. Em seguida, as matrizes foram estendidas até ao ponto de ruptura em um aparelho de teste Instron Modelo 4202 (Instron, Inc., Canton, Massachusetts), que estava equipado com uma célula de carga de 100 N. A carga de pico foi registada e convertida em tensão máxima utilizando a secção transversal medida da amostra no

ponto de ruptura. Os dados foram também representados como tensão versus estirpe, utilizando a expressão $\text{estirpe} = \Delta L / L_0$, em que ΔL é a extensão, e L_0 é o comprimento da amostra original.

Tabela 1
Medidas da força de tracção

Material	Resistência à Tracção
HEMA	>393
Cianoacrilato	385
PETA/PESH-P	78 (n=10)
PETA/PTMO-di-amino 350/1,100	26 (n=2)
PETA/PTMO-di-amino 1100	34
PETA/PPO-di-amino 230/2,000	36 (n=2)
PESH-P/PPO-di-acrilato	20
COH102/COH206/colagénio metilado	37 (n=3)
COH102/PPO-di-amino 2000 / PEG-di-acrilato 200	10 (n=2)
COH102/PTMO-di-amino	4 (n=2)
COH102/T403	5
COH206/PEG-di-acrilato	8
COH/206/PEG-di-metacrilato/PEG-diacrilato	4
COH206/PEG-di-metacrilato	26
Gelatina/DMS	6
Gelatina/S-EGS	6 (n=2)
Gelatina/PETA	5
Gelatina/DSS/T403	3
COH102/COH206 20%	5 (n=4)
COH102/COH206 10%	10

Exemplo 3

Adesivos de alta resistência à base de COH102 e COH206 e uma comparação com os adesivos preparados a partir de PETA, PESH-P e Glic-20HS

Sumário:

Vários tipos de géis foram investigados como potenciais formulações de substituição de sutura. Géis com base em derivados de penta-eritritol exibiram elevada força coesiva, mas fraca força adesiva. Géis com base num succinimidil glicerol PEG com 3 braços exibiram baixa resistência coesiva, mas uma boa força adesiva. Géis com base em solução aquosa a 60% (p/v) COH102/COH206, aos quais vários materiais fibrosos foram adicionados, tais como o colagénio insolúvel fibroso, suturas poliglicólido e lã de vidro, exibiram ambas: força coesiva e adesiva boas.

Adesivos clínicos de elevada resistência têm interesse como substitutos de suturas no fechamento de incisões cirúrgicas. Em particular, os géis formados a partir de PETA e de PESH-P demonstraram terem resistências à tracção cerca de 10X maiores do que as formadas a partir de 20% (p/v) de soluções de COH102 COH206. Quando géis de PETA-PESH-P foram suplementados com polímeros fibrosos ou particulados, foram observados géis com resistência à tracção ainda mais elevada.

Esta experiência descreve as propriedades adesivas do PETA/PESH-P e géis relacionados, bem como ambas as propriedades adesivas e de tracção de uma formulação de COH102 e COH206 a 60% (p/v), à qual o colagénio e outros polímeros são adicionados. Também são descritas as propriedades dos géis formados a partir de uma succinimida glicerol de 3 braços (NOF Corp, Japão) e os reagentes acima.

Materiais e métodos:

PETA, PESH-P, e tetraquis penta-eritritol (3 mercaptoacetato) (PESH-A), polietileno, a superfície activada de tamanho de partícula de 180 μ , e polibutadieno, epóxi funcionalizado, epóxi E.W. 260, foram adquiridos na Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin. GLYC-20HS (poli-oxietileno éter de glicerilo) succinimidil succinato 2600 mw), DEPA-10H (poli-oxietileno-bis-amina 1040 mw) foram obtidos a partir da NOF Corporation, Japão. COH102 e COH206 foram grau reagente de Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama. Polietileno-co-acrilato-succinimidato (PE-AC-S) foi sintetizado a partir de um polietileno-co-acrilato de etilo (aprox. mol. em peso. 400K com 5% de acrilato) adquirido à Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin. Colagénio insolúvel de Kensey-Nash (Semed F) foi adquirido a partir de Kensey-Nash Corporation, Exton, Pensilvânia. O colagénio Matrix, Inc, Franklin Lakes, New Jersey, forneceu um segundo tipo de colagénio insolúvel. As suturas Prolene 7-0 foram fabricados pela Ethicon Corporation. Folhas de colagénio fibrosas grosseiras foram cortadas a partir do mesmo colagénio cório de bovino fibroso grosseiro, como o utilizado para o ensaio de ruptura tal como descrito em Prior, J.J., Wallace, D.G., Harner, A., e Powers, N., "Um hemostático pulverizável contendo colagénio fibrilar, trombina bovina e plasma autólogo", Ann. Thor. Surg. 68, 479-485 (1999). Estas folhas de colagénio serviram como um modelo de tecido para estudos posteriores. Fibra de colagénio menor foi preparada a partir de colagénio de cório de bovino digerido com pepsina re-precipitado fabricado por Collagen Aesthetics, Inc., Palo Alto, Califórnia. Lã de vidro foi adquirida à VWR Corporation. Sutures de Poli-glicólido, não-revestidos ("Dexon S") foram adquiridas à Davis and Geck.

A formação do gel para as medições de resistência à tracção é descrita acima no Exemplo 1. Para testes de ruptura, o aparelho utilizado é descrito em Wallace, et al., Supra. Aproximadamente 1 ml da fórmula total foi pulverizado ou espalhado pela espátula sobre o substrato de folha de colagénio fibrosa grosseira e deixou-a assentar. A pressão da água foi aplicada após a formulação ter atingido a textura de um sólido de borracha relativamente firme (não mais pegajoso), e a pressão de ruptura do tampão selo foi registada como mm Hg.

Géis de 60% de COH102 e COH206 foram preparados como se segue: COH102 foi dissolvido em 60% (p/v) em tampão S (fosfato de sódio 0,5mM, pH 6,0) e o COH206 foi dissolvido também a 60% em fosfato de sódio 300 mM a um pH 7,5 ou 8,9; ou, em fosfato de sódio 117 mM, carbonato de sódio 183 mM, pH 9,6 ("tampão PC"). Em alguns casos a proporção acima referida de fosfato e carbonato foram alteradas para dar um pH de 9,44 para tempo estabelecido mais rápido. O pH utilizado em cada caso foi determinado pela taxa de gelificação desejada. Vários aditivos foram adicionados a uma tal base de formulação; por exemplo, o colagénio da Kensey-Nash e o colagénio de menor tamanho da fibra foram adicionados a 28 mg/ml do gel final; lã de vidro foi adicionada a 25 mg/ml; e suturas de poliglicólido, a 40 mg/ml.

Resultados e Discussão:

Os resultados são discutidos abaixo e mostrados nas Tabelas 2, 3 e 4 que se seguem. A resistência à tração de >60 N/cm² é considerado "forte". A resistência à ruptura de >50 mm Hg ($6,66 \cdot 10^3$ Pa) é considerada "boa adesão".

Os géis de PETA e PESH-P mostraram boas resistências à tracção (exemplo 1). No entanto, quando foram testados para a adesão a um tecido simulado hidratado (folhas de colagénio fibrosas e grosseiras), no teste de ruptura, exibiram fraca adesão (pressão de ruptura <50 mm Hg ($6,66 \cdot 10^3$ Pa)). Como mostrado abaixo na Tabela 2, a formulação foi então modificada para conter Glyc-20h e DEPA-10H solúveis em água, ou o par COH102 e COH206 (que por si só, em meio aquoso, deu uma boa aderência às folhas de colagénio). Estes materiais tiveram boa resistência à tracção (avaliação manual), mas novamente uma pobre adesão às folhas de colagénio. O gel formado a partir de Glyc-20h e DEPA-10H também tinha fraca adesão quando a água não estava presente na fórmula. Um resultado diferente pode ser observado quando estes reagentes são dissolvidos em tampões aquosos, uma vez que são solúveis em água.

No entanto, quando Glyc-20h foi o principal componente, em massa, os géis foram fracos mas exibiram uma boa aderência no teste de ruptura. Usando estas combinações particulares de componentes, pareceu que se podia conseguir tanto uma elevada resistência à tracção ou uma ligação adesiva elevada, mas não ambos.

Tabela 2

Resistência à tracção e resistência à ruptura de géis preparados com NOF de 3 braços glicerol-succinimida

Material	Resistência à Tracção (N/cm ²)	Força de Ruptura (mmHg)
PETA 500 mg	>60	23 ($3,06 \cdot 10^3$ Pa)
PESH-P 540 µl		
T403 5µl		

Resistência à tracção e resistência à ruptura de géis preparados com NOF de 3 braços glicerol-succinimida

Material	Resistência à Tracção (N/cm ²)	Força de Ruptura (mmHg)
GLYC-20HS a 50 mg	>60	14.5 (1,93.10 ³ Pa)
PETA 500 mg		
PESHF 540 µl		
DEPA-10H 9 mg		
PESH-A 216 µl	>60	11 (1,47.10 ³ Pa)
PETA 240 mg		
GLYC-20HS 40 mg		
PETA 400 mg	>60	15 (2.10 ³ Pa)
COH102100 mg		
PESH-P µL 440		
COH206 100 mg		
DEPA-10H 8 mg		
GLYC-20HS 640 ----- mg		25 (3,33.10 ³ Pa)
DEPA-10H mg		
GLYC-20HS 400 mg	<30	>120 (16,10 ³ Pa)

Resistência à tracção e resistência à ruptura de géis preparados com NOF de 3 braços glicerol-succinimida

Material	Resistência à Tracção (N/cm ²)	Força de Ruptura (mmHg)
PESH-A 36µl		
T403 10 µl		
GLYC-20HS 400 mg	<30	166,194 (22,1.10 ³ Pa, 259 10 ⁴ Pa)
PETA 50 mg		
PESH-A 72 µl		
T403 20 µl		
GLYC-20HS 200 mg	<30	55 (7,33.10 ³ Pa)
T403 19 µl		
PESH-P 18 µl		

Foi também avaliada a capacidade de um polietileno derivatizado de succinimidil- (PE-AC-S) agir como um intensificador eficaz de resistência à tracção para os géis de PETA-PESH-P géis e de COH101/206 (Tabela 3). Este material não aumentou a resistência à tracção destes géis, talvez porque não era um filamento estendido, isto é, a sua ratio relativamente ao aspecto não era suficientemente elevada.

Tabela 3

Polietileno-co-acrilato-succinimida ("PE-AC-S") como Intensificador da Resistência à Tracção

Material	Resistência à Tracção (N/cm ²)
PETA 400 mg	80
PESH-P 432 µl	(O mesmo que o controlo sem PE-AC-S)
T403 8 µl	
PE-AC-S 20 mg	
COH102	38
COH206 (60%)	(Mais fraco do que o controlo sem PE-AC-S)
colagénio +KN (28 mg/ml)	
+PE-AC-S (40 mg / ml)	

A tabela 4 também resume os resultados com COH102 e COH206 além do colagénio fibrilar da Kensey-Nash, que exibiram uma resistência à tracção melhorada superior aos géis a 20% e 60% (w/v) de COH102/206 sózinhos. Além disso, a formulação de COH102/COH206/colagénio possuía uma boa ligação adesiva às folhas de colagénio. Outros aditivos, tais como suturas de Prolene 7-0 e pó-de-pele (hide grindate) também aumentaram a força do gel em relação aos controlos. Alguns enchimentos, tais como colagénio de pequena fibra, polietileno, e polibutadieno, não exibem propriedades de resistência à tracção aumentadas. Finalmente, alguns enchimentos ou suas combinações, tais como a lã de vidro e colagénio insolúvel, além de suturas de poli-glicólido, exibiram um aumento significativo da resistência à tracção, superior à observada com cianoacrilato (385 N/cm²) (Exemplo 1). Foram recolhidos os dados relativos à força de ruptura limitada foram recolhidos, mas eles confirmam que todas estas formulações de COH102/206 (60%) são altamente adesivas às superfícies de colagénio, e, portanto, seria esperado que também aderissem aos tecidos.

Como mostrado na Tabela 4, o hidrogel P-HEMA é descrito em Santin, M., et al., Synthesis and characterization of a new interpenetrated poly(2-hydroxyethylmethacrylate)-gelatin composite polymer", Biomaterials 17,1459-1467; e o gelatina-PEG-di-acrilato é descrito em Nakayama, Y., e Matsuda, T., "Photocurable surgical tissue adhesive glues composed of photoreactive gelatin and poly(ethylene glycol)diacrylate", J. Biomed. Biomat. Res. (Appl. Biomater.) 48, 511-521 (1999).

Tabela 4

Testes de Resistência à tração e de Força de Ruptura

Material	Resistência à Tração (N/cm ²)	Força de Ruptura (mm Hg)
COH102/206	2-12	100-200 (13,3-26,6.10 ³ Pa)
GEL 20%		
Phema	3	
Hidrogel*		
Gelatina-PEG-DI- ACRILATO **	5-16	151±34 (20,1 ± 6,84.10 ³ Pa)
PETA-PESH-P	50-170	14,23 (1,87.10 ³ Pa, 3,06.10 ³ Pa)
PETA- PESH-P+ colagénio KN	140-200	
COH102/206 (60%) + KNcolagénio	123 ± 39 (N=7)	268,216 (3,81.10 ⁴ Pa, 28,8.10 ³ Pa)
COH102/206 (60%) + KNcolagénio	180	
+suturas Prolene 7-0		
COH102/206 (60%)+pó-de-pele	197,78 94	

COH102/206	27	
(60%) sem enchimento		
COH102/206	27	
(60%) + colagénio de pequena fibra		
COH102/206	58	
(60%) + suturas revestidas de Prolene 7-0		
COH 102/206	14	
(60%)+ polietileno + poli-butadieno		
COH102/206	58,30	
(60%)de	28,21	
polietileno + Poli-butadieno		
COH102/206	745	156 (2,08 10^4 Pa)
(60%)+ lã de vidro	161	
COH102/206	531	
(60%) + colagénio KN+Suturas Dexon S		
COH102/206	718	376 (5,01. 10^4 Pa)
(60%) + Colagénio	718	
Matriz de colagénio + Suturas Dexon S		

A Fig. 5 representa o ensaio de tracção de COH102/206 (60%) acrescido de 28 mg/ml de colagénio Collagen Matrix acrescido de 40 mg/ml de peças cortadas suturas de poliglicólido não revestidas Dexon S (4-0). A resistência à tracção medida foi maior do que 700 N/cm², e a medição foi

interrompida quando a amostra começou escorregar para fora do dispositivo de teste (declive descendente.)

Exemplo 4

Compósitos de Folhas de Colagénio Contendo PEG Activo

Resumo

COH102 e COH206 podem ser dissolvidos em conjunto em etanol sem reacção. A solução de etanol pode ser evaporada até à secura, deixando um pó de PEG reactivo. Quando colocado em tampão PC, pH 9,6, o pó gelifica instantaneamente. Esta descoberta foi então usada para desenvolver uma folha adesiva. As esponjas de colagénio e as folhas de colagénio fibrosas e grosseiras, cobertas com esponjas, foram impregnadas com soluções de etanol de COH102 e COH206. Após a secagem, tais folhas de PEG reactivo foram capazes de se ligar a uma folha de colagénio fibrosa grosseira. Foram observadas forças de ruptura de cerca de 300 mm Hg $4,10^4$ Pa, após 10 min a um pH de 7.

Foram também preparadas folhas adesivas as quais consistiam num suporte de colagénio fibroso grosseiro (preparado como descrito no Exemplo 3), ao qual foi ligado uma esponja de colagénio. A camada de esponja foi impregnada com o pó de PEG reactivo. Quando tais folhas foram colocadas secas sobre uma segunda folha de colagénio fibrosa grosseira, humedecida com tampão de pH 9,6, foi formada uma forte ligação num curto espaço de tempo como 30 segundos. A ligação da folha adesiva à segunda folha de colagénio foi medida pelo teste de ruptura. Foram observados forças de ruptura até 500 mm Hg $6,66.10^4$ Pa.

Materiais e métodos

Foram preparadas folhas grosseiras e fibrosas de colagénio, como descrito algures neste documento. As esponjas de colagénio foram fixas à folha de colagénio por extrusão de uma pasta de colagénio fibrilar reconstituído no topo. A pasta de colagénio reconstituído foi preparada por diluição de colagénio Zyderm II fora de prazo (65 mg/ml de proteína, da Collagen Aesthetics, Inc., Palo Alto, Califórnia) com água para atingir uma dispersão de 20 mg/ml. Aproximadamente 7 cm² de folha estavam cobertos por ml de pasta. Uma vez que a pasta de colagénio foi extrudida sobre as folhas de colagénio grosseiras fibrosas, o compósito foi congelado e, em seguida, liofilizado. Após a liofilização, uma esponja de colagénio poroso permaneceu aderente à folha de colagénio. Foi adicionada à esponja seca, gota a gota, uma solução de álcool de COH102 e COH206. O último foi preparado por adição de 200 mg de COH102 e 200 mg COH206, cada um para 1,8 ml de etanol absoluto (seco sobre crivos moleculares). A dissolução de ambos os compostos de PEG em etanol foi conseguida por aquecimento suave e agitação (até cerca de 40°C). As duas soluções foram então misturadas. Um ml da solução de etanol foi utilizado para cobrir cerca de 10 centímetros² de folha. As folhas de colagénio-esponja, humedecidas com a solução de PEG em etanol foram, em seguida, secas brevemente numa câmara de vácuo. Quando a massa do solvente desapareceu, as folhas foram transferidos para um liofilizador durante várias horas para remover os resíduos do solvente. As folhas secas foram armazenadas a -20°C sob argon seco.

Para testar a ligação a uma segunda folha de colagénio fibrosa e grosseira, foi realizado um teste de ruptura. A folha de teste de colagénio foi humedecida com tampão PC, a um

pH 9,6, e fixa na célula de amostra. Foi aplicado à folha um tampão adicional (0,1 a 0,2 ml). Em seguida foi aplicada a folha da esponja de PEG activo (preparado tal como acima; 1,2 x 1,2 cm), com o lado da esponja para baixo sobre a folha de colagénio de teste (tamanho do defeito: 2 mm). As duas folhas foram manualmente mantida no local durante 2-3 segundos para assegurar um bom contacto e hidratação da folha de PEG activo. Em seguida, as duas folhas foram deixadas a incubar à temperatura ambiente, até que foi aplicada a partir de baixo, pressão da água. A pressão necessária para ruptura do tampão foi registada.

Resultados

A Tabela 5 mostra que podem obter-se forças de ligação muito elevadas, a um pH de 9,6, se comparadas com as folhas de controlo sem ingredientes activos. Foram observadas forças de ligação elevadas mesmo em curtos espaços de tempo. A estabilidade a longo prazo da ligação foi examinada qualitativamente: um par de folhas ligadas foi removido do aparelho de teste de ruptura e colocado em 100 ml de água a 33°C. A ligação estava ainda intacta e aparentemente forte, mesmo 30 horas mais tarde.

Tabela 5

Forças de Ruptura de folhas de PEG Activo justapostas a Folhas de Colagénio Fibrosas e Grosseiras

Material	Tempo de incubação (min)	Força de Ruptura (mm Hg)
Folha (Controlo)	0,5	5 (6,66.10 ² Pa)

Forças de Ruptura de folhas de PEG Activo justapostas a Folhas de Colagénio Fibrosas e Grosseiras

Material	Tempo de incubação (min)	Força de Ruptura (mm Hg)
Folha + esponja (controlo)	0,5	17 ($2,27 \cdot 10^3$.Pa)
PEG activo + Folha + Esponja	0,5	360,391 ($4,8 \cdot 10^4$ Pa, 5,21 10^4 Pa)
PEG Activo + Folha + Esponja	3.0	276,231 ($3,68 \cdot 10^4$ Pa, $3,08 \cdot 10^4$ Pa)

A Tabela 6 mostra o efeito da diminuição do pH do tampão de hidratação. A força da ligação era dependente do pH, e foi observada uma força de ligação muito mais fraca a um pH de 7,5. No entanto, forças de ligação com pHs inferiores foram melhoradas permitindo mais tempo (3 a 10 minutos) para formação de ligação, que pode ser aceitável para determinadas aplicações.

O modo de falha não foi sempre evidente. Em alguns casos, a folha de teste tornou-se desalojada do grampo de teste, sem danificar a ligação. Estes resultados não foram relatados. Se a folha de teste permaneceu firmemente segura, pareceu que a falha foi entre folha activa e folha de teste. Em alguns casos, a folha activa foi levantada e esguichou água do orifício. Noutros casos, apareceu água nas margens da célula de teste, mas a sua fonte não era clara.

Tabela 6

Forças de Ruptura das folhas de PEG activas justapostas às folhas de colagénio fibrosas e grosseiras

Material	pH*	Tempo de incubação (min)	Força de Ruptura (mm Hg)
PEG activo +	8,9	0,5	121 (1,61.10 ⁴ Pa)
Folha +	8,9	1,0	191 (2,55.10 ⁴ Pa)
Esponja	8,9	1,0	191 (2,55.10 ⁴ Pa)
		3,0	298 (3,97.10 ⁴ Pa)
	7,5	1,0	2 (2,67.10 ² Pa)
	7,5	3,0	50 (6,66.10 ³ Pa)
	7,5	10,0	279 (3,72.10 ⁴ Pa)

* PH 8,9 tampão fosfato de sódio foi de 300 mM; tampão de pH 7,5 foi de 300 mM fosfato de sódio.

Exemplo 5

Estudos adicionais em folhas adesiva contendo PEG Ativa:

Sumário

Foram preparadas folhas adesivas a partir COH102/COH206, colagénio Zyderm, e colagénio da Kensey-Nash (Semen F). Tais folhas mostraram boas forças de ruptura quando ligadas a folhas de colagénio fibrosos e grosseiras.

Foi desenvolvido um teste de ligação de falha por cisalhamento. Neste teste, a força de ligação de folhas adesivas activas de PEG foram comparáveis ao cianoacrilato (SUPERGLUE). Esta experiência descreve a preparação de folhas adesivas a partir de materiais biocompatíveis, incluindo o colagénio de Kensey-Nash de grau implantável. Também são aqui

referidos os resultados comparativos de várias formulações para um teste de falha por cisalhamento.

Materiais e métodos:

Foram preparadas folhas activas a partir de folhas de colagénio grosseiras fibrosas, colagénio reconstituído, e COH102 e COH206, como descrito no Exemplo 4.

As folhas activas proveniente do colagénio de Kensey Nash foram preparadas como se segue: colagénio (4g) foi adicionado a 200 ml de água desionizada ajustada a um pH de 2 com HCl. A agitação com um rotor superior foi mantida durante 6 dias. As fibras tornaram-se inchadas e dispersas, criando uma massa quase coerente. A pasta foi vertida em recipientes de pesagem quadrados com 9 cm de diâmetro de poliestireno com (cerca de 15 ml por recipiente para cobrir o fundo). A pasta vertida foi deixada numa incubadora a 33 até 37°C para secar. As folhas formadas sobre a superfície dos recipientes de pesagem. Em alguns casos tais folhas foram revestidas com colagénio Zyderm (pasta em água a 20 ml/ml), congeladas, e liofilizadas. Tais folhas secas, revestidas com uma camada de semelhante a esponja fina de colagénio Zyderm foram então activadas com uma solução de etanol de COH102 e COH206 (cada componente com uma concentração de 10% p/v). Estas foram referidas como "folhas KN ácidas". Um procedimento alternativo utilizou folhas Samed F secas (secas a partir de pasta ácida), revestidas uma vez com folhas de colagénio Zyderm, e incubadas durante 3 horas em água ajustada para um pH de 9-10. Hidróxido de sódio adicional foi adicionado, conforme necessário, para manter a solução e as folhas a um pH de 9-10. As folhas foram recuperados a partir da solução e secas durante a noite a 37 °C. As folhas foram então re-revestidas com colagénio Zyderm a 12 mg/ml, congeladas, liofilizadas, e, finalmente, impregnadas

com PEG activo em etanol, para se obter as amostras secas, activas, denominadas "folhas KN básicas".

Foi desenvolvido um teste de falha de cisalhamento para folhas activas utilizando os dispositivos descritos na fig. 6. Folhas de colagénio grosseiras de fibrosas, quer activadas com PEG, ou, como normalmente, preparadas para o teste de ruptura, foram cortadas em tamanhos de 1 x 3 cm (denominadas "tiras"). Abas de plástico ou fita adesiva foram fixas numa extremidade, cobrindo uma área de um centímetro quadrado da tira. As abas de plástico foram fixas à tira do pó-de-pele (hide grindate) com cola de cianoacrilato. Foi perfurado um orifício de aproximadamente 2 mm de diâmetro na aba ou na fita de plástico. Sobre uma área de 1 cm quadrado de uma folha de colagénio foram colocados em, aproximadamente, 300 µl de tampão PC, pH 9,6. Uma folha de PEG activo/colagénio foi então colocada no pó-de-pele (hide grindate) humedecido com tampão e mantido com uma leve pressão durante 30 segundos. Desta forma, a superfície ligada era de 1 centímetro quadrado. Foram então colocados ganchos através dos orifícios na extremidade de cada tira, e as tiras ligadas foram suspensas num suporte adequado. Foram então adicionados anilhas metálicas no gancho inferior (peso médio da anilha 1,63g), para aumentar gradual da força de cisalhamento na superfície ligada. Foi registado o peso necessário para afastar a superfície ligada. Foram estudadas as variações na natureza das superfícies de ligação e formulações de ligação, incluindo o uso de tiras de controlo contendo esponja de colagénio na superfície, mas não PEG activo e também a ligação das tiras de pó-de-pele (hide grindate) com cianoacrilato.

Um conjunto de amostras envolveu a ligação de uma tira de pó-de-pele (hide grindate) não tratado a uma tira revestida com esponja de colagénio (não contendo PEG activo). Outro

conjunto de amostras foi realizado com os mesmos pares de tiras, mas desta vez uma mistura de COH102/COH206 foi adicionada às tiras apostas e deixada em gel. A mistura de gelificação foi como se segue:

10 mg de COH102 acrescido de 40 µl de tampão fosfato 0,5 mM, pH 6,0

10 mg de COH206 acrescido de 40 µl de tampão fosfato 300mM, pH 8,9

Uma tal mistura gelifica em cerca de 15 segundos, o que permite tempo suficiente para adicionar a mistura de gel a uma tira, pressionar a segunda tira no topo, e esperar 30 seg para a gelificação ocorrer.

Para a ligação das tiras com cianoacrilato, a tira de teste foi primeiro humedecida com tampão PC (200 µl para uma área de 1 centímetro quadrado). Em seguida, uma segunda tira revestida com cianoacrilato foi pressionado no topo da primeira. Tal como acontece com as folhas de PEG activas, foi usada apenas uma pressão moderada para manter a aposição durante o tempo de ligação de 30 seg.

Resultados:

Folhas KN ácidas e folhas KN básicas foram submetidas a um teste de ruptura; peças de 1 cm quadrado foram colocadas sobre uma folha de hídride grindate de teste já molhada com tampão de PC. Folhas ácidas KN exibiram forças de ruptura muito baixas (2 e 4 mm Hg) ($2,67 \cdot 10^2$ e $6,66 \cdot 10^2$ Pa). Folhas básicas KN exibiram deram valores semelhantes aos resultados anteriores com as folhas de colagénio revestidas (324, 286, e 311 mm Hg) ($4,32 \cdot 10^4$, $3,81 \cdot 10^4$ e $4,14 \cdot 10^4$ Pa).

Foi utilizado o método de falha de cisalhamento para comparar a ligação de folhas de colagénio sob várias condições (Tabela 7). Para as folhas ligadas por COH102/COH206, foram observadas forças de ligação muito fracas. Folhas activas de PEG apresentaram forças de ligação semelhantes às observadas com cianoacrilato.

Tabela 7

Falha de cisalhamento de Ligações de Vários Materiais de Folhas	
Material	Força de Ruptura da Ligação
	(g)
Folha + Esponja (controlo)	55,4, 53,8 (0,54 N, 0,53 N)
Folha + COH102 / COH206	14,7, 13,0 (0,14 N, 0,127 N)
Folha + Cianoacrilato	272 (2,67 N)
Folha + PEG activo	>217, >466*(>2,13N, >4,57N*)
* Últimas forças de ligação não determinadas; em ambos os casos a folha de colagénio rasgou, ou a fixação ganchos falhou, não a área ligada.	

Exemplo 6

Métodos para a síntese de alta resistência bio-adesivos

Este exemplo descreve a síntese de um copolímero de polietileno glicol (PEG) e de poli-caprolactona (PCL) contendo pendentos grupos N-hidroxi-succinimidilo.

Esquema 1 (Figura 7):

O PEG di-funcional de peso molecular variável é escolhido e acoplado a PCL por uma polimerização de abertura de anel controlada para adicionar PCL de peso molecular fixo e escolhido (Hedrick et al, *Macromolecules* 1998, 31, 8691-8705). Os grupos-OH terminais no PCL são convertidos em glutaril-succinimidilo (Abuchowski et al, *Cancer Biochem* 1984, 7,175-180). Lisina etil éster é adicionado para dar um polímero linear com PEG, PCL de repetição e segmentos de lisina. O segmento de lisina tem um éster de carboxilo pendente. O éster é hidrolisado para dar um grupo carboxilo livre (Nathan et al. *Macromolecules* 1992, 25, 4476-4484). Em seguida, o grupo carboxilo é convertido em glutaril-succinimidilo (Abuchowski).

Este esquema produziu uma cadeia linear com grupos reactivos pendentos (NHS), com ligações degradáveis (PCL), com grupos solúveis em água (PEG). A robustez do polímero pode ser aumentada pela adição de longos elementos de PCL, versus elementos de PEG curtos; no entanto, o PEG deve ser suficientemente longo para assegurar a solubilidade em água, que pode ser determinada empiricamente.

Esquema 2 (Figura 8):

Uma cadeia linear semelhante com grupos reactivos pendentos, mas com segmentos de repetição de PMMA (polimetilmetacrilato). O PEG di-funcional de peso molecular variável mas seleccionado é activado com 2-bromo-2-metil-propionil Br e um segmento controlado de PMMA é cultivado fora

de cada extremidade. O terminal contém um grupo Br que pode ser convertido, por métodos padrão de química orgânica, num grupo-OH e ainda derivatizado para glutaril-NHS, feito reagir com éster de etilo lisina, como no Esquema 1, e, finalmente, o pendente carboxilo etil éster é hidrolisado para carboxilato livre de etilo e derivatizado para NHS glutaril, de novo para dar um copolímero análogo com diferentes propriedades físicas (eg, PMMA é conhecido por ter elevada força de tracção). A suficiente funcionalidade PEG pode ser fornecida para a solubilidade em água. Pode ser necessário construir unidades de repetição PEG-PCL-PMMA-lys, de modo a que o PCL irá fornecer as necessárias ligações biodegradáveis. A construção de tais segmentos tem sido descrita por Hedrick.

Outra abordagem para polímeros reforçados é descrita por Liu, et al., *Macromolecules*, 29:5508 (1996). Pode-se sintetizar um bloco de PMMA, que também contém monómeros tais como metacrilato de 2-cinnamoiletil (CEM). A estrutura que se segue é ilustrativa: Um polimetacrilato dibloco é sintetizado o qual contém um bloco solúvel em água, tal como hidroxietilmetacrilato (HEMA) além de alguns monómeros que contêm carboxi e amino, tais como amino-etil metacrilato (AEM) e mono-2-(acriloxi) etilsuccinate (ARS), mais um bloco insolúvel em água, tal como poli-MMA-co-CEM. Quando este polímero está dentro água ou num meio polar, o bloco de MMA-CEM vai evitar a água e associar-se em domínios separados. Conforme descrito por Lie, et al., é possível alterar a proporção de blocos solúveis em água e insolúveis em água, no polímero, para se obter estruturas de domínio diferentes. Os domínios associados, que evitam a água pode tomar configurações micelares (em forma de esfera), em forma de haste, ou de placa, uma vez que inclui mais e mais do bloco insolúvel em água, na cadeia de polímero. Quando são

encontradas as condições correctas para gerar blocos poli-MMA-CEM em forma de haste, reticulam-se esses blocos pela luz do comprimento de onda e intensidade apropriados. Em seguida, as hastes são fixadas, e o bloco de polímero solúvel em água, poli-HEMA-AEM. ARS, neste caso, rodeia a haste. Pode-se então obter hastes em escala nanométrica possuindo grupos amino reactivos. Espera-se que as dimensões de tais hastes tenham 1-30 nm de diâmetro e centenas a milhares de nanómetros de comprimento. Tais hastes devem também funcionar para reforçar as redes de gel de polímero, tal como colagénio metilado é pensado para reforçar a rede PEG descrito em outro lugar no presente pedido.

Hedrick descreve como fabricar segmentos PEG-PCL-PMMA de tamanho controlado, mas sem grupos reactivos, e não cadeias lineares com múltiplos grupos reactivos pendentos. Nathan descreve como acoplar PEG e lisina para dar um polímero de repetição com cadeias pendentos reactivas (mas sem ligações ésteres degradáveis e sem a adição de PCL e PMMA para a força). Abuchowski dá um método para fazer glutaril-succinimidil PEG. A Patente WO 99/17417, e as referências aí citadas, descreve polímeros PEG-polilactido-acrilato a serem polimerizados através da luz e de um processo de radicais livres. Estes materiais não descrevem adição de PMMA para a força, nem mencionam NHS pendentos ou outros grupos de ligação covalente (não dirigida por radicais livres).

Exemplo 7

CON102/206/colagénio metilado mais os enchimentos fibrosos de
lã de vidro ou Vicryl.

Materiais:

a. Colagénio Metilado

Foi preparado Colagénio metilado por uma modificação do procedimento de Miyata et al, Patente Norte Americana No 4,164,559. Uma dispersão (3% p/v) de colagénio bovino pepsinizado, reconstituído, em fosfato de sódio 0,02 M, NaCl 0,13 M, pH 7,2 (preparado pelo método de McPherson et al., Collagen Rel. Res. 5, 119-135, 1985) foi extrudido sobre uma superfície de vidro numa camada fina e secou-se à temperatura ambiente. HCl metanólico foi preparado por adição de 104 g de sulfato de sódio anidro e 10,7 ml de HCl concentrado a 1300 ml de metanol anidro e deixou-se repousar bem fechado durante 2 dias. O colagénio seco foi cortado em tiras de 1 x 5 cm e adicionado ao HCl metanólico (200 ml HCl metanólico: 1 g de colagénio seco) num recipiente selado e agitando-se suavemente a 20 °C durante 3 dias. O HCl metanólico foi cuidadosamente decantado e o colagénio foi filtrado num funil de vidro silicatado para remover vestígios de metanol. Foi terminada a remoção completa do metanol sob vácuo durante a noite. O colagénio metilado foi re-solubilizado em água destilada e o pH foi ajustado para 4 a 6. A quantidade de água foi calculada para atingir uma concentração final de proteína de cerca de 31 mg/ml. As amostras de colagénio metilado solubilizado, em concentrações de proteína mais baixas foram re-concentradas por liofilização breve para remover a água. O colagénio metilado solubilizado era um material completamente transparente, isento de fibras ou opalescência, possuindo uma consistência viscosa, tipo gel. As preparações que ainda continham componentes de turvação ou insolúveis (devido à metilação incompleta do colagénio), pouco realizaram em formulações adesivas, produzindo géis que incharam muito e apresentaram fraca força de ligação.

b. Adesivos sem enchimento

Para 0,5 ml de adesivo, 50 mg de pó seco de COH102 (tetra-glutaril-succinimidilo polietileno glicol de 4 braços, 10K; Fig. 9a) e 50 mg de pó seco de COH206 (tetra-tiol polietileno glicol de 4 braços, 10K; fig. 9b) foram misturados com 400 mg de colagénio metilado em 31 mg de proteína/ml, pH 4. Ambos os componentes PEG dissolveram na solução aquosa de colagénio, obtendo-se um fluido transparente, viscoso. A solução foi espalhada sobre o local do tecido com uma espátula; fluuiu muito pouco sob a força da gravidade. Para curar o adesivo, 20-50 µl de um tampão (quer 134 mM fosfato de sódio, carbonato de sódio 166 mM, pH 8,9; ou tampão PC, pH 9,6) foi adicionado à superfície. O tampão não diluiu o gel, mas foi lentamente embebido em 3-5 min, e a superfície do gel ficou visivelmente endurecida.

Para os estudos da força de ligação sob condições hidratadas, o gel e o substrato foram deixada curar durante 20 min sobre a bancada e, em seguida imersos em fosfato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 130 mM, pH 6,7, a 37 °C durante 2 horas ou mais. O teste da força de ligação foi realizado num aparelho de tracção.

c. Adesivo com enchimento

O Vicryl é um copolímero de ácido glicólico e ácido láctico (90:10) vendido como uma rede implantável pela Ethicon Corporation (Polyglactin 910; Sommerville, New Jersey).

Foram adicionado, ao colagénio metilado, 19 mg de fios de Vicryl com 1-2 cm de comprimento, que tinham sido desfiados da rede de Vicryl implantável. Em alguns casos, foram também usadas fibras de Vicryl tão curtas como 0,3 cm. Os fios e o gel viscoso foram misturados e, em seguida, foram adicionados

os componentes PEG, como descrito acima. A aplicação no local de tecido e a cura foram efectuados como acima referido. Outros enchimentos e as suas respectivas quantidades adicionadas a 0,5 ml de adesivo foram: lâ de vidro, 9 mg; colagénio fibroso (colagénio Semed F, da Kensey-Nash Corporation) 8 mg; Dexon S (suturas de poli glicólido lactido, "4-0"), 10 partes de 1 cm de comprimento; fibras de elastina (ligamento cervical bovina, 0,25 a 10 mm, Elastin Products Co., Inc, Owensville, MO), 40 mg; fibras de aço inoxidável (Bekaert Fibre Technologies, Marietta, GA), 14-28 mg (As fibras foram lavadas com água ou com HCl 1N para remover um revestimento álcool polivinílico); micro-partículas de polilactido/glicólido, preparadas a partir de polilactido/glicolido (65:35, 40-75,000 peso mol, Aldrich Chemical Co., micro-partículas 2-4 de diâmetro preparadas pelo método de Zheng, J., e Hornsby, P.J., Biotechnol. Progr. 15, 763-767 (1999), 25 mg.

d. Adesivo com colagénio metilado substituído por outro agente

Foram testadas várias moléculas de cadeia longa, tais como ácido hialurónico (rooster comb (crista de galo), Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), quitosano (Sigma), e polilisina (Sigma). Para o ácido hialurónico, a fórmula foi: COH102, 50 mg, COH206, 50 mg, Vicryl, 14 mg, e 400 µL de ácido hialurónico, 2% (p/v) em água, pH ajustado para 4; para o quitosano, a mesma fórmula, com 400 µL de 1% de quitosano (p / v) em água, pH 4-5. Para polilisina, COH102, 40 mg, COH206, 30 mg, dissolveu-se em conjunto em 50 µL de água; bromidrato de polilisina, 330K, 40 mg dissolvidos em 60 µl de água; as duas soluções foram misturadas em conjunto, e 7 mg de fibrilas de Vicryl foram adicionadas. Além disso, partículas de polilactídeo/glicólido, preparadas como acima, foram testadas

como um substituto para o colagénio metilado: 16,5 mg de partículas foram suspensos em 300 µl de água e misturadas com 50 mg de COH102, 50 mg de COH206, e 14 mg de Vicryl. Todos os géis foram curados com um tampão de sobreposição de pH 9,6, como descrito acima.

e. Adesivo sem enchimento e sem colagénio metilado

COH102 foi dissolvido em água a 20% (p/v); COH206 foi dissolvido em 20% em tampão de pH 8,9. As duas soluções foram rapidamente misturadas e extrudidas no local. Gelificação ocorreu em -40 seg.

Ensaio mecânicos:

A força de ligação das formulações adesivas foram aplicados a três tipos de tecidos ou substitutos de tecidos ilustrados na fig. 10. Membranas de colagénio (Fig. 10a; parede intestinal; The SausageMaker, Inc., Buffalo, New York) foram lavadas com álcool isopropílico e água, para remover impurezas de lípidos e de sal, e secas. Foi realizada a ligação das membranas com uma sobreposição de 1-3 mm e uma largura de 1 cm, por espalhamento do adesivo sobre a parte superior das folhas. O adesivo foi deixada a curar 20 min sobre a bancada e depois imerso durante 30 min a 2 horas a 37 °C antes de o afastar num aparelho de ensaio Instron modelo 4202 (Canton, Massachusetts), usando uma célula de carga de 100N. Ligação das artérias carótidas de suínos (10b, Pelfreeze, Rogers, Arkansas) também foi realizada numa geometria de ponta a ponta. O corte dos segmentos de artérias carótidas foram confinados (4-6 mm de diâmetro) e espalhados com adesivo; não foram aplicadas suturas de retenção. A

incubação e o teste foram os mesmas que os descritos para as membranas de colagénio.

Para a ligação de tiras de couro (10c), pedaços de pele de bezerros sem pelos foram comprados à Spear Products, Inc., Quakertown, Pennsylvania. Os pedaços eram quase uniformes em espessura, 2-3 mm. Foram cortadas tiras de 0,4 cm de largura a partir das porções de pele de animal, usando um bisturi. As tiras cortadas foram confinadas ponta a ponta e ligadas por espalhamento de 0,25 ml de "CT003" adesivo ou de algumas gotas de cianoacrilato. A incubação e o teste foram os mesmos que os descritos para as membranas de colagénio. A Tabela 8 abaixo mostra que o COH102/COH206/colagénio metilado, quando cheio de lã de vidro (Fórmula c), foi superior na força de ligação para Fórmulas não preenchidos a e b, quando testado em membranas de colagénio. De facto, a força de ligação era comparável à obtida com um adesivo de cianoacrilato comercial (Tabela 9). O cianoacrilato de grau médico (Dermabond) formou ligações ainda mais fortes com membranas de colagénio (força $5,2 \pm 1,9$ N para 7 determinações).

Tabela 8

Desempenho de ligação com e sem colagénio metilado e um enchimento fibroso		
Fórmula	Força de ligação (Força N)	n
COH102/206 (20%)	$1,6 \pm 1,1$	3
COH102/206/colagénio metilado	$1,7 \pm 1,0$	4
COH102/206/colagénio metilado/lã de vidro	$>2,8 \pm 0,6^*$	6

Desempenho de ligação com e sem colagénio metilado e um enchimento fibroso

Fórmula	Força de ligação (Força N)	n
---------	-------------------------------	---

* A membrana de colagénio rasgou, mas a ligação vedante estava ainda intacta

Tabela 9

Força de ligação de cianoacrilato (Krazy Glue, Elmer's Products) em três diferentes substratos de tecido

Substrato	Força de ligação (Força N)
Tiras de couro	10,9, 16,2
Artéria carótida de porcino	2,0, 3,8
Membrana de colagénio	3,0 ± 1,0 (n = 5)

A Tabela 10 abaixo apresenta os dados sobre a adição de um enchimento diferente, fios de Vicryl, ao COH102/206/colagénio metilado. Com substratos tais como couro ou artéria carótida, o substrato não se rasgou, e os valores da força de ligação foram representativos da força da própria ligação adesiva. Tipicamente, estas ligações falharam adesivamente, isto é, a resistência à tracção do próprio gel adesivo permaneceu intacta e não foi o factor limitativo. As forças de ligação observadas na solução salina a 37 °C foram novamente comparáveis às observadas com cianoacrilato para a ligação do mesmo conjunto de substratos de tecidos (Tabela 9).

Tabela 10

Força de ligação de COH102/206/colagénio metilado com fios de Vicryl como um enchimento em três substratos diferentes de tecidos.

Tempo de Incubação (Hrs.)	Força de ligação (Força N)	* Substrato
2	6,6, 5,6	Couro
17	6,3, 5,5	Couro
2	4.3,2.2,	Suíno
	2,8, 5,1	Artéria carótida
2	>5,9, 3,9	Membrana de colagénio

* tiras de couro, 0,5 cm de largura, artéria carótida suína, 0,3 - 0,5 cm de diâmetro, membrana de colagénio: parede intestinal, 0,2 mm de espessura, 1 cm de largura.

Efeito dos Diferentes Enchimentos

A tabela 11 apresenta os resultados de vários materiais de enchimentos enchimento. O teste foi realizado em tiras de couro, imersas durante 2 horas em soro fisiológico a 37°C. Depreende-se que os materiais filamentosos foram mais eficazes do que as partículas esferoidais. A ligação do enchimento ao gel é muito importante para a melhoria da força. Os filamentos de colagénio-polietileno-glicol eram cerosos e não aderiam ao gel; assim, apesar das suas elevadas proporções relativas ao aspecto, não foram enchimentos eficazes.

Tabela 11

Efeito dos diferentes enchimentos na força de ligação de COH102/206/colagénio metilado

Material	Força de ligação (Força N)
Vicryl	4,7, 7,4
Vicryl, lavado com etanol	7,2, 7,8
Vicryl, tratado com etanol, em seguida, lavou-se com peróxido de hidrogénio a 30%	8,3, 9,1
Suturas de seda cirúrgicas 1-2 cm de comprimento, diâmetro 30-50u	2.5,3.8
Suturas cirúrgicas de seda desfiadas a partir 5.0,6.5 fios de seda mais finos, lavadas com clorofórmio	
Colagénio fibroso (Semed F, Kensy-Nash) ajustado para um pH 4; 0,5 a 1 mm de comprimento, -5 0 u de diâmetro	1.3,2.8
Partículas de gelatina, reticuladas pelo calor, ~100 µ de diâmetro poligonal	0.6,0.8
Partículas de hidroxiapatite 0,5 a 1 mm de diam. poligonal	0,7
Filamento de Conjugado de colagénio-polietileno glicol conjugado ~ 50 µ de diâmetro , 1 cm de comprimento	0.8,1.7
Fibras de aço inoxidável 8 µ de diâmetro, 4 mm de comprimento	4,8, 6,9
Fibras de elastina 0,25 a 10 mm de comprimento	3.9,4.0
Partículas de polilactideo/ácido glicolideo, 2-4 µ de diâmetro	1,1, 1,1

Efeito da substituição do colagénio metilado com outras moléculas poliméricas

A Tabela 12 mostra que nenhum dos materiais testados deu forças de ligação comparáveis à da fórmula contendo colagénio metilado

Tabela 12

Substituição de colagénio metilado por outras moléculas

Material	Força de Ligação (Força N)
ácido hialurónico	12, 1,3
Quitosano	2,1, 1,7
polilisina	2,0
Partículas polilactídeo/glicólido, 2-4 μ	0,6, 1,1

Efeito da Ligação de Reticulação

A tabela 13 abaixo mostra que, quando o gel foi formado a partir de outros tipos de reacções de ligação cruzada, a adesão e a força de ligação foram afectadas quando testadas em couros, após incubação a 37°C. Material 1 foi formado a partir de COH206 e peróxido de hidrogénio, que oxida grupos sulfidrilo adjacentes para uma ligação de dissulfureto. Um gel forma-se rapidamente, e o gel pode ser suplementado com colagénio metilado e Vicryl; no entanto, após várias horas em tampão de solução salina, o gel torna-se muito fraco; as fibras de Vicryl são facilmente puxadas para fora. O material 2 utilizou a reacção de grupos sulfidrilo a partir de COH206

com a ligação dupla de uma vinil-sulfona de 4 braços derivado de PEG (10K Shearwater Polymers; Fig. 11). A presumível reacção, uma adição de tipo Michael, formou uma ligação tio-éter. Tais géis tinham força de tracção adequada, mas fraca adesão ao couro após a incubação em solução salina. Os materiais 3 e 4 continham COH204 (aminoácidos PEG tetra-funcionais de 4 braços, 10K, Shearwater Polymers); a funcionalidade amino reagiu presumivelmente com o éster de succinimidilo do COH102 para formar uma ligação amida (Fig. 12). Estes géis foram comparáveis em desempenho aos formados a partir COH102 e COH206. (Para uma reacção adequada na presença de colagénio metilado, o COH204 teve de ser titulado para pH 2-4 durante a mistura dos reagentes; por adição do tampão de cura, o seu pH foi aumentado, permitindo que a reacção do grupo amino). Pareceu que a presença de éster de succinimidilo era importante para conseguir a mais elevada aderência ao substrato de tecido e para boa resistência à tracção do gel. Também se prevê que outros grupos que reagem com aminas, tais como aldeídos (aldeídos conjugados com PEG multi-braços), sejam eficazes reagentes formadores de adesivos.

Tabela 13

Forças de Ligação dos vários PEGs funcionalizados Preenchidos
com Fios de Vicryl

Material	Tempo Incubação (Hrs.)	de Força de Ligação (Força N)
COH206/Colagénio Metilado/Vicryl/ 17 H ₂ O ₂		0,32, 0,20
COH206/Vinil de 4 braços/ 2 sulfona PEG/colagénio	2	2.2, 1.5

Forças de Ligação dos vários PEGs funcionalizados Preenchidos
com Fios de Vicryl

Material	Tempo Incubação (Hrs.)	de Força de Ligação (Força N)
metilado/fios de Vicryl		
COH102/206/204/Colagénio metilado 2 /Fios de Vicryl		6,4
COH102/204/Colagénio metilado /Fios de Vicryl	4	3.6, 6.4
COH102/206 / Colagénio desnaturado / Fios de Vicryl	2	6.6, 5.6

Persistência da Ligação sob Condições Hidratadas.

A Tabela 14 mostra que os adesivos formados a partir de COH102, COH206, e também COH204 formam ligações utilizando couro que persistem por longos tempos imersas em tampão de solução salina a 37°C. Tais condições rigorosas hidratadas simulam o ambiente in vivo. Foi observado o enfraquecimento da força de ligação depois de mais de 100 horas de hidratação. Pensou-se que o enfraquecimento da força de ligação era devido à hidrólise de ligações de rede de carboxilo- e tio-éster (Fig. 13). O COH102 é um éster de glutaril-succinimidil; mesmo após a reacção com o terminal carboxilo do éster de succinimidilo, continua a haver um éster de carboxilo que se liga a porção glutaril à cadeia de PEG principal; essa ligação, bem como a ligação tio-éster, pode hidrolisar.

Tabela 14

Desempenho de ligação sob tempos de hidratação longos

Material	Tempo de Incubação (h)	Força de ligação (Força N)
COH102/206/204/ Colagénio metilado/ Fios de Vicryl	2 66 70 137 140	6,4 2,6, 4,1 3,0 0,70, 2,6 1.1,0.4
COH102/204/ Colagénio Metilado Fios de Vicryl	4 64 136 234	3.6,6.4 7,0, 5,1 3,8, 2,7 2,7, 1,7
COH102/206/ Colagénio Metilado/ Fios de Vicryl	2 17 69 93 140 235	6.6,5.6 6,3, 5,5 0.63,0.90, 3,4, 5,4 2,4, 5,4 3.2,2.9 >2,4, 3,7

Fórmulas Relacionadas com Compostos de Peso Molecular Menor possuindo éster de succinimidilo e grupos amino ou tiol reactivos.

A Tabela 15 apresenta as forças de ligação em tiras de couro de derivados de PEG de menor peso molecular como adesivos, novamente suplementado com colagénio metilado e Vicryl. GLYC-20HS é um succinimidil-succinato tri-funcional de um PEG de 3 braços, construído a partir de um núcleo de glicerol, 2600 mol em peso, NOF Corporation, Japão. O COH201 é um PEG de 4 braços, tetra-amino, 2000 Peso Mol., da Shearwater Polymers. Os polímeros que foram preenchidos com Vicryl pareciam ter um pequeno efeito na resistência de ligação. Foram utilizadas as seguintes proporções: Colagénio Metilado, 500 µL (22 mg/ml em água 2707-30B); GLYC-20HS, 48mg; COH201, 60 µL de solução a 60% em água, ajustada para pH 1-2 com HCl 6M ; Fios de Vicryl, 26 mg.

Tabela 15

Análogos de Baixo Peso Molecular para COH102 e COH206

Materials	Tempo Incubação (Hrs.)	de Força de Ligação (Força N)
GLYC-20HS/COH201/Colagénio Metilado	2	2,3, 0,64
GLYC-20HS/COH201/Colagénio Metilado/Fios de Vicryl	5	2,3, 3,3

Testes de Ruptura de Discos de Colagénio e em Defeitos de Incisão nas Artérias Carótidas

O desempenho dos adesivos para utilização em aplicações cirúrgicas é frequentemente medido pela sua capacidade para vedar fugas de fluido. Foram utilizados dois tipos de testes de fugas ou de pressão de fluido:

a. Teste de Ruptura num Disco de Colagénio

Utilizando o dispositivo ilustrado na fig. 15, uma camada de colagénio foi montado sobre uma plataforma de latão e fixado com um segundo anel de latão enroscado no primeiro. A plataforma inferior latão foi perfurada e ligada a uma linha cheia com água. A água foi accionada por um êmbolo de seringa a 5 ml/min. Uma linha de derivação conduziu a um medidor de pressão. A camada de colagénio de teste também foi perfurado (orifício de 2 mm de diâmetro). A preparação adesiva (aprox. 0,5 ml) foi aplicada na camada, cobrindo a perfuração. O adesivo foi deixado a curar 3 min (ou mais tempo, se necessário, para efectuar a cura para uma borracha dura), em seguida, foi aplicada pressão da água. Foi registada a pressão necessária para romper o tampão. Para o cianoacrilato, um pedaço (4 x 4 mm) de pequena camada de colagénio foi colada à camada inferior perfurada.

b. Defeito da incisão na Artéria Carótida

O modelo de artéria carótida pressurizado é ilustrado na fig. 16. Uma artéria de porcino (Pel Freeze Biologicals, Rogers, Arkansas) foi ligada a uma linha de água. A água foi conduzida por uma bomba peristáltica. O fim da linha tinha um limitador de fluxo colocado sobre a mesma de modo que poderiam ser aplicadas pressões até 10 psi, e mais, sobre a linha, através do aumento da velocidade da bomba. Primeiro a artéria intacta foi colocada no sistema e submetida à pressão da água,

para assegurar que iria manter as pressões desejadas, sem fugas. Foram preferidas as secções da artéria desprovidas de ramificações laterais; As ramificações de fuga foram por vezes grampeadas para evitar fugas. incisões de cerca de 2 mm de comprimento foram cortadas transversalmente na artéria em quatro locais sobre uma circunferência (Fig. 16). Na artéria cortada, em seguida, simulou-se uma anastomose na qual foram aplicadas suturas de contenção. Os locais de corte foram então colados completamente, numa tentativa para os vedar. Foi aplicado um tampão (fosfato ácido de sódio 134 mM e carbonato de sódio 166 mM, pH 8,9), ao tecido da artéria, pouco antes da aplicação da cola. A massa de cola foi adicionalmente irrigada com algumas gotas deste tampão para curar o gel. Após um tempo de cura 8 min, a junta colada foi submetida a pressão da água. A pressão foi aumentada para incrementos de 1 psi $6,89.10^3$ Pa e mantida a cada pressão durante 1 minuto antes de aumentar ainda mais. A fuga foi classificada como positiva se o gotejamento fosse mais rápido do que 1 gota por 10 segundos.

A Tabela 16 mostra as forças de ruptura de COH102/206/Colagénio metilado/Vicryl em orifícios de diâmetros variados (em membranas de colagénio com tempos de cura de 8 min; curadas com tampão de pH 8,9, 0,5 ml de amostra espalhado sobre o orifícios com a com espátula). Um furo com um diâmetro de 5 mm é o maior defeito que se pode prever numa aplicação cirúrgica, uma vez que suturas de contenção seriam usadas para fechar os defeitos maiores, e estimou-se que o maior intervalo entre as tais suturas seria de 5 mm. Mesmo com tais grandes orifícios, o adesivo foi capaz de sustentar pressões próximo ou acima do máximo esperado em pacientes hipertensos, isto é, 4 psi $2,76.10^4$ Pa. A entrada de terceiros dados enfatiza a necessidade de ter de um bom gel de cura na interface do gel e no disco de colagénio. A adição do tampão de cura nesta

superfície, antes da aplicação, melhora a ligação a curto prazo.

Tabela 16

Força de Ruptura do COH102/206/colagénio metilado/Vicryl			
Diâmetro do orifício (mm)	Pressão de Ruptura (PSI)*		
2	>3.0, 7.4, 4.6 (>2,07 10 ⁴ Pa, 5,1.10 ⁴ Pa, 3,17.10 ⁴ Pa)		
5	3,1, 5,5, 5,3 (2,11.10 ⁴ Pa, 3,79.10 ⁴ Pa, 3,65.10 ⁴ Pa)		
5	1,0 ⁺ (6,89.10 ³ Pa)		

* 1 PSI = 0,68 N / CM²= 51 mm Hg 4 PSI = 2,7 N / CM²= 204 mm Hg

Membrana + não pré-tratada com uma gota de tampão pH 8,9

A Tabela 17 apresenta dados sobre defeitos de fechamento de grandes incisões em artérias carótidas (4 x 2 mm incisões cortadas em 4-6 mm de diâmetro da artéria). A fórmula COH102/206/colagénio metilado/Vicryl era comparável ao cianoacrilato no desempenho. Deve notar-se que os resultados mais pobres são vistos em artérias mais finas que esticam mais sob pressão.

Tabela 17

Teste da Força de Ruptura em Artérias Carótidas de Suínos			
Material	Pressão de Ruptura (PSI)		Tempo de Cura (min)
COH102/206 /	4,3 ± 2,0 (2,96.10 ⁴ ± 8 1,38.10 ⁴ Pa) (n = 5)		

Teste da Força de Ruptura em Artérias Carótidas de Suínos			
Material	Pressão de Ruptura (PSI)	Tempo de Cura (min)	
Colagénio metilado / Vicryl	$8,0 \pm 4,0$ ($5,51 \cdot 10^4 \pm 2,75 \cdot 10^4$ Pa) (n = 3)	30	
Cianoacrilato (Elmer's Products)	$2,7 \pm 3,6$ ($1,86 \cdot 10^4 \pm 2,48 \cdot 10^4$ Pa) (n = 6)	8	
Cianoacrilato (Dermabond)	$5,5 \pm 5,2$ ($3,78 \cdot 10^4 \pm 3,58 \cdot 10^4$ Pa) (n = 4)	8	

Exemplo 8

Derivados de penta-eritritol e tri-metilol propano funcionalizados com tiol e acrilato de, além de enchimentos tais como Vicryl.

Esta classe de adesivos foi preparada a partir de reagentes líquidos puros (sem adição de tampão aquoso). A reacção de acoplamento que envolveu a adição de grupos tiol na ligação dupla activada de acrilato é mostrada na fig. 17. A Tabela 19 abaixo apresenta os dados da força de ligação do par reactivo TPETA (tri-metilol propano etoxilato de tri-acrilato, peso mol. 912, Aldrich Chemical Co.; fig. 18) e TMPE-SH (tri-metilol-propano etoxilato de tri-tiol, peso mol. 1140 (Fig. 19), sintetizado a partir de trimetilol propano etoxilato, peso mol. 1100, Aldrich Chemical Co.) para conduzir a reacção, foi necessária uma base para converter o tiol num anião tiolato. Foi utilizado T403, um tri-amino óxido de propileno de 3 braços, 970 mol. em peso (Texaco Chemical Co., Fig. 2c). O gel formado era suficientemente forte de tal forma que foi apenas adicionado o Vicryl como filler. Não foi adicionado

colagénio metilado. (É pouco provável que o colagénio metilado, dissolvido em água, permanecesse em solução com o líquido puro TPETA e TMPE). A formulação era como se segue:

Tabela 18

TPETA/TMPE-SH/T403/Vicryl

Valores	Grupos reativos Mmoles
160 mg TPETA	0,53
200 mg TMPE-SH	0,53
10 µl T403	0,03
15 mg Fios de Vicryl, 1-2 cm de comprimento	

TMPE-SH e T403 foram misturados em conjunto, seguidos pela adição de fios de Vicryl, e finalmente o TPETA foi adicionado e misturado com os outros componentes. A mistura foi espalhada sobre substratos de teste molhadas com uma espátula, como descrito acima. A mistura tornou-se viscosa em cerca de 3 min, e era um gel firme em 5 min. Em seguida, a mistura de teste foi imersa em solução salina, como descrito acima, após 20 min. O tempo de gel era livremente controlável pela quantidade de T403 adicionado.

A Tabela 19 mostra que a ligação foi alcançada em todos os três substratos de tecidos, mas a força de ligação foi menor do que a das formulações de COH102/206. A falha de ligação era sempre adesiva - estes géis exibiram elevada resistência à tracção, mas não aderiram bem ao tecido. No entanto, em certas aplicações clínicas, não é necessária uma forte aderência aos tecidos. Esta característica foi particularmente evidente na membrana de colagénio. A reacção de acoplamento químico, aparentemente, não proporcionou um mecanismo adequado para a

ligação covalente ao tecido, como é o caso com COH102, em que o éster de succinimidilo pode, em princípio, reagir com grupos amino no tecido. Grupos sulfidrilo livres nas proteínas de tecido podem reagir com o grupo de acrilato de TPETA, mas esses grupos são relativamente raros em proteínas.

Tabela 19

Força de ligação de TPETA/TMPE-SH/VICRYL/T403 em três substratos de tecido.		
Tempo de incubação (Hrs)	Força de ligação (Força N)	Substrato*
2	3.3,6.0	Couro*
18	3.7,2.9	Couro
2	1.7,2.0	Suíno
		Artéria
		Carótida
2	0.7,0.5	Colagénio
		Membrana
*tiras de couro, 0,5 cm de largura, artéria carótida suína, 0,3 - 0,5 cm de diâmetro e membrana de colagénio: invólucro de salsicha, 0,2 mm de espessura, 1 cm de largura.		

A Tabela 20 mostra que as formulações TPETA/TMPESH, embora tenham exibido apenas uma modesta de ligação às tiras de couro, durante a imersão longa em solução salina fisiológica a 37 °C, exibem, no entanto, ligações persistentes após a imersão em solução salina. Isto é provavelmente devido à estabilidade relativa da ligação tio-éter, em relação às ligações presentes nos géis de COH102/206. As proporções de

material mol. utilizados foram 0.59:0.52:0.031, 15mg para TPETA: TMPE-SH: T403: Vicryl, mg/0.39 ml.

Tabela 20

Desempenho de TPETA/TMPE-SH/T403/Vicryl como um adesivo

Tempo de Incubação (Hrs)	Força de ligação (Força N)
2	3,3, 6,0
18	3.7,2.9
66	2,8, 3,3
260	2,5, 3,1

Exemplo 9

Força de Tracção de Materiais Adesivos Hidratados

As formulações adesivas aqui descritas costumam falhar adesivamente - sua força de coesão não parece ser o factor limitante. Os dados abaixo comparam as forças de tracção do próprio adesivo com outros adesivos e hidrogéis.

Medição das Forças de tracção após 2 horas de imersão em solução salina a 37 °C

O adesivo foi formado numa forma aproximadamente cilíndrica e deixou-se curar num recipiente de pesagem de poliestireno, durante aproximadamente 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi imersa em água para horas 2-21/2 a 37 °C. A amostra foi removida da água, enxugada, e a fita foi afixada a cada uma das extremidades com cola de cianoacrilato. A amostra foi então montada num testador de tracção Instron, fixo em cada extremidade pela fita, e

estendido na falha. Foi observada a última resistência à tracção em N/cm^2 , em relação à área da secção transversal da amostra no ponto de ruptura. Em alguns casos curvas tensão-deformação foram calculados usando $\Delta L/L_0$ como a tensão, onde $\Delta L = L - L_0$, L é o comprimento da amostra no tempo t , e L_0 é o comprimento da amostra original. Para preparar uma amostra de controlo constituída apenas por cianoacrilato, o cianoacrilato foi matizado em fígado bovino. Após cerca de 20 minutos, o cianoacrilato tinha curado para uma tira. O fígado foi descascado (que é um tecido extremamente frágil), e as partículas de fígado residuais foram removidas. Foi assim obtida uma tira de polímero de cianoacrilato curada, relativamente uniforme e limpa.

Os dados apresentados na Tabela 21 mostram que os adesivos que contêm um intensificador de resistência à tracção potenciador exibem maior resistência à tracção do que hidrogéis sem tal intensificador. A classe de acrilato-tiol de adesivos (tais como TPT-SH: Trimetilol propano tris (3-mercaptopropionato), Fig. 20), contendo Vicryl, tinha resistências à tracção superiores às do cianoacrilato sozinho. Formulações sem um intensificador de resistência à tracção tinham resistências à tracção de, aproximadamente, 8 a 20 N/cm^2 . O COH 102/206 (20%) é um hidrogel simples - que tinha uma resistência à tracção muito mais baixa do que a formulação correspondente contendo colagénio metilado e Vicryl. As medições foram realizadas após 2 h de imersão em solução salina a 37 °C.

Tabela 21

Resistência à Tração de Adesivos selecionados

Material	Resistência à Tração (N/cm ²).
COH102/206 /	84 ± 21 (n = 5)
Colagénio metilado /	
Vicryl	
TPETA / TPT-SH /	310 ± 160 (n = 2)
GdMA/T403/Vicryl ¹	
Cianoacrilato	200 ± 7 (n = 2)
(cola Krazy, Elmer's Products)	
COH102/206 (20%)	7 ± 5 (n = 3)
Gelatina-PEG-di-	5-16
acrilato ²	
pHEMA ³	3

¹TPT-SH: trimetilol propano tris (3-mercaptopropionato) (fig. 20), mol. em peso. 400, Aldrich; GdMA: glicerol di-metacrilato, Aldrich (Fig. 21).

²Nakayama, Y., e Matsuda, T., "Photocurable surgical tissue adhesive glues composed of photoreactive gelatina and poly(ethylene glycol diacrylate", J. Biomed. Biomat. Res. (Appl. Biomater.) 48, 511-521 (1999).

³pHEMA: poli hidroximetacrilato; Santin, M., Huang, SJ, Iannace, S., Ambrosio, L., NICOLAIS, L., e Peluso, G., "Synthesis and characterization of a new interpenetrated poly (2-hydroxyethylmethacrylate)-gelatin composite polymer", Biomaterials 17, 1459-1467.

Exemplo 10

Copolímeros lineares com grupos reativos pendentes.

O objectivo desta experiência foi o de encontrar um meio para sintetizar polímeros de cadeia linear com grupos reactivos pendentes como mostrado na fig. 1. Um outro objectivo era ser capaz de inserir na cadeia de polímero linear, não apenas os grupos reactivos pendentes, mas também as subunidades monoméricas ou blocos de polímero que poderiam dar tenacidade aos géis formados a partir do polímero. Como tal, esta experiência é uma extensão do Exemplo 6 acima.

Todos os polímeros preparados eram da família dos poli-acrilato/metacrilato. Seguindo um procedimento delineado em Sun, YM, et al, "Composite poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes as rate-controlling barriers for transdermal applications", Biomaterials 18, 527-533, 1997, foram preparados polímeros lineares. Os monómeros incluídos na polimerização foram HEMA (hidroxi-etil-metacrilato), MMA (metacrilato de metilo), ARS (mono-2 (acriloxi) etil succinato), e AEM (2-amino-etil-metacrilato) (Figura 14).

A polimerização para formar poli-HEMA com cadeias laterais carboxilo e amino foi realizada durante 4 horas a 75 °C, com os seguintes ingredientes: HEMA, 1260 µL; ARS, 240 µL; AEM 348mg; azobis-isobutiro-nitrilo, 54 mg ; e etanol seco, 34 ml. A precipitação foi realizada com éter de petróleo seco.

A polimerização foi iniciada com azobis-isobutiro-nitrilo em etanol seco, com agitação vigorosa. AEM, que é pouco solúvel em etanol, foi primeiro dissolvido em água (50% p/v), a solução ajustada para um pH de 2-4 com HCl, e adicionado à solução dos outros constituintes em etanol. A reacção completa foi purgada com azoto e conduzida numa garrafa com tampa de rosca num banho de água. Os inibidores de radicais livres em HEMA e MMA foram removidos pela passagem destes reagentes através de uma coluna de óxido de alumínio 90 (Activo neutro, actividade 1, 70-230 mesh, EM Science, Gibbstown, New Jersey)

mesmo antes da adição à mistura de reacção. Após 4 horas a 70-80 °C, a solução foi arrefecida, filtrada para remover AEM insolúvel e outras partículas, e o polímero foi precipitado por adição de 10 ml de éter de petróleo. O polímero coagulou sobre a superfície do copo de vidro, e a solução de etanol gasto foi decantada. O polímero foi seco sob vácuo durante vários dias.

A Tabela 22 mostra que os polímeros aparentemente foram obtidos, e para as duas primeiras amostras na tabela, os géis foram rapidamente formados com COH102, sugerindo a presença de porções AEM na cadeia de polímero. No caso das preparações anteriores de polímero, a quantidade relativa de funcionalidade amino e carboxilo no polímero foi estimada a partir de uma curva de titulação. Aproximadamente 1 subunidade AEM e 2 subunidades ARS estavam presentes para cada 20 unidades de HEMA ao longo da cadeia. Ver figura 23.

Nenhum dos géis de polímero que se formaram foram mais resistentes do que hidrogéis formados a partir de COH102 e COH206 sozinho. Co-polímeros elevados em MMA eram gredosos e desmoronaram-se rapidamente. MMA foi originalmente escolhido porque pMMA em si é um polímero resistente, insolúvel em água. Por conseguinte, estas classes de cadeias de polímero com grupos reactivos pendentes são aparentemente não adequadas para utilização na presente invenção. Modificações adicionais da proporção desses monómeros de acrilato/metacrilato ou introdução de outros monómeros da família do acrilato, podem resultar num polímero com as propriedades desejadas, e tais estudos de optimização podem facilmente ser realizados utilizando os ensinamentos aqui apresentados.

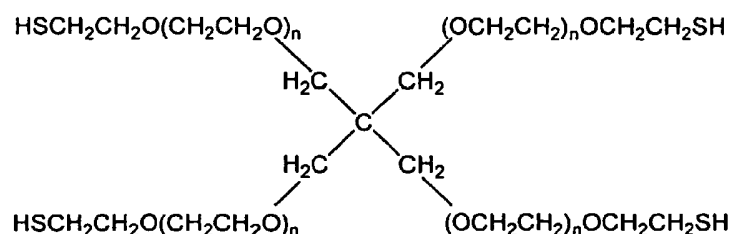
Tabela 22

Propriedades de polímeros sintetizados poli- acrilato/metacrilato			
Razão HEMA:MMA	Gelificação (+ ou -) ¹	Solúvel (Sim ou Não)	Peso Mol. (Daltons) ²
100:0	+	Sim	880
80:20	+	Não	1300
50:50	-	Não	4500
1. Aproximadamente 50% (p/v) de soluções ou dispersões de polímero em tampão pH 9,6 (descrito acima) foram misturadas com uma solução a 50% (p/v) de COH 102 em água. A formação de um gel em segundos a horas foi pontuada como "+". 2. Peso molecular relativo a padrões PMMA, HPLC em gel PL em tandem, colunas de crivo molecular, em solvente de dimetil formamida a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min.			

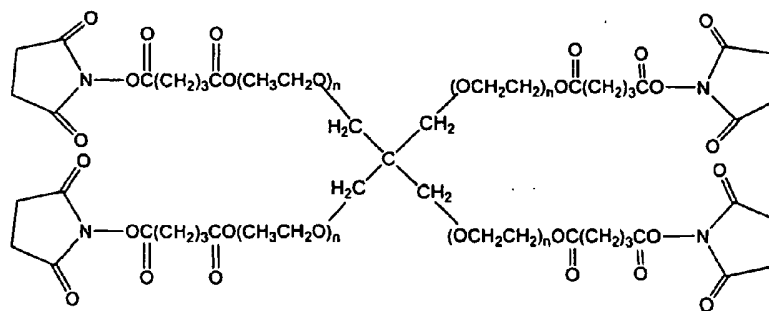
Lisboa, 22 de Maio de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Um dispositivo de polímero biocompatível para utilização no tratamento de tecidos compreendendo uma esponja de colagénio ou uma folha impregnada com um pó de polietilenoglicol reactivo de dois componentes, caracterizado por o referido pó reactivo compreender ainda um primeiro polietilenoglicol possuindo múltiplos grupos nucleofílicos e um segundo polietilenoglicol possuindo múltiplos grupos electrofílicos, e por o pó de polietilenoglicol permanecer não reactivo até contactar com um tampão de pH elevado.
2. Um dispositivo de polímero biocompatível, de acordo com a reivindicação N.º.1, caracterizado por o primeiro polietilenoglicol possuir 4 ou mais grupos nucleofílicos e o segundo polietilenoglicol possuir 4 ou mais grupos electrofílicos.
3. Um dispositivo de polímero biocompatível, de acordo com a reivindicação N.º. 1, caracterizado por o referido primeiro polietilenoglicol ser um polietileno tiol glicol tetra funcional (MW 10.000) com a seguinte fórmula



e o referido segundo polietilenoglicol ser um polietilenoglicol glutaril-succinimidilo tetra-funcional (MW 10.000) com a seguinte fórmula



4. Um dispositivo de polímero biocompatível, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizado por compreender ainda um intensificador de resistência à tracção constituído por um material seleccionado de entre o grupo que consiste em fibras de poliglicólido, fibras de polilactídeo, lã de vidro, e plástico.
5. Um dispositivo de polímero biocompatível, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizado por compreender ainda um composto adicional seleccionado de entre o grupo consistindo em glicosaminoglicanos e proteínas.
6. Um dispositivo de polímero biocompatível, de acordo com a reivindicação N°.5, caracterizado por o composto adicional ser uma proteína seleccionada de entre o grupo consistindo em colagénio, fibronectina, gelatina, albumina, ou fragmentos peptídicos dos mesmos.
7. Um dispositivo de polímero biocompatível, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1 a N°.6, caracterizado por ser utilizado como um vedante de tecidos, no aumento dos tecidos, na reparação de tecidos, como um agente hemostático, para uso na prevenção de aderências de tecidos ou para a libertação de fármacos, células ou genes.

Lisboa, 22 de Maio de 2012

FIG. 1

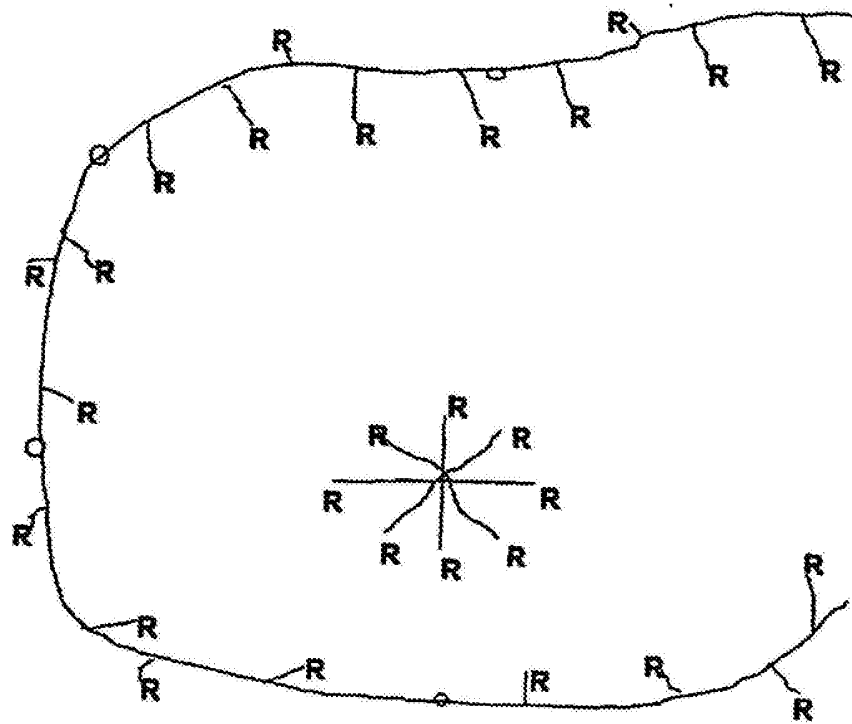


FIG. 2

Fig. 2a: PESH-P
Penta Eritrito Tetraquis (Tri Mercapto Propionato)

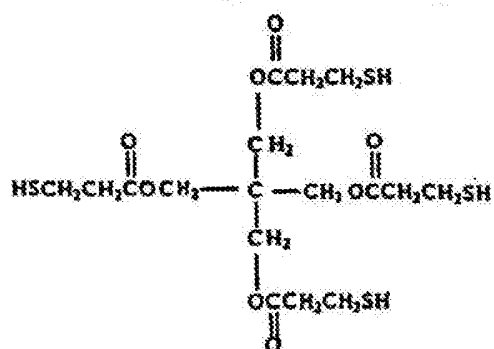


Fig. 2b: PETA
Penta Eritrito Tetra Acrilato

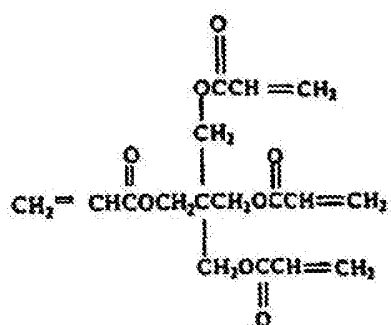


Fig. 2c
Poli-Oxipropileno Triamina

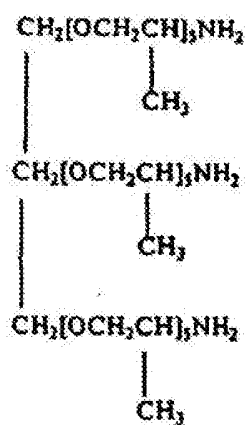


FIG. 4

Fig. 4a

Poli Tetrametileno Óxido Di-Amina



Fig. 4b

Poli Propileno Óxido Di-Acrilato

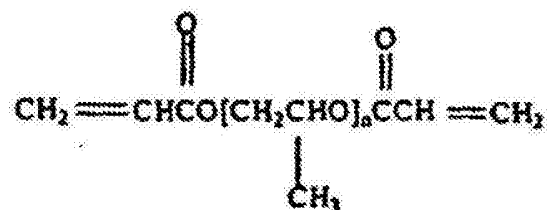


Fig. 4c

Poli Propileno Óxido Di-Amina

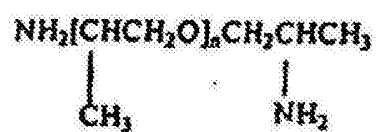


FIG. 5

COH102/COH206 (60%)

+ Colagénio

+ Dexon S

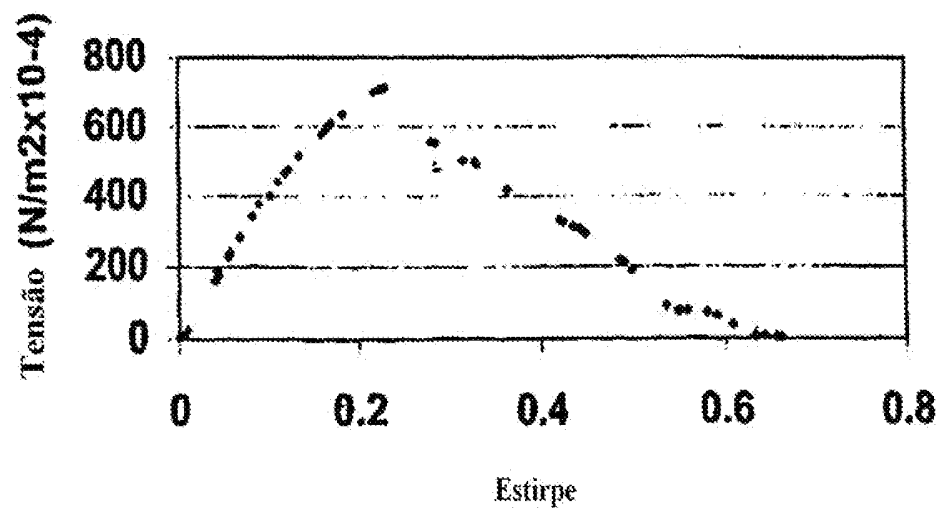


FIG. 6

Figura Esquemática da Configuração da
Tira para Testes de Falha por Cisalhamento

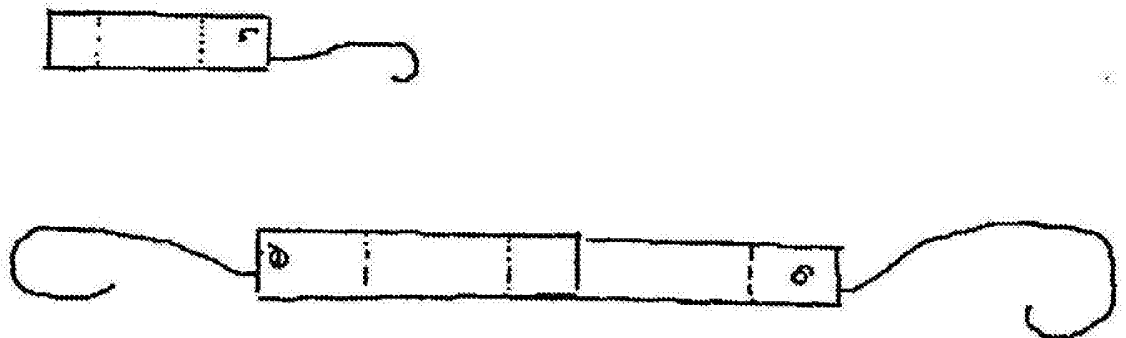


Fig. 7

Esquema 1

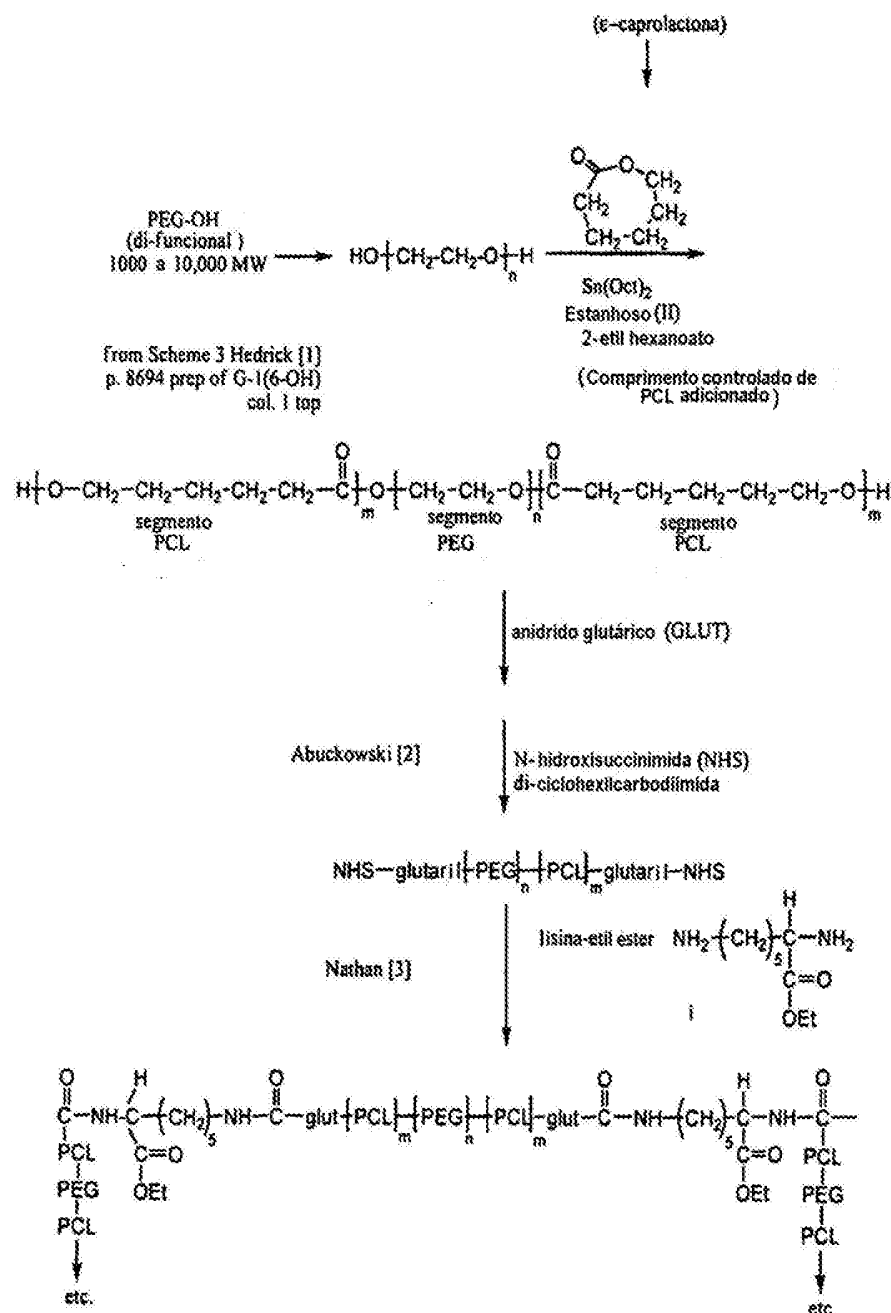
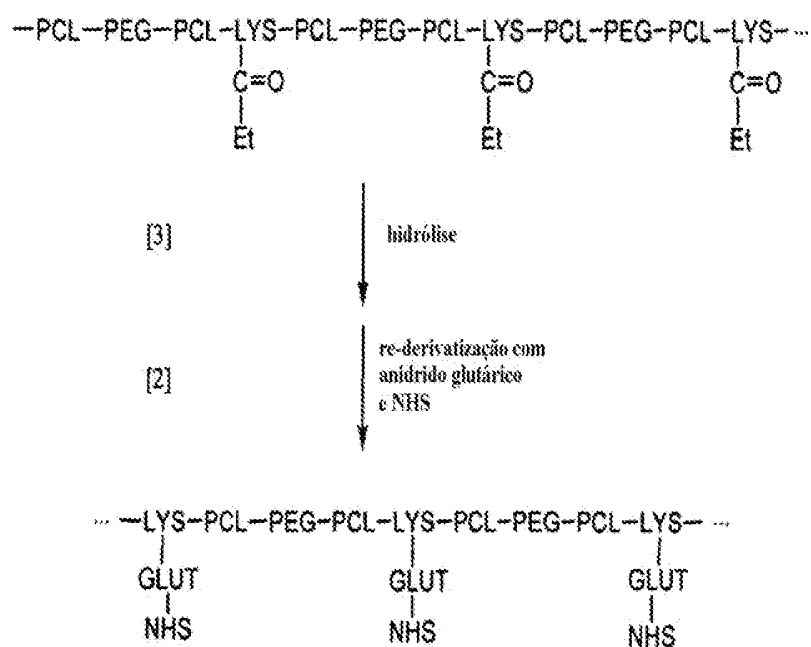


Fig. 7

Esquema 1, cont.

cadeia de polímero de repetição



cadeia de repetição com elementos degradáveis (PCL)
com grupos reactivos pendentes (NHS), com
segmentos solúveis na água (PEG)

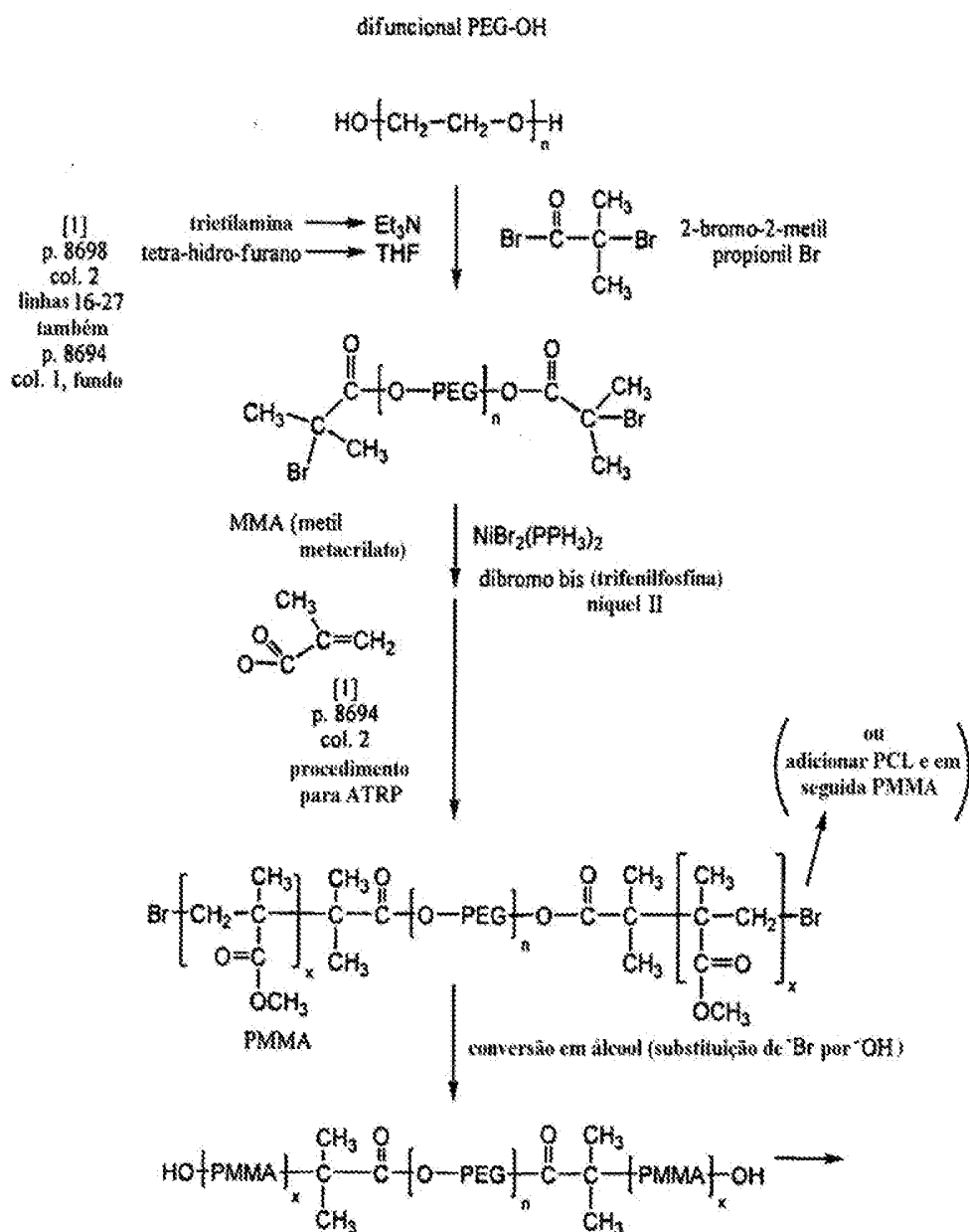
Fig. 8**Esquema 2**

Fig. 8

Esquema 2, cont.

Conversão

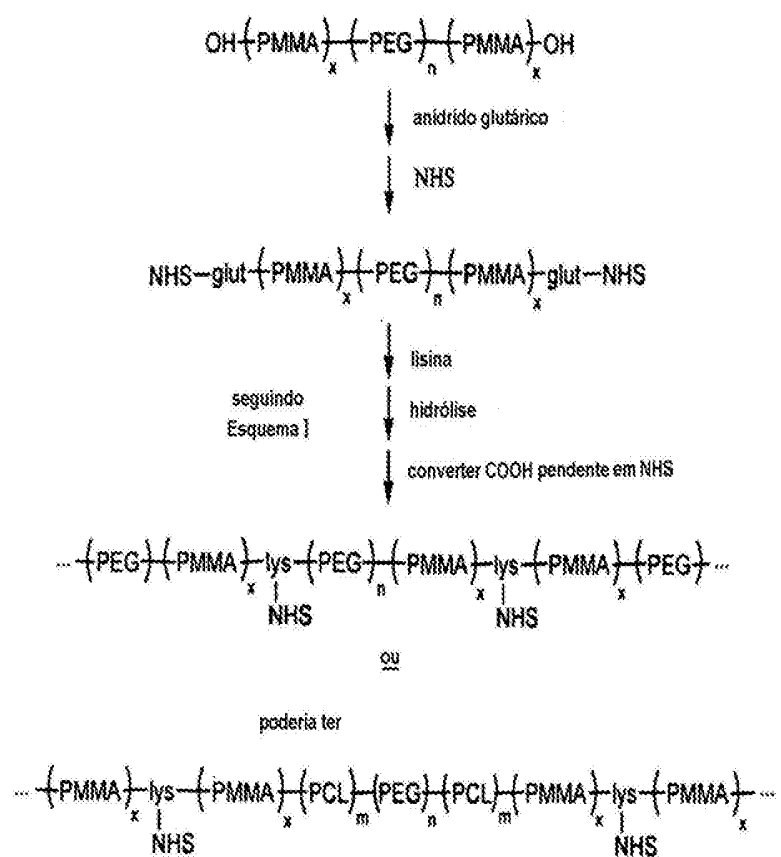
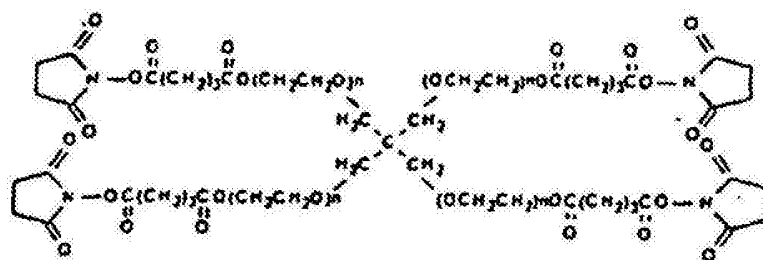


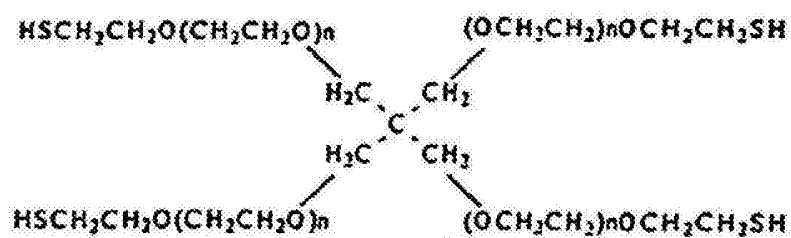
FIG. 9

Fig. 9a



COH102: GLUTARIL-SUCCINIMIDIL
POLIETILENO GLICOL TETRA-FUNCIONAL

Fig. 9b



COH206: TIOL POLIETILENO GLICOL
TETRA-FUNCIONAL

FIG. 10

Fig. 10a
MEMBRANAS DE
COLAGENIO



Fig. 10b
ARTÉRIA CARÓTIDA
SUINA

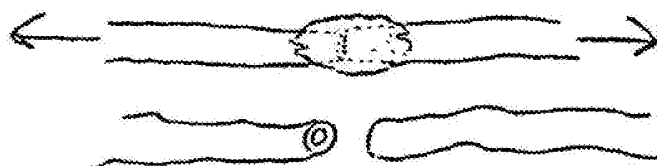


Fig. 10c
TIRA DE COURO



FIG. 11

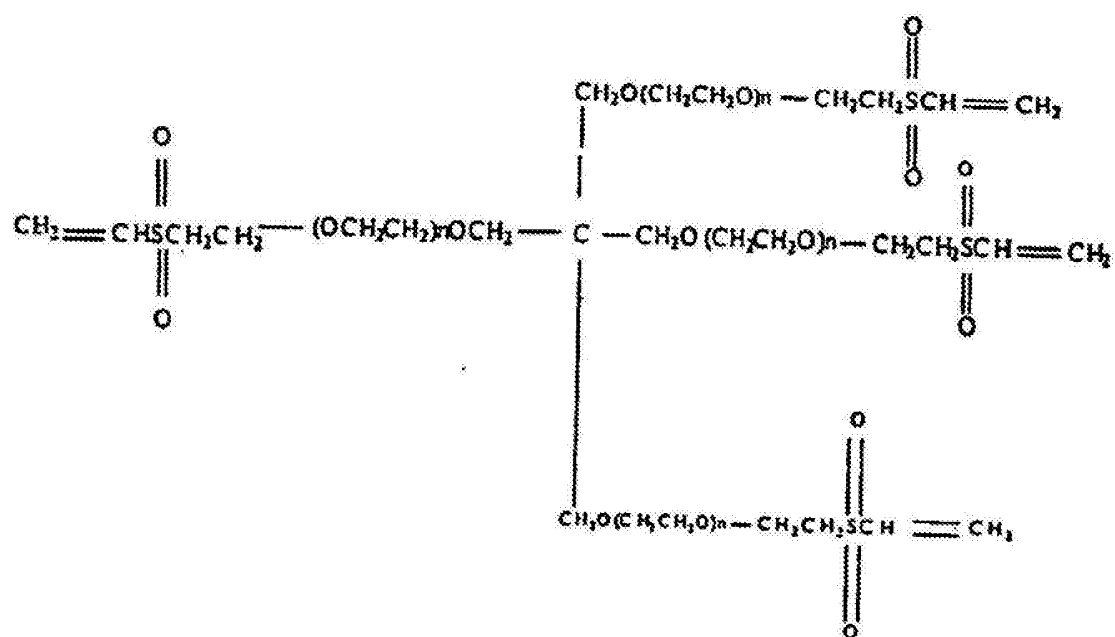


FIG. 12

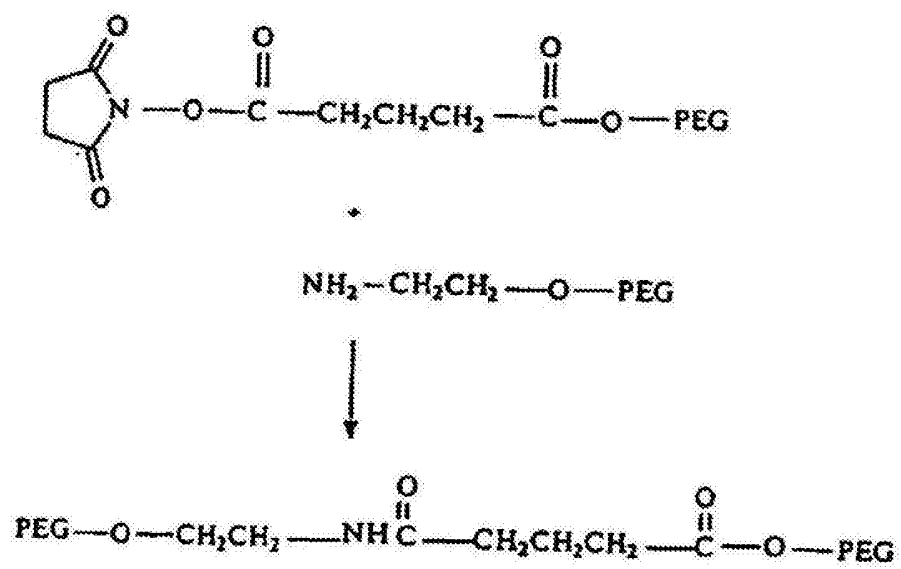


FIG. 13

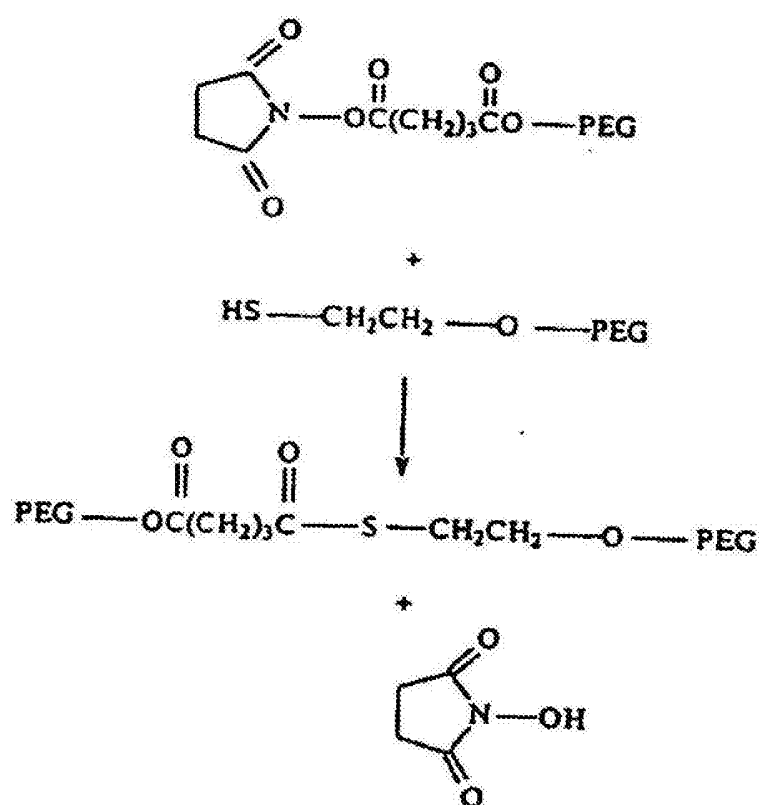
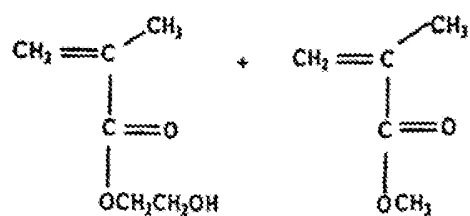
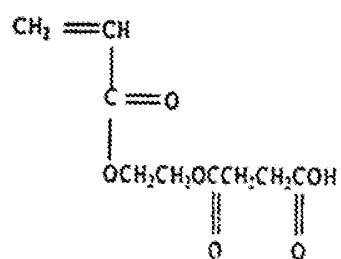


FIG. 14

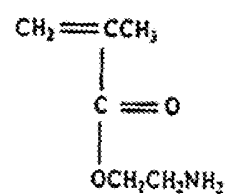


HEMA =
hidroxi-etil-
metacrilato

MMA =
metil-
metacrilato



mono-2-(acriloxi)etil succinato



2-amino-etil
metacrilato

FIG. 15

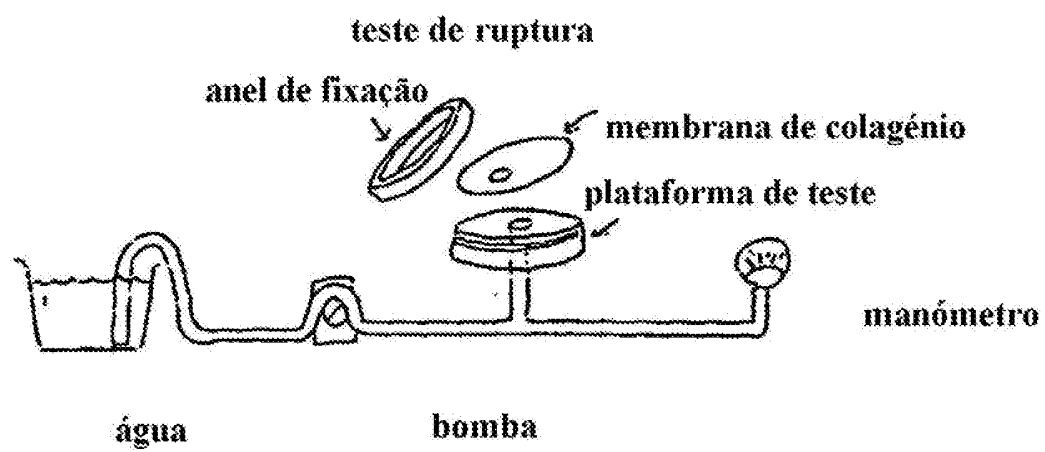


FIG. 16

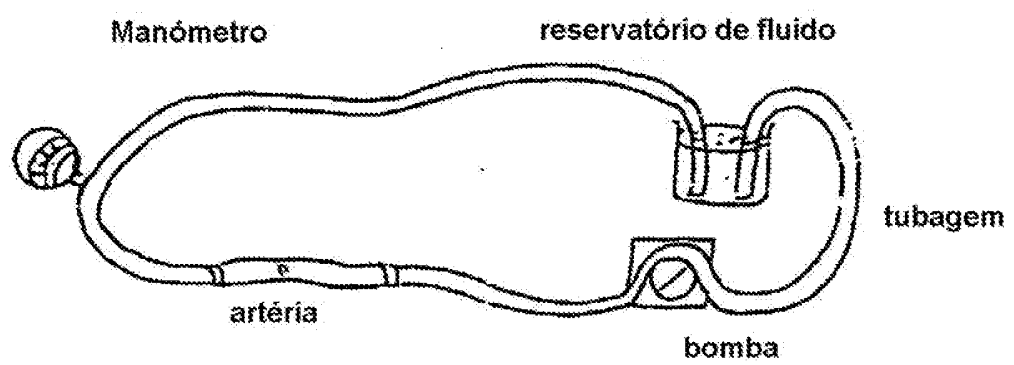


FIG. 17

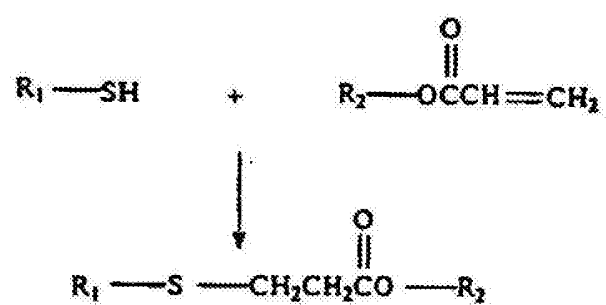


FIG. 18

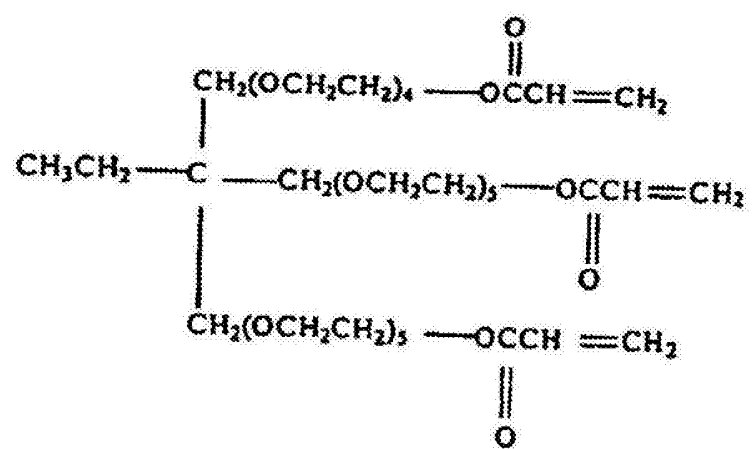


FIG. 19

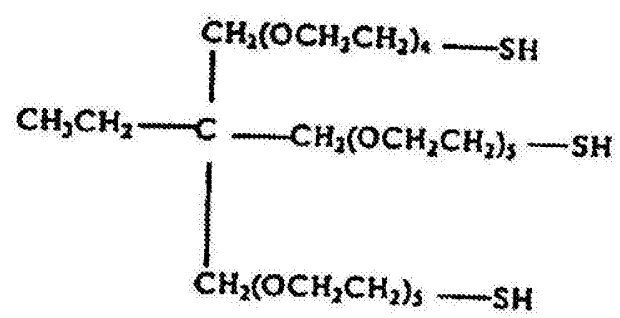


FIG. 20

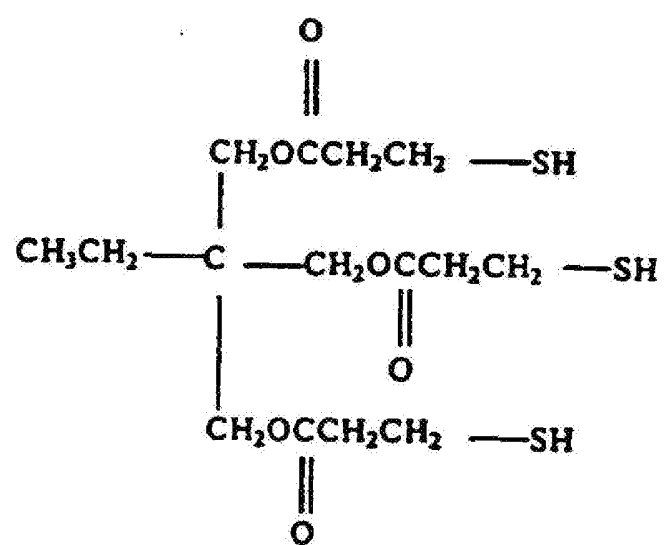


FIG. 21

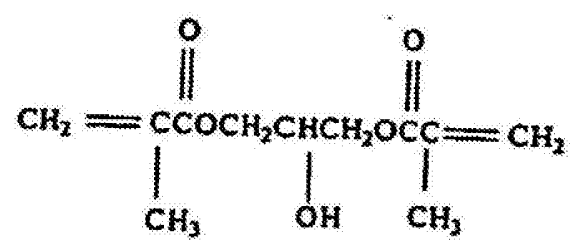


FIG. 22

