



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 311 455**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61L 15/50 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00921450 .3**

(96) Fecha de presentación : **23.03.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1181023**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

(54) Título: **Composiciones de poliácidos, de polímeros no iónicos de monómeros de óxido de alquileo y cationes multivalentes y su utilización para la reducción de adherencias.**

(30) Prioridad: **02.04.1999 US 127571 P**
27.12.1999 US 472110

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

(73) Titular/es: **Fziomed, Inc.**
231 Bonetti Drive
San Luis Obispo, California 93401, US

(72) Inventor/es: **Schwartz, Herbert, E.;**
Blackmore, John, M.;
Cortese, Stephanie, M. y
Oppelt, William, G.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 311 455 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de poliácidos, de polímeros no iónicos de monómeros de óxido de alquileño y cationes multivalentes y su utilización para la reducción de adherencias.

Composiciones de poliácidos y poliéteres y métodos para su uso en la reducción de adherencias.

Campo de la invención

Esta invención se refiere generalmente a la fabricación y uso de membranas que comprenden complejos moleculares de carboxipolisacárido/poliéter, geles reticulados que comprenden poliácidos, óxidos de polialquileño e iones multivalentes, y el uso de esas membranas y geles para inhibir la formación de adherencias entre tejidos después de una cirugía, después de un traumatismo y/o después de procesos patológicos. Las propiedades de las composiciones pueden adaptarse para conseguir los grados deseados de prevención de adherencias, capacidad de biorresorción, bioadhesividad y efectos antitrombogénicos.

Antecedentes de la invención

Las adherencias son crecimientos tisulares no deseados que aparecen entre capas de tejidos corporales adyacentes o entre tejidos y órganos internos. Comúnmente las adherencias se forman durante la cicatrización que sigue a los procedimientos quirúrgicos y, cuando están presentes, las adherencias pueden impedir los movimientos normales de esos tejidos y órganos con respecto a sus estructuras vecinas.

Las comunidades médica y científica han estudiado formas de reducir la formación de adherencias postquirúrgicas mediante el uso de biopolímeros que contienen carboxilo de alto peso molecular. Estos biopolímeros pueden formar geles hidratados que actúan como barreras físicas para separar tejidos entre sí durante la cicatrización, de tal modo que no se formen adherencias entre estructuras normalmente adyacentes. Después de que se haya completado sustancialmente la cicatrización, la barrera ya no es necesaria y debería eliminarse del cuerpo para permitir una función más normal de los tejidos afectados.

Se han usado varios tipos diferentes de biopolímeros para este fin. Por ejemplo, Balazs *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.141.973 describe el uso de una fracción de ácido hialurónico (HA) para la prevención de adherencias. Sin embargo, debido a que el HA es relativamente soluble y se degrada fácilmente *in vivo*, tiene una vida media relativamente corta *in vivo* de 1 a 3 días, que limita su eficacia como un preventivo de la formación de adherencias.

También se sabe que la metilcelulosa y los derivados de metilcelulosa reducen la formación de adherencias y la cicatrización que pueden desarrollarse después de una cirugía. (Thomas E. Elkins *et al.*, *Adhesion Prevention by Solutions of Sodium Carboxymethylcellulose in the Rat, Part I, Fertility and Sterility*, Vol. 41, N° 6, junio 1984, Tomas E. Elkins, M. D. *et al.*, *Adhesion Prevention by Solutions of Sodium Carboxymethylcellulose in the Rat, Part II, Fertility and Sterility*, Vol. 41, N° 6, junio 1984. Sin embargo, estas soluciones se reabsorben rápidamente por el cuerpo y desaparecen del sitio quirúrgico.

Además, las soluciones de poliéteres también pueden disminuir la incidencia de adherencias post-quirúrgicas. Pennell *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.993.585, describe el uso de óxido de polietileno en soluciones de hasta el 15% para disminuir la formación de adherencias post-quirúrgicas. Pennel *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.156.839 describe el uso de mezclas de carboximetilcelulosa de hasta aproximadamente el 2,5% en peso y óxido de polietileno en concentraciones de hasta aproximadamente el 0,5% en peso en mezclas de pH neutro fisiológicamente aceptables. Debido al pH neutro, estos materiales no forman complejos de asociación y, por lo tanto, siendo solubles, se eliminan del cuerpo en un periodo de tiempo reducido.

Las soluciones descritas anteriormente pueden tener desventajas por el hecho de que pueden tener tiempos de permanencia biológica cortos y, por lo tanto, pueden no permanecer en el sitio de la reparación durante tiempos suficientemente largos como para tener los efectos antiadherencia deseados. Por lo tanto, se han preparado membranas antiadherencias usando ciertos polímeros.

Aunque se han descrito ciertas membranas que contienen carboxipolisacáridos, las membranas anteriores pueden tener desventajas para el uso para prevenir adherencias en ciertas condiciones. Butler, Patente de Estados Unidos N° 3.064.313 describe la fabricación de películas hechas de carboximetilcelulosa al 100% (CMC) con un grado de sustitución de 0,5 e inferior, hechas insolubles por acidificación de la solución a un pH de entre 3 y 5 y, después, secado de la mezcla a 70°C para generar una película. Estas películas no se diseñaron para usarse como barreras antiadherencias.

Anderson, Patente de Estados Unidos N° 3.328.259 describe la fabricación de películas de carboximetilcelulosa al 100% y óxido de polietileno, sales de metales alcalinos y un agente plastificante para el uso como vendas externas. Estos materiales son rápidamente solubles en plasma y agua y, por lo tanto, tendrán un tiempo de permanencia muy corto como una película intacta. Por lo tanto, estas composiciones no son adecuadas para mitigar las adherencias quirúrgicas.

Smith *et al.*, Patente de Estados Unidos 3.387.061 describe complejos de asociación insolubles de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno preparados por disminución del pH hasta por debajo de 3,5 y, preferiblemente, por debajo de 3,0 y, después, secado y horneado del precipitado resultante (véase el Ejemplo XXXVIII). Estas membranas no estaban diseñadas para el uso quirúrgico para mitigar las adherencias. Tales membranas son demasiado insolubles, demasiado rígidas y se hinchan demasiado poco como para ser ideales para prevenir las adherencias postquirúrgicas.

Burns *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.017.229 describe películas insolubles en agua hechas de ácido hialurónico, carboximetilcelulosa y un agente reticulante químico. Debido a la reticulación covalente con una carbodiimida, estas películas requieren procedimientos de limpieza exhaustivos para liberarse del exceso de agente reticulante; y debido a que se preparan sin plastificante, son demasiado rígidas y quebradizas para servir idealmente para prevenir adherencias -no se adaptan fácilmente a las formas de los tejidos y órganos del cuerpo.

Por lo tanto, existe una necesidad de membranas antiadherencias y geles que pueden usarse en una diversidad de circunstancias diferentes. El D. Wiseman revisa el estado de la técnica del campo en *Polymers for the Prevention of Surgical Adhesions, En: Polymeric Site-specific Pharmacotherapy*, A. J. Domb, Ed., Wiley & Sons, (1994). Un gel antiadherencias actualmente disponible está hecho de ácido hialurónico iónicamente reticulado (Huang *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.532.221, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad).

La reticulación iónica de polisacáridos está bien documentada en la bibliografía química y de patentes (Morris y Norton, *Polysaccharide Aggregation in Solutions and Gels*, Cap. 19, en *Aggregation Processes in Solution*, Wyn-Jones, E. y Gormally, J. Eds., Elsevier Sci. Publ. Co. NY (1983)). Cada tipo de ión metálico puede usarse para formar geles de diferentes polímeros en condiciones específicas de pH, fuerza iónica, concentración iónica y concentraciones de componentes poliméricos. Por ejemplo, el alginato (un polisacárido lineal de ácido beta-D-manurónico y ácido alfa-L-glucurónico con unión 1,4) puede formar estructuras de asociación entre secuencias de poliglucuronato en las que pueden unirse iones de calcio divalentes, conduciendo a estructuras ordenadas y a la formación de un gel. También se demuestra una capacidad de unión de calcio similar por la pectina, que tiene una secuencia de poli-D-galacturonato. El orden de selectividad de cationes para pectinas es $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+}$. La CMC también puede unirse a cationes monovalentes y divalentes y las soluciones de CMC pueden gelificarse con la adición de ciertos cationes trivalentes (*Cellulose Gum*, Hercules, Inc., página 23 (1984)).

Sayce *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 3.969.290) describe un gel ambientador que comprende CMC y cationes trivalentes tales como cromo o aluminio.

Smith (Patente de Estados Unidos Nº 3.757.786) describe suturas quirúrgicas sintéticas hechas de sales metálicas insolubles en agua de éteres de celulosa.

Shimizu *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 4.024.073) describe hidrogeles que consisten en polímeros solubles en agua tales como dextrano y almidón quelado con cistina o lisina a través de cationes polivalentes.

Mason *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 4.121.719) describe hidrogeles de aluminio con CMC y goma arábiga usados como agentes de unión de fosfato en el tratamiento de la hiperfosfatemia.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.266.326 describe geles de alginato hechos insolubles mediante cloruro de calcio.

Un gel antiadherencias está hecho de ácido hialurónico iónicamente reticulado (Huang *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.532.211). La reticulación se genera mediante la inclusión de cationes polivalentes, tales como sales férricas, de aluminio o de cromo. El ácido hialurónico (ya sea de origen natural u obtenido por bioingeniería) es muy caro.

Por lo tanto, la técnica anterior no describe ni membranas ni geles que sirvan de forma ideal para la diversidad de usos quirúrgicos de la presente invención.

Pennell *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 5.156.839) describe soluciones de CMC que contienen pequeñas cantidades de PEO del alto peso molecular. En una realización, Pennell describe geles covalentemente reticulados usando dimetilolurea.

Por lo tanto, existen varios objetos de la presente invención.

Un primer objeto es proporcionar composiciones y medios para reducir la incidencia de la formación de adherencias durante y después de la cirugía. Esto incluye la prevención de la formación de adherencias *de novo* en cirugías primarias o secundarias.

Un objeto adicional es proporcionar medios para prevenir la reformación de adherencias después de un procedimiento secundario con la intención de eliminar las adherencias que se habían formado *de novo* después de un procedimiento primario.

ES 2 311 455 T3

Otro objeto es proporcionar composiciones antiadherencias económicas que permanezcan en el sitio quirúrgico durante las fases iniciales de cicatrización de heridas crítica.

5 Otro objeto más de la invención es proporcionar una membrana antiadherencias que puede hidratarse rápidamente de una forma controlada para formar un hidrogel intacto.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una membrana antiadherencias que tiene grados controlados de capacidad de biorresorción.

10 Un objeto adicional de la invención es proporcionar una membrana antiadherencias que tenga buenas características de manejo durante un procedimiento quirúrgico, sea adaptable a un tejido, flexible, resistente y fácil de moldear en superficies tisulares y posea una suficiente bioadhesividad para asegurar una colocación segura en el sitio quirúrgico hasta que se minimice la probabilidad de formación de adherencias.

15 Otro objeto más de la invención es proporcionar una membrana antiadherencias con las propiedades deseadas con fármacos incorporados en la membrana, de tal modo que el fármaco pueda administrarse localmente durante un periodo de tiempo en el sitio quirúrgico.

20 Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones de gel que tengan propiedades viscoelásticas, antiadherencias, facilidad de recubrimiento, adherencia tisular, antitrombogenicidad o capacidad de biorresorción mejoradas.

Un objeto adicional es proporcionar composiciones combinadas de membrana/gel con propiedades antiadherencias mejoradas.

25 Para lograr estos objetivos, en ciertas realizaciones de la presente invención se pueden controlar cuidadosamente las propiedades de las membranas antiadherencias regulando atentamente el pH, las cantidades de restos carboxilo y poliéter dentro del complejo de asociación de carboxipolisacárido/poliéter, para controlar atentamente el grado de asociación entre los polímeros. Mediante el control cuidadoso del grado de unión intermolecular y de la cantidad de poliéter, se pueden variar atentamente las propiedades físicas de las membranas y, por lo tanto, se pueden optimizar
30 las propiedades antiadherencias, bioadhesivas, de capacidad de biorresorción y antitrombogénicas de las membranas para lograr los resultados terapéuticos deseados.

En otras realizaciones de la invención, pueden usarse cationes multivalentes incluyendo Fe^{3+} , Al^{3+} y Ca^{2+} y/o policationes incluyendo polilisina, poliarginina y otros, para proporcionar una atracción intermolecular, proporcionando
35 de este modo geles que tengan una viscosidad aumentada.

Demasiada hidratación puede dar como resultado una transformación irreversible de la membrana en un “gel flácido” que no permanecerá en su lugar o que puede desintegrarse. Además, demasiada hinchazón puede generar una presión hidrostática demasiado grande que afectaría desfavorablemente a la función de tejidos y órganos. La
40 membrana debe ser fisiológicamente aceptable, blanda, tener el grado deseado de capacidad de biorresorción, tener el grado deseado de antitrombogenicidad y debe ser biológicamente inerte.

Sumario de la invención

45 La presente invención es como se proporciona en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un gel iónicamente reticulado biocompatible que comprende un poliácido (PA), un polímero no iónico que consiste en monómeros de óxido de alquileño y un catión multivalente.

50 El gel anterior es útil para inhibir adherencias post-quirúrgicas.

La presente invención también proporciona una membrana seca que comprende una composición como se ha definido anteriormente.

55 La generación de complejos en la forma de membranas con propiedades deseadas se lleva a cabo por variación del grado de enlace entre los polímeros. Esta variación en las propiedades se logra por variación del pH de la solución de moldeo (en lo sucesivo denominado como “el pH de la membrana”), los pesos moleculares de los polímeros, la composición en porcentaje de la mezcla de polímeros y/o el grado de sustitución (d. s.) por restos carboxilo dentro del CPS, y la presencia y concentración o concentraciones de cationes multivalentes y/o policationes. Se logra una
60 variación adicional en las propiedades de la membrana por acondicionamiento de las membranas después de su fabricación inicial. También son un aspecto de la invención las membranas multicapa, con diferentes capas seleccionadas para presentar diferentes propiedades.

65 Para abordar los problemas de las composiciones antiadherencias de la técnica anterior, se han descubierto nuevos geles antiadherencias basados en la formación de complejos de asociación entre poliácidos iónicamente asociados (“PA”) y óxidos de polialquileño hidrófilos (“PO”). Los PA de esta invención pueden prepararse con ácido poliacrílico, carboxipolisacáridos tales como CMC y otros poliácidos conocidos en la técnica. Pueden prepararse geles iónicamente reticulados de esta invención por mezcla de un poliácido y un poliéter juntos, en forma seca o en solución acuosa, y

después adición de una solución que contiene cationes para proporcionar la reticulación entre el PA, el PO y los cationes. En ciertas realizaciones, el pH de la mezcla puede ajustarse para proporcionar un grado de formación de complejos directamente entre el PA y el PO, dando como resultado de este modo una composición que puede asociarse tanto mediante enlaces de hidrógeno como mediante enlaces iónicos. Posteriormente, el pH y/o la osmolaridad de la composición pueden ajustarse para que sea fisiológicamente aceptable. Después, los geles pueden esterilizarse y almacenarse antes del uso.

Las membranas y geles de esta invención pueden usarse para inhibir la formación de adherencias post-quirúrgicas, para disminuir las consecuencias de la artritis y/o para proporcionar un lubricante para numerosos usos médicos y/o veterinarios.

Además, de acuerdo con algunos aspectos de la invención, pueden incluirse fármacos en las membranas o geles para administrar compuestos farmacológicos directamente en los tejidos.

En ciertas realizaciones, las composiciones pueden esterilizarse usando métodos térmicos, irradiación gamma y haces iónicos que pueden alterar las propiedades físicas y otras propiedades de los componentes. Como alternativa, en otras realizaciones de esta invención, los materiales pueden esterilizarse por filtración.

Los materiales son biocompatibles y se eliminan del cuerpo en un periodo de tiempo deseado que puede controlarse.

A diferencia de la técnica anterior, pueden prepararse composiciones antiadherencias que tengan las propiedades deseadas. Además, el acondicionamiento de las membranas antiadherencias después de su fabricación puede dar como resultado propiedades inesperadas que tengan ciertas ventajas deseables.

Mediante el uso tanto de composiciones de gel como de composiciones de membrana juntas en el mismo procedimiento de tratamiento, pueden conseguirse propiedades antiadherencias mejoradas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de una teoría de formación de complejos de asociación entre carboxipolisacáridos y poliéteres que da como resultado la formación de enlaces de hidrógeno a diferentes pH.

La Figura 2 muestra los resultados de estudios de valoraciones del pH de las soluciones preparadas para el moldeo de membranas que contienen CMC y óxido de polietileno (PEO).

La Figura 3 muestra el curso de tiempo de la hidratación o hinchazón de membranas de CMC/PEO preparadas a partir de soluciones de moldeo a diferentes pH, desde 2,0 hasta 4,31, a temperatura ambiente.

La Figura 4 muestra la hidratación o hinchazón de membranas de CMC/PEO en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4 a temperatura ambiente.

La Figura 5 muestra la solubilidad en PBS de membranas de diferente composición y pH.

La Figura 6 muestra los resultados de estudios de la acidificación de soluciones de PBS por membranas de CMC/PEO.

La Figura 7 muestra el efecto del cambio del peso molecular del PEO sobre la hidratación o hinchazón de membranas de CMC/PEO.

Las Figuras 8a-8b muestran el efecto de la variación del pH de soluciones de CMC/PEO de diferentes composiciones sobre la viscosidad de las soluciones.

Las Figuras 9a y 9b muestra el efecto del pH de la solución sobre la turbidez de una solución que contiene el 1,33% de sólidos totales y una proporción de CMC:PEO de 50:50, siendo el peso molecular del PEO de 4,4 Md (Figura 9a) o 500 kd (Figura 9b), medido usando un aparato de nefelometría.

La Figura 10 muestra el efecto del pH de la solución sobre la absorbancia del espectro completo (●) y turbidez por barrido hacia delante (Δ) de las soluciones descritas en las Figura 9, medidas usando un aparato de nefelometría.

Las Figuras 11a-11b muestran los efectos del pH sobre la proporción de hidratación de membranas de CMC/PEO: 77,5%/22,5%, PEO de 4,4 Md, 50%/50%, PEO de 4,4 Md y 50%/50%, PEO de 300 kd.

La Figura 11a muestra los resultados de un pH de desde aproximadamente 1,3 hasta aproximadamente 4,2.

La Figura 11b muestra los resultados del mismo estudio que en la Figura 11a pero desde un pH de 1,3 hasta aproximadamente 3.

ES 2 311 455 T3

La Figura 12 muestra la relación entre el pH de la solución y la solubilidad de membranas de CMC/PEO de las composiciones indicadas.

La Figura 13a muestra las relaciones entre el pH de la membrana y la bioadhesión para 3 membranas de CMC/PEO de las composiciones indicadas.

La Figura 13b muestra los datos promedio para las relaciones entre el pH y la bioadhesividad para membranas de CMC al 77,5%.

Las Figuras 14a-14b muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie y de una sección transversal de una membrana bicapa irradiada de CMC al 95%/PEO al 5% a pH 5; CMC al 60%/PEO al 40% a pH 3, respectivamente.

Las Figuras 15a-15b muestran imágenes de SEM de la superficie y de una sección transversal de una membrana irradiada de CMC al 60%/PEO al 40%, respectivamente.

Las Figuras 16a-16b muestran imágenes de SEM de la superficie y de una sección transversal de una membrana no irradiada de CMC al 95%/PEO al 5% a pH 5; CMC al 60%/PEO al 40% a pH 3, como en las Figuras 14a-14b.

Las Figuras 17a-17b muestran imágenes de SEM de la superficie y de una sección transversal de una membrana no irradiada de CMC al 60%/PEO al 40%, como en las Figuras 15a-15b.

Las Figuras 18a-18b muestran imágenes de SEM de la superficie y de una sección transversal de una membrana monocapa irradiada de CMC al 77,5%/PEO al 22,5%, respectivamente.

Las Figuras 19a-19b muestran imágenes de SEM de una membrana no irradiada, como en las Figuras 18a-18b.

Las Figuras 20a-20b muestran imágenes de SEM de la superficie y de una sección transversal de una membrana de CMC al 100%, respectivamente.

La Figura 21 representa la relación entre la proporción de CMC/PEO, el peso molecular del PEO y la composición de sólidos totales sobre la viscosidad de geles iónicamente reticulados de acuerdo con una realización de esta invención.

La Figura 22 representa las relaciones entre la proporción de CMC/PEO y la composición de sólidos en porcentaje y la viscosidad de geles iónicamente reticulados, de acuerdo con realizaciones de esta invención.

La Figura 23 representa la relación entre el porcentaje de asociación iónica de geles de CMC/PEO, la composición iónica y la viscosidad de geles autoclavados de realizaciones de esta invención.

La Figura 24 representa la relación entre el porcentaje de asociación iónica de geles de CMC/PEO, la composición iónica y la viscosidad de geles no autoclavados de realizaciones de esta invención.

Las Figuras 25a-25c representan los efectos de la irradiación γ sobre el peso molecular de componentes de CMC/PEO de esta invención.

La Figura 25a representa los efectos de la irradiación γ sobre membranas de CMC/PEO.

La Figura 25b representa los efectos de la irradiación γ sobre patrones de CMC y PEO.

La Figura 25c representa los efectos de la irradiación γ y del autoclavado sobre soluciones de moldeo de CMC y PEO.

Descripción detallada

Definiciones

Antes de describir la invención en detalle, se definen los siguientes términos como se usan en la presente memoria.

El término “adherencia” se refiere a uniones anormales entre tejidos y órganos que se forman después de un estímulo inflamatorio, tal como un traumatismo quirúrgico.

Las expresiones “prevención de adherencias” y “antiadherencias” se refieren a prevenir o inhibir la formación de cicatrices y bandas fibrosas postquirúrgicas entre tejidos traumatizados y entre tejidos traumatizados y no traumatizados.

ES 2 311 455 T3

Las expresiones “complejo de asociación” o “complejo intermacromolecular” se refieren a la red molecular formada entre polímeros que contienen CPS, poliácidos, PE, óxido de polialquileño y/o iones multivalentes, donde la red se reticula a través de enlaces de hidrógeno y/o iónicos.

5 El término “bioadhesivo” se refiere a que es capaz de adherirse a tejidos vivos.

La expresión “capacidad de biorresorción” se refiere a que es capaz de reabsorberse y eliminarse del cuerpo.

10 El término “biocompatible” se refiere a que es fisiológicamente aceptable para un tejido y un organismo vivo.

El término “carboximetilcelulosa” (“CMC”) se refiere a un polímero compuesto por unidades repetidas de celobiosa carboxilada, compuesta además por dos unidades de anhidroglucosa (restos de β -glucopiranosas) unidos por enlaces 1,4 glucosídicos. Las unidades de celobiosa están carboxiladas de forma variable.

15 El término “carboxipolisacárido” (“CPS”) se refiere a un polímero compuesto por unidades repetidas de uno o más monosacáridos y en el que al menos una de las unidades de monosacárido tiene un resto hidroxilo sustituido con un resto carboxilo.

20 La expresión “gel químico” se refiere a una red de gel compuesta por polímeros covalentemente reticulados.

La expresión “grado de sustitución” (“d. s.”) se refiere al número medio de restos carboxilo u otros restos aniónicos presentes por mol de celobiosa o de otro polímero.

25 El término “disectomía” se refiere a una operación quirúrgica por la que se retira un disco vertebral fracturado.

El término “endoscopio” se refiere a un dispositivo de fibra óptica para la observación detallada de tejidos dentro del cuerpo, tal como un laparoscopio o un artroscopio.

30 La expresión “tejido fibroso” se refiere a cicatrices o adherencias.

La expresión “pH del gel” se refiere al pH del gel o al pH de la solución de moldeo a partir del que se forma el gel o una forma parcialmente seca del gel.

35 La expresión “ácido hialurónico” (“HA”) se refiere a un polisacárido aniónico compuesto por unidades repetidas de disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. El HA es un componente natural de la matriz extracelular en el tejido conectivo.

40 El término “hidratación” (también “hinchazón”) se refiere al proceso de captación de un disolvente por una solución polimérica.

La expresión “proporción de hidratación” (también “proporción de hinchazón”) se refiere al peso húmedo de una membrana, esponja o microesfera hidratada menos el peso seco, dividido por el peso seco X 100%.

45 El término “hidrogel” se refiere a una red tridimensional de polímeros hidrófilos en los que está presente una gran cantidad de agua.

El término “laminectomía” se refiere a un procedimiento quirúrgico en el que se retiran una o más láminas vertebrales.

50 El término “laparoscopio” se refiere a un endoscopio de pequeño diámetro que se inserta a través de una herida punzante en el abdomen, usado para la visualización durante procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos.

La expresión “pH de la membrana” se refiere al pH de la solución de moldeo a partir de la que se prepara la membrana.

55 El término “mesotelio” se refiere al revestimiento epitelial de las cavidades pleural, pericárdica y peritoneal.

El término “peritoneo” se refiere al revestimiento de membrana serosa de la cavidad abdominal y que rodea a las vísceras.

60 Las expresiones “gel físico”, “red física” y “pseudogel” se refieren a redes poliméricas reticuladas de una forma no covalente en las que la asociación de polímeros en estos geles se caracteriza por interacciones cadena-cadena relativamente débiles y potencialmente reversibles, que pueden comprender enlaces de hidrógeno, asociación iónica, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, reticulación mediante segmentos cristalinos y/o formación de complejos con el disolvente.

65 El término “poliácido” se refiere a moléculas que comprenden subunidades que tienen grupos ácidos disociables.

La expresión “óxido de polialquileno” (“PO”) se refiere a polímeros no iónicos que comprenden monómeros de óxido de alquileno. Los ejemplos de óxidos de polialquileno incluyen óxido de polietileno (PEO), óxido de polipropileno (PPO) y polietilenglicol (PEG) o copolímeros de bloque que comprenden PO y/o PPO.

El término “policación” se refiere a un polímero que contiene múltiples restos cargados positivamente. Los ejemplos de policaciones incluyen polilisina, poliarginina y quitosana.

La expresión “polietilenglicol” (“PEG”) se refiere a un polímero de poliéter no iónico que está compuesto por monómeros de óxido de etileno y que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 daltons (“d”) a aproximadamente 5000 daltons.

La expresión “óxido de polietileno” (“PEO”) se refiere al polímero de poliéter no iónico compuesto por monómeros de óxido de etileno. El peso molecular del PEO que se usa en la presente memoria está entre 5.000 d y 8.000 kilodaltons (“kd”).

El término “sólidos”, usado con respecto a composiciones poliméricas, se refiere al contenido total de polímeros como un porcentaje en peso del peso total de la composición.

La expresión “proporción de sólidos” se refiere al porcentaje del contenido de polímero seco total como porcentaje en peso del contenido de sólidos totales.

La expresión “isquemia tisular” se refiere a la privación de flujo sanguíneo en tejidos vivos.

Descripción detallada de la invención

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren al uso de un complejo de asociación implantable, biorresorbible de (a) un poliácido, por ejemplo, un carboxipolisacárido (CPS), (b) un polímero no iónico constituido por monómeros de óxido de alquileno, por ejemplo, un poliéter (PE) o un polietilenglicol (PEG) y (c) un ión multivalente y/o policación, en la fabricación de un medicamento para el uso en la reducción de la formación de adherencias durante y después de una cirugía y/o de la cicatrización de heridas.

Generalmente pueden prepararse complejos en forma de membrana por mezcla de las cantidades y composiciones apropiadas de CPS y PE juntos en solución, acidificando después opcionalmente la solución hasta un pH deseado para formar un complejo de asociación acidificado y, después, si se desea, vertiendo la solución en una superficie plana adecuada y permitiendo que la mezcla se seque para formar una membrana a presión atmosférica reducida (>0,01 Torr) o normal (aproximadamente 760 Torr). El complejo de asociación se coloca entre tejidos que, durante la cicatrización de heridas, tenderían de otro modo a formar adherencias entre ellos. El complejo permanece en el sitio durante diferentes periodos de tiempo, dependiendo de su composición, método de fabricación y del acondicionamiento post-fabricación. Cuando los tejidos han cicatrizado sustancialmente, entonces el complejo se degrada y/o se disuelve y se elimina del cuerpo.

Membranas

Pueden prepararse membranas de acuerdo con la invención con los grados de rigidez deseados, diferentes índices de capacidad de biorresorción, diferentes grados de bioadhesión, diferentes grados de eficacia antiadherencias y diferentes grados de propiedades antitrombogénicas.

Formación de complejos de asociación

Aunque no se conoce completamente el mecanismo exacto de formación de complejos de asociación entre un CPS y un PE, una teoría es que pueden aparecer enlaces de hidrógeno entre los restos carboxilo del polisacárido y los átomos de oxígeno de éter del poliéter. Véase, Dieckman *et al.*, Industrial and Engineering Chemistry 45(10): 2287-2290 (1953). La Figura 1 ilustra esta teoría. El pH de la solución polimérica a partir de la que se moldea la membrana (la “solución de moldeo”) se valora cuidadosamente hasta un pH ácido por medio de un ácido adecuado. Los grupos carboxilo de polisacárido aniónico inicialmente neutros se convierten en grupos de ácido carboxílico libres protonados por la adición del ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico) en la solución de moldeo de polímeros mixta. Posteriormente, los restos carboxilo protonados pueden unirse electrostáticamente a los átomos de oxígeno de éter del poliéter, formando de este modo enlaces de hidrógeno, un tipo de interacción dipolo-dipolo.

La disminución del pH de la solución de moldeo aumenta el número de restos carboxilo protonados, que aumenta el número de posibles enlaces de hidrógeno con el poliéter. Esto aumenta la resistencia de la red polimérica y da como resultado una membrana más firme, de mayor duración, menos soluble y menos biorresorbible. Por otro lado, si la solución de moldeo tiene un pH próximo al neutro, los grupos carboxilo del carboxipolisacárido se cargan más negativamente y, por lo tanto, se repelen tanto entre sí como con los átomos de oxígeno de éter del PE, dando como resultado un gel débilmente unido por enlaces de hidrógeno con escasa o ninguna integridad estructural.

Con fines ilustrativos, pueden diferenciarse tres casos de dichas interacciones, como se muestran en la Figura 1. La Figura muestra una representación esquemática de la posible formación de complejos intermoleculares en la que

cuatro grupos carboximetilo de una cadena de carboxipolisacárido (CPS) se alinean frente a cuatro átomos de oxígeno de éter de una cadena de poliéter (PE). La Figura 1a muestra la situación que existiría a un pH de aproximadamente 7. A un pH neutro, los restos carboxilo se disocian, de tal modo que no se forma ningún complejo unido por enlaces de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de éter del PE y los grupos carboximetilo cargados negativamente del CPS. La Figura 1b muestra la situación que existiría a un pH de aproximadamente 2. A un pH reducido, la mayoría de los restos carboxilo están protonados, de tal modo que la mayoría están unidos por enlaces de hidrógeno a los átomos de oxígeno de éter del PE. La Figura 1c muestra la situación que existiría a un pH de aproximadamente 3-5. Al pK del CPS de aproximadamente 4,4, la mitad de los grupos carboxilo están protonados y, por lo tanto, están unidos por enlaces de hidrógeno a los átomos de oxígeno de éter del PE correspondientes. Dentro de esta región de PE intermedio, el grado de reticulación puede ajustarse cuidadosamente de acuerdo con la presente invención (Figura 2).

Las membranas preparadas de acuerdo con la Figura 1b son como las descritas por Smith *et al.*, (1968). Carecen de varias características clave de la membrana preventiva de adherencias ideal. Las membranas de pH reducido apenas se hidratan. Además, son ásperas al tacto, no flexibles y son poco solubles. Debido a que son insolubles, no se eliminarían del cuerpo en un periodo de tiempo suficientemente corto. Además, debido a la elevada acidez de la solución de moldeo, suministran una cantidad relativamente mayor de ácido al tejido en comparación con membranas de pH más neutro. Puede que los mecanismos fisiológicos tengan dificultad para neutralizar esta carga ácida antes de que se produzcan daños tisulares. Por lo tanto, tienen una escasa biocompatibilidad.

Al contrario que las membranas de la técnica anterior descritas anteriormente, la presente invención muestra membranas preventivas de la formación de adherencias que tienen, típicamente, un intervalo de pH intermedio, típicamente de entre aproximadamente 3 y 5, de tal modo que la cantidad de reticulación no es ni demasiado grande, que daría como resultado complejos que no se disolverían suficientemente rápido, ni demasiado escasa, que daría como resultado un complejo que se desintegraría demasiado rápidamente. Además, la variación del pH de las soluciones de moldeo varía las propiedades reológicas de la solución (Tabla 1) y varía las propiedades físicas de las membranas preparadas a partir de estas soluciones (Tabla 2).

El mecanismo anterior para la formación de complejos de asociación no es necesario para la invención. Los resultados de los estudios con CPS y PE describen la invención en su totalidad, sin dependencia de ninguna teoría en particular de la asociación entre los componentes.

Típicamente, dicho poliácido se selecciona de un carboxipolisacárido, ácido poliacrílico, ácido poliamino, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido polimetacrílico, ácido politereftálico, ácido polihidroxibutírico, ácido polifosfórico, ácido poliestirenosulfónico y copolímeros de dichos poliácidos.

Típicamente, dicho óxido de polialquileño se selecciona de óxido de polipropileno, polietilenglicol, óxido de polietileno y copolímeros de bloque de PEO/PPO.

La fabricación de membranas a partir de soluciones de moldeo de CPS/PE requiere sólo que la solución de CPS y PE pueda manejarse fácilmente. Soluciones diluidas (de hasta aproximadamente el 10% en peso/volumen) de CPS son fáciles de manejar y soluciones de aproximadamente el 2% de CPS son aún más fáciles de manejar. Soluciones de PEO de hasta aproximadamente el 20% (peso/volumen) son posibles de preparar y manejar y soluciones de aproximadamente el 1% en peso son fáciles de manejar.

Las membranas hechas de CMC y PEO juntos son más flexibles que las membranas hechas de CMC sola, que son duras y rígidas. Las membranas pueden manipularse en consecuencia durante la cirugía para adaptarse estrechamente a la forma necesaria para una adherencia estrecha a una diversidad de tejidos. Además, la inclusión de PEO en el complejo confiere propiedades antitrombogénicas que pueden ayudar a prevenir la formación de adherencias por disminución de la adherencia de proteínas sanguíneas y plaquetas a la membrana (M. Amiji, *Biomaterials*, 16: 593-599 (1995); Merrill, E. W., *PEO and Blood Contact in Polyethylene Glycol Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications*. Harris, J. M. (ed.), Plenum Press, NY, 1992; Chaikof *et al.*, *A. I. Ch. E. Journal* 36 (7): 994-1002 (1990)). Las membranas que contienen PEO pueden reducir el acceso de coágulos de fibrina a las superficies tisulares incluso más que una membrana que contiene CMC sola. El aumento de la flexibilidad de membranas de CMC/PEO sin comprometer la resistencia a la tracción mejora las características de manejo de la membrana durante la cirugía. El intervalo de peso molecular del poliéter que se usa en esta invención puede variar de aproximadamente 5 kd a aproximadamente 8000 kd. Poliéteres en el intervalo de 100 kd a 5000 kd funcionan bien y están fácilmente disponibles en el mercado.

El polietilenglicol (PEG) es un polímero similar al PEO excepto por que el número de unidades de monómero en el polímero generalmente es menor que para el PEO. El PM del PEG adecuado para esta invención está en el intervalo de aproximadamente 200 d a aproximadamente 5 kd, como alternativa, de aproximadamente 1000 d a 4000 d y, en otras realizaciones, de aproximadamente 2000 d.

Además de PEO, pueden incorporarse plastificantes tales como glicerol en las composiciones de esta invención. El glicerol y otros plastificantes pueden aumentar la flexibilidad de las membranas. Otros plastificantes distintos del glicerol incluyen etanolaminas, etilenglicol, 1,2,6-hexanotriol, monoacetina, diacetina y triacetina, 1,5-pentanodiol, polietilenglicol (PEG), propilenglicol y trimetilolpropano. El contenido de glicerol de la composición puede estar en el intervalo de más de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 30% en peso. En realizaciones alternativas, el

contenido del glicerol puede estar en el intervalo de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% y, en otras realizaciones más, en el intervalo de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 5%. A medida que aumentaba el porcentaje de glicerol en las películas, la película se hacía más plástica, teniendo una textura gomosa y era más blanda al tacto que las películas que no tenían glicerol. En un experimento, una película preparada con glicerol al 30% se colocó sobre la piel y se adhirió en un grado similar a una película de control que no tenía glicerol incorporado en la misma. La incorporación de glicerol mejora las características de manejo y puede proporcionar membranas que sean fáciles de enrollar y de aplicar, usando un dispositivo de inserción especialmente diseñado, en lo sucesivo denominado dispositivo "FilmsertTM". Se encuentra una descripción del dispositivo Filmsert en la solicitud de patente en trámite junto con la presente por Oppelt *et al.*, titulada "Laparoscopic Insertion and Deployment Device", US 6193731, presentada el 27 de octubre de 1998.

La variación de la proporción del polisacárido y del poliéter altera las propiedades viscoelásticas de las soluciones (Tablas 4 y 5) y produce diferentes grados de prevención de las adherencias y efectos antitrombogénicos. El aumento del porcentaje de CPS aumenta la bioadhesividad pero reduce el efecto antitrombogénico. Por otro lado, el aumento del porcentaje de PE aumenta el efecto antitrombogénico pero disminuye la bioadhesividad. El porcentaje de carboxipolisacárido con respecto a poliéter puede ser del 10% al 100% en peso, preferiblemente entre el 50% y el 90% y, más preferiblemente, debería ser del 90% al 95%. Por el contrario, el porcentaje de poliéter puede ser del 0% al 90%, preferiblemente del 5% al 50% y, más preferiblemente, debería ser de aproximadamente el 5% al 10%.

La fuerza de la asociación y, por lo tanto, las propiedades físicas del complejo de asociación entre el CPS y el PE, puede estar atentamente regulada. La disminución del pH del complejo de asociación aumenta la cantidad de reticulación mediante enlaces de hidrógeno. De forma similar, el aumento del grado de sustitución del carboxipolisacárido en la membrana aumenta la reticulación dentro del complejo de asociación a cualquier pH dado y, por lo tanto, disminuye la solubilidad y, de este modo, la capacidad de biorresorción del complejo. Generalmente, membranas preparadas a partir de soluciones poliméricas de pH reducido son más duras y más rígidas, se disuelven más lentamente y, por lo tanto, tienen tiempos de permanencia más largos en tejidos que las membranas preparadas a partir de soluciones con un pH mayor o de hidrogeles. Generalmente, las membranas poliméricas de pH reducido son útiles en situaciones en las que el periodo de formación de adherencias puede ser largo o en tejidos que cicatrizan lentamente. Dichas situaciones pueden aparecer en la recuperación de cirugías de ligamentos y tendones, tejidos que de una forma característica cicatrizan lentamente. Por lo tanto, una membrana de larga duración podría minimizar la formación de adherencias entre esos tejidos. Sin embargo, las membranas de pH reducido son ásperas al tacto, se agrietan fácilmente cuando se pliegan y tienden a romperse más fácilmente.

Por el contrario, las membranas preparadas a partir de soluciones con un pH mayor son más flexibles y más fáciles de usar que las membranas preparadas a partir de soluciones con un pH más bajo. Son más bioadhesivas y se biodegradan más rápidamente que las membranas preparadas a un pH más bajo y, por lo tanto, son más útiles cuando el periodo de formación de adherencias es corto. Estas membranas son suaves al tacto y son flexibles y capaces de plegarse sin tanto agrietamiento o rotura en comparación con las membranas preparadas a partir de soluciones con un pH reducido.

Típicamente, el pH del gel está en el intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 7,5. En otra realización, el pH de las composiciones de la presente invención puede estar entre 1 y 7, como alternativa, entre 2 y 7, en otras realizaciones entre 2,5 y 7, en otras realizaciones entre 3 y 7 y en otras realizaciones más, entre 3,5 y 6,0. Para ciertos usos, se desea un pH de aproximadamente 4,1 cuando existe un equilibrio deseable entre la bioadhesividad, las propiedades antiadherencias, los índices de capacidad de biorresorción y la biocompatibilidad para varios usos contemplados en la presente invención.

Bioadhesividad e hidratación

La bioadhesividad se define como la unión de macromoléculas a un tejido biológico. La bioadhesividad es importante en la prevención de adherencias quirúrgicas debido a que la barrera potencial no debe deslizarse fuera del sitio quirúrgico después de colocarse allí. Tanto la CMC como el PEO individualmente son bioadhesivos (por ejemplo, véase Bottenberg *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 457-464 (1991)). Como otros polímeros que se sabe que se hinchan cuando se exponen al agua, las membranas de CMC/PEO también son bioadhesivas.

La hidratación contribuye a la bioadhesividad de las membranas (Gurney *et al.*, *Biomaterials* 5: 336-340 (1984); Chen *et al.*, *Compositions Producing Adhesion Through Hydration, En: Adhesion in Biological Systems*, R. S. Manly (Ed.) Acad. Press NY (1970), Capítulo 10). Una razón posible para este fenómeno es que con una hidratación aumentada, quedan expuestas más cargas en la CMC y, por lo tanto, pueden hacerse disponibles para la unión a proteínas tisulares. Sin embargo, una hidratación excesiva es perjudicial para la bioadhesión. Por lo tanto, un medio de control de la bioadhesividad de membranas es controlar sus propiedades de hidratación.

Las membranas de la presente invención se hidratan fácilmente en una solución de PBS (Figura 3). Este comportamiento mimetiza el de las membranas colocadas en tejidos húmedos durante la cirugía o el tratamiento de lesiones. La hidratación de las membranas aumenta tanto el grosor de la barrera como su flexibilidad, permitiendo de este modo que se adapte a la forma de los tejidos que se van a separar durante el periodo durante el que pueden formarse las adherencias. Las proporciones de hidratación preferidas (% de aumento en masa debido a la absorción de agua) que proporcionan una prevención de las adherencias deseable son de aproximadamente el 100%-4000%, como alternativa

del 500%-4000%, en otras realizaciones, las proporciones son entre el 700%-3000% y, para otras realizaciones, una proporción de hidratación deseada para mitigar las adherencias es de aproximadamente el 2000% (Figura 4).

Además de disminuir el pH del complejo de asociación, puede lograrse una asociación intermacromolecular aumentada usando CPS con un grado aumentado de sustitución de carboxilo. Mediante el aumento de la densidad de restos carboxilo protonables en el CPS, existe una probabilidad creciente de formación de enlaces de hidrógeno incluso a un pH relativamente elevado. El grado de sustitución del CPS debe ser mayor que 0, es decir, debe haber algunos restos carboxilo disponibles para la formación de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, el límite superior es teóricamente 3 para derivados de celulosa, en los que para cada mol del sacárido, pueden existir 3 moles de restos carboxilo. Por lo tanto, en la aplicación más amplia de la invención que implica CPS como el poliácido, el d. s. es mayor de 0 y hasta 3 incluido. En otras realizaciones, el d. s. está entre 0,3 y 2. Un CPS con un d. s. entre 0,5 y 1,7 funciona bien y CPS con un d. s. de aproximadamente 0,65-1,45 funcionan bien y están disponibles en el mercado.

Biorresorción

Se pretende que los complejos de la presente invención tengan un tiempo de permanencia limitado en el cuerpo. Una vez colocados en un sitio quirúrgico o en una herida, o en el sitio de una inflamación, las membranas secas se hidratan rápidamente, convirtiéndose en una lámina de tipo gel, y están diseñadas para servir como una barrera durante un periodo de tiempo limitado. Una vez que sustancialmente ha tenido lugar la cicatrización, la barrera antiadherencias se desintegra de forma natural y los componentes se eliminan del cuerpo. Es deseable que el tiempo que lleva la eliminación del cuerpo para ciertas realizaciones no sea superior a 29 días, debido a una mayor regulación por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos de dispositivos destinados a permanecer dentro del cuerpo durante más de 30 días. Sin embargo, puede ser deseable proporcionar composiciones de mayor duración para ciertos usos a largo plazo.

No se conocen bien los mecanismos para la biorresorción de complejos de CMC/PEO. Sin embargo, una etapa temprana en el proceso de biorresorción es la solubilización de la red de CMC y PEO. Por lo tanto, el aumento de la solubilidad del complejo aumenta la facilidad de eliminación de los componentes del tejido (Figura 5). Cuando están solubles, la CMC y el PEO pueden difundir hacia el interior de la circulación y pueden ser transportados al hígado y a los riñones, donde pueden metabolizarse o eliminarse de otro modo del cuerpo. Además, la acción enzimática puede degradar hidratos de carbono. Es posible que enzimas contenidas en neutrófilos y otras células inflamatorias puedan degradar las redes poliméricas y aumentar, por lo tanto, la velocidad de eliminación de los componentes del cuerpo.

La degradación y la velocidad de solubilización y alteración de la membrana se manipula mediante un ajuste cuidadoso del pH durante la formación de los complejos de asociación, mediante la variación de la proporción de CPS/PE y mediante la selección del grado apropiado de sustitución del CPS y de los pesos moleculares del PE y del CPS. La disminución del peso molecular del CPS aumenta su solubilidad (Kulicke *et al.*, *Polymer* 37(13): 2723-2731 (1996)). La resistencia de la membrana puede adaptarse a la aplicación quirúrgica. Por ejemplo, ciertas aplicaciones quirúrgicas (por ejemplo, columna o tendones) pueden requerir una membrana más resistente y de mayor duración que otras (tales como aplicaciones intraperitoneales). La manipulación de las variables experimentales mencionadas anteriormente permite la fabricación y el uso de productos con tiempos de permanencia variables en el cuerpo.

Biocompatibilidad

La biocompatibilidad de complejos de CPS/PE de la presente invención puede estar en función de su acidez. Un complejo muy ácido aporta una carga ácida total relativamente mayor a un tejido que un complejo más neutro. Además, cuanto más rápidamente se disocian los iones de hidrógeno de un complejo, más rápidamente deberán compensar los mecanismos fisiológicos la carga ácida por tamponamiento, dilución y otros mecanismos. Para mimetizar el índice y la cantidad total de ácido cedida por una membrana *in vivo*, las membranas se colocan en soluciones de PBS y se mide el grado de acidificación del PBS. Además del pH de la membrana, la composición de la membrana también influye en la carga ácida suministrada al cuerpo. La Figura 6 y las Tablas 3 y 6 muestran los resultados de estudios diseñados para mimetizar el suministro de ácido por membranas a los tejidos.

Después de su fabricación, las membranas pueden modificarse para adaptarse a las necesidades particulares del usuario. Por ejemplo, membranas con una capacidad de biorresorción relativa pueden hacerse más insolubles por tratamiento con soluciones que contienen un ácido, ejemplificadas, pero sin limitación, por ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético o nítrico, el método "ácido".

Por el contrario, una membrana ácida relativamente no resorbible puede hacerse más biorresorbible y bioadhesiva por acondicionamiento con un álcali, tal como amoníaco (el método "alcalino") o con soluciones tamponadas tales como tampón fosfato (PB) o solución salina tamponada con fosfato (PBS; los métodos de "tampón"). Se prefiere una solución de PBS 10 mM a un pH de 7,4, debido a la biocompatibilidad de los tampones fosfato. Además, el pH de una membrana puede tamponarse sin eliminar las ventajas de las membranas preparadas a un pH más bajo. Por lo tanto, una membrana originalmente ácida se hidratará lentamente y tendrá un tiempo de permanencia relativamente largo incluso si su pH se eleva mediante un tratamiento con un álcali o tampón.

La Tabla 7 muestra los efectos del tratamiento con amoníaco sobre las propiedades de CMC/PEO. Una membrana original muy ácida (pH 2,03) acidificaba una solución de tampón de PBS originalmente a un pH de 7,40 por disminu-

ción de su pH hasta 4,33. Después de empapar esta membrana en la solución de PBS, se hidrató hasta 2,5 veces su peso seco original y, después de 4 días en PBS, esta membrana perdió aproximadamente el 29% de su masa original. En una membrana idéntica, la incubación durante 1 minuto en una solución de amoníaco 0,5 N neutralizaba sustancialmente la membrana, de tal modo que liberaba pocos iones de hidrógeno hacia la solución de tampón y el pH de la solución de PBS permanecía casi neutro (pH 7,29).

La Tabla 8 muestra los efectos del tratamiento con tampón fosfato sobre las propiedades de membranas de CMC/PEO. Las membranas tratadas con solución de tampón fosfato 50 mM durante periodos de tiempo progresivamente más largos tenían un pH cada vez más neutro, a juzgar por su liberación disminuida de ácido hacia una solución de PBS. De forma similar, el PBS (tampón fosfato 10 mM) neutralizaba el ácido en las membranas (Tabla 9). Por lo tanto, pueden prepararse membranas que sean fisiológicamente compatibles con tejidos, ya que debido a que se preparan a un pH original ácido que genera un complejo de asociación, las membranas conservan las propiedades deseadas del complejo original.

15 *Membranas multicapa*

Además, pueden prepararse membranas multicapa, por ejemplo, para incorporar una membrana interna de pH reducido, rodeada por una membrana externa preparada con un pH mayor. Esta composición permite la introducción de una membrana con estabilidad a largo plazo y bajo índice de capacidad de biorresorción de la membrana interna al tiempo que se minimizan los efectos secundarios de las membranas de pH reducido, tales como daños tisulares y la estimulación de respuestas inflamatorias. Además, el pH elevado de la porción externa es más bioadhesivo que las membranas de pH reducido, asegurando que dicha membrana permanece en el sitio más firmemente.

También pueden prepararse membranas multicapa que incluyen como una capa una membrana de CPS o PE puro. Dicha membrana podría tener las propiedades de flexibilidad, antiadherencias y solubilidad del lado que es una mezcla de CPS y PE, y tener la propiedad del material puro en el otro. Por ejemplo, la bioadhesividad es una propiedad del CPS y un lado de CPS puro tendría el mayor grado de bioadhesividad. Como alternativa, una membrana de PE puro tendría las propiedades antitrombogénicas más elevadas. Por lo tanto, puede prepararse una membrana que incorpore las propiedades deseadas de cada componente.

También pueden prepararse membranas multicapa en las que las dos capas tengan proporciones diferentes de CPS y PE. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una membrana bicapa que tiene CMC al 97,5%/PEO al 2,5% en un lado y una capa de CMC al 60%/PEO al 40% en el otro lado.

Las membranas de esta invención presentan varias propiedades deseables que incluyen, pero sin limitación, antiadherencias, bioadhesividad, antitrombogenicia y capacidad de biorresorción.

Las membranas de esta invención pueden ser flexibles y pueden insertarse a través de cánulas durante procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos.

Un descubrimiento inesperado de esta invención es que una mezcla de un poliéter, un poliacido y un agente reticulante iónico puede aumentar la viscosidad del gel por encima de la viscosidad predicha en base a las interacciones entre el poliéter y los iones reticulantes, el poliacido y el poliéter o el poliacido y los iones. Por lo tanto, las composiciones de esta invención proporcionan ventajas que no se encuentran en composiciones antiadherencias descritas anteriormente.

Ciertas realizaciones que tienen enlaces iónicos intermoleculares relativamente pequeños pueden resorberse más fácilmente que realizaciones que tienen más enlaces. Por lo tanto, el aumento de los enlaces intermoleculares puede aumentar el tiempo de permanencia de la composición en el cuerpo y, por lo tanto, puede permanecer en el sitio durante un periodo de tiempo más largo que composiciones que tienen grados menores de enlaces intermoleculares. A modo de ejemplo, mediante la selección de composiciones que proporcionan la mayor viscosidad (véase a continuación), el tiempo de permanencia puede ajustarse para proporcionar una vida útil deseada del efecto antiadherencias. Además, en ciertas otras realizaciones, las composiciones pueden secarse para formar una membrana que puede aumentar adicionalmente el tiempo de permanencia en un sitio tisular. Por lo tanto, mediante la selección de la composición química del gel y mediante la selección de la forma de la composición (por ejemplo, gel o membrana) puede lograrse una combinación de propiedades deseada para adaptarse a necesidades particulares.

Estructuras de gel

Los geles de esta invención se denominan “geles físicos”. La expresión de geles físicos se ha usado (de Gennes, P. G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca, NY. Cornell University Press, pág. 133, (1979)) para describir redes poliméricas reticuladas de forma no covalente. Los geles físicos se diferencian de los “geles químicos” que están covalentemente reticulados. Los geles físicos son relativamente débiles y tienen interacciones cadena-cadena potencialmente reversibles que pueden estar compuestas por enlaces de hidrógeno, asociación iónica, interacciones hidrófobas, formación de estereocomplejos, reticulación mediante segmentos cristalinos y/o formación de complejos con el disolvente.

Pueden prepararse geles iónicamente reticulados por mezcla de las cantidades y composiciones apropiadas de poliácidos, poliéteres y cationes reticulantes juntos en una solución. Además y, opcionalmente, la solución puede acidificarse para promover la reticulación de las moléculas de poliácido y de poliéter a través de enlaces de hidrógeno, como se describe para carboxipolisacáridos y poliéteres anteriormente y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 08/877.649, presentada el 17 de junio de 1997, actualmente Patente de Estados Unidos N° 5.906.997, expedida el 25 de mayo de 1999; Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/023.267, presentada el 23 de febrero de 1998, actualmente documento US 6017301; Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/023.097; y Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/252.147, 18 de febrero de 1999, actualmente documento US 6133325.

Los geles iónicamente reticulados pueden prepararse en forma de una membrana por vertido de la solución sobre una superficie plana adecuada, tal como una bandeja, y permitir que la mezcla se seque para formar una membrana a presión atmosférica reducida ($>0,01$ Torr) o normal (aproximadamente 760 Torr). Además, pueden prepararse esponjas y microesferas de materiales de gel. El complejo de asociación iónicamente reticulado puede colocarse entre tejidos que, durante la cicatrización de heridas, formarán adherencias entre ellos. Los complejos pueden permanecer en el sitio durante diferentes periodos de tiempo, dependiendo de su composición, método de fabricación y del acondicionamiento posterior a la fabricación. Cuando los tejidos hayan cicatrizado sustancialmente, entonces el complejo puede degradarse y/o disolverse y se elimina del cuerpo.

Pueden prepararse geles y membranas iónicamente reticulados de acuerdo con la invención con los grados deseados de viscosidad, rigidez, diferentes índices de capacidad de biorresorción, diferentes grados de bioadhesión, diferentes grados de eficacia antiadherencias y diferentes grados de propiedades antitrombogénicas.

Aunque no se conoce completamente el mecanismo exacto de reticulación iónica de la formación de complejos de asociación de poliácido/poliéter, una teoría es que se produce la unión o asociación iónica entre los restos ácidos del poliácido y los átomos de oxígeno de éter del poliéter. De acuerdo con esta teoría, pueden extenderse iones divalentes tales como calcio (Ca^{2+}), cobalto (Co^{++}), magnesio (Mg^{++}), manganeso (Mn^{++}) e iones trivalentes tales como hierro (Fe^{3+}) y aluminio (Al^{3+}) entre los restos ácidos del poliácido y los átomos de oxígeno de éter del poliéter y pueden atraerse hacia electrones de valencia con el ácido y los átomos de oxígeno, formando de este modo un enlace iónico. Debido a que los iones trivalentes tienen tres valencias, de acuerdo con esta teoría, los iones trivalentes pueden proporcionar enlaces iónicos más fuertes entre los polímeros de la solución. Además, puede producirse reticulación entre moléculas de poliácido adyacentes, atrapando de este modo moléculas de poliéter sin la necesidad de una asociación directa poliácido/poliéter a través de interacciones iónicas. La reticulación también puede lograrse mediante el uso de un polícatión tal como polilisina, poliarginina o quitosana. Sin embargo, esta invención no depende de ninguna teoría particular para funcionalidad.

Además, el ajuste del pH de la solución puede afectar al grado de unión iónica que puede aparecer entre restos ácidos sensibles al pH y los átomos de oxígeno de éter. Por ejemplo, si se usa un poliácido tal como CMC, a un pH menor, pueden disociarse menos restos carboxilo y pueden estar disponibles menos electrones de carboxilo para la unión iónica con átomos de oxígeno de poliéter. En estas situaciones, puede promoverse una unión iónica aumentada por aumento del pH de la solución.

Sin embargo, la reducción del pH puede aumentar el grado de enlaces de hidrógeno que pueden aparecer entre polímeros. Véase, Dieckman *et al.*, *Industrial and Engineering Chemistry* 45 (10): 2287-2290 (1953). Mediante la adición de ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico) a la solución de CPS, los grupos carboxilo del polisacárido aniónico inicialmente neutros se convierten en grupos de ácido carboxílico libres protonados. Posteriormente, los restos carboxilo protonados pueden unirse electrostáticamente con los átomos de oxígeno de éter del poliéter, formando de este modo enlaces de hidrógeno.

La disminución del pH de la solución polimérica puede aumentar el número de restos carboxilo protonados, que puede aumentar el número de posibles enlaces de hidrógeno con el poliéter. Esto puede aumentar la resistencia de la red polimérica y puede dar como resultado una composición más firme, más duradera, menos soluble y menos biorresorbible. Por otro lado, si la solución polimérica tiene un pH próximo al neutro, los grupos carboxilo en el carboxipolisacárido están cargados más negativamente y, por lo tanto, se repelen entre sí y con los átomos de oxígeno de éter del PE, dando como resultado un gel débilmente unido por enlaces de hidrógeno.

Por lo tanto, mediante la combinación del uso de la reticulación iónica y la formación de enlaces de hidrógeno, los geles de esta invención pueden fabricarse para que tengan las propiedades específicamente deseadas.

Los mecanismos anteriores para la formación de complejos de asociación iónicamente reticulados no son necesarios para la invención. La invención no depende de ninguna teoría particular de asociación entre los componentes.

Las composiciones iónicamente reticuladas de PA y PO solo requieren que las soluciones de PA y PO puedan manejarse fácilmente. Las soluciones diluidas (hasta aproximadamente el 10% en peso/volumen) de CPS son fáciles de manejar y las soluciones de aproximadamente el 2% de CPS son aún más fáciles de manejar. Es posible preparar y manejar soluciones de PEO de hasta aproximadamente el 20% (peso/volumen) y las soluciones de aproximadamente el 1% en peso son fáciles de manejar. Sin embargo, la concentración máxima puede aumentarse si se reduce el peso molecular del PE. A modo de ejemplo solamente, puede prepararse un PEG que tiene un peso molecular de apro-

ximadamente 1000 daltons en una concentración de aproximadamente el 50%. Una disminución adicional del peso molecular del PE puede permitir que se preparen y se manejen fácilmente concentraciones aún mayores.

5 Componentes de poliácido

El poliácido puede ser de cualquier clase biocompatible. A modo de ejemplo, un grupo de poliácidos útiles para la presente invención son carboxipolisacáridos (CPS) que incluyen carboximetilcelulosa (CMC), carboxietilcelulosa, quitina, carboximetilquitina, ácido hialurónico, alginato, pectina, carboximetildextrano, carboximetilquitosana y glicosaminoglicanos tales como heparina, sulfato de heparina y sulfato de condroitina. Además, pueden usarse ácidos poliurónicos tales como ácido polimanurónico, ácido poliglucurónico y ácido poligulurónico, así como alginato de propilenglicol. Además, son adecuados ácidos poliacrílicos, ácidos poliamino, ácido poliláctico, ácidos poliglicólicos, ácido polimetacrílico, ácido politereftálico, ácido polihidroxibutírico, ácido polifosfórico, ácido poliestirenosulfónico y otros poliácidos biocompatibles conocidos en la técnica. Dichos poliácidos se describen en *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, Park *et al.*, Ed., Technomic Publishing Company, Basel, Suiza (1993). Preferiblemente, se usa carboximetilcelulosa o carboxietilcelulosa. Más preferiblemente, se usa carboximetilcelulosa (CMC). El peso molecular del carboxipolisacárido puede variar de 10 kd a 10.000 kd. El CPS en el intervalo de 600 kd a 1000 kd funciona bien y el CPS de 700 kd funciona bien y es fácil de obtener en el mercado.

20 Componentes de óxido de polialquileno

De forma similar, pueden usarse muchos óxidos de polialquileno. Estos incluyen óxido de polipropileno (PPO), PEG y PEO y copolímeros de bloque de PEO y PPO tales como el Pluronics™ (una marca comercial de BASF Corporation, North Mount Olive, Nueva Jersey). El PO preferido de la presente invención es el óxido de polietileno (PEO), que tiene pesos moleculares de entre aproximadamente 5.000 Daltons (d) y aproximadamente 8.000 Kd. Además, son útiles polietilenglicoles (PEG) que tienen pesos moleculares entre aproximadamente 200 d y aproximadamente 5 kd.

La inclusión de un poliéter en el complejo confiere propiedades antitrombogénicas que ayudan a prevenir las adhesiones por disminución de la adherencia de proteínas sanguíneas y plaquetas en una composición (M. Amiji, *Biomaterials*, 16: 593-599 (1995); Merrill, E. W., *PEO and Blood Contact in Polyethylene Glycol Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications*. Harris, J. M. (ed.), Plenum Press, NY, 1992; Chaikof *et al.*, *A. I. Ch. E. Journal* 36(7): 994-1002 (1990)). Las composiciones que contienen PEO reducen el acceso de coágulos de fibrina a superficies tisulares incluso más que una composición que contiene CMC sola. Para realizaciones de la invención en las que los geles asociados con iones se secan para formar membranas, esponjas o microesferas, el aumento de la flexibilidad de las composiciones de CMC/PEO sin comprometer la resistencia a la tracción o la flexibilidad mejora las características de manejo de la composición durante la cirugía.

La inclusión de PE en los geles también puede aumentar la capacidad de extensión o recubrimiento del gel sobre tejidos biológicos. Mediante el aumento de la extensión, existe una probabilidad aumentada de que el gel pueda recubrir más eficazmente más cantidad del tejido y, por lo tanto, pueda disminuir la probabilidad de formación de adherencias en sitios distantes del tejido lesionado.

La variación de las proporciones y concentraciones del poliácido, el poliéter y los cationes multivalentes o policationes puede alterar las propiedades viscoelásticas de las soluciones y puede producir diferentes grados de bioadhesión, prevención de adherencias y efectos antitrombogénicos. El aumento del porcentaje de poliácido aumenta la bioadhesividad pero reduce el efecto antitrombogénico. Por otro lado, el aumento del porcentaje de PE aumenta el efecto antitrombogénico pero disminuye la bioadhesividad. La proporción en porcentaje de poliácido con respecto a PO puede ser de aproximadamente el 10% al 99% en peso, como alternativa entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 99% y, en otra realización, de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 99%. Por el contrario, cuando el PO es PE, el porcentaje de PE puede ser de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 90%, como alternativa de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 50% y, en otra realización, de aproximadamente el 1% al 10%. En otra realización, la cantidad de PE puede ser de aproximadamente el 2,5%.

55 Componentes iónicos

La fuerza de la asociación y, por lo tanto, las propiedades físicas del complejo de asociación entre el PA y el PO pueden regularse atentamente mediante la selección de cationes multivalentes apropiados. En ciertas realizaciones, puede ser deseable el uso de cationes seleccionados de los grupos 2, 8 ó 13 de la tabla periódica. El aumento de la concentración y/o valencia de cationes polivalentes puede aumentar la formación de enlaces iónicos. Por lo tanto, los iones trivalentes del grupo 3 de la tabla periódica, tales como Fe^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+} pueden proporcionar complejos de asociación reticulados iónicamente más firmemente que los iones del grupo 2, tales como Ca^{2+} , Cr^{3+} o Zn^{2+} . Sin embargo, pueden usarse otros cationes para reticular los polímeros de los geles de esta invención. Pueden usarse policationes tales como polilisina, poliarginina, quitosana o cualquier otro polímero biocompatible que contenga cargas netas positivas en condiciones acuosas.

ES 2 311 455 T3

Los aniones que acompañan a los cationes pueden ser de cualquier ión biocompatible. Típicamente, puede usarse cloruro (Cl), pero también PO_4^{2-} , HPO_3^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , boratos tales como $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ y muchos aniones comunes. Además, pueden usarse ciertos polianiones orgánicos. A modo de ejemplo, puede usarse citrato, oxalato y acetato. En ciertas realizaciones, puede ser deseable usar complejos de iones hidratados porque ciertas sales iónicas hidratadas pueden disolverse más fácilmente que las sales anhidras.

Además, la disminución del pH del complejo de asociación aumenta la cantidad de reticulación de hidrógeno. De forma similar, el aumento del grado de sustitución del carboxipolisacárido en el gel puede aumentar la reticulación en el interior del complejo de asociación a cualquier pH o concentración iónica dada. El pH de los geles puede estar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 7,5, como alternativa entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7,5 y, en otras realizaciones, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6.

Métodos para calcular el grado de asociación iónica de geles iónicamente reticulados

El grado de asociación iónica y de reticulación puede variarse por variación de la concentración del catión usado. Un método para comparar los cambios en la viscosidad de geles de esta invención es comparar la viscosidad medida de un gel en función de un grado calculado de asociación iónica. El grado de asociación iónica está relacionado con el grado de reticulación entre cadenas poliméricas en un gel reticulado. Un método para determinar la asociación iónica de un gel iónicamente reticulado puede calcularse de acuerdo con el siguiente método, ejemplificado para CMC. La CMC consiste en unidades repetidas de unidades de anhidroglucosa carboximetilada (denominadas en la presente memoria unidades "CMAG"). Se logra una asociación iónica del 100% cuando 3 unidades de CMAG se unen con un ión trivalente tal como Fe^{3+} . Teóricamente, el porcentaje de asociación iónica ("% IA") está relacionado con el número de moles de unión trivalente (" I^{3+} ") y el número de moles de la CMAG ("CMAG") de la forma siguiente:

$$\% \text{IA} = \frac{\text{Moles } \text{I}^{3+}}{\text{Moles CMAG}} \times 3 \times 100\% \quad (\text{Ecuación 1})$$

Por ejemplo, la cantidad de cloruro de hierro (FeCl_3) necesaria para producir una asociación iónica del 30% de una muestra de 500 ml de gel que contiene el 2% en peso/volumen de sólidos totales, proporción de CMC/PEO del 95%/5%, usando PEO con un peso molecular de 8.000 kd. La CMC tiene un grado de sustitución de 0,82. La cantidad de CMC se corrige por el contenido de agua presente en el material a granel (agua al 6%) y por el grado de sustitución. Un grado de sustitución de 0,82 indica que la CMC se fabricó con 8,2 grupos de carboximetilo por 10 unidades de anhidroglucosa. Por lo tanto,

$$\text{Moles CMAG} = \frac{9,5 \text{ g CMC (0,94)} \times 0,82}{242 \text{ g/mol CMAG}}$$

Por lo tanto, Moles CMAG = 0,0303.

Reorganización de la Ecuación 1 y resolución para el número de moles de hierro:

$$\begin{aligned} \text{Moles Fe} &= \frac{0,0303 \text{ mol CMAG} \times 30\% \text{ IA}}{3 \times 100\%} \\ &= 0,00303 \text{ mol} \end{aligned}$$

Por lo tanto, el volumen necesario de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 25,2% (peso/volumen) es:

$$\begin{aligned} &= \frac{0,00303 \text{ mol} \times 270,2 \text{ g/mol} \times 100 \text{ ml}}{25,2 \text{ g}} \\ &= 3,2 \text{ ml} \end{aligned}$$

La Tabla 1 muestra la comparación del porcentaje calculado de asociación iónica y la concentración iónica para cada ión enumerado para geles preparados con una proporción de CMC:PEO del 95:5 y un contenido de sólidos totales del 2%.

TABLA 1

Relación entre el porcentaje de asociación iónica con respecto a la concentración de iones

% asociación iónica	Fe mmol	Al mmol	Ca mmol
5	0,47	0,47	0,7
10	1,03	1,03	1,54
15	1,49	1,49	2,24
20	2,05	2,05	3,08
25	2,52	2,52	3,78
30	2,98	2,98	4,48
35	3,54	3,54	5,33
40	4,01	4,01	6,03
45	4,57	4,57	6,87
50	5,04	5,03	7,57
55	5,5	5,5	8,27
60	6,06	6,06	9,11
65	6,53	6,52	9,81
70	7,09	7,08	10,85
75	7,55	7,55	11,35
80	8,11	8,11	12,19
85	8,58	8,57	12,89
90	9,05	9,04	13,39
95	9,61	9,60	14,43
100	10,07	10,07	15,13

A modo de ejemplo, el aumento de la concentración de Fe^{3+} puede aumentar la viscosidad del gel. Sin embargo, este efecto tiene un máximo o una concentración de Fe^{3+} suficiente para producir un gel que tiene entre aproximadamente el 35% y aproximadamente el 50% de la reticulación máxima teórica en base a la disponibilidad de grupos carboxilo (véase el Ejemplo 31). Aumentos adicionales en la reticulación pueden disminuir la viscosidad medida (véanse las Figuras 23 y 24 a continuación). De forma similar, para geles que contienen sólidos al 1,33%, una proporción de CMC:PEO de 97:3 y con PEO de peso molecular de 8 kd, el Ca^{2+} y el Al^{3+} tienen una dependencia de concentración que tiene un máximo. Sin embargo, el máximo para el Ca^{2+} es sólo a aproximadamente el 5% de la reticulación teórica total y el Al^{3+} tiene un máximo a aproximadamente el 45% de la reticulación máxima teórica (Figura 23).

Los geles que tienen un % de sólidos elevado o grados elevados de reticulación, tales como los preparados usando cationes trivalentes en el intervalo de concentración que proporciona una asociación iónica máxima, pueden disolverse más lentamente que los geles preparados con una concentración iónica inferior y/o con iones que tienen números de valencia inferiores. Dichos geles pueden usarse ventajosamente durante la recuperación de cirugías de ligamentos y tendones, tejidos que de forma característica cicatrizan lentamente. Por lo tanto, una composición de larga duración podría minimizar la formación de adherencias entre esos tejidos.

Propiedades de composiciones de políacido y óxido de polialquileno iónicamente reticuladas

1. Tiempo de permanencia, viscosidad y composición de composiciones de políacido y óxido de polialquileno

Para que las composiciones iónicamente reticuladas de esta invención sean eficaces en la disminución de las adherencias, el material debería permanecer en el sitio durante un tiempo suficientemente largo para permitir que se produzca la reparación tisular al tiempo que se mantienen los tejidos separados. Los tejidos no necesitan cicatrizar completamente para reducir la incidencia de adherencias, sino que puede ser deseable que la composición permanezca

durante el periodo post-quirúrgico inmediato. El tiempo que una composición permanece en un sitio tisular puede depender de la capacidad de la composición para adherirse al tejido, una propiedad denominada "bioadhesividad".

La bioadhesividad se define como la unión de macromoléculas al tejido biológico. La bioadhesividad es importante en la prevención de adherencias quirúrgicas, porque la barrera potencial no debe deslizarse fuera del sitio quirúrgico después de colocarse allí. Tanto la CMC como el PEO individualmente son bioadhesivos (por ejemplo, véase Bottenberg *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 457-464 (1991)). Como otros polímeros que se sabe que se hinchan cuando se exponen a agua, los geles y membranas de CMC/PEO también son bioadhesivos.

La hidratación contribuye a la bioadhesividad (Gurney *et al.*, *Biomaterials* 5: 336-340 (1984); Chen *et al.*, *Compositions Producing Adhesion Through Hydration*, En: *Adhesion in Biological Systems*, R. S. Manly (Ed.) Acad. Press NY (1970) Capítulo 10). Una posible razón para este fenómeno podría ser que con una hidratación aumentada, se exponen más cargas en el políácido y, por lo tanto, pueden hacerse disponibles para unirse a proteínas tisulares. Sin embargo, una hidratación excesiva es perjudicial para la bioadhesión. Por lo tanto, un medio de controlar la bioadhesividad de composiciones y membranas de gel es controlar sus propiedades de hidratación.

La bioadhesividad puede depender de la viscosidad del gel y/o de la densidad de cargas. Un mecanismo posible podría ser que sitios cargados positivamente, introducidos a modo de cationes multivalentes o policationes, pueden interactuar con sitios cargados negativamente en los tejidos. Sin embargo, otros mecanismos pueden ser responsables del fenómeno, y la invención no se limita a ninguna teoría o mecanismo en particular. Los geles preparados de acuerdo con la invención tienen propiedades inesperadas que no se habían previsto en base a la técnica anterior. Se descubrió inesperadamente que la adición de cationes polivalentes a mezclas de políácidos y óxidos de polialquileño puede aumentar la viscosidad por encima de la esperada en base al políácido y al óxido de polialquileño en solitario. Además, se ha descubierto inesperadamente que la adición de poliéteres a mezclas de políácidos y cationes polivalentes aumenta la viscosidad por encima de la predicha en base al políácido y a los iones en solitario. Además, los resultados son inesperados en base a la falta de aumento en la viscosidad de soluciones de óxido de polialquileño con la adición de iones. Este sinergismo entre políácido/poliéter y cationes polivalentes puede proporcionar un intervalo más amplio de propiedades biofísicas de las composiciones que las que estaban previamente disponibles.

Además de modificar la concentración iónica y la valencia de los iones del complejo de asociación, puede lograrse una asociación intermolecular aumentada usando políácidos con números aumentados de restos ácidos. Mediante el aumento del número o de la densidad de restos ácidos en el políácido, existe una probabilidad creciente de formación de enlaces iónicos incluso a un pH relativamente bajo. El grado de sustitución ("d. s.") debe ser superior a 0, es decir, debe haber algunos restos ácidos disponibles para la formación de enlaces iónicos. Sin embargo, el límite superior es teóricamente 3 para derivados de celulosa con ácidos carboxílicos, donde para cada mol del sacárido pueden existir tres moles de restos carboxilo. Por lo tanto, en la aplicación más amplia de la invención para CPS, el d. s. es superior a 0 y hasta 3 incluido. Preferiblemente, el d. s. está entre 0,3 y 2. El CPS con d. s. de entre 0,5 y 1,7 funciona bien y los CPS con un d. s. de aproximadamente 0,65-1,45 funcionan bien y están disponibles en el mercado.

La viscosidad de un gel puede depender del peso molecular del PA. Con un peso molecular aumentado, puede haber más restos ácidos por mol de PA y, por lo tanto, más oportunidades de que aparezcan interacciones iónicas con otras moléculas en solución. Además, el peso molecular aumentado produce cadenas de PA más largas que pueden proporcionar mayores oportunidades para enmarañarse con polímeros cercanos. Esto puede conducir a una red polimérica más enmarañada. Por lo tanto, en las realizaciones en las que el políácido es un CPS, los pesos moleculares del carboxipolisacárido pueden variar de 10 kd a 10.000 kd. El CPS en el intervalo de 600 kd a 1000 kd funciona bien y el CPS de 700 kd funciona bien y puede obtenerse fácilmente en el mercado.

2. Resorción de composiciones de políácido y óxido de polialquileño iónicamente reticuladas

Se desea que los complejos de geles de la presente invención tengan un tiempo de permanencia en el cuerpo limitado. Una vez colocadas en un sitio quirúrgico, las composiciones están diseñadas para servir como barrera durante un periodo de tiempo limitado. Una vez que ha tenido lugar sustancialmente la cicatrización, la barrera antiadherencias se desintegra de forma natural y los componentes se eliminan del cuerpo.

La degradación y el índice de solubilización y alteración de las composiciones pueden manipularse mediante un ajuste cuidadoso de la composición y de la concentración iónica durante la formación de los complejos de asociación, por variación de la proporción de PA/PO y por selección del grado apropiado de sustitución del PA y de los pesos moleculares del PO y del PA. La disminución del peso molecular del CPS disminuye su solubilidad. (Kulicke *et al.*, *Polymer* 37 (13): 2723-2731 (1996)). La resistencia del gel o membrana pueden adaptarse a la aplicación quirúrgica. Por ejemplo, ciertas aplicaciones quirúrgicas (por ejemplo, columna o tendones) pueden requerir materiales más resistentes y duraderos que otras (tales como aplicaciones intraperitoneales). La manipulación de las variables experimentales mencionadas anteriormente permite la fabricación y el uso de productos con tiempos de permanencia variables en el cuerpo.

3. Esterilización de composiciones de políácido y óxido de polialquileño

Después de su fabricación, los geles y membranas de esta invención pueden envasarse y esterilizarse usando autoclavado con vapor, óxido de etileno, radiación γ , irradiación con haces de electrones u otros métodos biocompatibles.

El autoclavado puede llevarse a cabo usando cualquier temperatura, presión y tiempo adecuados. Por ejemplo, una temperatura de 250°F (121,11°C) durante 20 minutos es adecuada para muchas preparaciones. Para preparaciones que no deberían exponerse al vapor de agua en un autoclave, las composiciones, incluyendo membranas secas y/o esponjas pueden irradiarse con radiación gamma. En ciertas realizaciones, la intensidad de radiación está en el intervalo de aproximadamente 1 megaRad ("MRad") a aproximadamente 10 MRad, como alternativa, de aproximadamente 2 MRad a aproximadamente 7 MRad, en otras realizaciones de aproximadamente 2,5 MRad o, en otras realizaciones, de aproximadamente 5 MRad. La irradiación gamma puede realizarse usando, por ejemplo, un dispositivo de Steri-Genics, Corona, CA. Se observó que los procedimientos de esterilización pueden alterar las propiedades químicas y físicas de las composiciones y sus componentes individuales y, por lo tanto, pueden aumentar la biorresorción de las composiciones.

Incorporación de fármacos en composiciones

Pueden prepararse geles y membranas iónicamente reticulados que incorporen fármacos para administrarlos en el sitio quirúrgico. La incorporación de fármacos en membranas se describe en Schiraldi *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.713.24. La incorporación puede ser en la fase de fabricación o añadirse posteriormente pero antes de la inserción. Los fármacos que pueden inhibir la formación de adherencias incluyen agentes antitrombogénicos tales como heparina o activador del plasminógeno tisular, fármacos que sean antiinflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno, ketoprofeno u otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Además, pueden añadirse hormonas, citocinas, factores osteogénicos, factores quimiotácticos, proteínas y péptidos que contienen un motivo de arginina-glicina-aspartato ("RGD"), analgésicos o anestésicos a las composiciones, durante la fabricación o durante el acondicionamiento. Cualquier fármaco u otro agente que sea compatible con las composiciones y métodos de fabricación puede usarse con la presente invención.

Usos de composiciones de PA/PO

Los tipos de cirugía en los que pueden usarse las composiciones de membrana y/o gel de la presente invención no están limitados. Los ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen abdominales, oftálmicos, ortopédicos, gastro-intestinales, torácicos, craneales, cardiovasculares, ginecológicos, artroscópicos, urológicos, plásticos, musculoesqueléticos, ortorinolaringológicos y vertebrales.

Entre el 67% y el 93% de todas las laparotomías y laparoscopias dan como resultado la formación de adherencias. Los procedimientos abdominales específicos incluyen cirugías de los intestinos, apéndice, colestectomía, reparación de hernias, lisis de adherencias peritoneales, riñón, vejiga, uretra y próstata.

Los procedimientos ginecológicos incluyen cirugías para tratar la infertilidad debida a una enfermedad tubárica bilateral con adherencias unidas a ovarios, trompas de Falopio y fimbrias. Dichas cirugías incluyen salpingostomía, salpingolisis y ovariolisis. Además, las cirugías ginecológicas incluyen eliminación del endometrio, prevención de la formación de adherencias *de novo*, tratamiento de una gestación ectópica, miomectomía del útero o del fondo del útero e histerectomía.

Las cirugías musculoesqueléticas incluyen laminectomía lumbar, sacra, torácica y cervical, discectomía lumbar, sacra, torácica y cervical, cirugía de los tendones flexores, fusión vertebral y reemplazo o reparación de articulaciones y otros procedimientos vertebrales.

Las cirugías torácicas que implican esternotomía o toracotomía pueden ser peligrosas después de una cirugía primaria debido a la formación de adherencias entre el corazón o la aorta y el esternón. Las cirugías torácicas incluyen anastomosis de derivación y reemplazo de válvulas cardíacas.

Debido a que muchos procedimientos quirúrgicos craneales requieren más de un procedimiento, las adherencias que implican al cráneo, la duramadre, la corteza, las cavidades sinusales y la oreja pueden complicar los procedimientos secundarios.

Los usos quirúrgicos oculares incluyen cirugía de estrabismo, cirugía de filtración de glaucoma y procedimientos del sistema de drenaje lacrimal. Además, las composiciones de esta invención son útiles para la prevención de adhesiones *de novo* y la reformación de adherencias en sitios locales y en sitios distantes del sitio inmediato del procedimiento.

Además de los usos quirúrgicos, las composiciones de membrana y/o gel de esta invención pueden usarse fácilmente para reducir las adherencias y para promover la cicatrización después de lesiones traumáticas o de un proceso patológico en el que pueden formarse adhesiones y limitar de este modo la capacidad del tejido cicatrizado para funcionar adecuadamente. Los ejemplos de lesiones incluyen heridas punzantes, cortes y abrasiones. Los ejemplos de enfermedades incluyen artritis, abscesos y enfermedades autoinmunes.

Por ejemplo, la inyección de las composiciones de esta invención puede disminuir la gravedad de afecciones artríticas y de la inflamación articular. Además, los procedimientos artroscópicos pueden beneficiarse del uso de los geles de esta invención. En la artroscopia, el cirujano visualiza el interior de una articulación a través de un endoscopio de pequeño diámetro insertado en la articulación a través de una pequeña incisión. La articulación puede operarse a

ES 2 311 455 T3

través de incisiones similares usando sistemas endoscópicos de fibra óptica. Además, puede usarse la artroscopia de diagnóstico en las articulaciones temporomandibular, del hombro, del codo, de la muñeca, de los dedos, de la cadera y del tobillo. Los procedimientos quirúrgicos artroscópicos incluyen sinovectomía, condroplastia, eliminación de cuerpos sueltos y resección de tejido cicatricial o adherencias. Además, pueden inyectarse composiciones directamente en articulaciones para suplementación de líquido sinovial. Además, las composiciones de esta invención pueden usarse como lubricantes tisulares o para lubricar instrumentos quirúrgicos antes de o durante el uso.

Los usos adicionales para las composiciones de esta invención incluyen usos como lubricantes para la inserción de instrumentos médicos tales como catéteres y para disminuir los traumatismos causados por instrumentos y dispositivos médicos. Mediante el recubrimiento de la superficie del instrumento o dispositivo antes del uso, puede disminuirse la fricción del dispositivo contra los tejidos. La disminución del traumatismo puede disminuir la tendencia de los instrumentos médicos a promover la formación de adherencias indeseadas.

Métodos generales para el ensayo y la evaluación de membranas antiadherencias

A. Proporción de hidratación de las membranas

Para determinar la proporción de hidratación y la proporción de hidratación de las membranas, se colocaron trozos de membrana secas, preferiblemente de 160 mg, por separado en un vial de vidrio y se añadieron 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las membranas se hidratan, generando películas blandas de hidrogel. Después de un periodo de tiempo determinado (típicamente de 1 h a 5 días), cada una de las membranas hidratadas se retiró con cuidado del vial de ensayo y se colocó en una placa de petri de poliestireno. Se eliminó el exceso de agua usando una pipeta desechable y por secado de la membrana con un pañuelo de papel. Después se pesó cada membrana y se determinó la proporción de hidratación (% H) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{(\text{masa húmeda} - \text{masa seca})}{\text{masa seca}} \times 100\%$$

B. Solubilidad de las membranas

Para determinar la solubilidad de las membranas se midió la solubilidad relativa en agua y la estabilidad acuosa de las membranas en función de sus composiciones químicas. La solubilidad de la membrana en agua se correlaciona con el tiempo de resorción de las membranas *in vivo*.

Típicamente, el ensayo se realiza junto con las mediciones de hidratación explicadas anteriormente. Sin embargo, las membranas captan sal durante el ensayo de hidratación debido a la exposición al PBS. Esta sal añadida da como resultado un peso seco artificialmente elevado. Por lo tanto, después de determinar la proporción de hidratación, se empaparon las membranas en agua desionizada (30 ml durante 30 min) para eliminar la sal incorporada en la red polimérica. El agua se decantó y se añadió una alícuota recién preparada de 30 ml de agua desionizada. Las membranas se dejaron en remojo durante otros 30 min, se sacaron de las placas de petri, se transfirieron en seco y se colocaron en un horno de convección por gravedad a 50°C para secarlas.

El tiempo de secado dependía de la cantidad de agua absorbida por la membrana. llevaba hasta 24 horas secar membranas de tipo gel muy hidratadas, mientras que llevaba tan sólo unas pocas horas secar membranas parcialmente hidratadas. Después de que las membranas perdieran el exceso de agua, se dejó que las membranas se equilibraran a temperatura ambiente durante 1-2 horas antes de pesarlas. Las mediciones de peso se repitieron hasta que se obtuvo un peso constante. Típicamente, tenía lugar cierta rehidratación de la membrana durante este periodo debido a la absorción de humedad del aire.

Después del proceso de desalinización descrito anteriormente, las membranas se colocaron en placas de petri que contenían 30 ml de agua desionizada para hidratarlas durante periodos de 20 minutos a 5 días. Los estudios preliminares demostraron que las membranas a un pH dentro del intervalo de 6 e inferior no se disgregaban durante el periodo de desalinización de 1 hora.

La solubilidad (S) de las membranas se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% S = \frac{(\text{masa seca antes del empapado} - \text{masa seca después del empapado})}{\text{masa seca antes del empapado en PBS}} \times 100\%$$

La masa seca antes del empapado es la masa después de la desalinización y la masa seca después del empapado es la masa después del periodo de hidratación en agua.

C. Determinación de la carga ácida suministrada por las membranas

Este ensayo se realizó junto con los ensayos de hidratación y solubilidad descritos anteriormente. El ensayo proporciona indicios de la carga ácida que la membrana suministraría a un tejido cuando se colocase implantada en un

sujeto animal o humano. Después de la fabricación, las membranas se colocaron en una solución de PBS, el complejo liberaba protones de una forma dependiente del tiempo dando como resultado una disminución medible en el pH de la solución de PBS.

- 5 El ensayo de carga ácida se realizó usando un pHmetro Model 40 (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Se colocaron 160 mg de membrana seca en un vial de vidrio y se añadieron 20 ml de PBS. El pH inicial de la solución de PBS era de 7,40; el pH de esta solución se disminuyó gradualmente a medida que los polímeros en la membrana se disolvían parcialmente, exponiendo de este modo más restos carboxílicos protonados. En membranas muy hidratadas (pH 4-7) este proceso se aceleraba a medida que las cadenas poliméricas se separaban por las fuerzas hidrostáticas generadas durante el proceso de hidratación.

VI. Ejemplos

- 15 En los siguientes ejemplos, se describen membranas de carboxipolisacárido/poliéter y composiciones de gel iónicamente reticuladas para CMC como un carboxipolisacárido ejemplar y PEO es el poliéter ejemplar. Se entiende que pueden prepararse complejos de asociación de otros carboxipolisacáridos, otros poliácidos, poliéteres y otros óxidos de polialquileno y usarse de formas similares. Por lo tanto, la invención no se limita a estos ejemplos pero puede practicarse de cualquier forma equivalente sin alejarse de la invención.

20 Ejemplo 1

Membranas de CMC/PEO neutras (Ejemplo de referencia)

- 25 Se obtuvo carboximetilcelulosa sódica de tipo 7HF PH (PM de aproximadamente 700 kd; lote FP 10 12404) de Aqualon Division of Hercules (Wilmington, DE). Se obtuvo PEO con un PM de aproximadamente 900 kd de Union Carbide (Polyox WSR-1105 NF, lote D 061, Danbury CT); se obtuvo PEO con un PM de aproximadamente 1000 kd de RITA Corporation (PEO-3, lote 0360401, Woodstock, Illinois).

- 30 Se preparó una membrana con una composición de CMC a 65% y PEO al 35% de la forma siguiente: 6,5 g de CMC y 3,5 g de PEO se mezclaron en seco en un plato para pesar. Se usó una mezcladora de laboratorio Modelo 850 (Arrow Engineering, PA) para agitar 500 ml de agua desionizada en un agitador vorticial a aproximadamente 750 RPM. La mezcla seca de CMC y PEO se dispersó gradualmente en el agua agitada durante un periodo de tiempo de 2 min. A medida que la viscosidad de la solución polimérica aumentaba a medida que se disolvían los polímeros, la velocidad de agitación se disminuyó gradualmente. Después de aproximadamente 15 min, la velocidad de agitación se ajustó a entre 60-120 RPM y se continuó con la agitación durante aproximadamente 5 h para obtener una solución homogénea que contenía una concentración de polímeros total del 2% (p/p) sin ningún grumo visible.

- 40 En lugar de premezclar la CMC y el PEO, una forma alternativa de formular la solución de moldeo para las membranas es disolver individualmente los polímeros. El polímero aniónico, la CMC, puede acidificarse después por adición de la cantidad apropiada de HCl. Por ejemplo, un lote de 500 ml de CMC al 2% preparado por disolución de 10,0 g de CMC 7HF en 500 ml de agua desionizada se acidificó hasta un pH de 2,6 por adición de 2700 μ l de HCl concentrado ("solución A"). Por separado, se preparó un lote de PEO al 2% (p/v 900.000 PM, "solución B"). Después, las soluciones A y B se mezclan minuciosamente en una proporción específica usando el agitador de laboratorio del Ejemplo 1 a 60 RPM. La concentración de polímeros total se mantuvo al 2% (p/v) como en los Ejemplo 1-2.

- 45 Las membranas se moldearon a partir de soluciones por vertido de 20 g de solución en placas de petri de poliestireno circulares de 100 x 15 mm (Fisher Scientific, Santa Clara, CA.). Las placas de petri se colocaron en un horno de convección por gravedad de laboratorio ajustado a 40°-45°C y se dejaron secar durante una noche a aproximadamente 760 Torr. Las membranas resultantes se retiraron con cuidado de la superficie de poliestireno mediante el uso de una cuchilla Exacto.

- 50 Para membranas de mayor tamaño, se usaron placas de poliestireno de 243 x 243 x 18 mm (Fisher Scientific). El uso de la misma proporción de peso con respecto al área de superficie que para las membranas circulares (en este caso, se usaron 220 g de solución de moldeo) dio como resultado una membrana que tenía un peso seco de aproximadamente 4,5 g. La membrana parecía homogénea, suave y flexible. La colocación de 160 mg de esta membrana en 20 ml de una solución de PBS (pH 7,4) no modificó el pH de la solución. La resistencia a la tracción en seco y el % de alargamiento a rotura eran ligeramente superiores a los de las membranas correspondientes que se prepararon a partir de una solución de moldeo acidificada (Tabla 2). Cuando se colocaba en agua desionizada o PBS, la membrana presentaba una hinchazón excesiva y una pérdida de su estructura laminar rápidamente (en 10 minutos) para formar una sustancia de tipo gel que finalmente se dispersaba homogéneamente en una solución polimérica.

Ejemplo 2

Membranas e hidrogeles de CMC/PEO moderadamente acidificados (Ejemplo de referencia)

- 65 El procedimiento para preparar membranas acidificadas en la región de pH intermedia ($2,5 < \text{pH} < 7$) inicialmente sigue el procedimiento explicado en el Ejemplo 1. La solución polimérica mezclada neutra que contiene los polímeros especificados en el Ejemplo 1 se acidifica por adición de ácido clorhídrico concentrado (HCl, 37,9%, Fisher Scientific,

Santa Clara, CA) al tiempo que se agita la solución polimérica a 60-120 RPM durante 1 hora. Inicialmente, se forma un precipitado blanco en la solución; el precipitado desaparece gradualmente y se forma una solución estable. Típicamente, se descubrió que era útil una concentración de polímeros total del 2% para lograr la viscosidad deseada para soluciones de moldeo estables. Mayores concentraciones de polímero daban como resultado soluciones poliméricas que eran demasiado viscosas y demasiado difíciles de verter. Concentraciones de polímero inferiores requerían más solución de moldeo para el mismo peso de membrana, que aumentaba enormemente el tiempo de secado para membranas equivalentes. En los 500 ml de mezcla polimérica de CMC al 65%/PEO al 35% del Ejemplo 1, se necesitan 1500 μ l de HCl concentrado para lograr un pH de 3,1 en la solución de moldeo. La viscosidad de la solución polimérica de partida disminuía al menos el 50% mediante este proceso de acidificación.

Se muestran en la Figura 2 las curvas de valoración para diversas mezclas poliméricas (así como para CMC al 100% y PEO al 100%). La Figura 2 muestra la cantidad de HCl necesaria para preparar soluciones de moldeo de pH deseados dependiendo de la composición de la mezcla de CMC/PEO. Las membranas hechas de CMC al 100% (■) requieren más ácido que otras composiciones para acidificarse en el mismo grado. El aumento de la concentración de PEO (disminuyendo la concentración de CMC) disminuye la cantidad de ácido necesaria para acidificar una solución de moldeo hasta un punto deseado. El aumento de la concentración de PEO hasta el 20% tiene un efecto pequeño, independientemente de que el peso molecular del PEO sea de 200k (●) o 1000 kd (▲). El aumento de la concentración de PEO hasta el 40% (+) o hasta el 100% (□) disminuye adicionalmente la cantidad de ácido necesaria para lograr un pH deseado de la solución de moldeo.

A. Viscosidad de hidrogeles

Debido a que las propiedades antiadherencias de un hidrogel dependen de su viscosidad, se determinó la relación entre el pH de la solución de moldeo y la viscosidad del hidrogel. Se determinó la viscosidad de soluciones de PCS/PE a 22°C usando un viscosímetro Brookfield™. Usando métodos publicados en el folleto *Cellulose Gum*, Hercules, Inc., Wilmington, DE, (1986), página 28. En resumen, se selecciona la composición de la solución a ensayar y, consultando la Tabla XI de la página 29 de *Cellulose Gum*, se selecciona el número de eje y la velocidad de rotación del eje. Se realizan mediciones de viscosidad a las 2 h después de agitar la solución. Después de colocar el eje en contacto con la solución y de permitir que el eje gire durante 3 minutos, la medición de viscosidad se lee directamente en centipoise en un viscosímetro digital Brookfield (Model DV-II). Se estudiaron soluciones de CMC al 65%/PEO al 35% hechas con CMC 7HF PH y PEO de 1000 kd a un pH 7,5. Se preparó otra solución de CMC al 65%/PEO al 35% a un pH de 3,1.

TABLA 2

Efecto del pH de la solución de moldeo sobre la viscosidad del hidrogel

RPM	Viscosidad a pH 7,5, 22°C (centipoise)	Viscosidad a pH 3,1, 22°C (centipoise)
0,5	38.000	13.000
1,0	31.000	12.000
2,0	23.200	10.400
5,0	19.400	8.800
10	15.500	7.300

La Tabla 2 muestra el cambio en la viscosidad debido a la acidificación de soluciones de moldeo. La reducción del pH de 7,5 a 3,1 disminuye la viscosidad de la solución de moldeo en más de la mitad. Debido a que la viscosidad de un hidrogel está relacionada con su capacidad para prevenir adhesiones, posiblemente debido a su capacidad para permanecer en un sitio durante un periodo tiempo más largo, los geles de un pH más elevado tienen propiedades antiadherencias mayores. Además, también es posible caracterizar soluciones de moldeo por su viscosidad, así como por su pH. Por lo tanto, para situaciones en las que la medición del pH no es tan fácil o fiable, se prefieren mediciones de la viscosidad. Para preparar membranas, las soluciones de moldeo acidificadas que contienen el complejo de PE-CMC unido débilmente mediante enlaces de H intermoleculares se vertieron después en placas de poliestireno y se secaron de una forma similar a la que se describe en el Ejemplo 1. Después del secado, se determinaron las propiedades físicas.

B. Propiedades físicas de las membranas de CMC/PEO

Se midió la resistencia a la tracción y el alargamiento de membranas para trozos de membrana en forma de un “hueso de perro”, de 12,7 mm de anchura en su punto más estrecho. Después, las membranas se montan en un equipo de ensayo Instron™ provisto de una celda de una tonelada de carga. La velocidad de cruceta se ajusta a 5,0 mm/min. Se midió el grosor de la membrana, la resistencia a la tracción y la elasticidad (% de alargamiento de la membrana hasta el punto de rotura). Se describen los resultados para las muestras que eran insuficientes en la región de ensayo deseada. Las muestras que fallaron en el radio de la muestra o en las sujeciones se consideraban ensayos inapropiados y los resultados de esos ensayos se descartaban.

TABLA 3

Propiedades físicas de membranas de CMC/PEO

Composición de membrana	Grosor (mm)	Resistencia a tracción (psi)	% de alargamiento al punto de rotura
CMC al 65%/PEO al 35% (1000 kd) pH 3,1	0,081	6017	4,17
	0,076	5527	4,47
	0,076	5956	5,07
CMC al 65%/PEO al 35% (1000 kd) pH 7,5	0,071	10.568	6,69
	0,069	10.638	6,61
CMC al 65%/PEO al 35% (1000 kd) pH 3,1	0,084	3763	3,20

Todas las membranas tienen un grosor menor de 0,1 mm. La Tabla 3 muestra que la disminución del pH de la membrana desde el neutro disminuye la resistencia a la tracción y disminuye la elasticidad (% de alargamiento) al punto de rotura. De forma similar, la disminución de la concentración de PEO disminuye la resistencia a la tracción y la elasticidad de las membranas.

C. Hidratación de membranas de CMC/PEO en PBS

Para evaluar las propiedades bioadhesivas de las membranas se determinaron las propiedades de proporción y grado de hidratación de membranas de CMC/PEO de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

La Figura 3 muestra el curso de tiempo de hidratación de membrana de CMC/PEO de la presente invención. Una membrana hecha de CMC al 80%/PEO al 20% (p. m. 900 kd), a un pH de 4,31 se hidrataba rápidamente (●). Después de 2 h en PBS, su proporción de hidratación (peso húmedo - peso seco)/peso seco; % de hinchazón aumentaba en más del 6000%. Después de 5 h en PBS, la proporción de hidratación de esta membrana era próxima al 8000%. Esta membrana altamente hidratada perdía su cohesividad y se disgregaba sustancialmente a partir de entonces. La reducción del pH de la membrana hasta 3,83 e inferior daba como resultado membranas que se hidrataban casi hasta sus puntos de equilibrio en 2 h y mantenían su grado de hidratación y cohesividad durante al menos 40 h. El grado de hidratación dependía del pH de la membrana, siendo las membranas menos ácidas capaces de hincharse hasta un grado superior. A un pH de 3,83 (▲), la membrana tenía una proporción de hidratación próxima al 6000%, mientras que a un pH de 2,0 (□), la proporción de hidratación era inferior al 300%. Dentro del intervalo de pH de 3,2 a 4,3, el grado de hidratación es muy sensible al pH.

La Figura 4 muestra un resumen de otro estudio del efecto de la composición de membrana y del pH sobre la hidratación de membranas de CMC/PEO. La hidratación se midió después de al menos 6 h en PBS, un tiempo después de que el grado de hidratación hubiera casi alcanzado el equilibrio para cada membrana (véase la Figura 3). Para cada una de las composiciones estudiadas, el aumento del pH de la membrana aumentaba la hidratación de la membrana. Membranas de CMC al 100% (■) aumentaban en sus proporciones de hidratación desde aproximadamente el 100% en una membrana de pH 1,7 hasta más del 1300% en una membrana de pH 3,4. Para membranas hechas de CMC al 80%/PEO al 20%, el peso molecular del PEO tenía un efecto ligero sobre la hidratación. Membranas preparadas con PEO de 900 kd (▲) se hidrataban ligeramente más a un pH dado que las membranas preparadas con PEO 200 kd (●). Además, membranas preparadas con CMC de un grado de sustitución superior (d. s. = 1,2; ⊕) se hidrataban de forma similar a las de CMC al 100% con un grado de sustitución de 0,84 (■). Por último, las membranas que se preparaban con CMC al 50%/PEO al 50% (900 kd) se hidrataban menos que cualquier otra membrana, excepto a un pH de membrana reducido (< 2,5).

D. Solubilidad de membranas de CMC/PEO

Debido a que la biodegradación de polímeros de CPS/PE está relacionada con la solubilidad, se midió la solubilidad de membranas después de al menos 4 días en PBS de acuerdo con métodos descritos anteriormente. La Figura 5 muestra los efectos del pH y la composición de membrana sobre la solubilidad de membranas en solución de PBS. Se prepararon membranas de diferentes composiciones de CMC/PEO y a diferentes pH de membrana. Para todas las membranas, a medida que aumentaba el pH de membrana, aumentaba la solubilidad en PBS. Las membranas de CMC al 100% (■) eran las menos solubles. Las membranas que contenían PEO eran más solubles, siendo menos solubles las membranas hechas de PEO de 900 kd (▲) que las membranas de PEO de 200 kd (●). Aumentando adicionalmente el porcentaje de PEO hasta el 50% (+) aumentaba adicionalmente la solubilidad de la membrana. La disminución del peso molecular de la CMC (7MF; *) aumentaba la solubilidad. Además, el aumento del grado de sustitución de la CMC desde 0,84 hasta 1,2 (⊕) daba como resultado membranas aún más solubles. Además, con el mayor grado de sustitución, había un mayor efecto del pH sobre la solubilidad de membrana. Para las otras membranas, el efecto del aumento del pH parecía ser de una magnitud similar independientemente de la composición de la membrana. Por lo tanto, las pendientes de las líneas eran similares. Estos resultados indican que, independientemente de la composición de membrana, la solubilidad de membranas puede aumentarse mediante el aumento del pH de la membrana. Además, debido a que la resorción requiere solubilización, las membranas más altamente solubles se eliminarán del cuerpo más rápidamente que las membranas menos solubles.

E. Biocompatibilidad de membranas de CMC/PEO

Debido a que la biocompatibilidad está relacionada con la carga ácida suministrada a un tejido, se determinó la carga ácida suministrada por membranas de CMC/PEO a una solución de PBS, como se ha descrito anteriormente como un modelo *in vitro* adecuado. Se determinó primero el curso de tiempo de la acidificación de soluciones de PBS expuestas a diferentes composiciones de membranas de CMC/PEO.

TABLA 4

Curso de tiempo de la acidificación de PBS por membranas de CMC/PEO

Composición de membrana	pH de la solución de moldeado	Tiempo en solución de PBS (h)				45h PBS Cambio de pH
		1	3,5	21	45	
CMC al 80%/PEO al 20% (900 kd)	1,85	6,26	5,62	4,78	4,64	2,76
	3,17	6,53	5,71	5,61	5,65	1,75
CMC al 50%/PEO al 50% (900 kd)	1,77	6,60	6,12	5,62	5,42	1,98
	2,71	6,47	6,13	6,01	5,98	1,42
CMC al 80%/PEO al 20% (8 kd)	1,82	3,71	3,39	3,52	3,45	3,95

La Tabla 4 muestra la cinética de acidificación de una solución de PBS por membranas de CMC/PEO de la presente invención. Cuando se añadían a una solución de PBS, las membranas liberaban ácido a la solución disminuyendo de este modo el pH de la solución. Este proceso se producía lentamente, con una reducción del pH de la solución de aproximadamente 1 unidad de pH en la primera hora para membranas que incluían las que combinan PEO de alto peso molecular. Esto es cierto para membranas que se moldean a partir de soluciones poliméricas de pH reducido, así como para las que se moldean a partir de soluciones poliméricas de un pH superior. La reducción restante en el pH se producía durante las siguientes 20 h, momento en el que el pH de la solución permanecía aproximadamente constante. A las 45 h en la solución de PBS, los pH habían disminuido hasta por debajo de 6,0.

Además, a medida que disminuía el peso molecular del PEO, el pH de la solución disminuía más rápidamente y en un grado superior que en membranas hechas de PEO de alto peso molecular. Este descubrimiento puede deberse a una capacidad del PEO de mayor peso molecular de proteger los restos carboxilo ácidos de la CMC, disminuyendo de este modo la disociación de los iones de hidrógeno de carboxilo.

Estos resultados sugieren que el PEO de alto peso molecular actúa disminuyendo la liberación de ácido a los tejidos y, por lo tanto, los protege de una acidificación excesiva. Además, como se liberan protones *in vivo*, se diluirán en los espacios extracelulares, se tamponarán mediante tampones fisiológicos y, en última instancia, se eliminarán

del tejido mediante los sistemas linfático y circulatorio. Durante el tiempo relativamente largo durante el que se liberan los protones, los mecanismos de dilución fisiológica, tamponamiento y eliminación eliminarán la carga ácida, manteniendo el pH en el tejido dentro de intervalos aceptables. Por lo tanto, estas membranas son adecuadas para su implantación *in vivo* sin causar una alteración tisular excesiva debido a la gran carga ácida que se suministra.

La Figura 6 muestra los resultados de estudios en los que el pH de la solución de PBS varía en función del pH de la membrana y de la composición de la membrana. Las membranas se colocan en una solución de PBS durante 4-5 días, momento en el que la acidificación ha alcanzado el equilibrio (Tabla 4). La composición de membrana que dio como resultado la menor acidificación fueron las membranas previamente acondicionadas de 80/20/300 k (○). Estas membranas se prepararon como se ha descrito anteriormente, excepto por una etapa adicional de empapado de las membranas en PBS y después nuevo secado de las mismas (véanse los Ejemplos 7-9). Las membranas de 80/20/200k moldeadas en PBS (+) suministraban la siguiente menor carga ácida y la serie de membranas de CMC/PEO 50/50 (900 k) (Δ) suministraban la tercera menor carga ácida a la solución de PBS. Membranas hechas de CMC al 100% (■), 80/20/200k (●) y las de 80/20/900K (▲) suministraban progresivamente más ácido al PBS y la serie de membranas de 80/20/300k preparadas con CMC con un grado de sustitución de 1,12 suministraban la mayor carga ácida a la solución de PBS.

La Figura 6 también muestra que el acondicionamiento de membranas por empapado de las mismas en PBS disminuía la carga ácida suministrada a la solución de PBS. Por ejemplo, una membrana previamente acondicionada moldeada a un pH original de 3,4 reducía el pH de la solución de PBS solamente hasta 7,0 desde 7,4. Por lo tanto, para las aplicaciones en las que es necesaria una membrana de larga duración, pero una que cause la menor acidificación, es deseable el acondicionamiento previo de una membrana ácida en PBS.

Ejemplo 3

Membranas con diferentes proporciones de PEO/CMC (Ejemplo de Referencia)

Se obtuvo un lote de 500 ml de una membrana de CMC/PEO 80/20 por disolución de 8,0 g de CMC y 2,0 g de PEO en 500 ml de agua desionizada (la fuente de CMC y PEO y los procesos de solución eran como en el Ejemplo 1). Mientras se agitaba a baja velocidad (60 RMP), se acidificaron 200 g de esta solución polimérica con 1500 μl de HCl 5 N (LabChem, Pittsburgh, PA), dando como resultado un pH de equilibrio de 3,17. La solución polimérica acidificada se vertió después en placas de poliestireno y se secó de una forma similar a como se ha descrito en el Ejemplo 1. Mediante el cambio de las cantidades relativas de CMC y PEO, se obtuvieron membranas con diferentes composiciones. Las membranas de CMC al 100% eran más quebradizas y menos flexibles que las membranas que contenían PEO. Para nuestros fines, generalmente no eran preferibles membranas que contuvieran más del 70% de PEO, puesto que estas membranas eran inestables en un entorno acuoso.

La Tabla 5 muestra el efecto de la proporción de CMC/PEO sobre la viscosidad de la solución. Se prepararon membranas con diferentes porcentajes de PEO (p. m.: 1.000.000) a dos pH diferentes. Las soluciones que contenían mayores proporciones de CMC eran más viscosas que las soluciones que contenían menos CMC. Además, las soluciones menos ácidas tenían una viscosidad mayor que las soluciones con mayor acidez. Esta relación se mantenía para todas las soluciones excepto para la solución de CMC al 100%. A un pH 2,6, la viscosidad era ligeramente superior que a un pH de 4,0. Esto era posiblemente debido a la asociación entre las moléculas de CMC a un pH inferior.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 5

Viscosidad de soluciones con diferentes proporciones de CMC/PEO (cps, a eje n° 6, 20°C)

		RPM del eje				
Composición de membrana (PEO de 1000 kd) (%) CMC/%PEO; pH)		0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
25/75	4,0	8000	7000	4800	4400	3700
	2,6	3200	3000	2800	2400	2000
33/66	4,0	8000	7000	6800	6200	5100
	2,6	—	3000	3200	2800	2500
50/50	4,0	16.000	15.000	12.800	10.600	8400
	2,6	4000	5000	4800	4200	3500
66/33	4,0	28.000	25.000	20.400	16.000	12.300
	2,6	8000	7000	6400	5800	4900
CMC al 100%	4,0	72.000	61.000	42.800	31.600	28.700
	2,6	88.000	67.000	42.400	29.400	20.400
PEO al 100% (900 kd) 2,6		480	300	280	290	290

Se obtuvieron disminuciones de la viscosidad mayores de las esperadas cuando se mezclaron las dos soluciones. Por ejemplo, se logró una pérdida de viscosidad del 85% cuando se mezclaron las soluciones A (pH 2,6) y B en una proporción de 50/50. A una RPM del eje de 2,5, la concentración de partida de CMC al 2% (p/v), una solución de pH 2,6, tenía una viscosidad de 42.400 cps, la solución de PEO al 2% tenía una viscosidad de 280 cps. Por lo tanto, si la viscosidad de una mezcla es la media de las viscosidades de los componentes, se esperaría que una solución de CMC/PEO 50/50 tuviera una viscosidad de $(42400 + 280)/2 = 21300$ cps (aproximadamente una disminución de la viscosidad del 50% respecto a la de la CMC sola). Sin embargo, las soluciones de CMC/PEO (50/50) reales tienen una viscosidad de sólo 4.800 CPS. Se describió una disminución similar mayor de la esperada en la viscosidad por Ohno *et al.* (*Makromol. Chem., Rapid Commun.* 2, 511-515, 1981) para PEO mezclado con dextrano e inulina.

Se muestran pruebas adicionales para la formación de complejos intermoleculares entre la CMC y el PEO por comparación de las disminuciones relativas en las viscosidades causadas por acidificación para la CMC al 100% y las mezclas de CMC/PEO. La Tabla 5 muestra a 2,5 rpm que la viscosidad de la solución de CMC permanecía esencialmente invariable cuando el pH se disminuía de 4,0 a 2,6. Sin embargo, para mezclas de CMC/PEO, la acidificación causaba una disminución grande en la viscosidad. Las disminuciones eran del 69%, 63%, 53% y 42% para mezclas de CMC/PEO del 66%/33%, 50%/50%, 33%/66% y 25%/75%, respectivamente.

Por lo tanto, existe una asociación intermolecular entre la CMC y el PEO que se teoriza da como resultado que las moléculas de PEO se intercalen entre las moléculas de CMC, impidiendo de este modo la formación de enlaces intermoleculares entre las moléculas de CMC. Dicha teoría podría explicar las observaciones, pero no se pretende limitar la presente invención a una sola teoría de interacción molecular. Otras teorías pueden explicar las observaciones.

A continuación, después de la fabricación de membranas con diferentes proporciones de CMC/PEO, se estudió sus propiedades de hidratación, carga ácida y solubilidad usando métodos descritos anteriormente.

TABLA 6

Efecto de la proporción de CMC/PEO sobre la hidratación, la carga ácida y la solubilidad

Composición de membrana (% CMC 7HF/% PEO de 900 kd)	pH de membrana	Proporción de hidratación (%)	Carga ácida (pH de PBS)	Solubilidad (% pérdida de masa)
CMC al 100%	2,52	1145	3,46	9,7
66/33	2,87	2477	3,80	30
50/50	2,94	3077	4,58	34
33/66	2,98	(disuelta)	5,88	(disuelta)

La Tabla 6 muestra el efecto del aumento de la concentración de PEO en membranas de CMC-PEO sobre el % de captación de agua, la acidez y la pérdida de masa. El aumento del contenido de PEO de membranas aumenta la proporción de hidratación y la solubilidad y disminuye la carga ácida suministrada al PBS. Estos resultados indican que a medida que disminuye la cantidad total de CMC en la membrana, disminuye la carga ácida.

El efecto de proporciones de CMC/PEO diferentes se demuestra adicionalmente en la Figura 5 (solubilidad frente a pH de membrana) y en la Figura 6 (acidez de membrana frente a pH de solución de PBS).

Ejemplo 4

Membranas de PEO de diferente peso molecular (Ejemplo de referencia)

Se prepararon membranas de PEO de diferente peso molecular por mezcla de soluciones de PEO al 2% (p/v) con soluciones de CMC al 2% (p/v) (tipo 7HF PH (lote FP 10 12404) obtenidas de Aqualon Division of Hercules (Wilmington, DE). Se obtuvo PEO con un peso molecular de 8000 (8K) como Polyglycol E8000NF de Dow Chemical, Midlans, Michigan. Los PEO con pesos moleculares de 300.000 (300K), 900.000 (900K) y 5.000.000 (5M) eran todos de Union Carbide. Se prepararon soluciones de PEO al 2% (p/v) por disolución de 6,0 g de PEO en 300 ml de agua desionizada de acuerdo con los métodos usados en el Ejemplo 1. La solución madre de CMC se preparó de forma similar por disolución de 10,0 g de CMC en 500 ml de agua desionizada. La solución madre de CMC se acidificó por adición de 2100 μ l de HCl concentrado para disminuir el pH de la solución de moldeo hasta 3,37.

Se preparó una membrana de CMC al 50%/PEO al 50% (8K) por mezcla de 40,07 g de la solución madre de CMC con 40,06 g de la solución madre de PEO (8K). La solución de moldeo se acidificó hasta un pH de 3,46. Se preparó una membrana de CMC al 50%/PEO al 50% (300K) por mezcla de 39,99 g de la solución madre de CMC con 40,31 g de la solución madre de PEO (300K) y adición de HCl suficiente para disminuir el pH hasta 3,45. Se preparó una membrana de CMC al 50%/PEO al 50% (900K) por mezcla de 39,22 g de la solución madre de CMC con 39,63 g de la solución madre de PEO (900K) y adición de suficiente HCl para disminuir el pH hasta 3,56. Se preparó una membrana de CMC al 50%/PEO al 50% (5M) por mezcla de 38,61 g de la solución madre de CMC con 40,00 g de la solución madre de PEO (5M) y adición de suficiente HCl para disminuir el pH hasta 3,55.

Las membranas preparadas a partir de estas diversas mezclas de CMC/PEO acidificadas se moldearon y se secaron de acuerdo con los métodos que se proporcionan en el Ejemplo 1. La Figura 7 muestra el efecto del peso molecular del PEO sobre las proporciones de hidratación de las membranas resultantes. Los resultados indican que el aumento del peso molecular del PEO aumenta la proporción de hidratación, aunque se produjo un aumento pequeño en la hidratación por aumento del peso molecular del PEO de 900 kd a 5000 kd. Diferencias adicionales entre las membranas preparadas a partir de PEO de diversos pesos moleculares pueden observarse a partir de los datos que se presentan en las Figuras 4-6.

Ejemplo 5

Membranas de CMC de diferente peso molecular (Ejemplo de referencia)

Se preparó una membrana de CMC al 50%/PEO al 50% a partir de CMC (tipo 7MF PH; lote FP10 12939, obtenido de Aqualon Division of Hercules, Wilmington, DE) y PEO con un peso molecular de 900.000 (Union Carbide). Al contrario que el tipo 7HF de CMC de "alta viscosidad", el 7MF de CMC tiene una viscosidad mucho menor en

ES 2 311 455 T3

solución. El peso molecular promedio del tipo 7 MF es de aproximadamente 250 kd en comparación con 700 kd para el tipo 7 HF de CMC. Se mezclaron previamente en seco 5,0 g de CMC y 5,0 g de PEO (900K) y después se disolvieron en 500 ml de agua desionizada de acuerdo con los métodos del Ejemplo 1. La solución se acidificó con 950 μ l de HCl concentrado que redujo el pH hasta 3,48. Una membrana preparada a partir de 20,0 g de solución madre de moldeo. Se usaron otras porciones de la solución madre para preparar membranas más ácidas (con pH de soluciones de moldeo de 3,07, 2,51 y 1,96). Las membranas se moldearon y se secaron a partir de estas soluciones acidificadas. Después del secado, se determinó la proporción de hidratación, la pérdida de masa y la carga ácida como se ha descrito anteriormente. Para estas membranas que tenían un pH de 3,48, 3,07 y 2,51, no pudo determinarse el % de pérdida de masa ni la proporción de hidratación porque las membranas se disolvían. El pH final de las soluciones de PBS para cada membrana era de 5,93, 5,33 y 5,20, respectivamente. La membrana preparada a un pH de 1,96 conservaba su coherencia y el % de pérdida de masa era del 60% y la proporción de hidratación era del 343% y el pH de la solución de PBS era de 4,33. La comparación de la membrana de pH reducido con otras (Figura 5) muestra que a un pH de 2,0 la membrana hecha de CMC de un peso molecular inferior era la más soluble. Por lo tanto, la resistencia del complejo de asociación depende del peso molecular de la CMC.

Ejemplo 6

Membranas de CMC/PEO con CMC de un grado de sustitución diferente (Ejemplo de referencia)

Se prepararon membranas de CMC/PEO a partir de CMC del tipo 99-12M31XP (lote FP10 12159, grado de sustitución (d. s.) de 1,17, obtenida de Aqualon Division of Hercules, Wilmington, DE) y PEO con un peso molecular de 300.000 (Union Carbide). Se acidificaron 200 ml de solución polimérica mezclada con 600 μ l de HCl concentrado para dar una solución madre con un pH de 4,07. Se vertieron 20,7 g de esta solución de moldeo en una placa de petri; la membrana se secó como se describe en el Ejemplo 1. El resto de la solución madre se usó para preparar membranas con una acidez aumentada. Los pH de las soluciones de moldeo para esas membranas eran de 3,31, 3,03, 2,73, 2,44 y 2,17, respectivamente.

Las Figuras 4-6 muestran las propiedades de estas membranas en comparación con otras con diferentes composiciones de CMC y PEO. La Figura 4 muestra que la proporción de hidratación de CMC con un grado de sustitución de 1,12 ($\oplus$) es similar a la de otras membranas de CMC/PEO con una proporción de hidratación del 837% de agua cuando se colocan en PBS durante 4 días. Sin embargo, existen diferencias en otras propiedades medidas. La Figura 5 muestra que, en comparación con las otras membranas, las membranas preparadas a partir de CMC con el mayor grado de sustitución producen las membranas más solubles. La Figura 6 muestra que las membranas preparadas a partir de CMC altamente sustituida producen membranas que suministran la carga ácida más grande al PBS. Esto es coherente con la idea de que a cualquier pH dado, hay más iones de hidrógeno disponibles para disociación en estas membranas hechas con un d. s. mayor.

Ejemplo 7

Acondicionamiento de membranas con amoniaco (Ejemplo de referencia)

Para estudiar los efectos del acondicionamiento alcalino en membranas de CMC/PEO, se colocaron 3 trozos de membrana secas (de aproximadamente 160 mg, composición: CMC al 80% (7HF PH)/PEO al 20% (de 300K ó 5000 kd) en una placa de petri. Se añadieron 30 ml de hidróxido de amonio 0,5 N (preparado a partir de una dilución 10 x de amoniaco 5 N, LabChem, Pittsburg, PA) sumergiendo las membranas. Una vez completamente sumergidas, las membranas se dejaron en remojo durante 1 ó 5 min. Después, las membranas se retiraron de la solución de amoniaco, se retiró el exceso de amoniaco por secado con papel de filtro y las membranas se colocaron en un horno de convección por gravedad a 45°C y se dejaron secar. Después del secado y del reequilibrado a temperatura ambiente, se determinó la masa de las membranas. Después del secado, se determinó la proporción de hidratación, la carga ácida y la solubilidad de las membranas. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

Efecto del acondicionamiento con amoníaco en membranas de CMC/PEO

Composición de membrana CMC al 80%/PEO al 20%	Tratamiento de control o con NH ₃ 0,5N	Proporción de hidratación (%)	pH del PBS; a 4 d	Pérdida de masa después del NH ₃ (%)	Pérdida de masa después del PBS (4d) (%)	Pérdida de masa total (%)
PEO 300 kd pH 2,03	Control	258	4,33	—	29	29
	1 min	374	7,29	22	1	23
	5 min	368	7,29	22	0	22
PEO 300 kd pH 2,45	Control	281	3,92	—	26	26
	1 min	551	7,23	21	7	28
PEO 5000 kd pH 3,1	Control	553	4,24	—	36	36
	1 min	4774	6,98	21	61	63

La Tabla 7 demuestra que el tratamiento con amoníaco disminuía sustancialmente la carga ácida suministrada a una solución de PBS. Por extensión, este efecto también disminuiría la carga ácida suministrada a un tejido *in vivo*. Además, en comparación con otras membranas que suministran la misma carga ácida a las otras soluciones de PBS, las membranas acondicionadas con amoníaco tienen una solubilidad menor y, por lo tanto, un tiempo de permanencia *in vivo* aumentado. Por lo tanto, es posible introducir membranas antiadherencias con tiempos de permanencia prolongados que suministren escaso ácido residual a los tejidos. Por el contrario, las membranas no acondicionadas se disgregan rápidamente a un pH de aproximadamente 7,0 y, por lo tanto, son de escaso valor en la prevención de adherencias post-quirúrgicas.

El tratamiento de la membrana después de la fabricación inicial redujo la carga ácida de la membrana. En comparación con los controles (no empapados en amoníaco) en todos los casos el tratamiento de acondicionamiento aumentó el pH desde aproximadamente 4 hasta valores de pH más neutros. En comparación con los controles, el tratamiento de acondicionamiento también aumentó la proporción de hidratación de las membranas. Aunque este aumento de la hidratación era relativamente pequeño para los dos tipos de membranas ácidas, la membrana menos ácida (pH 3,1 CMC al 80%/PEO al 20% (5M)) se hinchó en un grado mayor. Por lo tanto, el efecto del tratamiento depende de la condición previa de la membrana. La pérdida de masa total debida al acondicionamiento con amoníaco en dos casos (para las membranas de CMC al 80%/PEO al 20% (300 kd) pH 2,03) es ligeramente inferior que la de los controles. Este resultado inesperado puede deberse a la pérdida inicial de sal en la solución de amoníaco seguida de una captación de sal en las membranas con sal reducida durante el remojo en PBS.

Ejemplo 8

Acondicionamiento de membranas usando tampón fosfato (Ejemplo de referencia)

De forma similar al Ejemplo 7, se acondicionaron membranas después de la fabricación en tampón fosfato (50 mM, pH 7,40). Un trozo de membrana seca (0,163 g; CMC (7 HF PH) al 80%/PEO al 20% (5000 kd), pH 3,1) se colocó en una placa de petri. La membrana se empapó durante 5 min en 30 ml de tampón de fosfato potásico monobásico/hidróxido de sodio (50 mM, pH 7,40; Fisher Scientific). Después de 5 minutos la membrana se retiró de la solución, el exceso de tampón se retiró por secado con papel de filtro y la membrana se colocó en un horno de convección por gravedad a 45°C para secarla. Después del secado y del reequilibrado a temperatura ambiente, la masa de la membrana era de 1,42 g (es decir, pérdida de masa del 13%). Otras membranas se empaparon durante 20 ó 60 minutos en tampón antes del secado. Después del secado, las membranas se ensayaron como anteriormente. Se determinó la proporción de hidratación, la carga ácida y la solubilidad (después de 4 días en PBS) para cada una de las membranas y los resultados se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

Efecto del acondicionamiento con tampón fosfato sobre membranas de CMC/PEO

Composición de membrana CMC al 80%/PEO al 20%	Tratamiento	Proporción de hidratación (%)	pH del PBS (3d)	Pérdida de masa después del PO ₄ (%)	Pérdida de masa después del PBS (3 d) (%)	Pérdida de masa total (%)
PEO (300 kd) pH 2,03	Control	258	4,33	—	29	29
	5 min	296	5,92	20	10	30
PEO (5000 kd) pH 3,1	Control	553	4,24	—	36	36
	5 min	572	6,58	13	18	31
	20 min	685	7,17	16	19	35
	60 min	833	7,30	20	17	37

La Tabla 8 demuestra que, como el acondicionamiento con amoníaco, el acondicionamiento con tampón fosfato neutralizaba la carga ácida suministrada a la solución de PBS. Además, el aumento de la duración de la exposición al tampón fosfato daba como resultado una neutralización progresiva del ácido en las membranas. El pH aumentó desde aproximadamente 4,3 hasta 7,30 después de 1 hora de incubación. Estas membranas permanecían intactas en PBS durante al menos 3 días. Por el contrario, membranas preparadas a un pH original de 7,0 y superior se hidrataban rápidamente y se disociaban completamente y perdían la integridad en varias horas. Por lo tanto, el acondicionamiento de membranas ácidas con un álcali o tampón fosfato neutro puede disminuir la solubilidad de la membrana (aumentando el tiempo de permanencia *in vivo*) al tiempo que se mantiene un pH muy biocompatible. Además, se espera que las membranas ácidas empapadas en otras soluciones tampón neutras o alcalinas (por ejemplo, ácido bórico-KCl pH 9,0, NaOH, 0,1 M; Fischer Scientific) también serán eficaces en la reducción de la acidez de una membrana original.

Ejemplo 9

Acondicionamiento de membranas usando PBS (Ejemplo de referencia)

Para determinar si una solución salina tamponada con fosfato isotónica puede reducir la carga ácida suministrada por una membrana, se repitió el experimento anterior como en el Ejemplo 8 pero usando PBS como el tampón (10 mM, pH 7,4, 3 lavados, de 20 minutos cada uno). Se colocó un trozo de membrana seca (peso 0,340 g, composición: CMC (7HF PH) al 80%/PEO (300 kd) al 20%; pH de 3,1) en una placa de petri que contenía 50 ml de una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (10 mM, pH 7,40, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y se dejó en remojo durante 20 minutos. El procedimiento de empapado se repitió otras 2 veces por decantación de la solución desde la membrana y adición de PBS recién preparado. Después, la membrana se retiró de la solución de PBS, se limpió y se secó como anteriormente. Después del secado y del reequilibrado a temperatura ambiente, la masa de la membrana era de 0,274 g (una pérdida de masa del 19,4%). Después del secado, se determinó la proporción de hidratación, la carga ácida y la solubilidad como anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Efecto del acondicionamiento en solución salina tamponada con fosfato sobre membranas de CMC/PEO

pH de membrana de CMC al 80%/PEO al 20% (300 kd)	Tratamiento	Proporción de hidratación (%)	pH del PBS (3 d)	Pérdida de masa después del acondicionamiento en PBS (%)	Pérdida de masa después del PBS (3d) (%)	Pérdida de masa total (%)
3,72	PBS	3230	7,0	20	53	73
3,14	PBS	1295	6,02	19	37	56
2,85	Control	362	4,28	—	32	32
2,35	PBS	417	5,26	24	9	33
1,84	PBS	267	5,14	23	2	25

Como con el tampón fosfato, el acondicionamiento de membranas ácidas con PBS aumenta el pH de la membrana sin alterar completamente la fuerte asociación entre polímeros que existía originariamente al pH inferior. Por lo tanto, cuando se acondiciona una membrana original de pH 3,14 usando el método de tampón PBS y posteriormente se coloca en PBS, genera un pH de 6,02. Una membrana no acondicionada que genera el mismo pH en PBS tendría originariamente un pH en el intervalo de 3-4. Además, excepto para pH inferiores a 2, las membranas acondicionadas se hidratan en un grado mayor que las membranas no acondicionadas. Por lo tanto, las membranas acondicionadas conservan algunas propiedades de las membranas ácidas originales aunque son más biocompatibles debido a la carga ácida disminuida suministrada en solución.

Ejemplo 10

Membranas de CMC/PEO multicapa (Ejemplo de Referencia)

Para proporcionar membranas con propiedades más variadas, se prepararon membranas intercalando una membrana acidificada entre dos capas de una membrana neutra, pudiendo o no tener esta última la misma proporción de CMC/PEO que la membrana acidificada. Una lámina de membrana neutra parcialmente seca se colocó primero en una superficie plana seca usada como la superficie de secado para la membrana laminada. Una lámina de membrana acidificada parcialmente seca de dimensiones ligeramente inferiores se colocó cuidadosamente sobre la membrana neutra. Después, otra lámina de membrana parcialmente seca se colocó con cuidado sobre la membrana acidificada de tal modo que los bordes de las dos membranas neutras se alineasen y que ninguno de los de la membrana acidificada se prolongase más allá de los bordes de las dos membranas neutras. Cuando las tres láminas se alinearon adecuadamente, se introdujo lentamente agua desionizada en la placa de petri, teniendo cuidado de no desalinearse las láminas entre sí. Cuando se humedecieron todas las láminas, se colocó con cuidado una membrana fina porosa no absorbible, tal como un medio de filtro de nylon, sobre el laminado humedecido y se presionó sólo ligeramente sobre él. Este ensamblaje se dejó después como estaba hasta que estuviera seco, momento en el que se retiró con cuidado la membrana porosa, seguido de retirada de la membrana laminada de la superficie plana.

Como alternativa, se preparó una membrana de doble capa de una forma similar. La membrana bicapa presenta diferentes propiedades en cada lado. El lado de pH reducido, que tiene una bioadhesividad más escasa, permite que ese lado se deslice más fácilmente sobre un tejido que el lado con un pH mayor. El lado con un pH mayor se adherirá más fuertemente al tejido en contacto con él y se adaptará mejor a las hendiduras del tejido manteniéndolo en su lugar. Dichas membranas son valiosas en situaciones en las que normalmente un tejido móvil puede moverse libremente con respecto a un tejido más fijo.

Se preparó otra membrana bicapa por colocación de una membrana parcialmente seca (proporción de CMC:PEO = 95:5, pH 3,0, moldeada a partir de 15 g de una solución polimérica al 2%) en una placa de petri y después vertiendo una mezcla de CMC/PEO (proporción de CMC:PEO = 95:5, pH 5,5, moldeada a partir de 10 g de una solución polimérica al 2%) sobre la parte superior de la membrana parcialmente seca. La mezcla y la membrana parcialmente seca se secaron después juntas para formar la membrana bicapa final. De una forma similar, se preparan membranas bicapa de composiciones de PEO variables, por ejemplo, membranas en las que las dos capas tenían diferentes contenidos de PEO. Cuanto mayor el contenido de PEO de la capa, mas resbaladiza se vuelve la superficie de esa capa. La otra capa, con un contenido de pH menor, se adhiere mas fuertemente al tejido.

Un ejemplo es la cirugía abdominal, donde las membranas intestinales se mueven libremente entre sí y con respecto al peritoneo abdominal circundante. Los ejemplos adicionales implican la cirugía torácica, donde los pulmones deben ser capaces de moverse con respecto al peritoneo circundante. La colocación del lado de pH elevado de una membrana contra el peritoneo parietal la mantendrá en su lugar pero permitirá que el peritoneo visceral unido a los pulmones se mueva libremente. De una forma similar, en la cirugía cardíaca, la colocación del lado de pH elevado de una membrana bicapa sobre el pericardio mantendrá la membrana en su lugar y permitirá que el lado de pH reducido se deslice más libremente sobre los tejidos cardíacos, por ejemplo, el miocardio. De forma similar, en la cirugía ortopédica, la colocación del lado de pH elevado de una membrana contra un tejido fijo, tal como hueso o periostio, provocará que se adhiera más firmemente a esas colocaciones y permitirá que un tejido menos fijo, tal como un ligamento tendón o músculo, se mueva más libremente.

Ejemplo 11

15 *Efecto de la concentración de CMC/PEO sobre la estabilidad de soluciones de moldeo (Ejemplo de referencia)*

Para determinar los efectos de las concentraciones de CMC y PEO sobre la estabilidad de las soluciones de moldeo, se añadieron 16 g de CMC de d. s. = 1,2 y 4 g de PEO (300 kd) a 50 ml de isopropanol para preparar una suspensión, que después se añadió a 450 ml de agua. Esto dio como resultado una solución de moldeo relativamente homogénea pero más viscosa que la de los Ejemplos 1-9. Se prepararon una serie de membranas por acidificación de porciones de la solución de moldeo para disminuir progresivamente los pH. Se vertieron 1 l g de porciones de la solución de moldeo en placas de petri de 10 cm y se secaron.

Las membranas eran homogéneas por encima de un pH de aproximadamente 3,3, mientras que los complejos de asociación precipitaban a partir de la solución de moldeo a un pH inferior. A un pH de membrana inferior, las membranas resultantes tenían áreas no homogéneas y agujeros y tenían superficies rugosas.

Pueden prepararse membranas a partir de soluciones de CMC de hasta el 10% en peso y de PEO de hasta el 20% en peso.

Ejemplo 12

35 *Efecto antitrombótico de membranas de CMC/PEO I (Ejemplo de referencia)*

Se prepararon muestras de membranas de CMC (7 HF PH) y CMC/PEO (5000 kd) con proporciones de CMC/PEO del 80%/20%, 65%/35% y 50%/50% a un pH de 2,7 a 2,9. Se ensambló una cámara de observación para plaquetas adherentes que consistía en un portaobjetos de vidrio recubierto con polímero, dos espaciadores de polietileno y un cubreobjetos de vidrio. Se recogió sangre humana obtenida de voluntarios adultos sanos después de su consentimiento informado en recipientes al vacío que contienen heparina (VacutainersTM, Bacton-Dickinson, Rutherford, NJ). Se centrifugó la sangre heparinizada a 100 g durante 10 min para obtener plasma rico en plaquetas (PRP).

Se instilaron doscientos μ l de PRP en la cámara de observación de plaquetas. Se dejó que las plaquetas del PRP se adhirieran y se activaran sobre las superficies poliméricas durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiraron las plaquetas no adherentes y las proteínas plasmáticas mediante lavado de la cámara con PBS. Las plaquetas adherentes se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2,0% (p/v) en PBS durante 1 hora. Después del lavado con PBS, las plaquetas se tiñeron con una solución colorante azul brillante de Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA) al 0,1% (p/v) durante 1,5 horas. Se observaron las plaquetas teñidas usando un microscopio de luz Nikon LabophotTM II a 40X aumentos (Melville, NY). La imagen de plaquetas adherentes se transfirió a un monitor de vidrio Sony TrinitronTM usando una cámara Mamamatsu CCDTM (Hamamatsu-City, Japón). El procesador de imágenes de Hamamatsu Argus-10TM se usó para calcular el número de plaquetas por área de superficie de 25.000 μ m² en cada campo de observación. El grado de activación de plaquetas se determinó cualitativamente a partir del comportamiento de extensión de plaquetas adherentes. Se obtuvieron imágenes de plaquetas activadas a partir del monitor de vídeo Sony TrinitronTM usando una cámara ScreenShooterTM (Cambridge, MA).

El número de plaquetas adherentes y el grado de activación de plaquetas se consideran indicadores tempranos de la trombogenicidad de biomateriales que contactan con la sangre. Se midió la activación de plaquetas cualitativamente mediante el grado de extensión de plaquetas sobre las superficies poliméricas. El grado de extensión de plaquetas se consideró de 1 (menos reactivo) a 5 (más reactivo), como se describe en la Tabla 10, que se basa en los criterios de Lin *et al.*, Polyethylene surface sulfonation. Surface characterization and platelet adhesion studies. *J. Coll. Interface Sci.* 164: 99-106 (1994).

TABLA 10

Evaluación de la activación de plaquetas: extensión inducida por superficie

Fase de activación de plaquetas	Área de extensión aproximada (μm^2)	Observaciones
1	10-15	Adherencia por contacto. Plaquetas no activas.
2	15-25	Parcialmente activas. Inicio de formación de pseudópodos
3	25-35	Parcialmente activadas. Extensión de pseudópodos e inicio de la liberación del contenido de los gránulos.
4	35-45	Parcialmente activadas. Formación y extensión significativa de pseudópodos. Liberación completa del contenido de los gránulos.
5	>45	Completamente activadas. Retracción de los pseudópodos que conduce a la forma plana o de "torta".

TABLA 11

Adherencia de plaquetas y activación por membranas de CMC/PEO

Composición de membrana	Número de plaquetas adherentes (por $25.000 \mu\text{m}^2$) ^a	Grado de activación
CMC al 100%	$95,8 \pm 15,3$	$2,96 \pm 0,37$
CMC al 80%/PEO al 20%	$48,1 \pm 10,9$	$3,25 \pm 0,35$
CMC al 65%/PEO al 35%	$17,8 \pm 4,25$	$1,57 \pm 0,39$
CMC al 50%/PEO al 50%	$5,25 \pm 2,67$	$1,00 \pm 0,00$
a: media $\pm$ desviación típica (n = 24)		

La Tabla 11 muestra que un número significativo de plaquetas se habían adherido y activado sobre membranas hechas de CMC al 100%. De media, más de 95 plaquetas activadas estaban presentes por $25.000 \mu\text{m}^2$. El número de plaquetas adherentes y el grado de activación disminuía a medida que aumentaba el contenido de PEO en las membranas. Las membranas de CMC/PEO al 50%/50% tenían el menor número de plaquetas. De media, solo estaban presentes 5,0 plaquetas adherentes por contacto en estas membranas.

Los resultados de este estudio indican que las membranas de CMC/PEO, especialmente la membrana de CMC/PEO 50%/50%, son muy antitrombogénicas en base a la reducción en el número de plaquetas adherentes y al grado de activación de plaquetas en estas superficies. Por lo tanto, el aumento de la cantidad de PEO en membranas aumenta sus propiedades antitrombogénicas.

ES 2 311 455 T3

Para determinar si la CMC y el PEO afectaban desfavorablemente a la coagulación sanguínea *in vivo* se realizó una serie de estudios en los que se inyectaron conejos con mezclas de CMC/PEO y se medía el tiempo de protrombina.

Se anestesiaron cuatro conejos (de 2,4 a 2,8 kg) usando ketamina (40 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg) y se inyectaron 0,20 ml de una solución de calidad clínica de CMC al 2%, PEO al 0,05%, H₂O al 50% y sal equilibrada al 47,9% (Lote N° SD011089) en el área vertebral inferior usando una aguja de calibre 27 y 1/2 pulgada (12,7 mm). Un quinto de los conejos sin inyectar (2,8 kg) sirvieron como el control. Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 1,6 ml) a las 0 (antes de la inyección), 2, 6, 24, 48 y 96 horas post-dosis. A 1,6 ml de la sangre recogida se añadieron 0,2 ml de solución de citrato sódico al 3,8%. Después de mezclar se preparó el plasma por centrifugación de la muestra a 200 rpm durante 3 a 5 minutos en una centrífuga clínica. El plasma se pipeteó en un tubo marcado distinto y se mantuvo en hielo. La muestra se congeló y se envió a California Veterinary Diagnostics, Inc., West Sacramento, CA para la determinación del tiempo de protrombina, que se realizó de acuerdo con las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio de la FDA.

La Tabla 12 muestra los tiempos de protrombina para cada muestra de plasma de conejo a diversos tiempos de muestreo. La sangre de conejo se coagula más rápidamente que la sangre humana (Didisheim *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 53, 866-1959); por lo tanto, varias de las muestras recogidas de estos conejos se coagularon antes del análisis. Sin embargo, las muestras ensayadas no mostraban efecto de la mezcla de CMC/PEO sobre el tiempo de protrombina excepto para el conejo N° 3, que mostró un aumento transitorio pero se recuperó el día 4.

Tabla 12					
Tiempos de protrombina (segundos) de conejos inyectados con CMC/PEO					
	Número de Conejo				
Tiempo (h)	1	2	3	4	5*
0	7,2	7,2	7,1	8,4	7,1
2	-	7,1	7,1	7,1	7,1
6	7,3	7,1	7,1	7,8	7,1
24	7,2	7,1	10,6	7,1	8,0
48	7,3	-	10,3	-	-
96	6,2	6,5	6,5	6,0	6,0
*Conejo de control no inyectado con CMC/PEO					
- indica que el ensayo no se realizó debido a que la muestra había coagulado					

Ejemplo 13

Determinación de la bioadhesividad de membranas de CMC/PEO (Ejemplo de referencia)

La bioadhesividad de las membranas se determinó generalmente usando un ensayo de adherencia que se describe a continuación. Se ensayaron varias membranas compuestas por CMC (7 HF HP) y PEO (peso molecular de 5000 kd) y acidez variable para determinar su bioadhesividad relativa usando un ensayo *in vitro*. Se adquirieron chuletas de cerdo de corte de centro frescas de un comercio local como adherendos a las membranas. Se colocaron seis chuletas de cerdo finamente cortadas en una placa de bioensayo de poliestireno (243 x 243 x 18 mm) y se colocó algo de agua en la placa para mantener un entorno relativamente húmedo. Se tuvo cuidado de secar cualquier exceso de agua del lado expuesto a la chuleta de cerdo. Se cortaron seis membranas en una forma rectangular de una masa de 120-130 mg y posteriormente se colocaron sobre seis trozos individuales de carne con sus lados suaves hacia abajo. El lado suave de la membrana es ese lado que estaba unido a la superficie de poliestireno durante el proceso de secado. El otro lado de la membrana que estaba expuesto al aire generalmente produce una superficie ligeramente más rugosa. Se colocó una tapa superior de poliestireno sobre la placa y se dejó que las membranas se hidrataran y se adhirieran a la carne a temperatura ambiente durante 3 horas. De una forma similar, se usaron otras placas de bioensayo para ensayar otras membranas.

Después de un periodo de incubación de 3 horas, las membranas y la carne se examinaron con cuidado de una forma cualitativa para determinar la claridad (color, transparencia), el carácter estructural de la membrana, la forma de la membrana (pliegues en la carne), el blanqueamiento y la ondulación como resultado de una fuerte bioadhesión. La fuerza de adhesión en g se midió cuantitativamente en un ensayo de adherencia uniendo primero una pinza al borde de la membrana, posteriormente uniendo la pinza a un dinamómetro (intervalo de 0-10 g o 0-250 g) y arrancando

ES 2 311 455 T3

lentamente la membrana de la carne levantando verticalmente el dinamómetro. Se registró la fuerza en g necesaria para retirar completamente la membrana de la carne o, en algunos casos, para provocar un desgarrón en la membrana.

TABLA 13

Resumen: Fuerza de adhesión comparativa de membranas de CMC/PEO

pH de la Membrana	% de PEO (5000 kd) en la membrana					
	35%	20%	10%	5%	2,5%	0
2,00	-	2	-	-	-	100
2,80	7	7,5 ^a	-	-	-	0
3,00	9	7,5 ^a	7 ^b	120 ^b	50 ^b	9
3,10	-	83 ^b	6 ^b	-	-	-
3,30	-	-	-	>150 ^b	67 ^b	11 ^b
4,00	-	-	8 ^c	10 ^c	7 ^c	3
a: valor medio: n = 2 ea b: valor medio: n = 3 ea c: valor medio: n = 4 ea						

Los resultados que se muestran en la Tabla 13 demuestran que la fuerza de adhesión entre las membranas de CMC/PEO está relacionada con el pH de la membrana. El pH que muestra la mayor fuerza adhesiva para un porcentaje de PEO dado era de aproximadamente 3,30, pero el aumento o la disminución del pH a partir de este nivel disminuía la fuerza de adhesión. Además, la fuerza de adhesión estaba relacionada con el % de PEO en la membrana. Las membranas con el mayor porcentaje de PEO presentaban la menor adhesión. El aumento del porcentaje de PEO aumentaba la adhesión hasta que se alcanzaba el 5% de PEO, pero aumentos adicionales en la concentración de PEO disminuían la fuerza adhesiva.

Ejemplo 14

Eliminación in vivo de CMC y PEO (Ejemplo de referencia)

Para determinar la eliminación *in vivo* de CMC y PEO se realizó una serie de experimentos en los que se inyectaban ratas con CMC y PEO radiomarcados (solución de CMC al 2%, PEO al 0,05%, H₂O al 50% y sal equilibrada al 47,9%). Los resultados se realizaron de acuerdo con Buenas Prácticas de Laboratorio.

Se inyectaron formulaciones que contenían [¹⁴C]-carboximetilcelulosa (CMC) y [¹⁴C]-óxido de polietileno (PEO) en el área vertebral inferior de cuatro grupos de seis ratas (3 machos, 3 hembras); se sacrificaron dos grupos después de 3 días y los dos grupos restantes después de 7 días. Se recogió orina y heces diariamente de estas ratas para estudiar el patrón de excreción de la radiactividad. Además, se ensayaron órganos internos representativos para los niveles residuales de radiactividad en estas ratas. Dos conjuntos separados de seis ratas se inyectaron de forma similar y se ensayaron muestras de sangre para radiactividad al tiempo 0 (preinyección) y a las 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la inyección.

Ambos compuestos se excretaron principalmente en la orina. La mayoría de la excreción en orina se produjo durante las primeras 24 horas. El día 7 de estudio, los tiempos medios para la excreción de la ¹⁴C-CMC en la orina y en heces eran aproximadamente de 0,2 días (5 h) inicialmente, seguidos de un tiempo medio de excreción más prolongado de aproximadamente 1,6 días. Los valores correspondientes para el ¹⁴C-PEO eran de 0,2 días (5 h) y 1,7 días, respectivamente. De los órganos ensayados, el hígado y el riñón contenían los mayores niveles de radiactividad. El porcentaje de la dosis inyectada en el hígado era comparable para la ¹⁴C-CMC y el ¹⁴C-PEO pero en el riñón era al menos 6 veces más elevada después de la inyección de ¹⁴C-PEO que después de la inyección de ¹⁴C-CMC.

El nivel de radiactividad en la sangre después de la administración de ¹⁴C-CMC disminuía con tiempos medios de aproximadamente 1 día, mientras que el tiempo medio en sangre para ¹⁴C-PEO era de aproximadamente 4 días. Mayores porcentajes de la dosis administrada permanecieron en la canal más en el sitio de inyección para la ¹⁴C-CMC que para el ¹⁴C-PEO. La recuperación global media de la dosis administrada era del 80% para ambos compuestos. No se observaron reacciones adversas a la ¹⁴C-CMC o el ¹⁴C-PEO inyectados.

Ejemplo 15

Viscosidad de soluciones de CMC/PEO en función del pH (Ejemplo de referencia)

5 Para determinar el efecto de la variación del pH de la solución sobre la viscosidad de soluciones de CMC/PEO, se determinó la viscosidad aparente de muestras de una solución que contenía sólidos al 1,33% y tenía una proporción de CMC:PEO de 77,5:22,5, siendo el peso molecular del PEO de 4,4 Md; $\blacklozenge$) una solución que tenía una proporción de CMC:PEO de 50:50, siendo el peso molecular del PEO de 4,4 Md; $\blacksquare$) y una solución que tenía una proporción de CMC:PEO de 50:50 y siendo el peso molecular del PEO al 50% de 300 kd; $\blacktriangle$) véanse las Figuras 8a-8b. Los datos de
10 viscosidad se presentan en centipoise; cps; según se midieron usando un eje N° 4 a 0,5 rpm.

La Figura 8a muestra que a cada pH, las viscosidades de soluciones que tenían una proporción de CMC:PEO de 77,5:22,5 eran superiores a las de las soluciones que tenía una proporción de CMC:PEO de 50:50. Además, para
15 pronunciados a valores de pH por encima de aproximadamente 2. La Figura 8b muestra los resultados de un estudio similar usando una solución que tiene una proporción de CMC:PEO de 50:50, siendo el peso molecular del PEO de 300 kd. Para esta solución, el aumento del pH por encima de aproximadamente 3,0 provocó un gran aumento en la viscosidad.

Ejemplo 16

Mediciones de la turbidez de soluciones de CMC/PEO (Ejemplo de referencia)

25 Para determinar si la CMC y el PEO se asocian en grandes agregados que provocan dispersión de luz se midió el aspecto de partículas de CMC/PEO en solución usando un aparato de nefelometría. Se usaron dos tipos de aparatos: un nefelómetro Modelo 21 (diseño de dispersión lateral, Monitek, Inc.) y un turbidímetro Modelo 251 (diseño de dispersión hacia delante, Monitek, Inc.). Se midió la absorbancia de luz usando un instrumento de absorbancia de luz Monitek que usa una bombilla de tungsteno que proporciona emisión de luz visible y próxima al infrarrojo.

30 Después de preparar las mezclas para estudio, las mezclas se mantuvieron en un estado homogéneo si es necesario mediante agitación con un dispositivo de agitación de laboratorio de baja velocidad (60-120 rpm). Los resultados de los estudios se muestran en las Figuras 9 y 10. La Figura 9a muestra los resultados de un experimento para determinar el efecto del pH de la solución sobre la dispersión lateral, como se mide en unidades de nefelometría (NTU), de una
35 solución que contenía el 1,33% de sólidos totales y una proporción de CMC:PEO de 50:50, en la que el peso molecular del PEO era de 4,4 Md. A un pH por encima de aproximadamente 3, la dispersión era mínima, estando cada punto de datos por debajo de 10 NTU. A medida que se disminuía el pH hasta 2,5, la dispersión lateral aumentaba ligeramente, y cuando el pH se redujo adicionalmente hasta 2 e inferior, la dispersión lateral aumentó sustancialmente. La Figura 9b es de un experimento similar al que se muestra en la Figura 9a, excepto por que la solución tenía una proporción
40 de CMC:PEO de 50:50 y el peso molecular del PEO era de 300 kd. Como con el PEO de mayor peso molecular, en el intervalo de pH por encima de aproximadamente 2,5 existía muy poca dispersión lateral, pero en el intervalo de por debajo de aproximadamente 2,5, la dispersión lateral aumentaba sustancialmente.

La Figura 10 muestra los resultados de estudios similares de una solución que tenía un contenido de sólidos totales
45 del 1,33% y una proporción de CMC:PEO de 50:50 y en la que el peso molecular del PEO era de 4,4 Md, en la que se midió la absorbancia del espectro completo expresada en unidades de absorción (AU) (escala a la derecha; $\bullet$) y la turbidez de barrido hacia delante, expresada como NTU (escala a la izquierda; Δ). Como con los datos de nefelometría presentados en las Figuras 9a y 9b, en el intervalo de pH por encima de aproximadamente 2,5 existía poca turbidez o absorbancia, mientras que en el intervalo de pH por debajo de aproximadamente 2,5 existen aumentos sorprendentes
50 en la turbidez y absorbancia a medida que se reduce el pH.

Estos estudios indican que por encima de un pH de aproximadamente 2,5, la CMC y el PEO permanecen en suspensión. Sin embargo, cuando el pH se reduce hasta por debajo de aproximadamente 2,5, comienza a aparecer precipitación y la CMC y el PEO forman agregados que dispersan la luz lo suficiente como para detectarse (véanse las
55 Figuras 9 y 10).

Ejemplo 17

Hidratación de membranas de CMC/PEO en función del pH (Ejemplo de referencia)

Se fabricaron tres series de membranas de CMC/PEO y se estudiaron y los resultados se muestran en las Figuras 11a y 11b. Una serie comprendía CMC al 77,5%/PEO al 22,5% (4,4 Md; $\bullet$). Otra serie estaba hecha de CMC al 50%/PEO al 50% (4,4 Md; $\blacksquare$) y la tercera estaba hecha de CMC al 50%/PEO al 50% (300 kd; $\blacktriangle$). En cada caso, las
65 membranas se secaron y después se sumergieron en PBS durante 20 horas. Después de 20 horas, las membranas se secaron y se determinó el peso húmedo. La proporción de hidratación (% de hidratación) se expresa como el (peso húmedo - peso seco)/peso seco x 100%.

La Figura 11a muestra los resultados de los experimentos a lo largo del intervalo completo de pH estudiado. A un pH de aproximadamente 2,0 e inferior, existe poca, si alguna, dependencia de la proporción de hidratación del pH. Sin embargo, a medida que el pH aumenta por encima de aproximadamente 2,0, existe un aumento en la proporción de hidratación para cada tipo de membrana estudiada.

La Figura 11b muestra los resultados de los mismos experimentos pero solo se muestra el intervalo de pH de 3 e inferior. Este gráfico enfatiza la ausencia de un efecto significativo del pH sobre la hidratación en el intervalo de pH por debajo de aproximadamente 2,0. Sin embargo, en el intervalo de pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, existen aumentos sustanciales en la hidratación a medida que se aumenta el pH. Además, en el intervalo de pH por debajo de aproximadamente 2, existe escasa dependencia de la hidratación del pH; el aumento del pH de 1,3 a aproximadamente 2 daba como resultado solo un ligero aumento en la hidratación para las membranas que contenían PEO de 4,4 Md. Sin embargo, por encima de un pH de aproximadamente 2, el efecto incremental del aumento de pH es mucho mayor que en el intervalo de pH por debajo de 2. Independientemente del PEO usado, o de la proporción de CMC con respecto a PEO, cada tipo de membrana demostraba la gran dependencia de la hidratación del pH por encima de 2.

Estos resultados eran inesperados en base a la técnica anterior, tal como la patente de Smith *et al.*, que mostraba proporciones de hidratación del 16% y del 18% para membranas de CMC/PEO a un pH de 1,25.

Ejemplo 18

Solubilidad de membranas de CMC/PEO (Ejemplos de referencia)

En otro experimento para estudiar la solubilidad de las membranas de CMC/PEO en NaCl al 0,9%, se prepararon membranas de CMC al 77,2%/PEO al 22,5% (4,4 Md; ♦), CMC al 50%/PEO al 50% (4,4 Md; ■) y CMC al 50%/PEO al 50% (300 kd; ▲). Se prepararon membranas a diferentes valores de pH y se sumergieron en NaCl al 0,9% durante un periodo de 5 días, tiempo después del cual las membranas se secaron y se pesaron. Los datos se expresan en la Figura 12 como porcentaje del peso seco original.

La Figura 12 muestra que la membrana de CMC al 77,5% era la menos soluble, con solo aproximadamente el 35% de pérdida del peso seco inicial durante la inmersión de 5 días. Además, en el intervalo de pH de 2 e inferior, no se producían cambios en la solubilidad con el pH. Sin embargo, a medida que aumentaba el pH hasta 2,5 y superior, se producía un aumento progresivo en la solubilidad de las membranas. Las membranas preparadas con CMC al 50% eran más solubles (al menos solubles al 55%) a cada pH que las membranas preparadas con CMC al 77,5%. Como con las membranas de CMC al 77,5%, las membranas preparadas con CMC al 50% no mostraban dependencia de la solubilidad del pH por debajo de aproximadamente 2,5. Sin embargo, por encima de un pH de aproximadamente 2,5, existía un aumento en la solubilidad a medida que aumentaba el pH.

Ejemplo 19

Bioadhesión de membranas de CMC/PEO (Ejemplo de referencia)

Para caracterizar adicionalmente las propiedades bioadhesivas de membranas de CMC/PEO de esta invención se determinó la relación entre el pH de membrana y la bioadhesividad usando un sistema de adhesión a bucle de mesenterio bovino. Trozos de mesenterio bovino fresco se unieron a una plataforma adhesiva y se usó un bucle de membrana de CMC/PEO como un adherendo, sosteniéndose en un brazo del dispositivo. El mesenterio y la membrana se humedecieron con agua y se hizo descender el bucle de membrana para hacer contacto con el mesenterio. El brazo se levantó y se controló continuamente la fuerza en gramos. Cuando el bucle de membrana se rompía del mesenterio, se registró la fuerza. La fuerza necesaria para despegar la membrana del mesenterio se registró para membranas fabricadas en el intervalo de pH de aproximadamente 1,25 a aproximadamente 4,25.

Las Figuras 13a y 13b muestran los resultados del ensayo de bioadhesión usando el mesenterio bovino. En la Figura 13a (CMC al 77,5%/PEO al 22,5%, 4,4 Md; ♦) las membranas a un pH por debajo de 2,5 no se adherían bien al mesenterio. Sin embargo, a medida que el pH se aumentaba hasta por encima de 2,5, la membrana se adhería bien al mesenterio, requiriendo una fuerza de aproximadamente 170 g para despegar la membrana a un pH de 3,0. Membranas hechas de CMC al 50%/PEO al 50% (300 kd; ■) de forma similar no se adherían al mesenterio bovino a un pH por debajo de aproximadamente 2,5. Sin embargo, el aumento del pH aumentaba la adherencia de estas membranas. Por el contrario, membranas de CMC al 50%/PEO al 50%, 4,4 Md (▲) se adherían al pH más bajo de 1,25, pero el aumento del pH hasta 2,5 disminuía la adherencia al mesenterio bovino. Inesperadamente, el aumento del pH por encima de 2,5 revirtió esta tendencia y aumentó la adherencia al mesenterio hasta un grado muy elevado, siendo la fuerza necesaria para despegar la membrana del mesenterio a un pH de 3,0 de aproximadamente 280 g. Además, a medida que el pH se aumentaba adicionalmente, se producían disminuciones en la adherencia de dos de las series de membranas, pero en ningún caso disminuyó la bioadhesión hasta valores por debajo de los observados a un pH de 2,5 para esa serie de membranas.

La Figura 13b muestra el resumen de los datos obtenidos para estudios de membranas de CMC al 77,5%/PEO al 22,5% (4,4 Md). Los datos se expresan como la media $\pm$ el error típico de la media; $n = 6$ ó 7 . Como con la serie individual presentada en la Figura 13a, en el intervalo de pH de 2,4 e inferior las membranas no se adherían

ES 2 311 455 T3

bien al mesenterio. Sin embargo, el aumento del pH por encima de aproximadamente 2,5 aumentó la adherencia sustancialmente y de una forma dependiente del pH, con una fuerza máxima necesaria para despegar la membrana del mesenterio de aproximadamente 120 g.

- 5 Estos resultados observados en el intervalo de pH de más de 2,5 eran completamente inesperados en base a los resultados obtenidos en el intervalo de pH reducido de 2,0 e inferior. Las membranas de CMC/PEO preparadas en el intervalo de pH similar al de Smith *et al.* se adherían solo escasamente a materiales biológicos y no predecían el comportamiento bioadherente de membranas de CMC/PEO a intervalos de pH por encima de aproximadamente 2,5.

10

Ejemplo 20

Efecto de películas de CMC/PEO sobre la adhesividad, biocompatibilidad y biorresorción (Ejemplo de referencia)

15 Introducción

- Los propósitos de este estudio eran en primer lugar determinar la capacidad de películas que contienen diversas combinaciones de óxido de polietileno (PEO) y carboximetilcelulosa (CMC) para adherirse a diversos órganos dentro de la cavidad peritoneal. El segundo propósito era evaluar a grandes rasgos la biocompatibilidad de las mismas cinco películas. El tercer propósito era determinar si las películas de esta invención son biorresorbibles.

Métodos

- Se mantuvieron en cuarentena veinte conejos New Zealand White hembra de 2,4-2,7 kg al menos 2 días antes de la cirugía. El día de la cirugía, los conejos se anestesiaron con ketamina/xilacina intramuscular y se prepararon para una cirugía estéril. Se realizó una laparotomía en la línea media y se colocaron trozos de película de la invención de 2 cm en la pared lateral, el intestino y los cuernos uterinos. La única herida que se realizó aparte de la línea de incisión fue la retirada del ligamento ancho de los cuernos uterinos del conejo para permitir que las películas se envolvieran sobre los cuernos uterinos. Después de la recuperación, los conejos se devolvieron al animalario. A las 24, 48, 72 y 96 horas después de la cirugía, los conejos volvieron a abrirse por la línea de incisión para una evaluación del sitio del material con respecto a la colocación inicial, la condición del material y el aspecto del tejido en contacto con el material.

Películas usadas

- 35 Las películas estudiadas se gamma-irradiaron con una dosis total de 2,5 megaRads ("MRad") y comprendían: CMC al 95%/PEO al 5%; pH 5,0 (película N°: 414), una membrana bicapa que comprende capas de CMC al 60%/PEO al 40%, pH 2,0 y CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 (película N°: 417), una membrana bicapa que comprende capas de CMC al 60%/PEO al 40%, pH 3,0 y CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 (película N°: 418), CMC al 95%/PEO al 5%, pH 4,0 (película N°: 419) y CMC al 95%/PEO al 5%, pH 3,0 (película N°: 422). Después de la inserción de la película, se usó una sutura que comprendía Dexon II 3-0 para cerrar el músculo abdominal y la piel.

Resultados

- La mayoría de los materiales estaban empapados con sangre en el cuerno y estaban asociados con un gran coágulo sanguíneo en todos los momentos observados. Sólo en los casos en los que éste no era el caso se anotará la observación a continuación. En conjunto, se observó una inflamación muy escasa en asociación con los materiales colocados. De nuevo, sólo se señalarán los casos en los que se observaba cualquier inflamación o daño tisular. En todos los momentos, la inflamación era localizada y muy transitoria (señalada solo en un momento y en un animal por punto temporal).

- 50 La película que comprendía CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 (película N°: 414) estaba presente en el sitio de colocación en 4 de 6 sitios 24 horas después de la implantación. Cuarenta y ocho horas después de la implantación, el material estaba presente en 5 de 6 sitios y estaba fragmentado en el intestino. Después de 72 horas, el material estaba presente solo en los cuernos (en un conejo el material estaba fragmentado). En un conejo a las 72 horas, se observaron ligeras hemorragias petequiales en el intestino de un conejo. Después de 96 horas, el material estaba presente en 3 de los 6 sitios. En un sitio, el material observado era de tipo gel.

- La película que comprendía CMC al 95%/PEO al 5%, pH 4,0 (película N°: 419) estaba presente en 5 de 6 sitios a las 24 y 48 horas. A las 48 horas, el material en el intestino estaba fragmentado. En un conejo, se observó palidez y hemorragia petequial en la pared lateral. A las 72 horas, el material estaba presente en 4 de 6 sitios. El material sobre el intestino estaba fragmentado. Estaba presente material de tipo gel en el surco paracólico. A las 96 horas, estaba presente material fragmentado y/o de tipo gel en 5 de los 6 sitios. En un conejo, el material en el cuerno no estaba asociado con un coágulo sanguíneo.

- 65 La película que comprendía CMC al 95%/PEO al 5%, pH 3,0 (película N°: 422) estaba presente en todos los sitios a las 24 horas después de la implantación. A las 48 horas, el material estaba presente en 3 de 5 sitios. Se observó palidez (más intensa en el centro que en los bordes) en la pared lateral de un conejo. Se observaron algunas hemorragias petequiales en el intestino de este mismo conejo. A las 72 horas, el material estaba presente en todos los sitios. En la pared lateral y en el intestino, el material no podía observarse a simple vista, pero se observó un recubrimiento de tipo

gel resbaladizo en el sitio de colocación. A las 96 horas, se observó un trozo intacto en el cuerno y en el intestino de un conejo. En la pared lateral de ambos conejos y en el intestino del otro conejo estaban presentes pequeños fragmentos y gel resbaladizo en el sitio de colocación.

La película bicapa que comprendía CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 y CMC al 60%/PEO al 40%, pH 2,0 (película N°: 417) estaba presente en 4 de 6 sitios. En este momento, se observó una pequeña cantidad de irritación en el intestino de un conejo. A las 48 horas, el material se observó en 3 de 6 sitios (fragmentado en el intestino). A las 72 horas, el material estaba presente en 3 de 6 sitios y se observó irritación en la pared lateral de ambos conejos. A las 96 horas, se observaron fragmentos en 5 de 6 sitios. En el cuerno, no se observó un gran coágulo sanguíneo asociado con el material en los cuernos. Se observó inflamación y petequias en el intestino.

La película bicapa que comprendía CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 y CMC al 60%/PEO al 40%, pH 3,0 (película N°: 418) estaba presente en todos los sitios a las 24 horas. Se observó cierta inflamación en la pared lateral de un conejo. A las 48 horas, el material se observaba en 5 de 6 sitios (tipo gel en 3 de estos sitios). A las 72 horas, el material estaba presente en 5 de 6 sitios (tipo gel en 4 sitios). En un conejo, se observaron hemorragias petequiales y hematomas en la pared lateral (mismo conejo con inflamación a las 24 horas). A las 96 horas, estaban presentes fragmentos de material en 5 de 6 sitios. En un conejo, el material en el cuerno no estaba asociado con un coágulo sanguíneo.

Conclusión

Estos estudios indicaban que las membranas tanto monocapa como bicapa de esta invención se adhieren a los tejidos peritoneales de conejos. Los estudios también indicaban que las películas eran biocompatibles y se retenían en los cuerpos de los animales durante periodos de tiempo, eliminándose algunas de las películas de los sitios quirúrgicos por los procesos fisiológicos de los animales.

Ejemplo 21

Evaluación de películas de la invención en la prevención de la formación de adherencias abdominales (Ejemplo de referencia)

Introducción

Los propósitos de esta serie de estudios eran ensayar la eficacia de películas de esta invención sobre la formación de adherencias abdominales en un modelo de conejo de formación de adherencias entre las paredes laterales y el ciego y el intestino.

Métodos

1. Animales

Se adquirieron cuarenta conejos New Zealand White hembra de 2,4-2,7 kg y se mantuvieron en cuarentena durante al menos 2 días antes del uso. Los conejos se alojaron en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 con agua y alimento disponible *ad libitum*.

2. Materiales

Las películas estudiadas comprendían películas bicapa que consistían en capas de CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 y CMC al 60%/PEO al 40%, pH 2,0 (película N°: 438) que se habían gamma-irradiado con una dosis total de rayos gamma de 2,5 MRad, una película bicapa que comprendía capas de CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 y CMC al 60%/PEO al 40%, pH 3,0 (película N°: 437) y una película monocapa que comprendía CMC al 95%/PEO al 5%, pH 4,0 (película N°: 436). Las suturas que se usaron para cerrar el peritoneo y la piel era sutura recubierta Dexon II 3-0 (Davis y Geck, Manati, PR).

3. Modelo de formación de adherencias en las paredes laterales

Se anestesiaron conejos con una mezcla de clorhidrato de ketamina 55 mg/kg y Rompum 5 mg/kg por vía intramuscular. Después de la preparación para una cirugía estéril, se realizó una laparotomía en la línea media. El ciego y el intestino se exteriorizaron y se ejerció una presión digital para generar hemorragias subserosas por todas las superficies. Después, el intestino dañado se raspó ligeramente con una gasa estéril de cuatro capas de 4" x 4" (10,16 cm x 10,16 cm) hasta que se observó un sangrado puntual. El ciego y el intestino se devolvieron entonces a su posición anatómica normal. Se extirpó un área de 4 x 3 cm de peritoneo y músculo transversal abdominal en la pared abdominal lateral derecha. La película se colocó en el lugar de la lesión de la pared lateral. Después de 7-8 días, los conejos se sacrificaron y se determinó el porcentaje del área de la lesión de la pared lateral que estaba implicada en adherencias.

ES 2 311 455 T3

Además, se puntúa la tenacidad de las adherencias usando el siguiente sistema:

0 = sin adherencias

1 = adherencias ligeras, fácilmente diseccionables

2 = adherencias moderadas; no diseccionables, no rompen el órgano

3 = adherencias densas; no diseccionables, el órgano se rompe cuando se eliminan

Una reducción en el área o en la tenacidad de las adherencias se consideraba beneficiosa.

Resultados

En los 10 conejos de control, 5 tenían adherencias que variaban de un área del 20% al 80% de la pared lateral. Los otros 5 conejos de control no tenían adherencias. Sin embargo, ninguno de los sitios que tenían membranas antiadherencias tenían ninguna prueba de adherencias.

Ejemplo 22

Evaluación de películas de CMC/PEO en la prevención de la reformación de adherencias abdominales (Ejemplo de referencia)

Introducción

El propósito de este estudio era evaluar la eficacia de películas de PEO/CMC en la reducción de la reformación de adherencias abdominales en conejos después de la lisis de adherencias entre la pared lateral y el ciego y el intestino.

Métodos

1. Animales

Se adquirieron ciento diez conejos New Zealan White hembra de 2,4-2,7 kg de Irish Farms (Norco, CA) y se mantuvieron en cuarentena en el animalario de la USC durante al menos 2 días antes del uso. Los conejos se alojaron en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Los conejos que tenían adherencias y no tenían pruebas de infección subcutánea se usaron en la porción de lisis del estudio.

2. Materiales

Las películas de PEO/CMC usadas en este estudio comprendían CMC al 95%/PEO al 5% pH 4,0 (película N°: 603), una película bicapa constituida por capas de CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 y CMC al 60%/PEO al 40%, pH 3,0 (película N°: 604) y una película bicapa constituida por capas de CMC al 95%/PEO al 5%, pH 5,0 y CMC al 60%/PEO al 40%, pH 2,0 (película N° 605). Las películas contenían colorante azul n° 2 de RD&C y se esterilizaron por exposición a irradiación gamma (dosis total de 2,5 MRad). En un experimento separado, se estudiaron películas (película N°: 627) que comprendían CMC al 77,5% y PEO al 22,5%, pH 4,2, que también tenían colorante azul n° 2. La prevención de adherencias en animales que recibían membranas que tenían las composiciones anteriores se comparó con animales de control que no recibían ninguna membrana antiadherencias. Después de la implantación de las membranas, se usaron suturas recubiertas Dexon II 3-0 (Davis y Geck, Manati, PR) para cerrar el peritoneo y la piel.

Modelo de reformación de adherencias en la pared lateral

Se anestesiaron conejos con una mezcla de clorhidrato de ketamina 55 mg/kg y Rompum 5 mg/kg por vía intramuscular. Después de la preparación para una cirugía estéril, se realizó una laparotomía en la línea media. El ciego y el intestino se exteriorizaron y se ejerció una presión digital para generar hemorragias subserosas por todas las superficies. El intestino dañado se raspó ligeramente con una gasa estéril de cuatro capas de 4" x 4" (10,16 cm x 10,16 cm) hasta que se observó un sangrado puntual. El ciego y el intestino se devolvieron entonces a su posición anatómica normal. Se extirpó un área de 5 x 3 cm de peritoneo y músculo transversal abdominal en la pared abdominal lateral derecha. La incisión se cerró en dos capas con Dexon II 3-0. Una semana después, los animales se anestesiaron como se ha descrito anteriormente y se sometieron a una segunda laparotomía. En los conejos donde existían adherencias, las adherencias se puntuaron y se lisaron usando una disección roma y afilada. Se tubo cuidado de no lesionar el intestino.

3. Implantación de películas antiadherencias

La película seleccionada se colocó en el sitio de lisis de adherencias. Después de 7 a 10 días los conejos se sacrificaron y se determinó el porcentaje del área de la lesión de la pared lateral que estaba implicada en adherencias, como se ha descrito en el Ejemplo 21 anterior.

Resultados

Los resultados de este estudio se presentan a continuación en las Tablas 14-16. Todas las películas de CMC/PEO estudiadas eran muy eficaces en la reducción de la reformación de adherencias. Estos datos se resumen en la Tabla 14 (área de reformación de adherencias) y en la Tabla 15 (incidencia de reformación de adherencias).

TABLA 14

Efectos de membranas de CMC/PEO sobre la reformación de adherencias

Composición de membrana	Área inicial de adherencias	Área de adherencias después de la reformación	% de área inicial
-			
Control	82,2 ± 2,8	67,8 ± 9,8	83,5 ± 11,9
95/5, 4,0	77,8 ± 8,5	5,6 ± 3,8	5,6 ± 3,8
95/5, 5,0:	80,9 ± 7,7	0,9 ± 0,9	1,3 ± 1,3
60/40, 3,0			
95/5, 5,0:	82,2 ± 7,2	1,1 ± 1,1	1,1 ± 1,1
60/40, 2,0			

La composición de membrana se expresa como el % de CMC/% de PEO, pH, y las membranas bicapa se expresan como la composición de las dos capas. Los datos se expresan como la media ± la desviación típica.

TABLA 15

Efecto de películas de CMC/PEO sobre la incidencia de la reformación de adherencias

Grupo	Nº de animales sin adherencias	% de animales sin adherencias
Control	0/9	0,0
95/5, 4,0	7/9	77,7
95/5, 5,0:	10/11	91,0
60/40, 3,0		
95/5, 5,0:	8/9	88,8
60/40, 2,0		

Estos experimentos demuestran que las películas de CMC/PEO bicapa evitan sustancialmente la reformación de adherencias.

TABLA 16

Efecto de una película de CMC/PEO (Nº: 627) sobre la formación de adherencias

	Área inicial de adherencias	Área de adherencias después de la reformación	% de área inicial
Control	84,6 ± 5,5	80,0 ± 6,7	95,5 ± 7,3
CMC al 77,5%/ PEO al 22,5%, pH, 4,2, teñida	81,0 ± 6,2	7,0 ± 4,7	7,0 ± 4,7

Los datos se expresan como media ± desviación típica.

La película monocapa nº 627 aumentaba el número de animales que estaban libres de adherencias de 0 de 11 a 8 de 10. Este estudio demuestra que la película de CMC/PEO monocapa reduce sustancialmente la incidencia y la gravedad de la reformación de adherencias.

Ejemplo 23

Reactividad intracutánea de películas de CMC/PEO (Ejemplo de Referencia)

Introducción

El propósito de este ensayo era evaluar el potencial del material de ensayo para producir irritación después de inyecciones intracutáneas en conejos.

Métodos

1. Animales

Como los ejemplos anteriores, se usaron conejos New Zealand White para este estudio. El conejo es la especie que se requiere para la versión actual de la International Organization for Standardization. Se obtuvieron de Grimaud Farms of California, Stockton, CA. Se usaron tres animales hembra adultos y pesaban entre 2,2 y 2,3 kg cada una. Los animales se alojaron individualmente y se mantuvieron a 16-22°C y una humedad relativa del 50 ± 20%. Se alimentaron con Laboratory Rabbit Diet (aproximadamente 200 gramos por día) y agua *ad libitum* y tenían un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas encendida-12 horas apagada.

2. Preparación de muestras

Para el extracto de SCI, un tubo de vidrio estéril seco con tapón de rosca se rellenó con 20 ml de medio de extracción apropiado. Se cortaron en trozos dos muestras de película de adhesión gamma-irradiada (2,5 MRad) (ambas superficies expuestas) que medían 120 cm² de área de superficie total y después se añadieron al tubo. Un tubo estéril adicional se rellenó con el mismo volumen de medio para servir como blanco. Cada muestra y el blanco se extrajeron a 37°C durante 72 horas. Cada extracto se agitó vigorosamente antes de la retirada de las dosis de inyección para asegurar una distribución uniforme de la sustancia extraída.

3. Protocolo de inyección

El día del ensayo se retiró la piel del lomo de cada conejo a ambos lados de la columna vertebral. Una porción de 0,2 ml de uno de los extractos de muestra se inyectó por vía intracutánea en cada uno de cinco sitios a lo largo de un lado de la columna vertebral de cada uno de los tres conejos. Una porción de 0,2 ml del blanco correspondiente (solución salina solo) se inyectó por vía intracutánea en cinco sitios a lo largo del otro lado de la columna vertebral de cada uno de los tres conejos. Los sitios de inyección se observaron inmediatamente después de la inyección para eritema, formación de escaras, edema y necrosis y se puntuaron a las 24, 48 y 72 horas.

4. Evaluación de los resultados

Todos los animales se observaron diariamente para signos de enfermedad. Los lugares de inyección se examinaron y se puntuaron para cualquier reacción tisular, tal como eritema, formación de escaras, edema y necrosis a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Para cada animal, se añadieron por separado las puntuaciones de irritación individuales para tanto eritema como edema para cada extracto de ensayo en cada punto de tiempo y se dividieron por 10 (el número total de observaciones). Se realiza una evaluación similar de los lugares inyectados con el control. Después, se obtiene una puntuación de irritación primaria para cada punto de tiempo restando las puntuaciones de irritación medias para el control de las del material de ensayo.

ES 2 311 455 T3

Las puntuaciones de irritación primaria de cada animal se añaden después y se dividen por el número total de animales para obtener el índice de irritación primaria (PII). Después se determina la respuesta de irritación primaria al material de ensayo.

- 5 Los métodos usados para estos estudios son convencionales en la técnica y cumplen las normas para el NV SOP 16G-43, *Intracutaneous Reactivity Test (ISO)*, the AAMI Standards and Recommended Practices, Vol. 4; Biological Evaluation of Medical Devices (1997) págs. 255-256 y USP 23 [1995] págs. 1699 -1702.

TABLA 17

Sistema de clasificación para reacciones intracutáneas (intradérmicas)¹

Eritema y formación de escaras	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy ligero (casi imperceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a grave	3
De eritema grave (rojo remolacha) a ligera formación de escaras (lesiones en profundidad)	4
Formación de edema	Puntuación
Sin eritema	0
Eritema muy ligero (casi imperceptible)	1
Edema ligero (bordes del área bien definidos por aparición definitiva)	2
Edema moderado	3
Edema grave (alcanza más de 1 mm y se extiende más allá del área de exposición)	4
Puntuación posible total para la irritación	8

¹ Deberían registrarse e informarse de otros cambios adversos en los lugares de inyección.

TABLA 18

Categorías de respuesta de irritación primaria en conejos²

Categoría de respuesta	Puntuación media (PII)
Insignificante	de 0 a 0,4
Ligera	de 0,5 a 1,9
Moderada	de 2 a 4,9
Grave	de 5 a 8

² El índice irritación primaria (PII) se determina por adición de las puntuaciones de irritación primaria para cada animal y división de la puntuación total por el número de animales.

Resultados

Los animales permanecieron sanos durante todo el periodo de ensayo. En ninguno de los animales inyectados con solución salina se observó ninguna respuesta irritante. En sólo 5 de los 15 sitios inyectados con el material de ensayo se observó eritema y, cuando estaba presente, el eritema era muy ligero, teniendo una puntuación de 1. En ningún animal se observó edema después de la inyección del material de ensayo. Las puntuaciones de irritación primaria y los índices de irritación primaria se muestran en la Tabla 19. Los índices de irritación primaria (PII) del material de ensayo extraído en SCI eran de 0.

TABLA 19

Puntuaciones de irritación primaria e índice irritación primaria (SCI)

Número de conejo	Tiempo (horas)	Media de control	Media de ensayo	Puntuación de irritación primaria (media de ensayo - media de control)
1	24	0	0,1	0,1
	48	0	0,1	0,1
	72	0	0	0
2	24	0	0,1	0,1
	48	0	0	0
	72	0	0	0
3	24	0	0,2	0,2
	48	0	0,2	0,2
	72	0	0,1	0,1
Índice de irritación primaria			0,3	
(9 puntuaciones de irritación primaria/3 animales)				

Ejemplo 24

Efecto del número de películas implantadas macroscópicamente y por histopatología (Ejemplo de referencia)

Introducción

El propósito de este estudio era determinar el efecto de la colocación de 10 a 20 veces la dosis clínica esperada de películas de CMC/PEO de esta invención sobre el aspecto macroscópico y microscópico del hígado, riñón, vejiga, intestino, pared abdominal, corazón, pulmón y ovarios.

Métodos

1. Animales

Se adquirieron doce conejos New Zealand White hembra de 2,4-2,7 kg y se mantuvieron en cuarentena durante al menos 2 días antes del uso. Los conejos se alojaron en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 con alimento y agua disponibles *ad libitum*.

2. Materiales

Se implantaron quirúrgicamente películas de CMC/PEO gamma-irradiadas (2,5 MRad) de 55,2 cm² (10 x dosis esperada) o 110,7 cm² (20 x por la dosis esperada por conejo) en las cavidades peritoneales de conejos. Las suturas que se usaron para cerrar el peritoneo y la piel eran sutura recubierta Dexon II 3-0 (Davis y Geck, Manati, PR).

3. Modelo de pared lateral

Se indujeron adhesiones usando los mismos métodos que se han descrito anteriormente para el Ejemplo 21.

4. Evaluación de los descubrimientos

Después de 7 días, los conejos se sacrificaron. Se evaluaron los órganos abdominales macroscópicamente para cualquier lesión. El riñón, bazo, hígado, pulmón, corazón, intestino, pared abdominal y ovarios (además de cualquier órgano que se descubriera que tenía lesiones macroscópicas) se colocaron en formalina para su conservación y se prepararon para la evaluación histopatológica.

Resultados

Las películas de CMC/PEO prevenían la formación de adherencias en las paredes laterales lesionadas. Esto era coherente con los estudios anteriores descritos en los Ejemplos anteriores, que mostraban una eficacia máxima de esta barrera en el modelo de formación de adherencias en la pared lateral. No se señalaron lesiones macroscópicas tras la necrosia. Tras el examen microscópico de los tejidos recogidos de acuerdo con el protocolo, no se señalaron lesiones microscópicas. En el bazo, se observaron macrófagos con material ingerido en los dos grupos de animales que recibieron membranas de la invención. Esto era más pronunciado en los animales que recibían las mayores cantidades de películas. Esto refleja un mecanismo de eliminación biológica para las membranas de CMC/PEO en este momento post-operatorio.

Ejemplo 25

Efectos de membranas de CMC/PEO sobre la formación de abscesos en ratas (Ejemplo de Referencia)

Introducción

Se usó un modelo de resistencia de hospedador para determinar si la implantación de películas de CMC/PEO de esta invención, al mismo tiempo que una inoculación bacteriana, afectaba a la mortalidad y a la formación de abscesos como resultado de la infección. El propósito de este ensayo era determinar si existía un riesgo aumentado asociado con el uso de este producto en la potenciación de la infección.

Métodos

1. Animales

Se usaron noventa ratas Sprague Dawley hembra de 175 a 225 g para este estudio. Se usaron diez ratas para producir material fecal. Se usaron veinte ratas para evaluar la DL_{10} y la DL_{50} del nuevo lote de material y se usaron sesenta ratas para el estudio de seguridad. Las ratas se aclimataron al menos 2 días antes de la cirugía. Las ratas se alojaron en el animalario de la USC (una instalación certificada/acreditada por la AALAC) en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas. El alimento y el agua estaban disponibles *ad libitum* excepto en el intervalo post-operatorio inmediato.

2. Preparación de cápsulas de gelatina

Se recogió contenido fecal y heces de ratas que se habían alimentado con hamburguesas durante 2 semanas y se mezclaron 1:1 con caldo de peptona-extracto de levadura-glucosa estéril que no contenía conservantes (Scott Laboratories) y sulfato de bario al 10%. La cantidad de esta preparación fecal que causaba mortalidad en del 0 al 20% de las ratas ($25 \mu\text{l}$ - DL_{10}) o del 40 al 60% de las ratas ($75 \mu\text{l}$ - DL_{50}) se determinó en 20 ratas. La cantidad apropiada de material se añadió asépticamente a una cápsula de gelatina (Number 1, Eli Lilly Company). Esta cápsula se colocó después en una segunda cápsula de mayor tamaño (Number 00, Eli Lilly Company). A esta se hace referencia como una cápsula de gelatina de doble pared. Las cápsulas se prepararon 1 semana antes de la implantación y se conservaron en condiciones de congelación bajo cuarentena hasta el día de la cirugía.

3. Preparación de película

Se cortaron películas de CMC/PEO gamma-irradiadas (2,5 MRad) en un trozo de 1,5 cm x 1,5 cm para cada rata.

4. Implantación de cápsulas de gelatina

Las ratas se sometieron a un procedimiento estandarizado de laparotomía (anestesia intramuscular con ketamina/rompum, afeitado con maquinillas para animales, restregado con betadine y restregado con alcohol). Después se realizó una incisión de 2 cm en la línea media. Se colocó una cápsula de gelatina de doble pared en el lado derecho del abdomen a través de la incisión. En los animales de control, no se administró ningún tratamiento adicional. En los animales tratados con cápsulas de gelatina que contenían CMC y PEO, la cápsula se colocó en el lado izquierdo del abdomen entre el peritoneo visceral y parietal.

Se estudiaron cuatro grupos de 15 animales cada uno, recibiendo dos grupos de control una DL_{10} y una DL_{50} , respectivamente, y recibiendo dos grupos una DL_{10} o una DL_{50} y un dispositivo implantado que contenía CMC y PEO. La pared abdominal y la piel se suturaron después para cerrarlas, usando dos capas de sutura Ethicon 4-0. Después de la cirugía, las ratas recibieron un analgésico durante 3 días y se observaron dos veces al día para signos de morbilidad/mortalidad.

5. Necropsia

A las ratas que murieron durante el periodo de observación post-operatorio de 11 días se les realizó una necropsia para confirmar la presencia de una infección bacteriana aguda. Las ratas que sobrevivieron a la infección inicial aguda se sacrificaron el día 11 después de la cirugía. Cada rata se examinó para determinar la presencia de cualquier absceso abdominal palpado a través de la piel, olor a la apertura y esplenomegalia. Además, se examinaron cuatro áreas del peritoneo para determinar la formación de abscesos. Estas áreas incluían el hígado, la pared de abdominal, el intestino y el omento. Los abscesos se puntuaron en cada sitio de la forma siguiente:

Puntuación	Descripción
0	Sin abscesos presentes en el sitio
0,5	Un absceso muy pequeño presente en el sitio
1	Varios abscesos pequeños en el sitio
2	Un absceso medio presente en el sitio
3	Abscesos grandes o varios medios presentes en el sitio
4	Un absceso muy grande o varios abscesos grandes presentes en el sitio

La puntuación se realizó de una forma ciega para dos observadores distintos y se registraron las puntuaciones.

Resultados

La administración del material de CMC/PEO al mismo tiempo que el inicio de la peritonitis bacteriana no afectó a la supervivencia de las ratas después de la infección. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 20 a continuación. Para el grupo que recibía una DL50, sobrevivieron 9 de 15, y para el grupo que recibía una DL10, sobrevivieron 13 de 15.

TABLA 20

Formación de abscesos en animales de control y animales que reciben mezclas de CMC/PEO

Grupo	Hígado	Pared abdominal	Intestino	Omento	Total
Control DL50	1,66	1,22	1,55	1,77	6,22
CMC/PEO DL50	0,77	1,55	1,0	2,33	5,66
Control DL10	0,54	1,78	0,46	0,85	3,6
CMC/PEO DL10	0,92	1,38	0,78	0,54	3,62

En general, los animales que recibían la mayor dosis de bacterias causantes de abscesos tenían una mayor incidencia de formación de abscesos que los animales que recibían la dosis menor. La mezcla de CMC/PEO no causó ningún cambio en la formación de abscesos en animales que recibían cualquiera de las dosis de bacterias.

Ejemplo 26

Propiedades de contacto con superficies y sangre de películas de CMC/PEO (Ejemplo de referencia)

Introducción

El propósito de estudio era determinar si las membranas de CMC/PEO de esta invención tenían propiedades antitrombogénicas. Se mezcló CMC (700 kd) y PEO (4,4 Md) y la mezcla se moldeó en películas finas. Las películas bicapa tenían aproximadamente el mismo grosor que las películas monocapa. Además, para las películas bicapa, las diferentes capas tenían aproximadamente la misma masa. Las películas se evaluaron para las propiedades de compatibilidad con superficies y sangre. Se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA), análisis del tiempo de adhesión y activación de plaquetas y de recalcificación del plasma (formación de coágulos de fibrina) en estas muestras de películas. La película A era una película bicapa no irradiada que tenía CMC al 95%/PEO al 5% en el lado 1, y CMC al 60% y PEO al 40% en el lado 2. La película B era idéntica

a la película A excepto por que no se había irradiado. Las películas C y D eran películas monocapa que tenían CMC al 77,5% y PEO al 22,5%, no irradiadas e irradiadas, respectivamente. La película E es una película de control hecha de CMC al 100% y estaba irradiada.

5 Métodos

1. Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la morfología de la superficie y de secciones transversales de las películas en el Electron Microscopy Center en Northeastern University, Boston, MA. Las muestras de película se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se golpearon para obtener un corte limpio para observar la sección transversal. Las muestras se montaron en un soporte de muestras de aluminio y recubierto por bombardeo con una película fina de oro y paladio. Las muestras de películas se observaron con un microscopio electrónico de barrido AMR-1000 (Amray Instruments, Bedford, MA) a una distancia de trabajo de 100 mm y un voltaje de aceleración de 10 kV. Los aumentos originales de imágenes de superficie y de secciones transversales de películas eran de 5.000 X y 2.000 X, respectivamente.

2. Espectroscopía electrónica para análisis químico

La espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA) es una técnica analítica de superficie que determina la composición elemental y mapea los grupos funcionales en la superficie hasta una capa de 100 Å de grosor. La técnica es útil para determinar la presencia superficial de PEO en las membranas de CMC/PEO (véase B. D. Ratner *et al.*, *Surface Studies by ESCA on Polymers for Biomedical Applications*. En: W. J. Feast y H. S. Munron (eds) *Polymer Surfaces and Interfaces*. John Wiley and Sons, Nueva York, NY págs. 231-251 (1987). La ESCA se realizó en el National ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems (NESAC/BIO) y el análisis se realizó en el centro. Las muestras de películas se analizaron mediante un instrumento de ESCA Surface Science Instruments (SSI, Mountain View, CA) equipado con una fuente de rayos X de aluminio $K_{\alpha 1,2}$. La presión típica en la cámara de muestra durante la captura del espectro era de 10^{-9} Torr. Se usó un programa informático de análisis de datos SSI para calcular las composiciones elementales de superficie de carbono (C1s) y oxígeno (O1s) a partir del análisis de barrido amplio y las áreas máximas. También se realizó un análisis de alta resolución por ajuste de picos para determinar la identidad de grupos funcionales químicos con el programa informático SSI. Se usó una pistola de torrente de electrones ajustada a 5,0 eV para minimizar la carga de superficie. La escala de energía de unión se referenció por ajuste del pico máximo de -C-H-(hidrocarburo) en el espectro de C1s a 285,0 eV.

3. Adhesión y activación de plaquetas

Se realizó una medición de la adhesión y activación de plaquetas como se ha descrito anteriormente (M. Amiji, *Permeability and Blood Compatibility Properties of Chitosan-Poly(ethylene oxide) Blend Membranes for Hemodialysis*. *Biomaterials* 16: 593-599 (1995), M. Amiji. *Surface Modification of Chitosan Membranes by Complexation-interpenetration of Anionic Polysaccharides for Improved Blood Compatibility in Hemodialysis*. *J. Biomat. Sci. Polym. Edn.* 8: 281-298 (1996). En resumen, se ensambló una cámara de observación de plaquetas que consistía en un portaobjetos de vidrio limpio recubierto por una película, dos espaciadores de polietileno y una cubreobjetos de vidrio. Se recogió sangre humana obtenida de voluntarios adultos sanos después del consentimiento informado en recipientes al vacío que contenían heparina (Vacutainers®, Becton-Dickinson, Rutherford, NJ). Se centrifugó la sangre heparinizada a 100 g durante 10 minutos para obtener plasma rico en plaquetas (PRP).

Se instilaron doscientos μ l de PRP en la cámara de observación de plaquetas. Se dejó que las plaquetas del PRP se adhirieran y activaran sobre las superficies poliméricas durante 1 h a temperatura ambiente. Se eliminaron las plaquetas no adherentes y las proteínas plasmáticas por lavado de la cámara con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Las plaquetas adherentes se fijaron con una solución de glutraldehído al 2,0% (p/v) en PBS durante 1 h. Después del lavado con PBS, las plaquetas se tiñeron con solución colorante de azul brillante de Coomassie al 0,1% (p/v) (Bio-Rad, Hercules, CA) durante 1,5 h. Las plaquetas teñidas se observaron usando un microscopio de luz Nikon Labophot® II (Melville, NY) a 40X aumentos. La imagen de plaquetas adherentes se transfirió a un monitor de vídeo Sony Trinitron® usando una cámara Hamamatsu CCD® (Hamamatsu-City, Japón). El procesador de imágenes de Hamamatsu Argus-10® se usó para calcular el número de plaquetas por $25.000 \mu\text{m}^2$ de área superficial en cada campo de observación. Los datos indican el número medio de plaquetas adherentes $\pm$ D. T. de al menos doce campos de observación y dos experimentos independientes.

El grado de activación de plaquetas se determinó cualitativamente a partir del comportamiento de extensión de plaquetas adherentes, como se ha descrito anteriormente en la Tabla 10.

4. Tiempo de recalcificación del plasma

El tiempo de recalcificación del plasma mide la longitud de tiempo necesaria para la formación coágulos de fibrina en plasma tratado con citrato que contiene calcio que está en contacto con la superficie de interés. Es un marcador útil de la reacción de coagulación intrínseca. Se recogió sangre humana en recipientes al vacío (Vacutainers, Becton-Dickinson) en presencia de tampón citrato sódico como anticoagulante. La sangre tratada con citrato se centrifugó a

2.500 g durante 20 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas. Se cortaron secciones circulares (de 20 mm de diámetro) de las películas de control y de CMC-PEO con ayuda de un bisturí afilado. Las secciones de película se colocaron en microplacas de poliestireno de cultivo de tejidos de 12 pocillos (TCP, Falcon®, Becton-Dickinson) y se hidrataron con 2,0 ml de PBS durante 10 minutos. El exceso de PBS se eliminó por succión.

El tiempo de recalcificación del plasma de plasma tratado con citrato en contacto con películas de control y de mezcla de CMC-PEO se midió de acuerdo con el procedimiento descrito por Brown (Brown, *Hematology: Principles and Procedures*. Sexta Edición. Lea y Febioger, Philadelphia, PA. 1993, pág. 218). En resumen, se mezcló 1,0 ml de plasma tratado con citrato con 0,5 ml de cloruro de calcio 0,05 M y se incubó con muestras de películas hidratadas en un baño de agua a 37°C. Las muestras se retiraron ocasionalmente del baño de agua y se agitaron suavemente. Se registró el tiempo necesario para la formación de coágulos de fibrina. Los datos indican el promedio del tiempo de recalcificación del plasma $\pm$ D. T. de cuatro experimentos independientes.

Resultados

1. Análisis de SEM

Las Figuras 14-20 son imágenes de SEM de la superficie y de secciones transversales de las 7 muestras de películas (A a E) con los aumentos originales de 5.000 X (superficie) y 2.000 X (sección transversal). La imagen en la Figura 14a (película A, lado 1; CMC al 95%/PEO al 5%; irradiada) es de una membrana bicapa y muestra una porción de la superficie del lado 1 que tiene muescas evidentes. Estas muescas pueden deberse a la incorporación de PEO, aunque no se pretende limitar la invención a esta teoría particular. Otras teorías pueden explicar las observaciones. La imagen de sección transversal (Figura 14b) muestra límites claros entre los dos lados de la película laminada. El lado superior de la película, que se muestra en la esquina superior izquierda de la Figura 14b (CMC al 95%/PEO al 5%) es relativamente suave en comparación con el otro lado, que se muestra en la esquina inferior derecha de la Figura 14b.

La imagen en la Figura 15a (película A, lado 2; CMC al 60%/PEO al 40%; irradiada) muestra “irregularidades” que pueden deberse a la elevada concentración de PEO en este lado de la película bicapa. La imagen de sección transversal (Figura 15b) muestra el lado 2 en la porción superior de la fotografía. La imagen muestra una estructura más “esponjosa” o porosa en la parte superior de la fotografía, que puede deberse a la incorporación de PEO. En estas películas, las cadenas de PEO se mezclan homogéneamente y los componentes de las películas no se separan en distintas fases.

Por el contrario, las imágenes en las Figuras 16 y 17 (muestras B, lados 1 y 2, respectivamente), eran de una película idéntica a la película A, excepto por que no se irradiaba. La Figura 16a muestra el lado 1 (CMC al 95%/PEO al 5%) y la 16b muestra una sección transversal de la película, con el lado inferior a la derecha de la fotografía siendo el lado 1 y la porción superior siendo el lado 2 (CMC al 60%/PEO al 40%). No había diferencias significativas en las morfologías de la superficie y de la sección transversal de estas películas en comparación con sus homólogos irradiados. Todas las películas bicapa mostraban zonas de separación diferentes que contenían un contenido de PEO bajo (5%) y alto (40%).

La Figura 17a muestra el lado 2 de la muestra (CMC al 60%/PEO al 40%; no irradiada) en una vista superior de la superficie. La Figura 17b muestra una sección transversal de la película B. La porción inferior derecha de la fotografía es el lado 1 (CMC al 95%/PEO al 5%) y la superior izquierda muestra el lado 2 (CMC al 60%/PEO al 40%).

Las Figuras 18 y 19 (películas C y D, respectivamente) son imágenes de películas preparadas por formulación de CMC y PEO a una proporción en peso de 77,5:22,5. La película C (Figura 18) se irradió mientras que la muestra D (Figura 19) no se irradió. En la Figura 18a, la imagen de superficie muestra “granos” que se distribuyeron sobre la superficie de la película. Estos “granos” podían deberse a fugas de algo de PEO a la superficie. Una imagen de la sección transversal (Figura 18b) mostraba una película “esponjosa” o porosa.

La Figura 19a también mostraba granos en la superficie. La imagen de la sección transversal en la Figura 19b muestra una película esponjosa. Como con la película bicapa A, la irradiación gamma no tenía un efecto significativo sobre la morfología de la película C mezclada.

La Figura 20 (película E) es de una película de CMC al 100% que se gamma-irradió. La superficie (Figura 20a) y la sección transversal (Figura 20b) de esta película eran suaves. La suavidad de la superficie y de la sección transversal de la película E podían deberse a la elevada cristalinidad de la película de CMC. Los materiales altamente cristalinos pueden formar películas sin porosidad. Sin embargo, otros mecanismos pueden ser responsables de la suavidad de esta película.

2. Análisis químico de la superficie

El ESCA proporciona la composición elemental de superficie y la identidad de los grupos funcionales químicos de una capa superficial de hasta 100 Å de grosor. El análisis de barrido amplio mapea la composición elemental de acuerdo con sus energías de unión respectivas en el espectro. Por ejemplo, el carbono (C) puede tener una energía de unión de aproximadamente 280-290 eV. El análisis de alta resolución del espectro elemental puede proporcionar

información adicional sobre los grupos funcionales asociados con el elemento de interés. En el espectro de C1s, la funcionalidad de -C-H- (o hidrocarburo) puede asociarse con la energía de unión de 285,0 eV. La funcionalidad de -C-O- (éter), por otro lado, puede asociarse con una energía de unión de 286,4 eV (M. Amiji, *Synthesis of Anionic Poly(ethylene glycol) Derivative for Chitosan Surface Modification in Blood-Contacting Applications*. *Carbohydr. Polym.* 32: 193-199 (1997). Debido a que los restos de óxido de etileno del PEO tienen funcionalidad -C-O-, cualquier cambio en el aspecto de alta resolución puede indicar un aumento en la composición de -C-O- debido a la presencia de cadenas de PEO sobre la superficie de la película. Esto podría corresponderse con el aumento en la accesibilidad a la superficie de cadenas de PEO. La accesibilidad a la superficie de cadenas de PEO puede ser importante para prevenir la adsorción de proteínas plasmáticas y la adhesión y activación de plaquetas. Una teoría para explicar estas observaciones es que el PEO impide la adsorción de proteínas plasmáticas a través de un mecanismo de repulsión estérica (M. Amiji, *Surface Modification of Polymeric Biomaterials with Poly(ethylene oxide), Albumin, and Heparin for Reduced Thrombogenicity*. En S. L. Cooper, C.H. Bamford y T. Tsuruta (eds.) *Polymer Biomaterials: In Solution, as Interfaces and as Solids*. VSP, Países Bajos, 1995, págs. 535-552; M. Amiji *et al.* *Surface Modification Polymeric Biomaterials with Poly(ethylene oxide): A Steric Repulsion Approach*. En S.W. Shalaby, Y. Ikada, R. Langer y J. Williams (eds.) *Polymers of Biological and Biomedical Significance*, ACS Symposium Series Publication, Volumen 540. American Chemical Society, Washington, DC. 1994, págs. 135-146. Sin embargo, es posible que otras teorías puedan explicar los efectos antitrombogénicos de las membranas de esta invención y las otras teorías también se consideran parte de esta invención.

Los resultados del análisis de superficie de las películas de control y de CMC-PEO descritas anteriormente en las Figuras 14-20 se representan en la Tabla 21.

TABLA 21

Composición elemental de superficie de películas de CMC y CMC/PEO^a

Muestra	Composición Elemental en Porcentaje					
	C	O	N	Na	Cl	Proporción C:O
A lado 1	59,3	27,8	7,0	4,4	1,6	2,1
A lado 2	64,6	33,3	-	1,3	0,7	1,94
B lado 1	56,6	17,0	-	12,9	13,5	3,33
B lado 2	66,3	32,5	-	0,9	0,4	2,04
C	65,7	33,5	-	0,8	-	1,96
D	61,4	17,5	0,9	10,1	10,1	3,51
E	69,3	17,4	-	7,7	7,7	3,98

^aEl ESCA se realizó en el Nacional ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems (NESAC/BIO) en la University of Washington (Seattle, WA).

La Tabla 21 muestra que estaban presentes Na y Cl en casi todas las películas. En las películas B y D no irradiadas, la contribución de Na y Cl era significativamente superior que en las películas A y C irradiadas. La presencia de N en algunas películas puede indicar contaminación, por el hecho de que el nitrógeno normalmente no está presente en las películas. Las proteínas y otras impurezas que contienen nitrógeno en la película pueden ser una fuente de nitrógeno. Un aumento en la composición de O se señalaba en el lado 2 de las películas A y B y en la película C. Esto podía deberse a la elevada concentración de PEO en estas muestras (40%) en comparación con el lado 1 de las películas A y B (solamente el 5% de PEO).

La película D (CMC al 77,5%/PEO al 22,5%; no irradiada) mostraba la presencia de Na y Cl. La presencia de Na y Cl puede distorsionar el porcentaje de contribución de otros elementos, especialmente C y O. Por lo tanto, la falta de un elevado pico de O en la película D no se debe a una baja cantidad de O en la película, sino que probablemente es un artefacto de la presencia de Cl en esta muestra.

La película de CMC al 100% (película E) tenía C al 69,3%, O al 17,4%, Na al 7,7% y Cl al 5,6%. El elevado porcentaje de C y el correspondiente bajo porcentaje de O en este espectro significa que la elevada cantidad de O en las otras películas puede deberse a la presencia de PEO.

Para determinar los tipos de enlaces presentes en las diferentes películas, se realizaron análisis de espectros de C1s, O1s y N1s de alta resolución mediante ajuste de picos de los picos de barrido amplio (Tabla 22).

Tabla 22 Análisis de enlaces químicos de ESCA de películas de control y de CMC/PEO						
Muestra	Intensidad relativa del pico (%)					
	C1s		O1s			N1s
Película	-C-H (285 eV)	-C-O- (286,4 eV)	-C=O (288 eV)	-O=C- (531,5 eV)	-O-C- (533 eV)	-N-H (399,6 eV)
A, lado 1	42	42	13	18	82	10
A, lado 2	-	100	-	-	100	-
B, lado 1	65	26	6	18	82	-
B, lado 2	-	100	-	-	100	-
C	-	100	-	-	100	-
D	-	100	-	-	100	100
E	70	21	6	27	73	-

Como se muestra en la Tabla 22, para la película A, el lado 1 (CMC al 95%/PEO al 5%), el 42% de carbono estaba unido a hidrógeno (-C-H) u otros átomos de carbono (-C-C-), el 42% estaba unido a oxígeno (-C-O-) y el 13% presentaba un doble enlace con oxígeno (-C=O). La presencia de restos unidos a carbono de éter (-C-O-) en un porcentaje mayor que el observado para la película de CMC al 100% (película E) indicaba que había restos de óxido de etileno en estas superficies. El pico de carboxilo (-C=O-) al 13% puede deberse a los grupos de ácido carboxílico neutralizados de la CMC. El pico O1s de la película A, el lado 1 se resolvía en dos picos asociados con los grupos funcionales -O=C- y -O-C-.

El espectro de N1s, debido a la probable contaminación de la película A, lado 1 por proteínas puede deberse a grupos funcionales -N-H-. La presencia de PEO en la superficie de la película A, lado 2 (60:40, CMC-PEO) se confirmaba por la presencia de un pico de C1s que puede deberse a los enlaces de carbono de éter (C-O). Además, el análisis de O1s también demostraba que había un porcentaje mayor de enlaces de -O-C- en el lado 2 en comparación con el lado 1. El lado 2 de las películas A y B tenía perfiles de enlaces de superficie similares. No había diferencias significativas en la estructura de enlaces de superficie de películas irradiadas frente a no irradiadas.

Los espectros de C1s y O1s de la películas C y la película monocapa D (CMC al 77,5%/PEO al 22,5%) también se asociaban con enlaces -C-O- o -O-C-, indicando cadenas de PEO en la superficie de las películas. Los espectros de N1s observados para la película D se debían a contaminación por proteínas, que aparecían como grupos funcionales -N-H-. En la película de CMC al 100% de control (película E) el 70% de la envoltura C1s se debía a grupos -C-H-, el 21% se debía a grupos -C-O- y el 6% era debido a grupos -C=O-. Además, el pico de O1s se resolvía en dos picos, que tenían el 27% de -O=C- y el 73% de -O-C-.

Los resultados mostraban que había PEO en la superficie de estas películas. La concentración de PEO en la superficie aumentaba con una concentración de PEO creciente en la composición de la película. Además, no había diferencias significativas en la composición elemental de superficie o en los tipos de grupos funcionales debido a la radiación.

3. Adhesión y activación de plaquetas

La adhesión y la activación de plaquetas es un indicador importante de las interacciones sangre-biomateriales (Hoffman. *Blood-Biomaterial Interactions: An Overview*. En S. L. Copper y N. A. Peppas (eds.). *Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications*. Volumen: 199. American Chemical Society, Washington, DC. 1982, págs. 3-8, incorporado en la presente memoria completamente como referencia). El número inicial de plaquetas adherentes y grado de activación plaquetaria en la superficie del biomaterial se correlaciona con el perfil de compatibilidad con la sangre a largo plazo potencial (Baier *et al.*, *Human Platelet Spreading on Substrata of Known Surface Chemistry*. J. Biomed. Mater. Res. 19: 1157-1167 (1985)). Cuando están en contacto con superficies poliméricas, las plaquetas inicialmente retienen su morfología discoidea presente en el estado restante y el área de extensión es típicamente entre 10-15 μm^2 . Tras la activación, las plaquetas extienden sus pseudópodos e inician la liberación del contenido granular.

Durante la fase de activación parcial, el área de la extensión de plaquetas puede aumentar hasta aproximadamente $35 \mu\text{m}^2$. Cuando las plaquetas están completamente activadas, retraen los pseudópodos para formar una morfología circular o de “torta” y el área extendida aumenta hasta 45 o $50 \mu\text{m}^2$ (Park *et al.* *Morphological Characterization of Surface-Induced Platelet Activation. Biomaterials* 11: 24-31 (1990)). Los perfiles de extensión de plaquetas activadas se usaron para generar cinco fases de activación, como se describe en Lin *et al.* (Lin *et al.* *Polyethylene Surface Sulfonation: Surface Characterization and Platelet Adhesion Studies. J. Coll. Interface. Sci.* 164: 99-106 (1994)). El vidrio limpio promueve la adhesión y activación de plaquetas (Park *et al.* *The Minimum Surface Fibrinogen Concentration Necessary for Platelet Activation on Dimethyldichlorosilane-Coated Glass. J. Biomed. Mater. Res.* 25: 407-420 (1991)).

El grado de adhesión de plaquetas se determinó por recuento de número de plaquetas por $25.000 \mu\text{m}^2$ de área superficial. La activación de plaquetas inducida por superficies se midió cualitativamente a partir del comportamiento de extensión de plaquetas adherentes, como se muestra en la Tabla 23.

TABLA 23

Adherencia y activación de plaquetas por películas de control y de CMC/PEO^a

Película	Número de plaquetas/ $25.000 \mu\text{m}^2$	Grado de activación
Vidrio	$157,3 \pm 19,6^b$	$4,8 \pm 0,3$
A, lado 1	$26,0 \pm 5,4$	$2,2 \pm 0,1$
A, lado 2	$6,2 \pm 2,2$	$1,2 \pm 0,4$
B, lado 1	$27,9 \pm 7,3$	$2,4 \pm 0,3$
B, lado 2	$6,0 \pm 2,9$	$1,2 \pm 0,1$
C	$3,5 \pm 1,7$	$1,0 \pm 0,0$
D	$3,4 \pm 1,1$	$1,0 \pm 0,0$
E	$62,8 \pm 12,4$	$3,6 \pm 0,4$

Como se muestra en la Tabla 23, las plaquetas se adherían a la superficie de vidrio y se activaban. No obstante, las plaquetas no se adherían en un número tan elevado a membranas de CMC/PEO, y no se activaban en el mismo grado que por el vidrio. El grado de adherencia y de activación estaba inversamente relacionado con la concentración de PEO. Por lo tanto, el aumento de la cantidad de PEO disminuía tanto la adherencia plaquetaria como la activación plaquetaria. Además, por comparación de las películas A y C (irradiadas) con las películas B y D (no irradiadas) no había efectos de la radiación gamma sobre la adhesión y la activación de plaquetas.

A partir de los estudios de adhesión y de activación de plaquetas, el aumento de PEO de superficie se correlacionaba con una adherencia y activación de plaquetas reducida. En base a estas observaciones, las membranas de CMC/PEO con elevado contenido de PEO son relativamente no trombogénicas.

4. Tiempo de recalcificación del plasma

El tiempo de recalcificación del plasma es una medida del mecanismo de coagulación intrínseco (Renaud, *The recalcification plasma clotting time. A valuable general clotting test in man and rats. Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47: 689-693 (1969), incorporado en la presente memoria en su totalidad como referencia). Puesto que el tiempo necesario para la activación por contacto del plasma varía con el tipo de superficie, el tiempo de recalcificación del plasma se usa como un indicador de la compatibilidad sanguínea de biomateriales (Rodees *et al.*, Plasma recalcification as a measure of the contact phase activation and heparinization efficacy alter contact with biomaterials. *Biomaterials* 15: 35-37 (1994)). El tiempo de recalcificación del plasma se determinó usando los métodos de Rodees *et al.*, citados anteriormente. Se generaron superficies de poliestireno para cultivo de tejidos (TCP) por tratamiento de microplacas de poliestireno con plasma oxigenado para convertir la superficie hidrófoba en una hidrófila. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 24.

TABLA 24

Tiempo de recalcificación para plasma en contacto con películas de control y de CMC-PEO^a

Película	Tiempo de recalcificación del plasma (minutos)
TCP de Control ^b	6,3 ± 0,2 ^c
A, lado 1	13,9 ± 0,6
A, lado 2	17,8 ± 0,5
B, lado 1	13,5 ± 0,9
B, lado 2	17,8 ± 0,6
C	15,3 ± 0,8
D	15,1 ± 0,5
E	5,6 ± 0,3

^aEl tiempo necesario para la formación de coágulos de fibrina con plasma humano tratado con citrato que contenía calcio se midió en minutos.

^bSe usaron microplacas de 12 pocillos de poliestireno para cultivo de tejidos (TCP) como control.

^cMedia ± D. T. (n = 4).

El tiempo de activación por contacto sobre TCP era de aproximadamente 6,3 minutos y sobre CMC al 100% (película E) era de aproximadamente 5,6 minutos. Esto es similar al tiempo de activación por contacto previamente encontrado para superficies de vidrio limpias. Al contrario, los tiempos de recalcificación del plasma sobre películas que contienen PEO (muestras A-D) eran significativamente superiores a los de superficies de TCP o CMC de control. El tiempo de recalcificación estaba correlacionado con el contenido de PEO aumentado de la película, dando como resultado un PEO aumentado un tiempo de recalcificación aumentado. Por lo tanto, la activación por contacto del plasma se reducía sustancialmente para membranas con cantidades aumentadas de PEO.

Conclusiones

Las películas que contenían cantidades aumentadas de PEO sobre sus superficies eran antitrombogénicas y pueden impedir la formación de coágulos de fibrina sobre las superficies de las películas. Los efectos antitrombogénicos dependen de la cantidad de PEO. Por lo tanto, la fabricación de películas que tengan una concentración de PEO aumentada puede disminuir la trombogenicidad.

Ejemplo 27

Capacidad de biorresorción de membranas de CMC/PEO (Ejemplo de referencia)

La capacidad de biorresorción de membranas de CMC/PEO se determina por realización de incisiones quirúrgicas en las extremidades posteriores de ratas y colocación de una porción de una membrana de CMC/PEO en una capa muscular. Se insertan varias membranas de diferente composición o grado de reticulación en cada animal, después de lo cual se cierran las incisiones. Se usará un número suficiente de animales para cada tipo de membrana que se vaya a evaluar. Posteriormente, los animales se sacrifican diariamente, las incisiones se vuelven a abrir y las membranas restantes se observan para determinar el grado de estado intacto y sus localizaciones. Las membranas se retiraron, se secaron para eliminar el exceso de agua, se pesaron mientras estaban húmedas, se secaron otra vez y se volvieron a pesar. Las cantidades de fluido absorbido, de sólidos restantes y el aspecto de las membranas se anotaron. Se realizan comparaciones entre la longitud de tiempo *in situ*, la localización tisular, la composición de membrana, el acondicionamiento previo a la inserción y la capacidad de resorción. Las membranas de la presente invención se confeccionan para tener un grado deseado de capacidad de biorresorción.

Ejemplo 28

Fabricación de un gel asociado con ión hierro al 30%

5 En una realización de un gel iónicamente reticulado de esta invención, para preparar un gel que tenía proporciones de sólidos del 2% p/v y CMC al 95%/PEO al 5%, se midieron 9,5 g de CMC en polvo seca ($ds = 0,82$) y se mezcló con 0,5 g de PEO en polvo seco ($PM = 8.000$ d). Después se preparó un vaso de precipitados con 500 ml de agua desionizada y 3,2 ml de una solución al 25,2% p/v de $FeCl_2 \cdot 6H_2O$. La mezcla de CMC/PEO en polvo seca se añadió después lentamente al vaso de precipitados que contenía la solución de cloruro de hierro/agua mientras que la solución se agitaba a alta velocidad. Una vez que los componentes secos se mezclaron en la solución, la velocidad de agitación se redujo y el gel se mezcló durante 30-50 minutos, mediante los que se logró la homogeneidad.

Después se ajustó la osmolaridad a un valor fisiológicamente aceptable de aproximadamente 300 mmol/kg por adición de aproximadamente 13 ml de una solución de NaCl al 30% p/v y mezcla adicional del gel. Después de otros 15 minutos de mezcla, el pH del gel se ajustó a 7,0 por adición de NH_4OH 1,7 N. Después el gel se esterilizó en un autoclave durante 15 minutos a 250°C.

Ejemplo 29

20 *Fabricación de un gel asociado con ión aluminio al 30%*

Para preparar un gel reticulado con aluminio (Al^{3+}), se llevó a cabo el procedimiento idéntico al que se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 28, excepto por que en lugar de añadir una solución que contiene hierro se añadieron 3,2 ml de una solución madre de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ al 22,5% p/v. Como con el gel reticulado con hierro, el pH del gel final se ajustó a 7,0 usando NH_4OH a 1,7 N. El gel se esterilizó después en un autoclave durante 15 minutos a 250°C.

Ejemplo 30

Fabricación de un gel asociado con ión calcio al 30%

30 Para preparar un gel reticulado con calcio (Al^{2+}), se llevó a cabo el procedimiento idéntico al que se ha descrito anteriormente para los Ejemplos 28 y 29, excepto por que en lugar de añadir una solución que contenía hierro o aluminio se añadieron 3,2 ml de una solución madre de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 20,6% p/v. Los geles asociados con ión calcio no requerían ningún ajuste del pH después de su fabricación. El gel se esterilizó después en un autoclave durante 15 minutos a 250°C.

Ejemplo 31

Viscosidad de geles de CMC/PEO asociados con iones

40 Después de su fabricación, los geles se equilibraron a 25°C en un baño de agua. La medición de la viscosidad del gel se realizó usando métodos convencionales. Se determinó la viscosidad de soluciones de CMC (7 HF, 700 kd)/PEO al 25°C usando un viscosímetro (Brookfield Digital Viscometer, Modelo DV-II) usando las directrices publicadas en el folleto *Cellulose Gum*, Hercules Inc., Wilmington, DE, página 28 (1986), incorporado en la presente memoria en su totalidad como referencia. En resumen, la composición de la solución a ensayar se seleccionó y por referencia con la Tabla XI de la página 29 de *Cellulose Gum*, se seleccionó el número de eje y la velocidad de rotación del eje. Las mediciones de viscosidad realizadas en geles no autoclavados se realizaron a las 2 horas después de la agitación de la solución. Las mediciones de viscosidad realizadas en geles autoclavados se realizaron después del equilibrado a 25°C. Después de colocar el eje en contacto con la solución y permitir que el eje gire durante 3 minutos, la medición de viscosidad se lee directamente en centipoise.

La Figura 21 es un gráfico que representa las relaciones entre la proporción de CMC/PEO, el peso molecular del PEO y la viscosidad para geles asociados con ión Fe^{3+} al 35% no autoclavados. Las tres curvas de la parte superior representan los datos obtenidos para geles que tienen un contenido de sólidos totales del 2,5% pero preparados con PEO que tiene diferentes pesos moleculares, como se indica. La curva inferior representa los datos obtenidos para geles que tienen un contenido de sólidos totales del 1,5%.

Las viscosidades de los geles variaban de aproximadamente 10.000 centipoise (cps) a aproximadamente 510.000 cps. El aumento del porcentaje de CMC aumentaba la viscosidad para cada tipo de formulación de gel estudiada, hasta un porcentaje de CMC de aproximadamente el 97%. Para geles que tenían un contenido de sólidos del 2,5%, los efectos de la reticulación sobre las viscosidades eran mayores que los efectos observados para los geles que tenían un contenido de sólidos del 1,5%. Sin embargo, se observó inesperadamente que el aumento del contenido de CMC hasta el 100% daba como resultado una disminución en la viscosidad para todos los tipos de geles estudiados. La viscosidad máxima lograda para cada tipo de gel se obtenía a un contenido en peso de PEO relativamente bajo, es decir, CMC de aproximadamente 97% (en peso; o del 88% por proporción en moles unitaria). Sin embargo, a medida que se eliminaba el PEO de la composición de gel, la viscosidad disminuía inesperadamente. Por lo tanto, mediante la adición de PEO a la mezcla de gel, se descubrió que la viscosidad del gel aumentaba hasta valores por encima de los predichos en base a la técnica anterior para CMC con iones o PEO con iones en solitario.

La Figura 22 representa un gráfico de la relación entre el porcentaje de CMC expresado como porcentaje en peso del contenido de los sólidos totales en una serie de geles asociados con ión Fe^{3+} al 35% no autoclavados que tenían contenidos de sólidos totales diferentes y la viscosidad del gel. Las viscosidades variaban de menos de aproximadamente 2.000 cps a más de 350.000 cps. Como en la Figura 21, el aumento del porcentaje de CMC con respecto al PEO en el gel aumentaba la viscosidad. En general para todas las composiciones de geles estudiados, el aumento del contenido de sólidos aumentaba la viscosidad. El aumento en la viscosidad era el mayor para los geles que tenían el mayor porcentaje de CMC. Sin embargo, como se observa en la Figura 21, el aumento de la cantidad relativa de CMC con respecto al PEO por encima de aproximadamente el 97% de CMC disminuía inesperadamente la viscosidad para geles de cada composición de sólidos. Como en la Figura 21, se observaba una viscosidad máxima para cada composición de gel a una concentración de PEO del 2,5% del contenido de sólidos totales.

La Figura 23 representa un gráfico de la relación entre el % calculado de asociación con iones de geles autoclavados preparados con el 2% de sólidos totales, teniendo CMC al 97% con un grado de sustitución de 0,82 y PEO de 8 kd al 3% y la viscosidad medida de los geles asociados con iones mediante tres iones, hierro (Fe^{3+}), aluminio (Al^{3+}) o calcio (Ca^{2+}).

Para cada ión usado, se observaron regiones relativamente amplias de viscosidad aumentada. En ausencia de cationes, la viscosidad basal medida era de aproximadamente 1.800 cps. En los intervalos de concentración de iones menores (cantidades relativamente menores de asociación iónica), a medida que aumentaba el porcentaje de asociación iónica, la viscosidad aumentaba hasta que se alcanzaba un valor máximo. El aumento del porcentaje de la asociación iónica por encima de ese punto, sin embargo, disminuía la viscosidad medida. Para Al^{3+} ($\blacktriangle$), la viscosidad aumentaba de aproximadamente 1800 cps a aproximadamente 55.000 cps para porcentajes de asociación iónica en los intervalos inferiores a aproximadamente el 20% y superiores a aproximadamente el 80%. Por encima de aproximadamente el 20% de asociación iónica, la viscosidad aumentaba hasta una viscosidad máxima observada de aproximadamente 180.000 cps, observada a aproximadamente el 40%.

Para Fe^{3+} ($\blacksquare$), la viscosidad disminuía a valores de asociación iónica de entre aproximadamente el 0 y aproximadamente el 20%, hasta valores por debajo de aproximadamente 500 cps. El aumento de la cantidad de asociación iónica por encima de aproximadamente el 20% aumentaba la viscosidad hasta aproximadamente 60.000 cps para geles que tenían valores de asociación iónica en el intervalo de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 70%, con una viscosidad máxima de aproximadamente 90.000 cps observada a una asociación de aproximadamente el 43-45%. El aumento de la asociación iónica disminuía adicionalmente la viscosidad hasta aproximadamente 70.000 cps a una asociación iónica de aproximadamente el 70%. El aumento adicional del grado de asociación iónica disminuía la viscosidad hasta aproximadamente 700 cps a una asociación del 90%.

Para Ca^{2+} ($\blacklozenge$) la curva parecía cambiar hasta valores de porcentaje de asociación iónica menores. Se observó una viscosidad máxima de aproximadamente 65.000 cps al menor porcentaje de asociación (5%). El aumento de la asociación iónica daba como resultado una disminución de la viscosidad, con una viscosidad medida de aproximadamente 2000 cps observada a porcentajes de asociación iónica por encima de aproximadamente el 20%. Independientemente del tipo de ión usado, el aumento del porcentaje de asociación iónica aumentaba la viscosidad medida hasta un valor determinado de asociación iónica. Sin embargo, más allá de los valores máximos, aumentos adicionales en la asociación iónica no aumentaban adicionalmente la viscosidad. En su lugar, la viscosidad observada disminuía a medida que aumentaba la concentración de iones más allá del valor máximo. Una teoría que podría explicar estas observaciones es que a concentraciones iónicas relativamente bajas, las reticulaciones iónicas entre cadenas poliméricas aumentan a medida que aumenta la concentración de iones. La formación de asociaciones intracatenarias alcanza un máximo a una concentración de iones determinada y a esa concentración de iones, la viscosidad es la más elevada. Sin embargo, mediante el aumento de la concentración de iones hasta valores por encima de los necesarios para producir la viscosidad más elevada, se puede disminuir la viscosidad por promover interacciones intracatenarias en lugar de interacciones intercatenarias. Las interacciones intracatenarias pueden dar como resultado la formación de bucles en forma de horquilla y otras configuraciones de los grupos reactivos en el polímero con otros grupos en la misma cadena. Mediante la formación de asociaciones entre porciones diferentes de la misma cadena en lugar de formar asociaciones intracatenarias, las concentraciones de iones más elevadas pueden evitar que las cadenas individuales interactúen con cadenas poliméricas cercanas y puedan dar como resultado una viscosidad disminuida del gel, en comparación con la viscosidad obtenida a una concentración iónica que promueve interacciones intracatenarias aumentadas. La viscosidad disminuida con una asociación iónica aumentada es por lo tanto similar a un efecto de "extracción salina" que puede observarse para otros polímeros en soluciones que contienen iones. Sin embargo, otras teorías pueden explicar las observaciones y la invención no pretende limitarse a ninguna teoría particular.

La Figura 24 represente un gráfico de la relación entre el % de asociación iónica calculado de geles iónicamente reticulados no autoclavados que tienen el 2% de sólidos totales y PEO de 8 kd y la viscosidad medida del gel para tres iones, hierro (Fe^{3+}), aluminio (Al^{3+}) o calcio (Ca^{2+}). Los geles no autoclavados generalmente tienen viscosidades medidas superiores a cada porcentaje de asociación iónica que los geles autoclavados, como se muestra en la Figura 23. Además, como con los geles autoclavados representados en la Figura 23, había máximos de viscosidad a determinados porcentajes de asociación iónica. En ausencia de asociación iónica, la viscosidad basal de los geles era de aproximadamente 40.000 cps.

Para Al^{3+} ($\blacktriangle$), el máximo de viscosidad aparecía como un pico ancho por encima de aproximadamente 350.000 cps en el intervalo de asociación iónica de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 50%. Para Fe^{3+} ($\blacksquare$),

la viscosidad era superior a aproximadamente 100.000 cps en el intervalo de porcentajes de asociación iónica de aproximadamente el 10% y aproximadamente el 70%, con viscosidades máximas de entre aproximadamente 150.000 y aproximadamente 175.000 cps observadas a aproximadamente el 10% y a aproximadamente el 43-45% de asociación iónica, respectivamente. Para Ca^{2+} (◆), había una región poco definida de elevada viscosidad a asociaciones iónicas en el intervalo de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20%. Sin embargo, la viscosidad se aumentaba por encima de los niveles basales para todos los grados de asociación iónica.

Ejemplo 32

10 *Fabricación de esponjas asociadas con iones*

Para fabricar esponjas asociadas con iones usando geles de esta invención, se fabrica un gel de acuerdo con métodos descritos anteriormente en los Ejemplos 28-30. El gel se vierte después en una placa hecha de un material termoresistente tal como, a modo de ejemplo, polipropileno. El gel se coloca después en un aparato de secado por congelación y se seca por congelación de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Las esponjas secas por congelación que comprenden PA y PO asociados con iones pueden hincharse tras la exposición a soluciones acuosas. Como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.906.997 las composiciones que comprenden carboxipolisacáridos y éteres de polietileno pueden hidratarse o hincharse cuando se colocan en un tejido húmedo, adhiriéndose de este modo a este tejido. El grado de hidratación está relacionado con el grado de bioadhesión y con el grado de eficacia antiadherencias. Existen relaciones similares entre esponjas secas iónicamente reticuladas y propiedades antiadherencias.

Pueden usarse esponjas secas por congelación como un medio para prevenir la formación de adherencias en diferentes partes del cuerpo, tal como en cirugías de columna, ortopédicas y abdominales. Además, las esponjas pueden ser útiles para la hemostasis.

Ejemplo 33

30 *Fabricación de microesferas asociadas con iones*

Pueden prepararse microesferas de geles iónicamente reticulados por extrusión de composiciones de gel que comprenden polímeros directamente en soluciones que contienen iones de reticulación multivalentes. Los diámetros de las microesferas pueden determinarse por el tamaño de gota del gel durante la extrusión. Por ejemplo, Kondo A. *In Liquid Coating Process (Orifice Process)* En: *Microcapsule Processing and Technology* Van Valkenburg, J. W. Ed., Marcel Dekker, NY, págs. 59-69 (1979) describe diferentes métodos para formar gotas de geles. Usando orificios de menor tamaño, el tamaño de las microesferas puede ser menor. Además, las microesferas pueden secarse por congelación para el uso. Las microesferas secadas por congelación que comprenden PA y PO iónicamente reticulados pueden hincharse tras la exposición a soluciones acuosas. Como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.906.997, las composiciones que comprenden carboxipolisacáridos y éteres de polietileno pueden hidratarse o hincharse cuando se colocan en un tejido húmedo, adhiriéndose de este modo a ese tejido. El grado de hidratación está relacionado con el grado de bioadhesión y con el grado de eficacia antiadherencias. Existen relaciones similares entre microesferas secas asociadas con iones y propiedades antiadherencias.

Pueden usarse microesferas para la administración de fármacos en localizaciones en las que no es práctica la inyección directa de geles. A modo de ejemplo, la inhalación de un aerosol de microesferas puede proporcionar un medio conveniente para administrar composiciones de PA/PO en las vías respiratorias. Además, en situaciones en las que es deseable administrar una composición de gel altamente viscosa a través de una aguja fina, puede usarse una suspensión de microesferas. Una suspensión de microesferas puede tener una viscosidad menor que la de una solución equilibrada de la misma composición global. Esto puede ser porque las microesferas pueden separarse entre sí y por lo tanto puedan tener movilidad en la suspensión. Por el contrario, una solución uniforme de gel reticulado que tiene la misma composición global puede tener reticulación iónica por toda la solución, confiriendo de este modo una mayor viscosidad tras la solución que la presente en la suspensión de microesferas relativamente aisladas.

Mediante el uso de una suspensión de microesferas, se puede administrar una suspensión relativamente menos viscosa a través de una aguja o cánula fina en la localización deseada sin requerir las elevadas presiones necesarias para forzar que una solución viscosa pase a través de una aguja o cánula del mismo tamaño. Además, las suspensiones de microesferas o geles pueden pulverizarse sobre superficies para proporcionar una deposición uniforme.

Ejemplo 34

60 *Fabricación de membranas asociadas con iones*

En otras realizaciones de esta invención, pueden formarse geles asociados con iones como se ha descrito anteriormente en membranas antes del uso. En general, las membranas secas tienen tiempos de permanencia más largos *in situ* que los geles que no se han secado. Se describen métodos para la fabricación de membranas a partir de soluciones de moldeo o geles en la Patente de Estados Unidos Nº 5.906.997. Para formar membranas de esta invención, cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede verse en una superficie plana y secarse, a presión atmosférica (aproximadamente 760 Torr) o a presión reducida.

Una vez fabricadas, pueden usarse membranas como una barrera preventiva de la formación de adherencias o pueden acondicionarse antes del uso. Las membranas preparadas de acuerdo con esta invención pueden ser deseables en situaciones en las que se desea que el tiempo de permanencia de la composición en el sitio sea prolongado.

En otras realizaciones más de esta invención, puede fabricarse una membrana de poliácido/óxido de polialquileno de acuerdo con métodos como se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.906.997 y después acondicionarse por inmersión de la membrana en una solución que comprende un catión o un polication. Mediante la selección del tipo de catión o polication, la concentración del catión, el tiempo de inmersión y otras condiciones, el catión puede penetrar en la superficie de la membrana, puede asociarse con grupos cargados de los polímeros en la membrana y de este modo puede aumentar el grado de enlace entre los polímeros en la membrana. Por lo tanto, puede formarse una superficie de membrana que comprende un polímero asociado con iones. Una vez que se ha formado de este modo, una membrana que tiene un acondicionamiento de superficie puede tener un tiempo de permanencia aumentado en el cuerpo y, por lo tanto, puede ejercer efectos antiadherencias durante periodos de tiempo más prolongados que membranas que no se han tratado de este modo.

Ejemplo 35

Efectos de la radiación gamma sobre componentes de membranas de CPS/PE (Ejemplo de referencia)

Para estudiar los efectos de la esterilización sobre membranas y soluciones de materiales usados para preparar membranas y geles de esta invención, se llevaron a cabo una serie de estudios sobre los efectos de la esterilización sobre los perfiles de pesos moleculares.

Métodos

1. Análisis Cromatográficos

Se obtuvieron perfiles de peso molecular en condiciones acuosas para los componentes de los complejos de CPS/PE mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando un método de dispersión de luz multiángulo ("SEC-MALS"). El aparato de cromatografía consistía en tres columnas en serie, había una columna que contenía Ultrahydrogel 2000, Ultrahydrogel 1000 y Ultrahydrogel 250, de Waters Corporation. El sistema de detección consistía en un detector de dispersión de luz multiángulo Dawn Wyatt y un detector de índice de refracción modelo 410 ("RI") (Waters, Inc.). Se determinaron los pesos moleculares y las distribuciones de peso molecular usando métodos conocidos en la técnica.

2. Preparación de muestras

Algunas muestras de películas o soluciones de moldeo se expusieron a 2,5 MRad de radiación γ como se ha descrito anteriormente. Posterior a la radiación γ , las muestras tratadas con γ y no tratadas se prepararon teniendo una concentración de sólidos totales del 0,2% (peso/volumen) en una fase móvil que consistía en nitrato de sodio 100 mM que contenía azida sódica al 0,02%. Se prepararon muestras que tenían un pH neutro. Para analizar el perfil de peso molecular de una película ácida, la película se neutralizaba primero por adición de una base, después de lo cual se valoraba la solución hasta neutralidad usando ácidos diluidos. Las condiciones de pH neutro eran deseables, puesto que los pesos moleculares de los componentes podían determinarse sin oscurecerse por el cambio en el tamaño molecular aparente debido a enlaces de hidrogeno entre componentes poliméricos. Se analizaron películas sin ninguna esterilización, después de esterilización con gamma-irradiación a 2,5 MRad o después de autoclavado a 250°F (12,11°C) durante 20 minutos. En algunos casos, se prepararon y analizaron muestras por duplicado.

A. Preparación de una membrana para análisis

Muestras preparadas que estaban hechas de membranas de CMC al 77%/PEO al 23% con y sin colorante azul se prepararon cortando primero muestras de 220 mg de película (#648-2) en trozos pequeños. Para cada membrana, se añadieron 110 ml de fase móvil y 40 μ l de NaOH 5 N y la solución se agitó con una barra de Teflon™ a baja velocidad. Después de 30 minutos, el pH se midió que era de 9,5. Se añadieron 10 μ l de HCl 1 N para disminuir el pH hasta 8,5 y se añadieron 5 μ l adicionales de HCl 1 N para disminuir el pH hasta 7,2. La solución de muestra se vertió después en un frasco de muestra de 100 ml y se almacenó en el frigorífico. Se analizó una alícuota de 5 ml.

B. Preparación de una solución de moldeo para análisis

Se preparó una solución de moldeo de CMC al 100% (lote n° 980506-1) que tenía un pH de 4,24 por preparación de una solución al 1,33% (peso/volumen) por mezcla de 20,5 g de CMC, 114,8 g de solución diluyente y 40 μ l de NaOH 5 N en un vaso de precipitados y agitación de la solución con una mezcladora. El pH después de 7 minutos era de 5,34. Se añadieron 5 μ l de NaOH 5 N después de 10 minutos adicionales y el pH se aumentó a 5,46. Se añadieron 5 μ l de NaOH 5 N después de 20 minutos adicionales, momento en el que el pH se aumentó a 5,82. 10 minutos después, se añadió otra alícuota de NaOH 5 N (10 μ l) y el pH se aumentó hasta 9,48. Esta solución básica se acidificó por adición de 20 μ l de HCl 1 N para dar como resultado un pH de 6,65 después de un total de 51 minutos. Se analizó una muestra de 5 ml.

C. Preparación de patrones

Las muestras denominadas como “patrones” estaban compuestas por CMC, PEO o mezclas de CMC y PEO disueltas en la solución de fase móvil de SEC. Los materiales sin procesar se irradiaron en forma seca para obtener “patrones irradiados”.

Resultados

Los resultados de los estudios anteriores se representan en las Figuras 25a-25c.

La Figura 25a representa los resultados para películas irradiadas y no irradiadas. La irradiación gamma disminuía el peso molecular promedio de los componentes para las películas mixtas de CMC/PEO, películas de CMC pura y películas de PEO puro. Sin embargo, el efecto era menor para la película de CMC al 100% (segunda columna empezando por la derecha). Las películas mixtas que contenían PEO presentaban disminuciones en el peso molecular tanto para la película teñida (columnas izquierdas) como para la película transparente sin colorante azul (segunda columna de la izquierda). La película de PEO puro (columna derecha) también presentaba una disminución en el peso molecular, disminuyendo el peso molecular desde aproximadamente 1000 kd hasta aproximadamente 26 kd. En base a los resultados anteriores, las moléculas de PEO tenían, de media, aproximadamente 38 roturas de cadena.

La Figura 25b muestra resultados de la irradiación γ sobre patrones de CMC y PEO. La irradiación γ disminuía el peso molecular promedio de una mezcla de CMC al 77%/PEO al 23% (columnas izquierdas) como lo hacía el patrón de CMC al 100% (columnas derechas, ahora disminuidas hasta aproximadamente 140 kd) mientras que la composición de CMC al 100% (columnas del medio) mostraban una reducción solo ligeramente superior al 50% en el peso molecular promedio.

La Figura 25c muestra los resultados de la irradiación γ y del autoclavado en soluciones de moldeo de geles. La solución de moldeo teñida de azul que contenía CMC al 77%/PEO al 23% (columnas izquierdas) presentaba una disminución en el peso molecular promedio cuando se irradiaba con rayos γ mientras que el autoclavado causaba una disminución menor en el peso molecular. De forma similar, el autoclavado de la solución de CMC al 77%/PEO al 23% transparente (segunda columna de la izquierda), la solución de CMC al 100% (segunda columna de la derecha) y de la solución de PEO al 100% (columnas derechas) causaba menores reducciones en el peso molecular que la irradiación gamma. El peso molecular promedio de la solución de moldeo de PEO después de la irradiación gamma era de aproximadamente 12.000.

Los resultados anteriores indican que la irradiación gamma puede disminuir el peso molecular promedio de los componentes de geles, geles y membranas. Sin embargo, la magnitud de la disminución indica que había de media, aproximadamente 83 roturas de cadena por unidad polimérica de PEO. La cromatografía de gases confirmó que ninguno de los componentes estaba completamente despolimerizado en unidades monoméricas.

Ejemplo 36

Fabricación de composiciones usando una suspensión de CPS y PE I (Ejemplo de referencia)

En realizaciones alternativas de esta invención, el CPS y el PE pueden mezclarse con un líquido no disolvente para formar una suspensión antes de su disolución en el medio acuoso. El líquido a usar en la preparación de la suspensión de forma deseable no disolverá los componentes en un grado significativo. Los líquidos adecuados incluyen alcoholes y en ciertas realizaciones isopropanol.

Para fabricar membranas usando este procedimiento, se colocaron 8,25 litros (l) de agua estéril en un recipiente de acero inoxidable en el que se colocaron 10 ml de colorante azul n° 2 de FD&C y la solución se mezcló lentamente durante 5 minutos.

Después se pesaron 75,25 g de CMC y 24,75 g de PEO en polvo para un total de 100 g y se mezclaron los componentes juntos con una espátula en un vaso de precipitados de 600 ml. Después se añadieron 300 ml de alcohol isopropílico al CMC y PEO en polvo mientras se mezclaba para humedecer los polvos y formar la suspensión.

Después se aumenta la velocidad de mezcla de la solución de agua/colorante hasta que se lograba una agitación vorticial en la solución. Después se añadía lentamente la suspensión de isopropanol/CMC/PEO a la solución de agua/colorante mientras se continuaba mezclando. A medida que se mezclaba la suspensión, se volvía más espesa y la velocidad del mezclador vorticial se ajustaba para mantener una velocidad de aproximadamente 50-150 rpm, como alternativa de aproximadamente 100 rpm. A medida que la solución se hacía más espesa, se ajustaba la velocidad del mezclador para mantener las rpm deseadas y mantener las rpm durante 1,5-2,0 h adicionales. Después de 2 horas de mezcla, la solución parecía ser homogénea.

Después se añadieron 10 ml de HCl concentrado a la mezcla y se agitó durante 30-60 minutos adicionales. El pH se ajustó para que estuviera en el intervalo de 4,1-4,3.

Ejemplo 37

Fabricación de composiciones usando una suspensión de CPS y PE II (Ejemplo de referencia)

- 5 En una variación del método descrito en el Ejemplo 36, se pesaron 85,25 g de CMC y 24,75 g de PEO en polvo para un total de 110 g y se mezclaron los componentes secos juntos con una espátula. Se llevó a cabo el mismo procedimiento que se describe para el Ejemplo 36 excepto por que después de añadir la suspensión de CMC/PEO/isopropanol a la solución de agua/colorante se mezclaron los componentes durante 10 minutos a una velocidad más elevada y después se redujo la velocidad a 130-150 rpm durante de 2 a 4 horas adicionales. Después de aproximadamente 2 horas, la solución parecía ser casi homogénea.

Ejemplo 38

- 15 *Filtración de soluciones de moldeo de CMC/PEO antes de secar las películas (Ejemplo de referencia)*

En ciertos casos, puede ser deseable aumentar la homogeneidad de la solución de moldeo por eliminación de cualquier componente no disuelto antes de secar la solución de moldeo en una membrana.

20 *Métodos*

- Para lograr esto, se usó un filtro de tamaño de poro de 30 μm o un filtro de tamaño poro de 50 μm (Millipore Corp.) y se forzó el paso de soluciones de moldeo hechas de acuerdo con los Ejemplos 36 y 37 a través del filtro usando nitrógeno presurizado (5-10 libras por pulgada cuadrada "psi"). Como los materiales atrapados en el filtro ralentizaban el flujo, la presión se aumentó hasta aproximadamente 20 psi. Después se evaluaron los efectos de la filtración sobre la distribución del tamaño de partículas y la viscosidad de la solución de moldeo y el % de hidratación y la bioadhesividad de membranas hechas de soluciones no filtradas y filtradas.

30 *Resultados*

La Tabla 25 muestra los resultados del análisis del tamaño de partículas.

TABLA 25

Análisis del tamaño de partículas de componentes filtrados

Tamaño de partícula	Distribución de tamaños de partícula para soluciones no filtradas	Distribución de tamaños de partícula para soluciones filtradas
5-10 μm	85,85%	94,91%
10-25 μm	11,01%	4,95%
25-50 μm	2,82%	0,05%
50-100 μm	0,22%	0,07%
más de 100 μm	0,1%	0,1%

- 55 Las viscosidades de las soluciones de moldeo anteriores se midieron a 1,0 rpm con eje n° 3 y se descubrió que era de 14.800 cps para la solución no filtrada, 14.300 cps para la solución filtrada con un filtro de 30 μm y era de 15.600 cps para la solución filtrada con el filtro de 50 μm .

- 60 Las membranas hechas de soluciones no filtradas y soluciones filtradas con los filtros de 30 μm o 50 μm mostraban diferencias pequeñas en la hidratación. Una membrana preparada a partir de una solución no filtrada se hidrataba en el 870%, una membrana preparada a partir de un filtrado de 30 μm se hidrataba en el 780% y una membrana preparada a partir de un filtrado de 50 μm se hidrataba en el 788%.

65

TABLA 26

Efecto de la irradiación gamma sobre la bioadhesión para membranas preparadas a partir de soluciones filtradas y no filtradas*

Tratamiento de la película	No irradiada (media, n = 5)	Irradiada (media, n = 5)
No filtrada	84,6	98,6
Filtro de 30 µm	99,2	89,8
Filtro de 50 µm	74,4	No realizada

*Se midió la bioadhesión como la fuerza en gramos necesaria para retirar la película del sustrato.

Por el contrario, Interceed™ no se adhería y Seprafilm II™ requería 69 g de fuerza para despegar la película del sustrato.

Ejemplo 39

Hidratación y pérdida de masa de películas que contienen glicerol (Ejemplo de referencia)

En ciertas otras realizaciones de esta invención, se prepararon películas que contenían glicerol. Glicerol es un plastificante y cuando se usa en preparaciones de membrana, los plastificantes pueden aumentar la flexibilidad de la membrana. El aumento de la flexibilidad puede hacer que la inserción y la colocación de la membrana sea más fácil y más precisa.

En un estudio para determinar la hidratación y la solubilidad en PBS características de películas de CMC/PEO que contienen glicerol, se fabricaron una serie de películas de CMC al 77%/PEO al 23% de acuerdo con métodos previos, excepto por la incorporación de cantidades crecientes de glicerol. Para películas que tienen glicerol, la composición de sólidos totales continuaba siendo la misma, de tal modo que a medida que aumentaba el glicerol o el contenido, el contenido de CMC/PEO disminuía en consecuencia. La Tabla 30 muestra los resultados de este estudio.

TABLA 27

Efectos del glicerol sobre la hidratación y la solubilidad de películas de CMC/PEO

Tipo de Película	pH	% de hidratación	% de pérdida de masa
Glicerol al 0%, NS*	6,47	2860	76,1
Glicerol al 2%, NS*	6,72	3057	No medida
Glicerol al 10%, NS*	6,89	0734	76,7
Glicerol al 20%, NS*	7,00	641	No medida
Glicerol al 30%, NS*	6,38	238	54,3
Glicerol al 0%, S**	6,53	1479	53,4
Glicerol al 2%, S**	6,55	1494	No medida
Glicerol 5, S**	6,46	1529	No medida
Glicerol 10, S**	6,66	867	52,8
Glicerol 20, S**	6,83	595	No medida
Glicerol 30, S**	6,32	156	49,7

*NS: No esterilizada

**S: Esterilizada

Los datos mostrados en la Tabla 27 mostraban en general que el aumento del porcentaje de glicerol en las películas disminuía la hidratabilidad de la película. Este efecto puede haberse debido al porcentaje disminuido de CMC y PEO en las películas que tienen más glicerol. La tendencia era constante tanto para películas no esterilizadas como esterilizadas.

Independientemente del mecanismo responsable, las películas de esta invención que contienen glicerol pueden tener ventajas. En primer lugar, son plegables y flexibles, haciéndolas fáciles de manipular. Por ejemplo, las películas que contienen glicerol pueden enrollarse más fácilmente e insertarse en un sitio quirúrgico usando un dispositivo adecuado para las películas de esta invención. Dicho dispositivo FilmsertTM se describe en la Solicitud de Patente en trámite junto con la presente de número de Serie 09/280.101, presentada el 24 de octubre de 1998.

Tipos de cirugía

Muchos tipos de procedimientos quirúrgicos pueden beneficiarse del uso de las membranas o geles de la presente invención. Los geles de la presente invención están diseñados (pero no limitados) para el uso como accesorios para prevenir las adherencias postoperatorias, una causa común de complicaciones quirúrgicas a corto y largo plazo. El tipo de cirugías en las que los geles han demostrado ser útiles son en concreto en los campos de cirugía de columna, nervios, tendones, cardiovascular, pélvica, abdominal, ortopédica, otorrinolaringológica y ocular. Los geles pueden actuar como una barrera temporal interpuesta entre tejidos que es probable que se adhieran entre sí después de un traumatismo quirúrgico.

Dependiendo de la formulación exacta (proporción en peso de PA/PO, grado de sustitución, grado de polimerización, % de sólidos totales, grado y tipo de asociación iónica, etc.), los geles de acuerdo con la invención pueden variar en consistencia desde fluidos, soluciones poliméricas similares a líquidos hasta geles rígidos. Por lo tanto, los geles pueden confeccionarse para las cirugías y necesidades mencionadas anteriormente mediante la selección de propiedades mecánicas/físicas específicas que están relacionadas con estas aplicaciones, por ejemplo, cohesividad, viscosidad, recubrimiento y capacidad de adherencia tisular, suavidad/aspereza, dureza, rigidez y la exclusión estérica de ciertos tipos celulares y proteínas.

Los siguientes son ejemplares y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 40

Cirugía de columna

En realizaciones de esta invención que pueden usarse para aplicaciones a la cirugía de columna, puede ser deseable usar una preparación mixta de gel/membrana para ejercer la antiadherencia deseada y otros efectos. Por ejemplo, en procedimientos que implican cirugía de la médula espinal y de los sitios intravertebrales circundantes, puede ser deseable colocar una composición de gel directamente en los nervios en el interior de un espacio vertebral y después aplicar una preparación de membrana sobre el gel para ayudar a mantener el gel en su lugar durante la cicatrización de heridas y recuperación.

Métodos

A. Animales

Se estudiaron 5 conejos New Zealand White adultos en cada uno de tres grupos. Los animales se anestesiaron con ketamina/xilazina y se afeitaron y prepararon de una forma estéril. Se inyectó penicilina (150.000 U) por vía subcutánea como un antibiótico profiláctico y se usó el agente anticolinérgico glicopirolato por vía intravenosa. Se insertó un catéter intravenoso permanente en la vena safena y se infundió solución salina al 0,9% para mantener una vena abierta y para mantener una hidratación adecuada. Cada animal se colocó en una mesa de operaciones caliente y se conectaron a soporte vital para permitir la relajación de su patrón de respiración abdominal. Se controló la saturación de oxígeno, la frecuencia respiratoria y el electrocardiograma durante la anestesia. Se usó gas isoflurano y oxígeno como el anestésico.

B. Preparación quirúrgica

Se realizó una incisión dorsal en el área de L-4 a L-6. Se realizaron dos laminectomías con una vértebra intacta y tejidos blandos separando los dos sitios operados. Esto evitaba la fuga de sangre y/o materiales de ensayo de un sitio al otro. Se usó un sitio como control. El quinto animal en cada grupo se trató en ambos sitios operados con el material de ensayo. Por lo tanto, había un total de 6 sitios tratados y 4 sitios de control por grupo.

C. Cuidados postoperatorios y evaluación de las adherencias

Después de las laminectomías, las preparaciones de gel y/o membrana se colocaron en el sitio de la cirugía y los sitios quirúrgicos se cerraron usando suturas de Vicryl 3-0 y la piel se cerró usando suturas de seda 4-0. Cada animal se colocó en un incubador caliente para recuperarse de la anestesia. Cuando estaban despiertos, cada animal se colocó en una jaula separada. Cada animal se sacrificó 4 semanas después de la cirugía y se midió la presencia y la gravedad

ES 2 311 455 T3

de las adherencias y el grado de recuperación usando el sistema de puntuación que se describe a continuación. La persona que evaluaba la eficacia de los materiales antiadherencias ignoraba qué materiales se usaron en cada animal.

Sistema de puntuación de adherencias

1. Las localizaciones para la evaluación de la curación de heridas

- (1) Sitio de la incisión;
- (2) Tejido subcutáneo;
- (3) Fascia;
- (4) Músculo paraespinal; y
- (5) Recrecimientos óseos.

2. Las localizaciones para la evaluación de formación de cicatrices y adherencias

(1) Cicatrices medias: justo debajo de la capa de músculo y por encima del sitio de laminectomía. En los márgenes del sitio de laminectomía y unidas al aspecto dorsal del hueso laminar restante, pero sin prolongarse hacia el defecto de hueso.

(2) Cicatrices profundas: dentro del defecto de laminectomía y se prolongan hacia el espacio previamente ocupado por el ligamento amarillo y la grasa epidural; y

(3) Adherencias dures: uniones de tejido conectivo entre el hueso o cicatrices profundas y la duramadre dentro del canal vertebral.

3. Escala del grado de curación

- 0 Cicatrización completa
- 1 Tejido no curado mínimo
- 2 Tejido no curado moderado
- 3 Tejido no curado amplio

4. Escala del grado de cicatrización/adherencias:

- 0 Ninguna
- 1 Mínimas o delgadas
- 2 Moderadas
- 3 Gruesas

Cada animal se clasificó en los cinco aspectos de cicatrización de heridas y los tres aspectos de formación de cicatrices. Cada animal recibía una puntuación de curación total y una puntuación de cicatrización total. El análisis del orden de rango y el análisis de la varianza de los rangos se calculó para cada tratamiento y control respectivo y para las diferencias entre tratamiento y control. Cuanto menor era la puntuación y menor la diferencia, mejor era la prevención de adherencias.

Después de una evaluación macroscópica de las adherencias, se extirpó por disección una columna vertebral de un animal de cada uno de los geles de ensayo y se colocó en formalina al 5% para el análisis histológico.

D. Preparaciones de gel antiadherencias

Se estudiaron tres preparaciones diferentes de gel de esta invención, teniendo cada una CMC al 97,5% de 0,82 ds, PEO 2,5%, con una asociación iónica del 60% con iones de Ca⁺, un gel antiadherencias disponible en el mercado, Adcon-L™ (una preparación que contiene sulfato de dextrano de Gliatech, Inc.) y una preparación de membrana de esta invención (CMC al 77,5%/PEO al 22,5%, pH = 4,2).

Gel A: Se preparó usando PEO de 1000 kd y un contenido de sólidos totales del 2,5%. La viscosidad de este gel era de 158.000 cps y la osmolaridad era de 320 mOsm/kg.

ES 2 311 455 T3

Gel B: Se preparó como el Gel A anterior, excepto por que el contenido de sólidos totales era del 3%, la osmolaridad era de 312 mOsm/kg y la viscosidad era de 314.000 cps.

Gel C: Se preparó como los Geles A y B anteriores, excepto por que el PEO era de 4,4 Md, el contenido de sólidos totales era del 3%, la osmolaridad era de 326 mOsm/kg y la viscosidad era de 306.000 cps.

E. Resultados

Los resultados del estudio se presentan a continuación en la Tabla 28.

TABLA 28

Efectos antiadherencias de geles y geles más membranas en la cirugía de columna

Preparación de gel	Control	Tratado	Diferencia
Gel A	21,3 ± 7,05	30,4 ± 7,2	-17,75 ± 3,65
Gel A + Membrana	35,8 ± 9,3	32,3 ± 7,75	12,6 ± 4,65
Gel B	29,4 ± 4,35	13,9 ± 5,8	11,4 ± 2,65
Gel C	33,3 ± 4,9	14,8 ± 7,2	9,2 ± 2,8
Adcon-L™	26,5 ± 6,35	9 ± 0	10,3 ± 5,6

Los datos se expresan como puntuación media ± desviación típica

Por lo tanto, los geles de esta invención pueden reducir el número y la gravedad de las adherencias. Por lo tanto, el uso de geles y membranas de esta invención puede mejorar los efectos adherencias en comparación con los efectos de geles en solitario.

Ejemplo 41

Cirugía Ocular

Los usos oculares incluyen la cirugía para el filtrado de glaucoma. La cirugía de filtrado de glaucoma exitosa se caracteriza por el paso del humor acuoso desde la cámara anterior a través de una fístula generada quirúrgicamente al espacio subconjuntival que da como resultado la formación de una ampolla filtrante. La insuficiencia de la ampolla con frecuencia da como resultado la proliferación de fibroblastos y fibrosis subconjuntival. Para prevenir esta fibrosis, puede colocarse una membrana de la presente invención de forma postoperatoria en la subconjuntiva en el espacio de la ampolla y también colocarse una membrana en la fístula.

Además, las composiciones de esta invención pueden prevenir la formación de adherencias y cicatrices después de procedimientos para cataratas, refractivos, glaucoma, estrabismo, lacrimales y retinales y pueden inhibir el sangrado intraocular. Las composiciones de líquido y gel de esta invención también pueden actuar como un lubricante para la inserción y/o retirada de anillos intraestromales o implantes de segmentos de anillos. Los geles o fluidos de esta invención también pueden actuar como agentes protectores para inhibir el secado y los traumatismos durante la cirugía ocular.

Ejemplo 42

Cirugía musculoesquelética

La reparación de tendones flexores puede mejorarse usando membranas de la presente invención. En la reparación de tendones, el colágeno secretado por los fibroblastos une los extremos de los tendones. La formación de adherencias habitualmente une el tendón con otras estructuras tisulares, destruyendo el espacio normal entre el tendón y la vaina del tendón, interfiriendo de este modo con la función de deslizamiento necesaria para un movimiento suave. Para prevenir la formación de adherencias entre el tendón y la vaina, una membrana de la presente invención se envuelve alrededor de los extremos del tendón suturado vueltos a unir y/o una forma de hidrogel de la presente invención se inyecta en el interior de la vaina.

Ejemplo 43

Cirugía abdominal

5 Se ha descrito que se forman adherencias postquirúrgicas en hasta el 93% de pacientes previamente operados por laparotomía. Una laparotomía es necesaria para acceder al abdomen para procedimientos del intestino grueso y delgado, estómago, esófago y procedimientos duodenales, colecistectomía, reparación de hernias y operaciones en el sistema reproductor femenino. En 1992, el Center for Health Statistics informó de 344.000 operaciones en los Estados Unidos para lisis de adherencias peritoneales. Las adherencias peritoneales se vuelven patológicas cuando deforman
10 anatómicamente las vísceras abdominales produciendo diversas morbilidades que varían desde obstrucción intestinal y vólvulo hasta infertilidad. Desgraciadamente, la reformación de adherencias y la reaparición de obstrucciones intestinales después de la división quirúrgica de adherencias es bastante común.

15 Para prevenir la formación de adherencias *de novo* o la reformación de adherencias, se colocan membranas y/o geles de la presente invención directamente sobre o alrededor del sitio quirúrgico separando este sitio del omento. Cuando se cierra, las membranas de la presente invención se colocan bajo la incisión de la línea media entre la fascia y el peritoneo. En procedimientos laparoscópicos, se usa una forma de hidrogel de la presente invención para recubrir el sitio quirúrgico y las áreas de entrada del trócar.

20 Los ejemplos previos que muestran la eficacia *in vivo* en la prevención de adherencias post-quirúrgicas y la reformación de adherencias en animales experimentales proporcionan una expectativa de que usos similares de las películas de esta invención también mitigarán los efectos adversos de las adherencias post-quirúrgicas en seres humanos.

25 Las composiciones de esta invención pueden inhibir la formación de adherencias *de novo* y/o cicatrices en un sitio quirúrgico o un sitio distante, pueden inhibir el sangrado y/o la formación de coágulos sanguíneos, pueden promover la cicatrización de heridas y pueden actuar como un precinto alrededor de reanastomosis de órganos. Mediante la inhibición de la formación de adherencias, las composiciones de esta invención pueden facilitar de este modo nuevas operaciones del abdomen.

30 Ejemplo 44

Efectos antiadherencias II

35 El propósito de estos estudios era ensayar la eficacia de polímeros de CMC/PEO reticulados en la reducción de la formación de adherencias en un modelo de cuerno uterino de conejo de formación de adherencias.

Métodos

40 *Animales:* Se adquirieron treinta y siete conejos New Zealand White hembra de 2,4-2,7 kg de Irish Farms (Norco, CA) y se mantuvieron en cuarentena en el animalario de la USC durante al menos 2 días antes del uso. Los conejos se seleccionaron aleatoriamente en siete grupos antes del inicio de la cirugía. Los conejos se alojaron en un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas:12 horas con alimento y agua disponibles *ad libitum*.

45 *Materiales:* Los polímeros de CMC/PEO asociados con iones ("IA") usados se describen a continuación en la Tabla 29. Para una comparación, se usó una muestra de Intergel™ (una marca comercial de Ethicon Division of Johnson & Johnson, Inc.). Las suturas usadas para cerrar las incisiones en el músculo y en la piel eran sutura recubierta Dexon II 3-0 (Davis y Geck, Manati, PR).

50 *Modelo de cuerno uterino doble:* Se anestesiaron conejos con una mezcla de clorhidrato de ketamina 55 mg/kg y Rompum 5 mg/kg por vía intramuscular. Después de la preparación para una cirugía estéril se realizó una laparotomía de la línea media. Los cuernos uterinos se exteriorizaron y se traumatizaron por abrasión de la superficie serosa con una gasa hasta que se desarrolló un sangrado puntual. Se indujo isquemia de ambos cuernos uterinos por eliminación del suministro de sangre colateral. El suministro de sangre restante de los cuernos uterinos eran las ramas ascendentes del suministro de la arteria útero-vaginal del miometrio. Al final de la cirugía, se administraron 15 ml de los geles 1-5
55 descritos a continuación, Intergel™ o ningún tratamiento (control) en el sitio de la cirugía con una mano enguantada estéril. Después de 7 días, los conejos se sacrificaron y se determinó el porcentaje del área de los cuernos adherentes a diversos órganos. Además, se puntuó la tenacidad de las adherencias usando el siguiente sistema:

Sistema de puntuación de adherencias

60

0 = Sin adherencias

1 = Leves, adherencias fácilmente diseccionables

65

2 = Adherencias moderadas; no diseccionables, no rompen el órgano

3 = Adherencias densas; no diseccionables, rompen el órgano cuando se eliminan

ES 2 311 455 T3

Además, se proporcionó a cada conejo una puntuación global que tiene en cuenta todos los datos anteriores. Se usó el siguiente sistema de puntuación:

- 0 Sin adherencias.
- 0,5+ Adherencias peliculares ligeras que implican a un solo órgano, típicamente solo 1 ó 2 adherencias pequeñas.
- 1,0+ Adherencias peliculares ligeras, no amplias aunque ligeramente más amplias que para 0,5.
- 1,5+ Adherencias ligeramente más duras y más amplias que la puntuación 1.
- 2,0+ Adherencias más duras, un poco más amplias, los cuernos uterinos habitualmente tienen adherencias tanto al intestino como la vejiga.
- 2,5+ Igual que la 2, excepto por que las adherencias habitualmente no son peliculares en ningún sitio y son más amplias.
- 3,0+ Adherencias más duras que en 2, más amplias, ambos cuernos están unidos al intestino y la vejiga, es posible cierto movimiento del útero.
- 3,5+ Igual que en 3, pero las adherencias son ligeramente más amplias y más duras.
- 4,0+ Adherencias graves, ambos cuernos unidos al intestino y a la vejiga, incapaz de mover el útero sin romper las adherencias.

Los conejos se puntuaron por dos observadores independientes que desconocían el tratamiento previo del animal. Si había desacuerdo en la puntuación a asignar para un animal individual, se le asignaba la puntuación más alta.

Análisis estadístico: Las puntuaciones globales se analizaron mediante análisis de orden de rangos y análisis de la varianza de los rangos para cada tratamiento y control respectivo y para las diferencias entre el tratamiento y el control. Cuanto menor la puntuación y menor la diferencia, mejor la prevención de las adherencias.

Resultados

El efecto de la administración de estos polímeros sobre la incidencia de formación de adherencias puede encontrarse en la Tabla 29.

TABLA 29

Efectos de geles iónicamente reticulados sobre la formación de adherencias

Tratamiento	Nº de sitios sin adherencias/nº de sitios totales	Puntuación global de adherencias
Ninguno	0/40	36,0 ± 0,6
Gel 1: PEO de 100 kd; 0,82 d. s.; IA al 10%	17/40	18,7 ± 3,7
Gel 2: PEO de 8 kd; 0,82 d. s.; IA al 60%	14/40	19,9 ± 3,2
Gel 3: PEO de 100 kd; 0,82 d. s.; IA al 60%	20/40	8,4 ± 1,9
Gel 4: PEO de 100 kd; 1,19 d. s.; IA al 10%	11/40	21,9 ± 3,7
Gel 5: PEO de 100 kd; 1,19 d. s.; IA al 60%	13/40	19,9 ± 3,3
Intergel TM	22/56	12,0 ± 2,1

Los datos se expresan como el rango medio ± desviación típica; n = 5-7 animales en cada grupo.

En comparación con animales sin tratar, las preparaciones de gel de esta invención disminuyen la frecuencia y la puntuación global de las adherencias, de acuerdo con un ensayo U de Mann-Whitney. Los mayores efectos antiadherencias se obtuvieron usando geles que tenían PEO de menor peso molecular (8 kd; Gel 3). Sin embargo, incluso los geles que tenían el PEO de mayor peso molecular (100 kd; Geles 1-2 y 4-5) eran eficaces. La administración de estos geles no se asociaba con la presencia de una respuesta inflamatoria.

Ejemplo 45

10 *Cirugía ginecológica: miomectomía mediante laparotomía o laparoscopia*

En la escisión quirúrgica de un fibroide uterino, el útero se expuso y se practicó una incisión para eliminar el fibroide. El útero se cerró con suturas absorbibles. Posteriores incisiones uterinas se asocian con más y con un grado mayor de adherencias anejas que con incisiones uterinas del fondo o del útero anterior. Para incisiones posteriores, 15 aplicar composiciones de la presente invención sobre la incisión uterina posterior y por debajo de la incisión de la pared abdominal anterior para prevenir la formación de adherencias entre el útero y los tejidos circundantes. Las incisiones anteriores dan como resultado más comúnmente la formación de adherencias entre la vejiga y la pared anterior del útero. Las membranas y/o geles de la presente invención se colocan sobre la incisión anterior y entre el útero y la vejiga.

20 Ejemplo 46

25 *Cirugía torácica*

Varios tipos de procedimientos de cirugía torácica pueden beneficiarse de las composiciones de esta invención. Las composiciones pueden inhibir la formación de adherencias y cicatrices alrededor de corazón, pulmones, tráquea y esófago, facilitando de este modo nuevas operaciones. Las composiciones pueden inhibir el sangrado, promover la cicatrización de heridas, pueden actuar como un precinto alrededor de punciones arteriales, trombos y alrededor 30 de reanastomosis de vasos sanguíneos y órganos. También pueden usarse membranas como un pericardio temporal. Además, las composiciones de esta invención pueden también lubricar instrumentos quirúrgicos, incluyendo, pero sin limitación, instrumentos endoscópicos e intravasculares, catéteres, endoprótesis y dispositivos.

Los procedimientos de cirugía cardíaca reoperatoria se están volviendo más comunes y dan como resultado la necesidad de reducir o prevenir las adherencias mediastínicas y pericárdicas postoperatorias. Una esternotomía media 35 precede a una pericardiotomía de la línea media. El pericardio se suspende, de tal modo que el corazón y el espacio pericárdico se exponen ampliamente. Se realiza la disección. Para realizar una derivación, se construyen anastomosis distales usando arterias mamarias internas, arterias radiales, arterias gastroepiploicas o injertos de vena safena. Para prevenir la formación de adherencias, las membranas de la presente invención se envuelven alrededor de las 40 anastomosis y se colocan entre el pericardio y el esternón antes de cerrar.

Ejemplo 47

45 *Procedimientos urológicos*

Geles y fluidos de esta invención pueden usarse en diversos procedimientos urológicos que implican la introducción de instrumentos y dispositivos, tales como catéteres en la uretra, la vejiga y los uréteres, inhibiendo de este modo el traumatismo al que pueden exponerse esos tejidos durante el procedimiento. La inyección de fluido y/o geles en el 50 tracto urinario puede facilitar la expulsión de piedras o cálculos mediante su actuación como lubricante. Los fluidos y/o geles también pueden mejorar la visualización de estructuras durante procedimientos quirúrgicos y pueden inhibir el sangrado y la formación de coágulos sanguíneos.

55 Ejemplo 48

Cirugía plástica

En la cirugía plástica, las composiciones de esta invención pueden usarse para recubrir el exterior de diversos 60 tipos de implantes, incluyendo implantes de pene o implantes de mamas, inhibiendo de este modo la formación de cicatrices, adherencias y pueden inhibir la contracción capsular que resulta de la implantación de una prótesis. Las composiciones de esta invención también pueden usarse como un material de relleno para implantes de mamas o para implantes testiculares y esfínteres artificiales.

Ejemplo 49

Procedimientos ortopédicos y articulares

5 Las composiciones de esta invención pueden usarse para inhibir la formación de adherencias y cicatrices después de una cirugía de reemplazo de articulaciones, revisión articular y cirugía de tendones. Los geles y fluidos de esta invención pueden usarse como reemplazo de líquido sinobial para articulaciones y, por lo tanto, puede disminuir el dolor, la inflamación y la hinchazón de estructuras articulares asociada con la osteoartritis. Los geles y fluidos de esta invención también pueden usarse como lubricantes de tendones y ligamentos, disminuyendo de este modo la
10 incidencia de inflamación de tendones, ligamentos y vainas. Las composiciones pueden actuar como un armazón o construcción de crecimiento de tejido resorbible para reemplazar tejidos ausentes o desgastados con tejidos recrecidos.

Ejemplo 50

15 *Tratamiento de la inflamación articular*

En otras realizaciones, los síntomas de inflamación articular pueden reducirse por administración de una composición de gel directamente en la articulación. La administración puede llevarse a cabo usando un artroscopio para
20 visualizar el área para depositar el gel o a través de una aguja en la articulación. En ciertas situaciones, puede ser deseable inyectar microesferas en lugar de un gel homogéneo.

Ejemplo 51

25 *Procedimientos de oídos, nariz y garganta*

Las composiciones de esta invención pueden usarse para inhibir la formación de adherencias y cicatrices después de procedimientos de la nariz, narinas, senos, oído medio y oído interno.
30

Ejemplo 52

35 *Administración de fármacos*

Las composiciones de esta invención pueden usarse para la administración local de fármacos, factores de crecimiento, enzimas, proteínas, agentes farmacológicos, genes, segmentos génicos, vitaminas y sustancias naturopáticas. Las composiciones se usan en formas de dosificación deseadas para ingestión oral, inhalación, aplicación transdérmica, aplicación rectal o vaginal y administración ocular. Las composiciones de esta invención pueden combinarse con
40 recubrimiento de superficies, deposición, impregnación, encapsulación o en realizaciones de una sola capa o multicapa.

Los tipos de fármacos son agentes antibacterianos, agentes antiinflamatorios, antiparasitarios, antivirales, anestésicos, antifúngicos, analgésicos, agentes de diagnóstico, antidepresivos, descongestivos, antiartríticos, antiasmáticos,
45 anticoagulantes, anticonvulsivantes, antidiabéticos, antihipertensores, agentes antiadherencias, agentes anticancerosos, agentes de reemplazo o modificación genética y fármacos de reemplazo de tejidos.

Otras características, aspectos y objetos de la invención pueden obtenerse de una revisión de las figuras y las reivindicaciones.
50

Se entenderá que otras realizaciones de la invención pueden desarrollarse y estarán dentro del alcance de la invención y las reivindicaciones.
55

60

65

65

REIVINDICACIONES

1. Un gel iónicamente reticulado biocompatible que comprende:

- un poliacido (PA);
- un polímero no iónico que consiste en monómeros de óxido de alquileo; y
- un catión multivalente.

2. El gel de la reivindicación 1, en el que dicho poliacido se selecciona de un carboxipolisacárido, ácido poliacrílico, ácido poliamino, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido polimetacrílico, ácido politereftálico, ácido polihidroxibutírico, ácido polifosfórico, ácido poliestirenosulfónico y copolímeros de dichos poliacidos.

3. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el poliacido es un carboxipolisacárido seleccionado de carboximetilcelulosa (CMC), carboxietilcelulosa, quitina, carboximetilquitina, ácido hialurónico, alginato, alginato de propilenglicol, pectina, carboximetildextrano, carboximetilquitosana, heparina, sulfato de heparina, sulfato de condroitina y ácidos poliurónicos, incluyendo ácido polimanurónico, ácido poliglucurónico y ácido poligulurónico.

4. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el poliacido es carboximetilcelulosa.

5. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el poliacido es carboximetilcelulosa que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 10 kd a aproximadamente 10.000 kd y un grado de sustitución en el intervalo de más de aproximadamente 0 a aproximadamente 3.

6. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho óxido de polialquileo se selecciona de óxido de polipropileno, polietilenglicol, óxido de polietileno y copolímeros de bloque de PEO/PPO.

7. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho óxido de polialquileo es óxido de polietileno o polietilenglicol que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 d a aproximadamente 8000 kd.

8. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho óxido de polialquileo es polietilenglicol que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 d a aproximadamente 5 kd.

9. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho PA está en el intervalo de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 99% en peso del contenido de sólidos totales.

10. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polímero no iónico está en el intervalo de aproximadamente el 1% en peso a aproximadamente el 90% en peso del contenido de sólidos totales.

11. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el contenido de sólidos totales del gel está en el intervalo de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10%.

12. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho catión es un catión trivalente.

13. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho catión es un catión divalente.

14. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho catión es un catión divalente seleccionado de Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} .

15. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el pH del gel está en el intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 7,5.

16. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un fármaco.

17. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un fármaco seleccionado de fármacos antitrombogénicos, fármacos antiinflamatorios, hormonas, factores quimiotácticos, analgésicos, factores de crecimiento, citoquinas, factores osteogénicos y anestésicos.

18. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un fármaco seleccionado de heparina, activador del plasminógeno tisular, aspirina, ibuprofeno, ketoprofeno, proteínas y péptidos que contienen un motivo de RGD y fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

19. El gel de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que tiene una viscosidad por debajo de aproximadamente 500.000 centipoises.

20. Una membrana seca que comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-19.

ES 2 311 455 T3

21. Un gel como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 o una membrana de acuerdo con la reivindicación 20, para el uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal.

22. Un gel o membrana de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el uso es cirugía plástica.

23. Uso de un gel iónicamente reticulado biocompatible que comprende:

un poliácido (PA);

un polímero no iónico que consiste en monómeros de óxido de alquileo; y

un catión multivalente,

en la fabricación de un medicamento para el uso en la inhibición de la formación de adherencias entre tejidos después de procesos quirúrgicos, traumatismos y/o patológicos.

24. Uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el gel es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

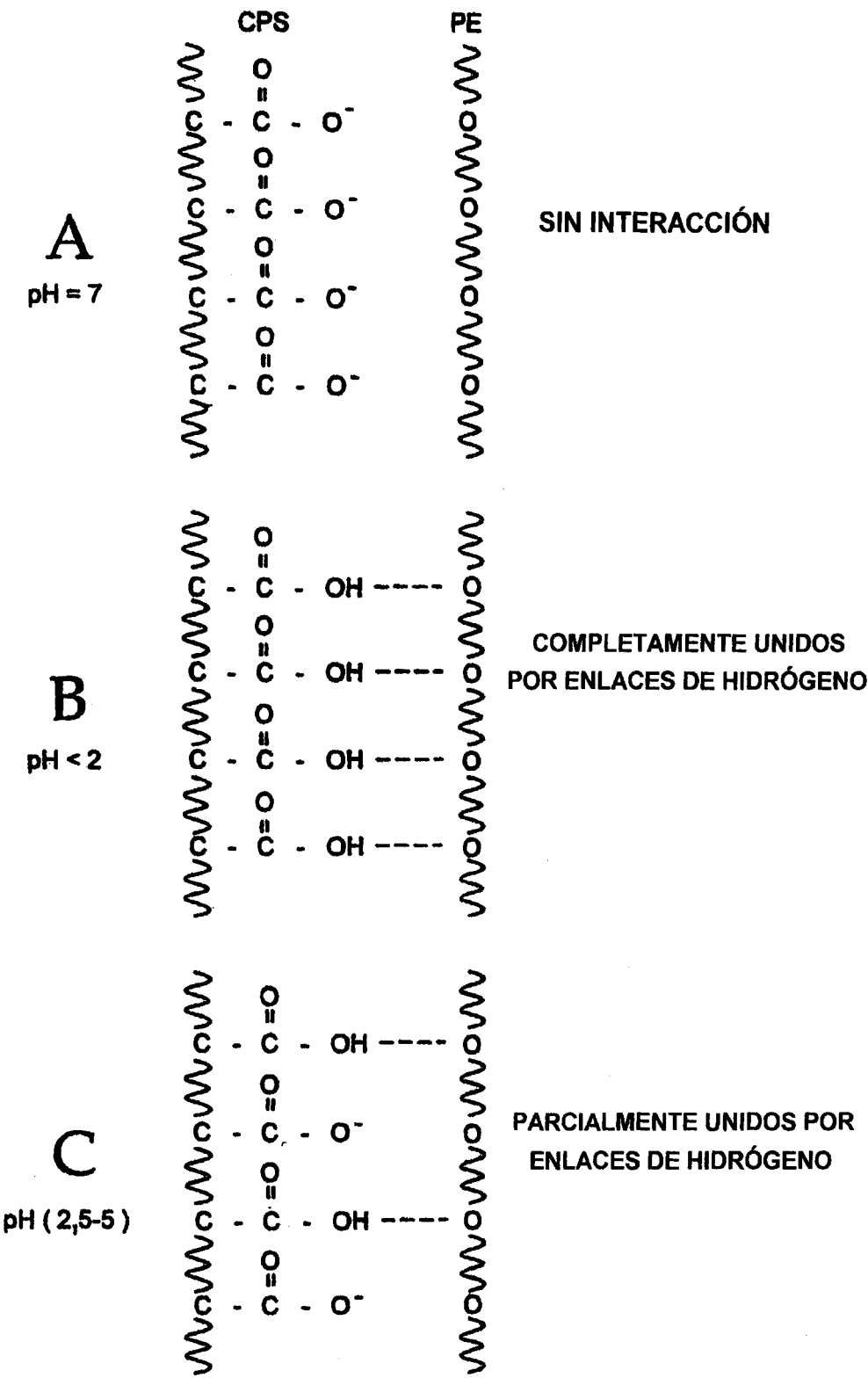
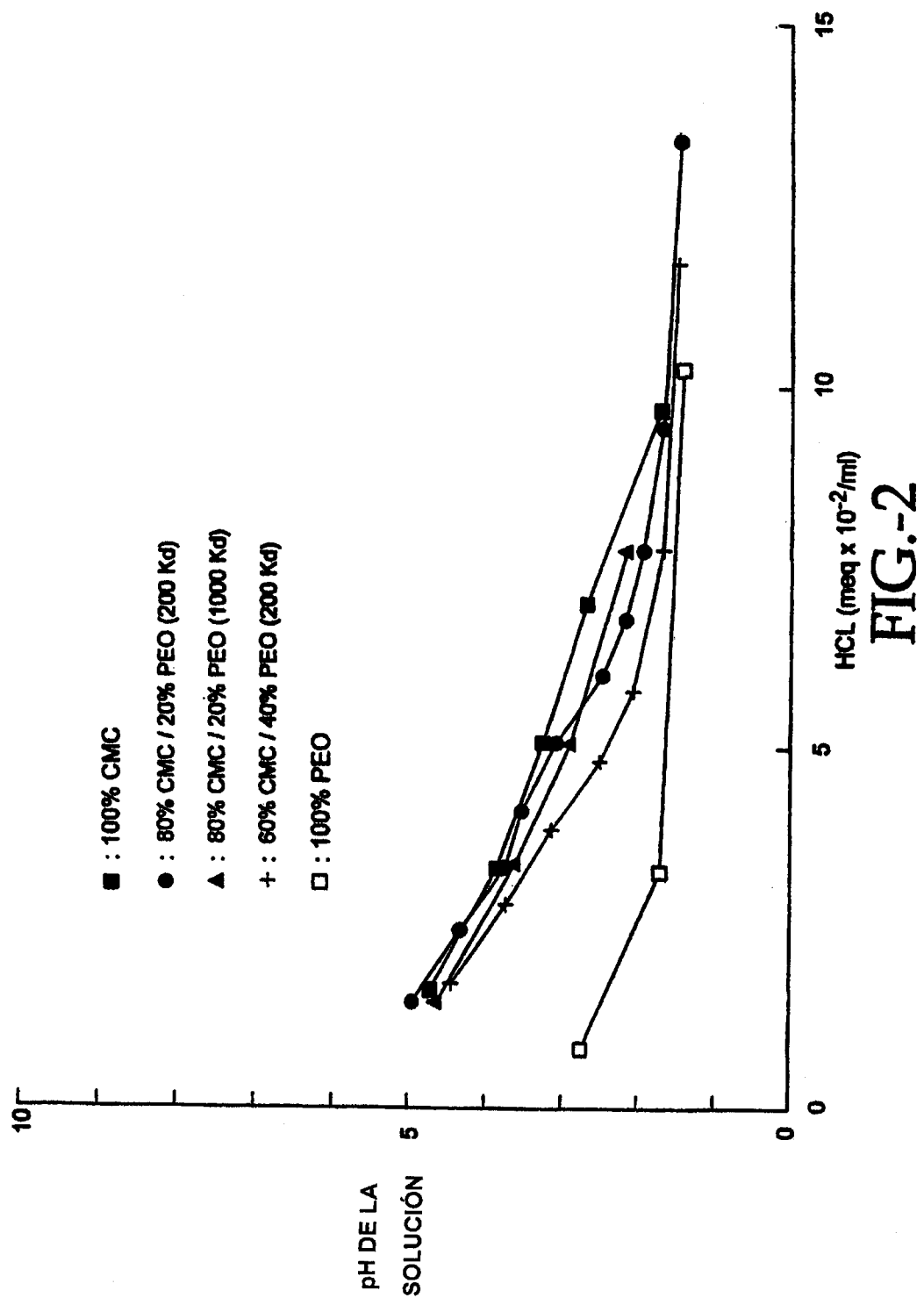


FIG.-1



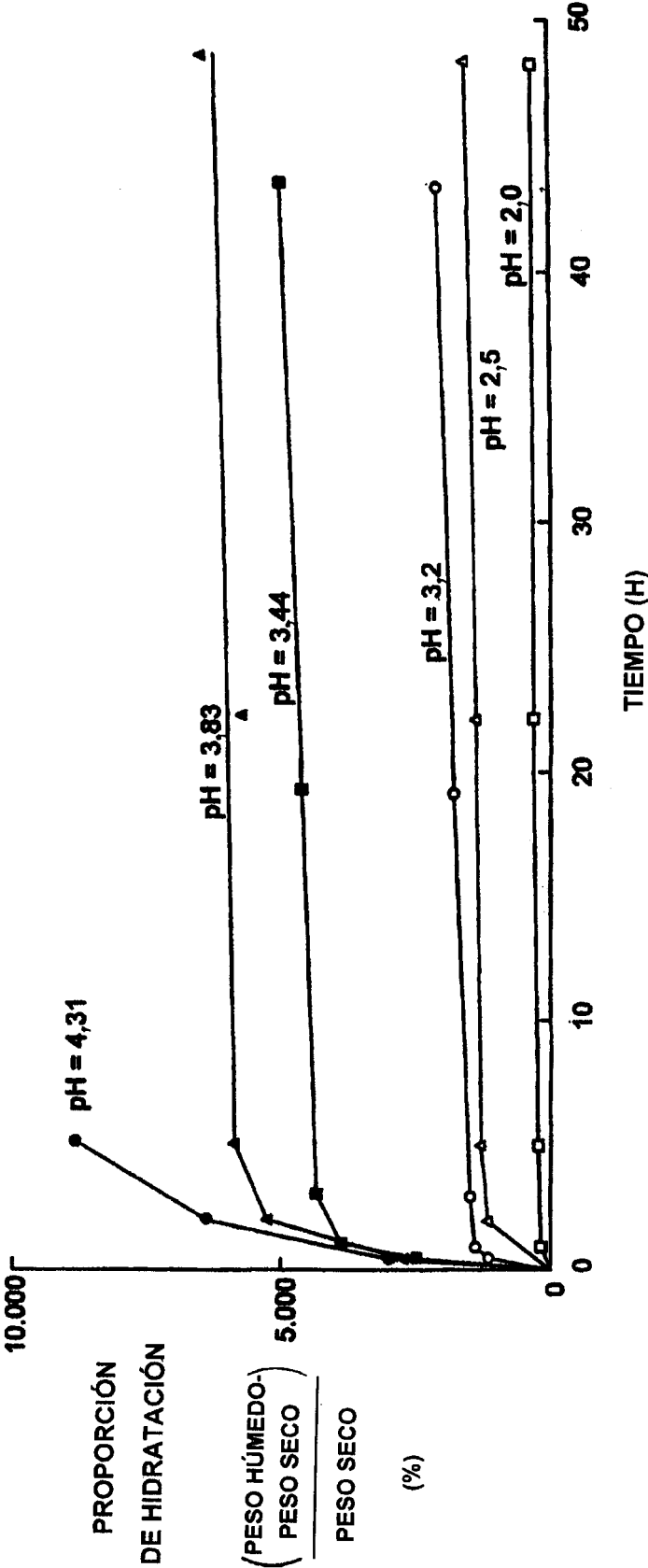


FIG.-3

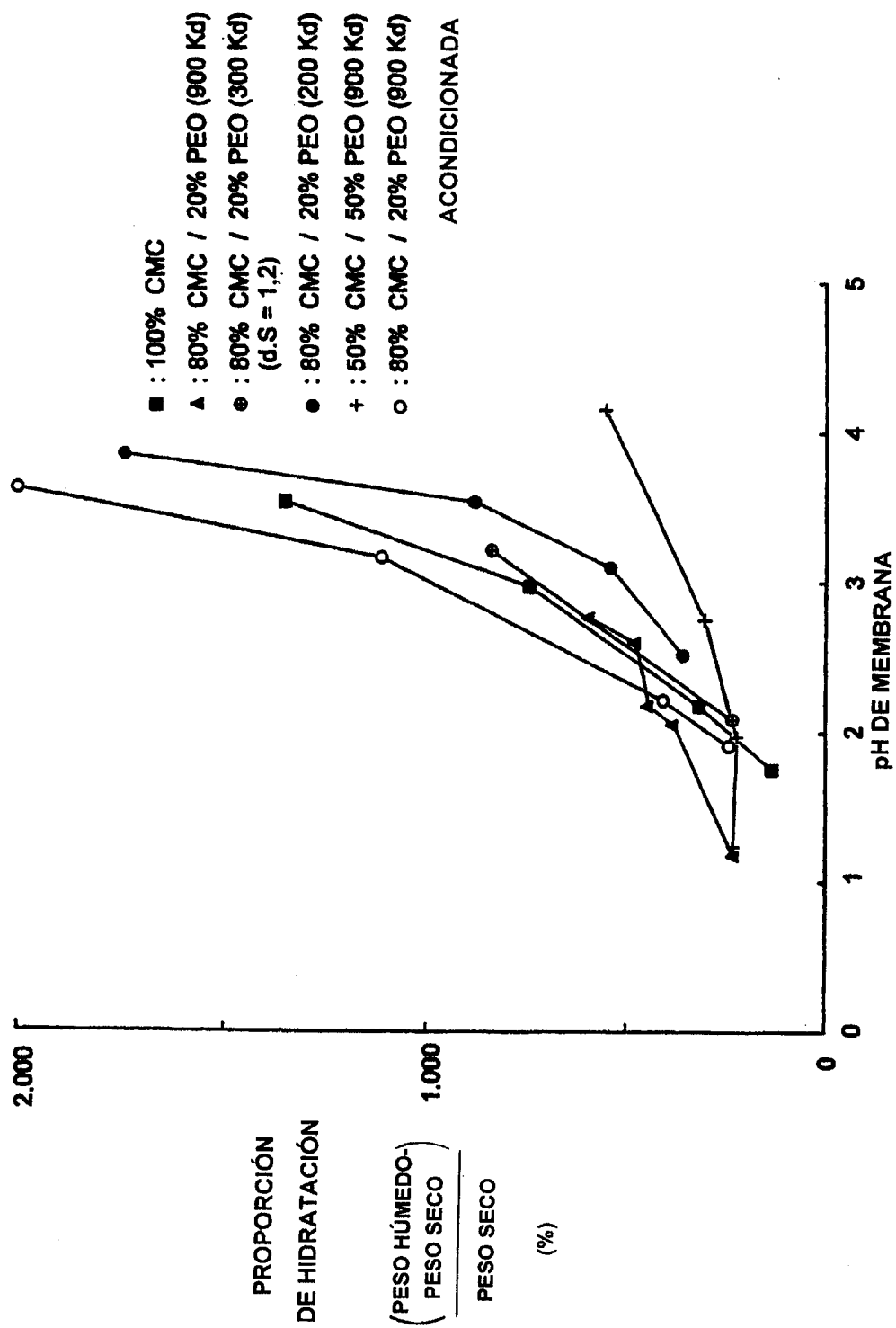


FIG.-4

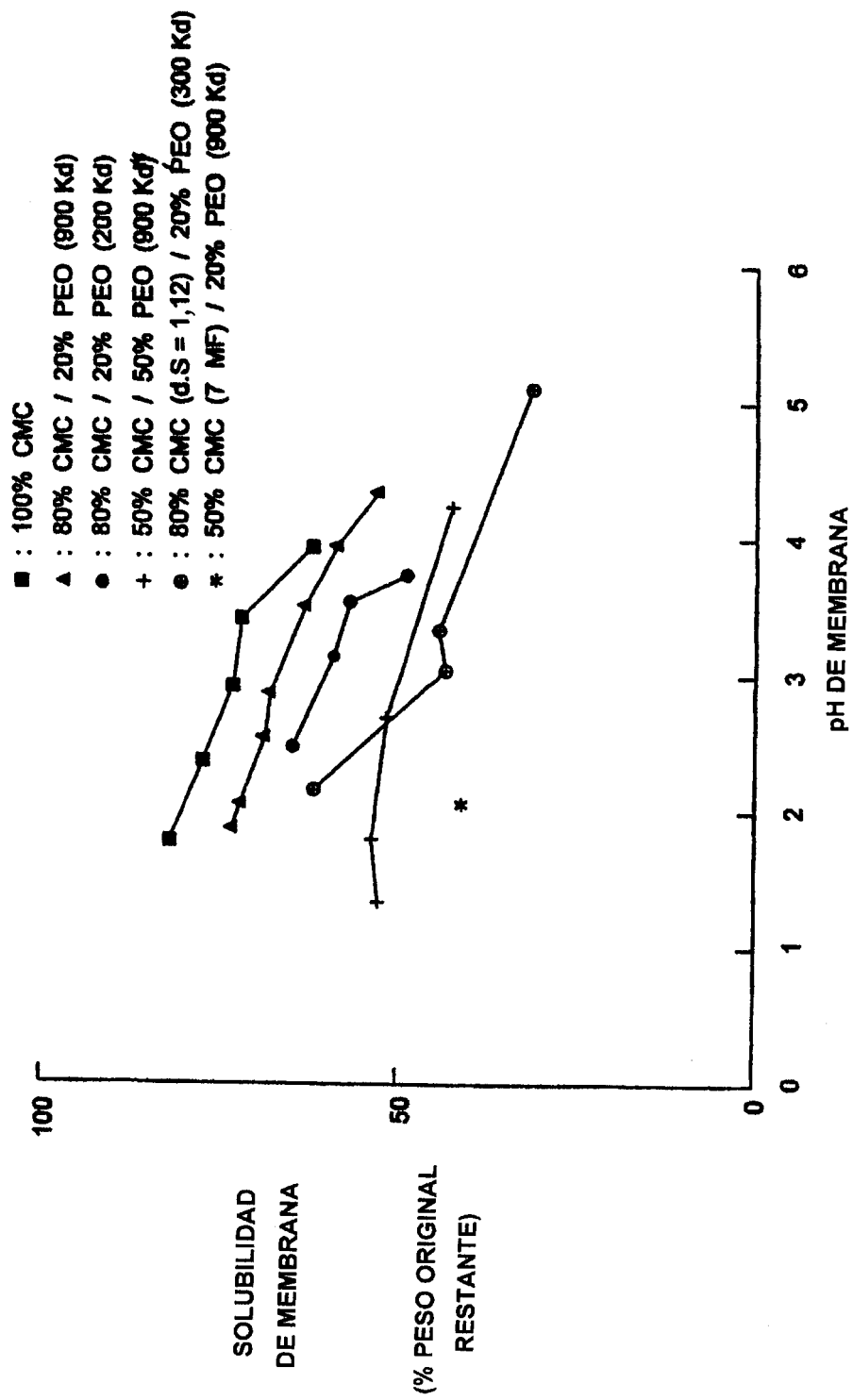


FIG.-5

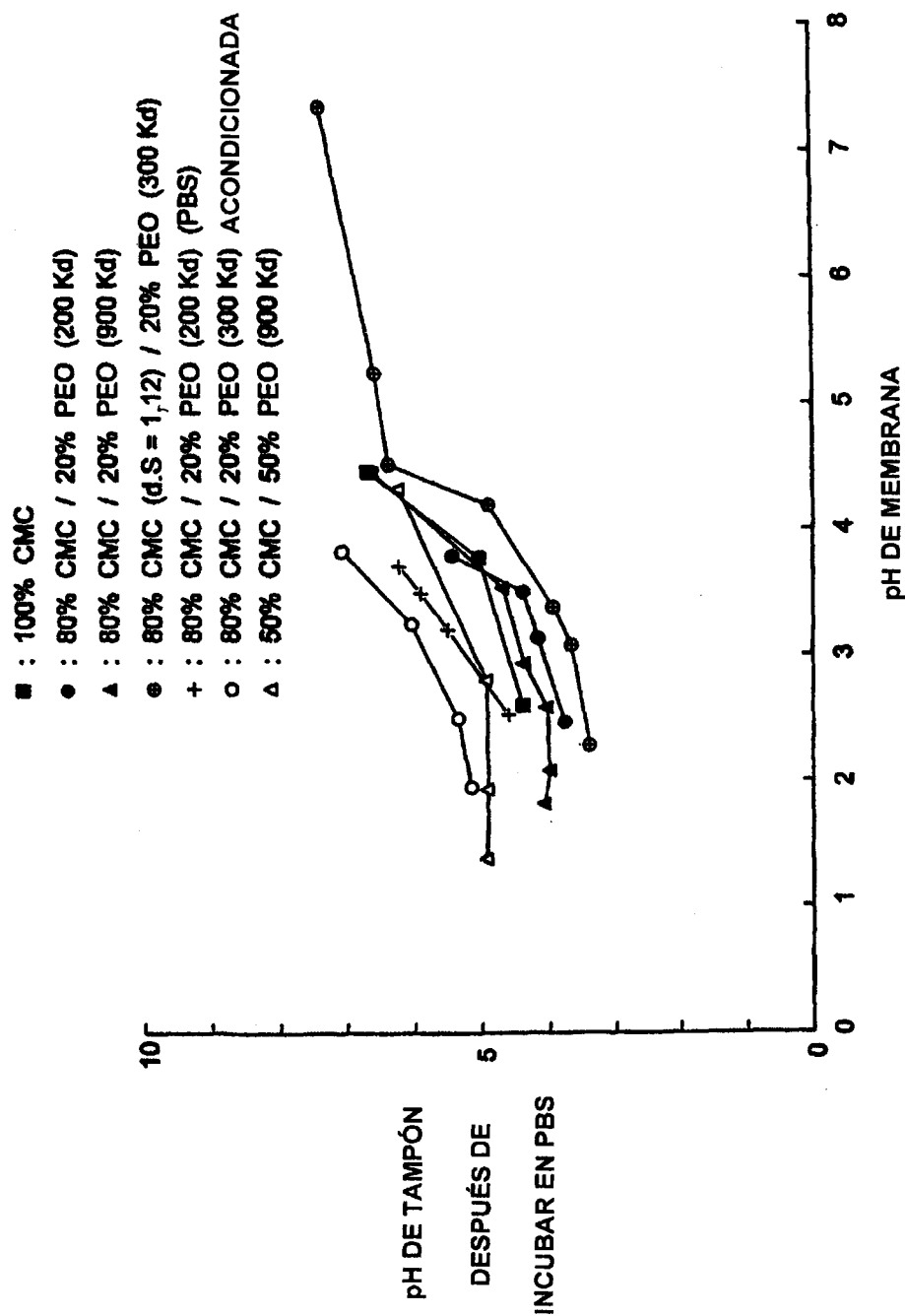


FIG.-6

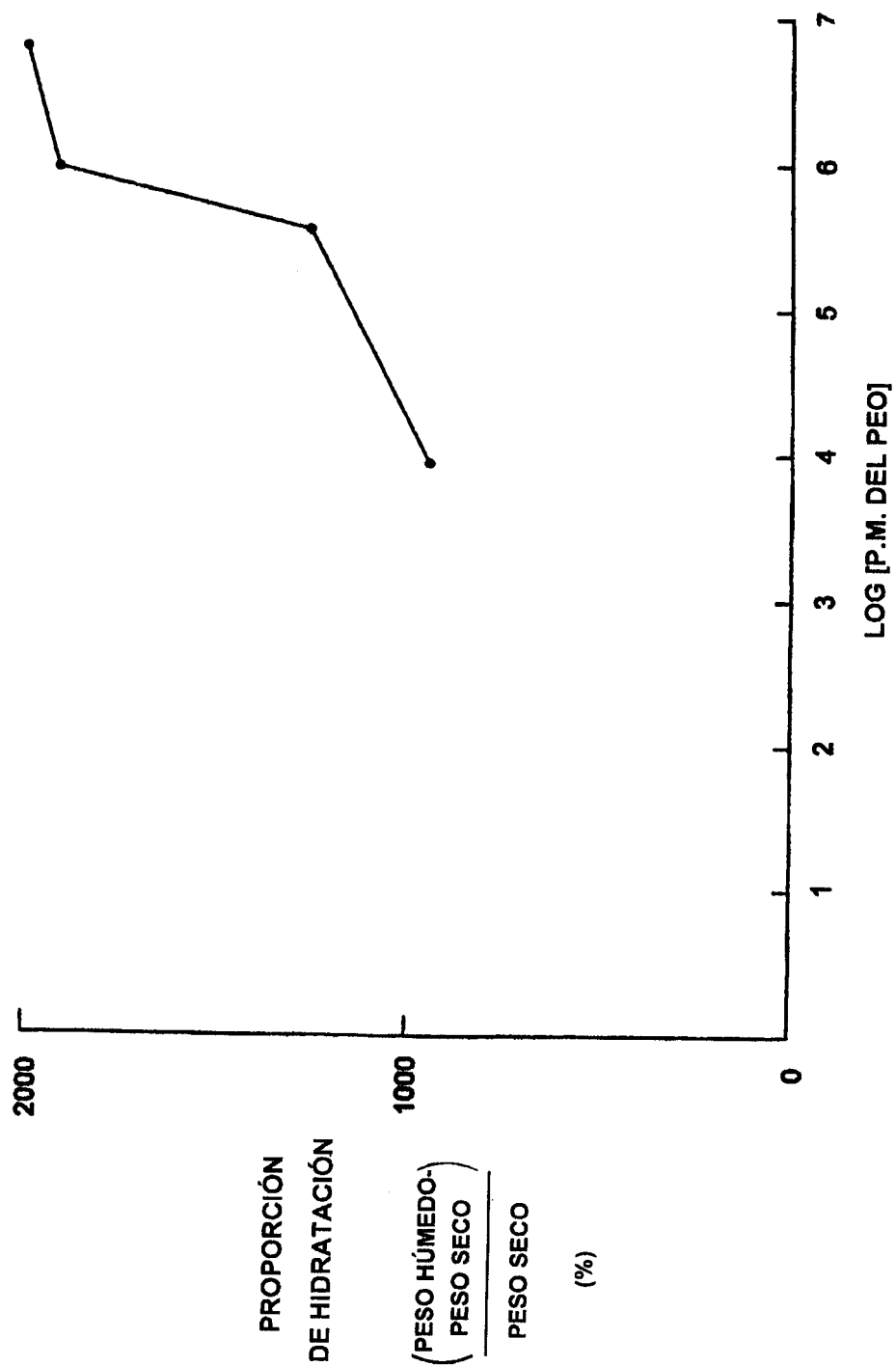


FIG.-7

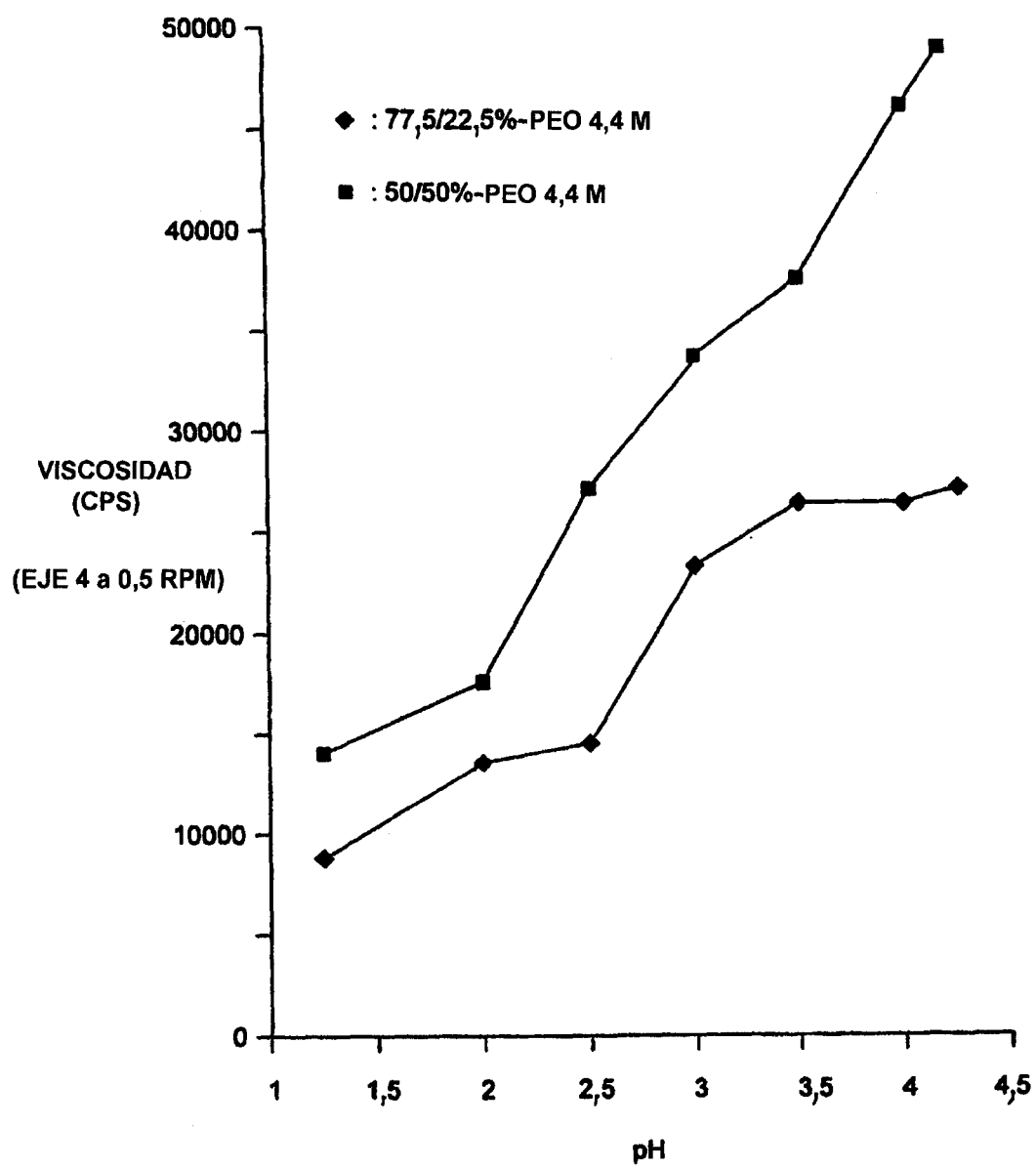


FIG.-8a

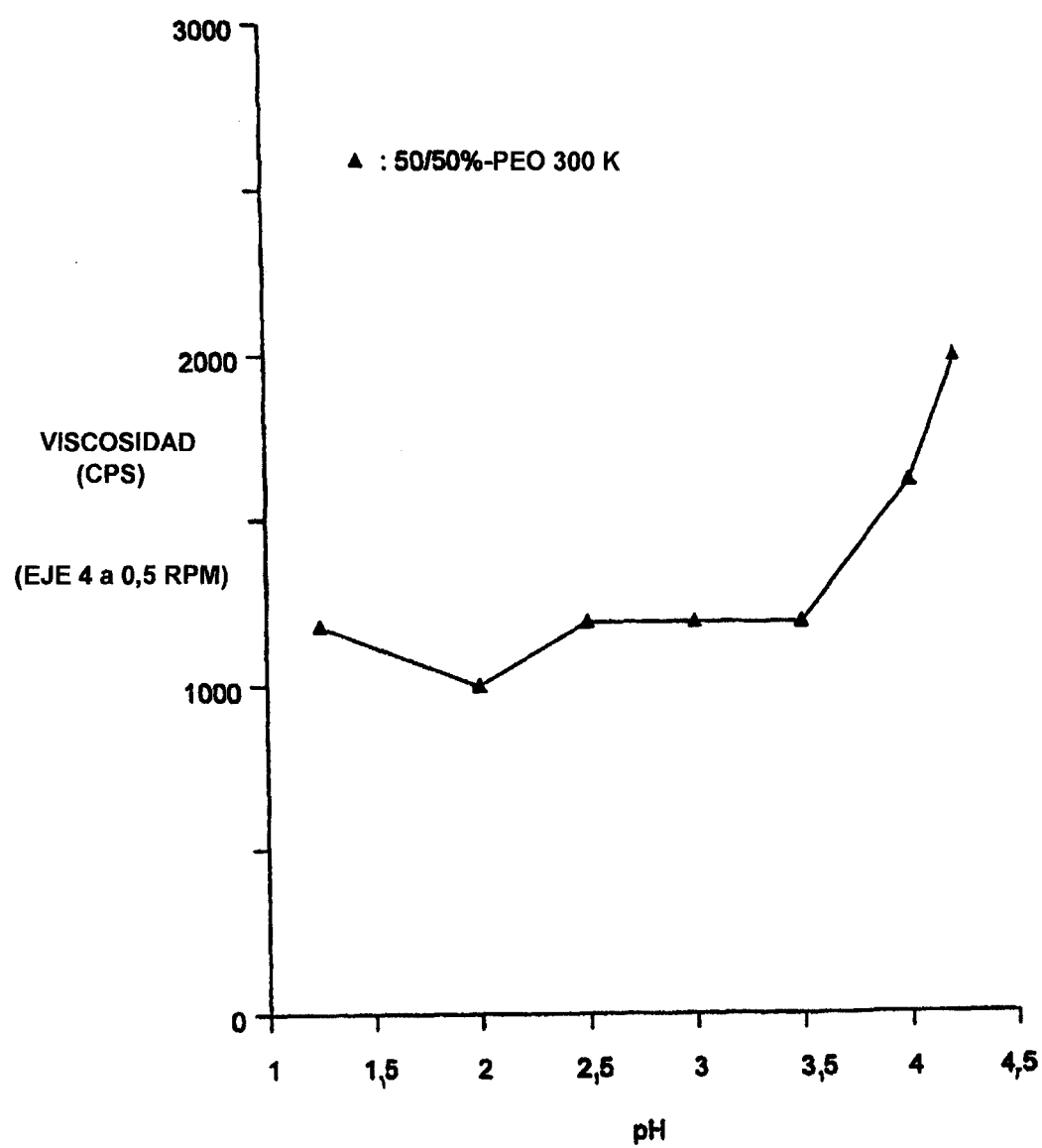


FIG.-8b

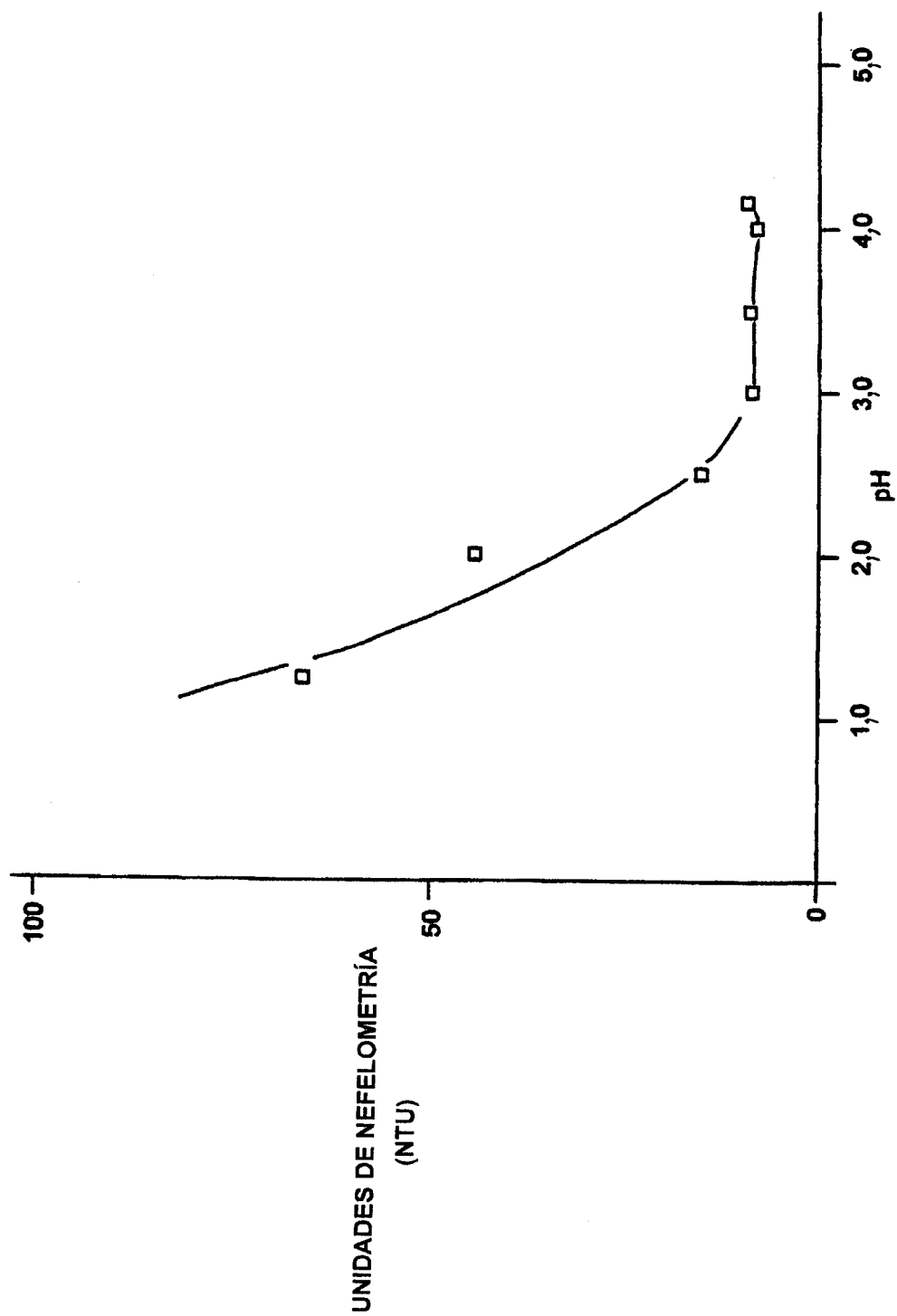


FIG.-9a

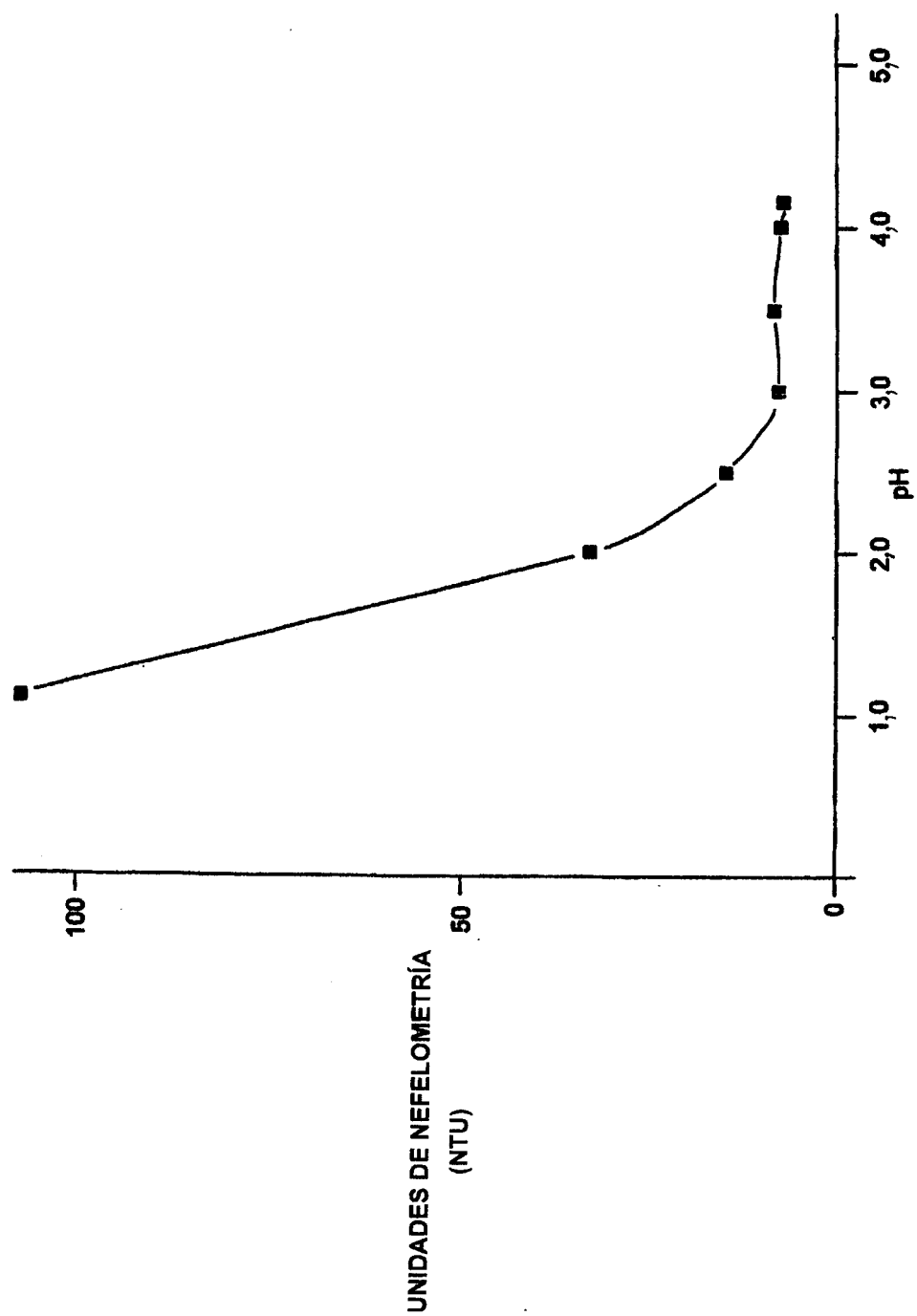


FIG.-9b

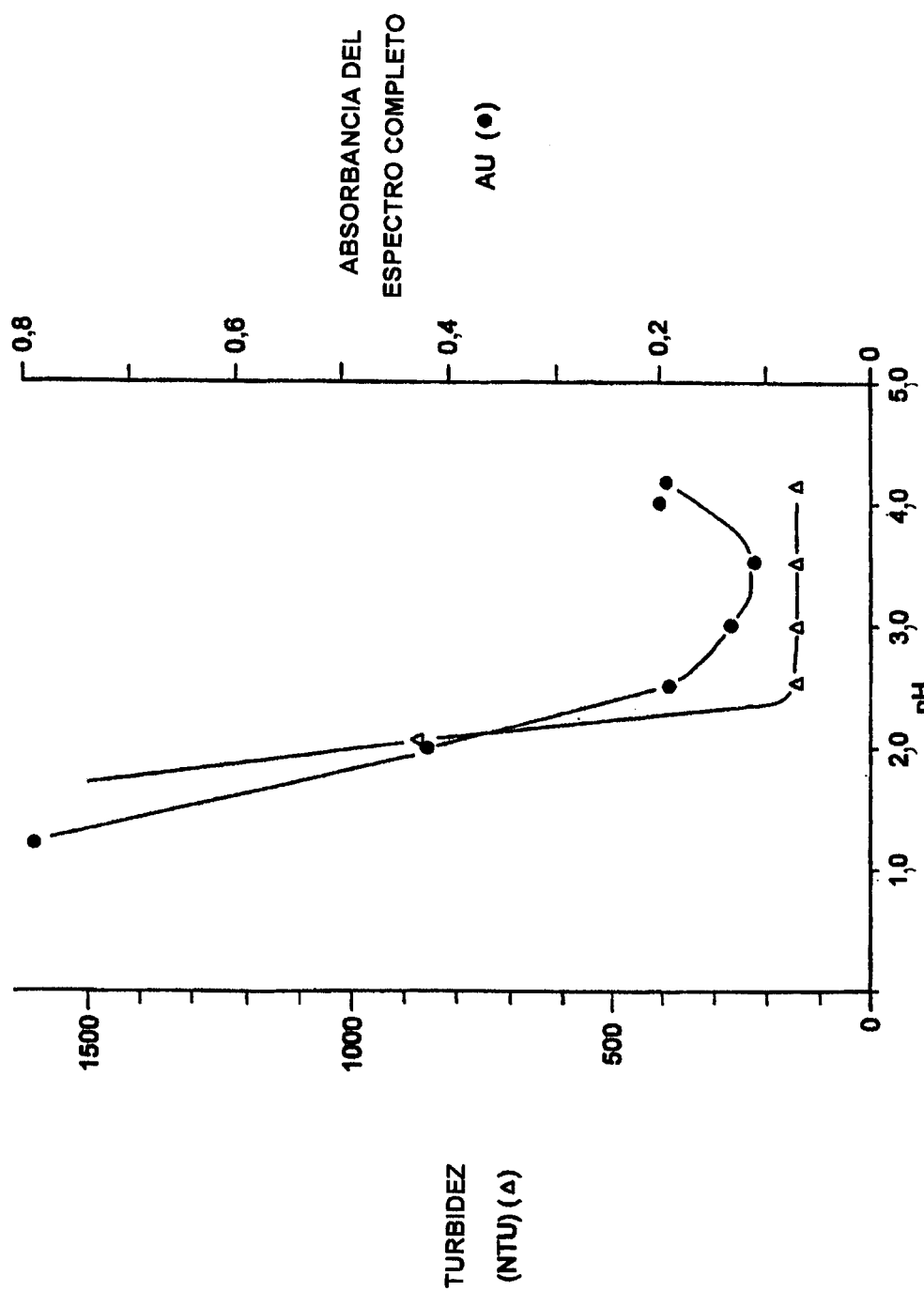


FIG.-10

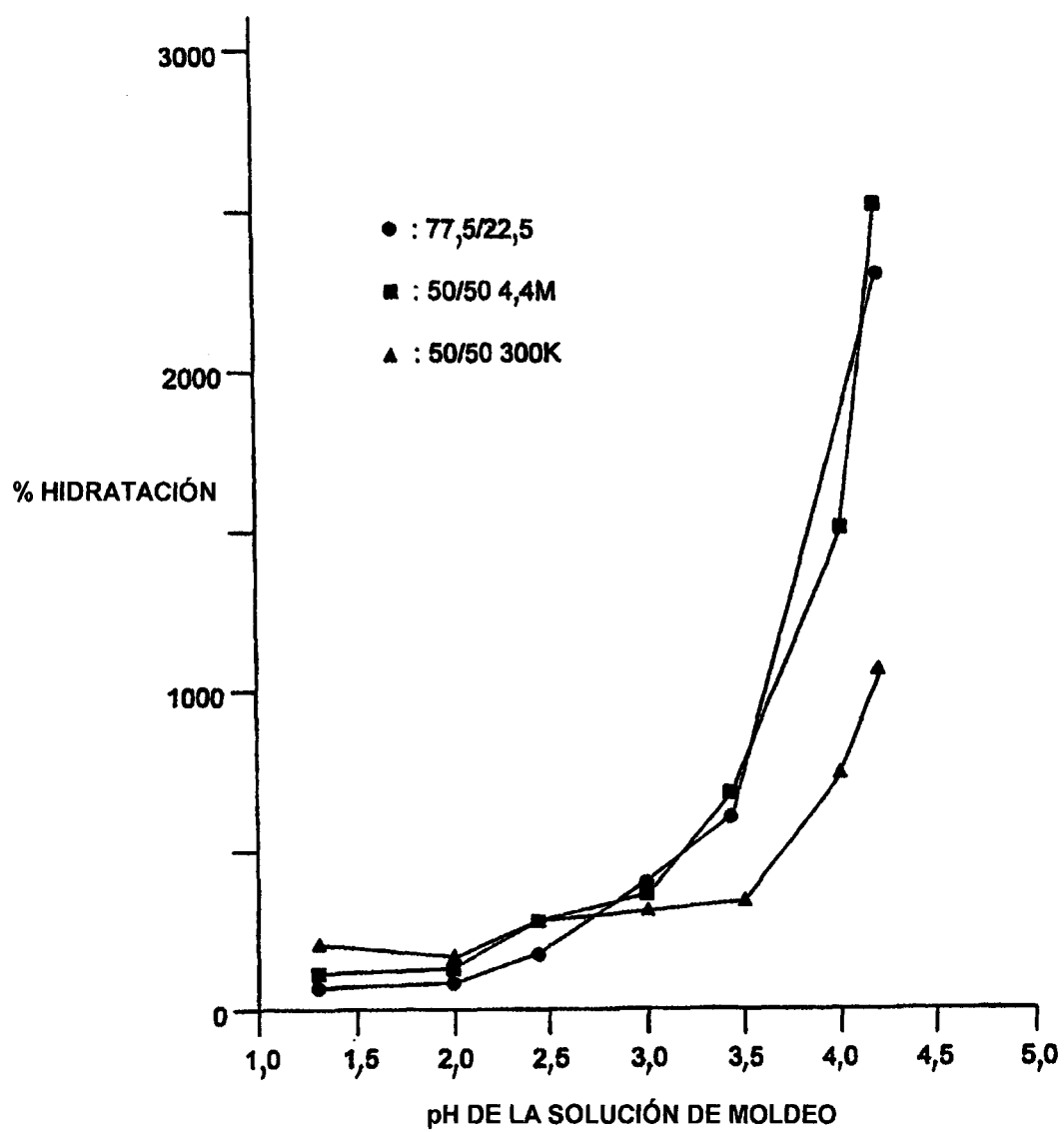


FIG.-11a

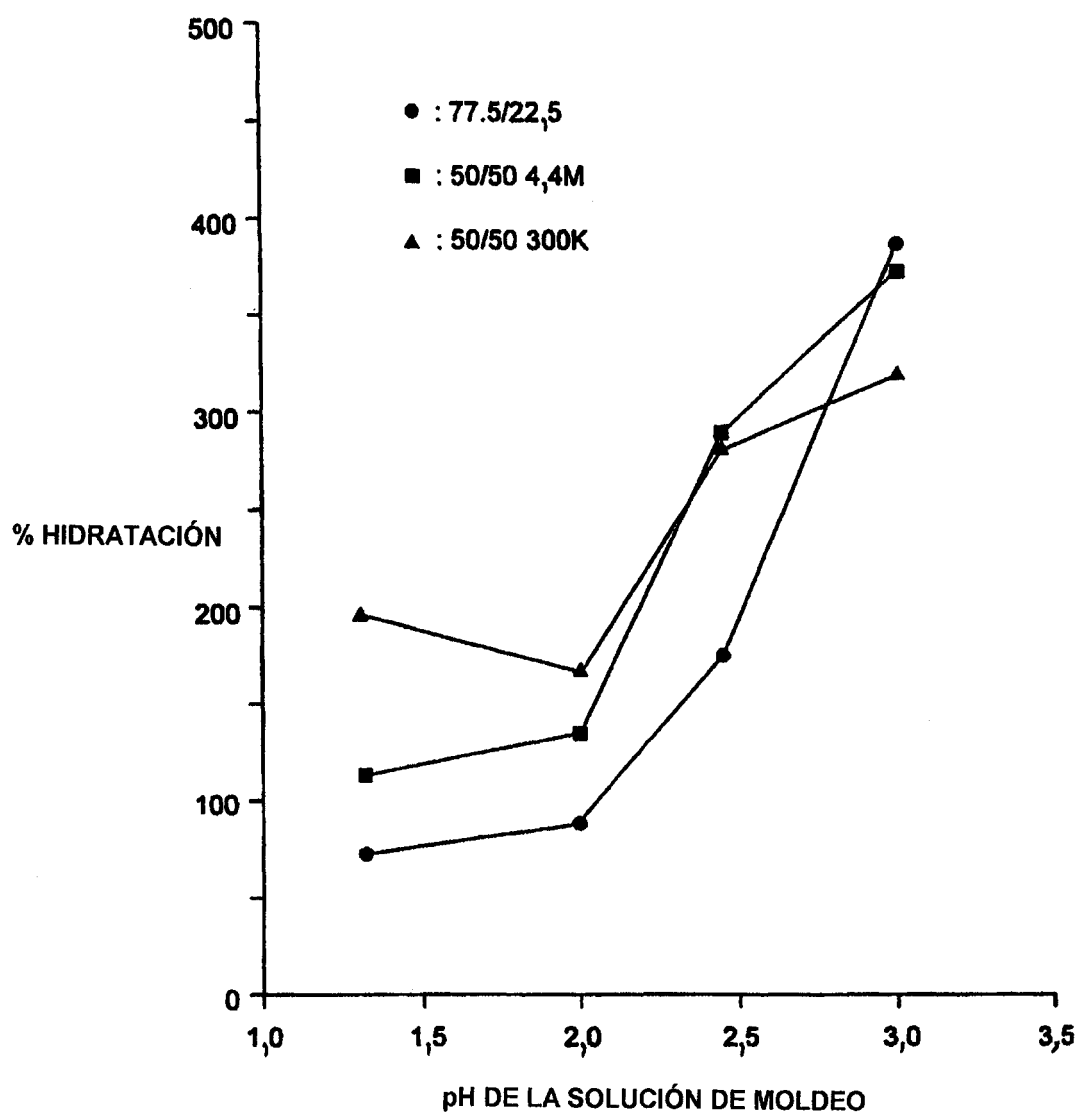


FIG.-11b

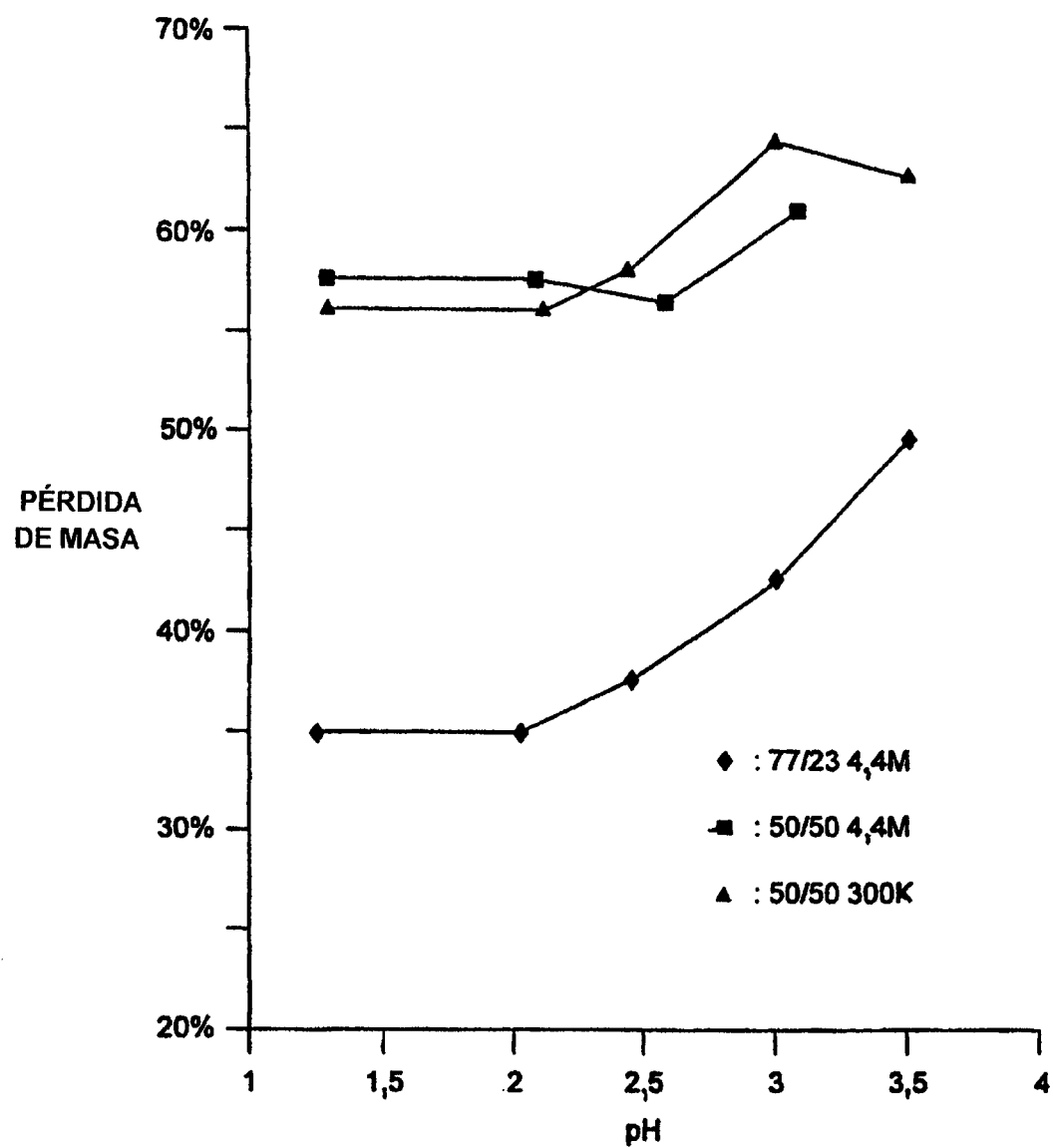


FIG.-12

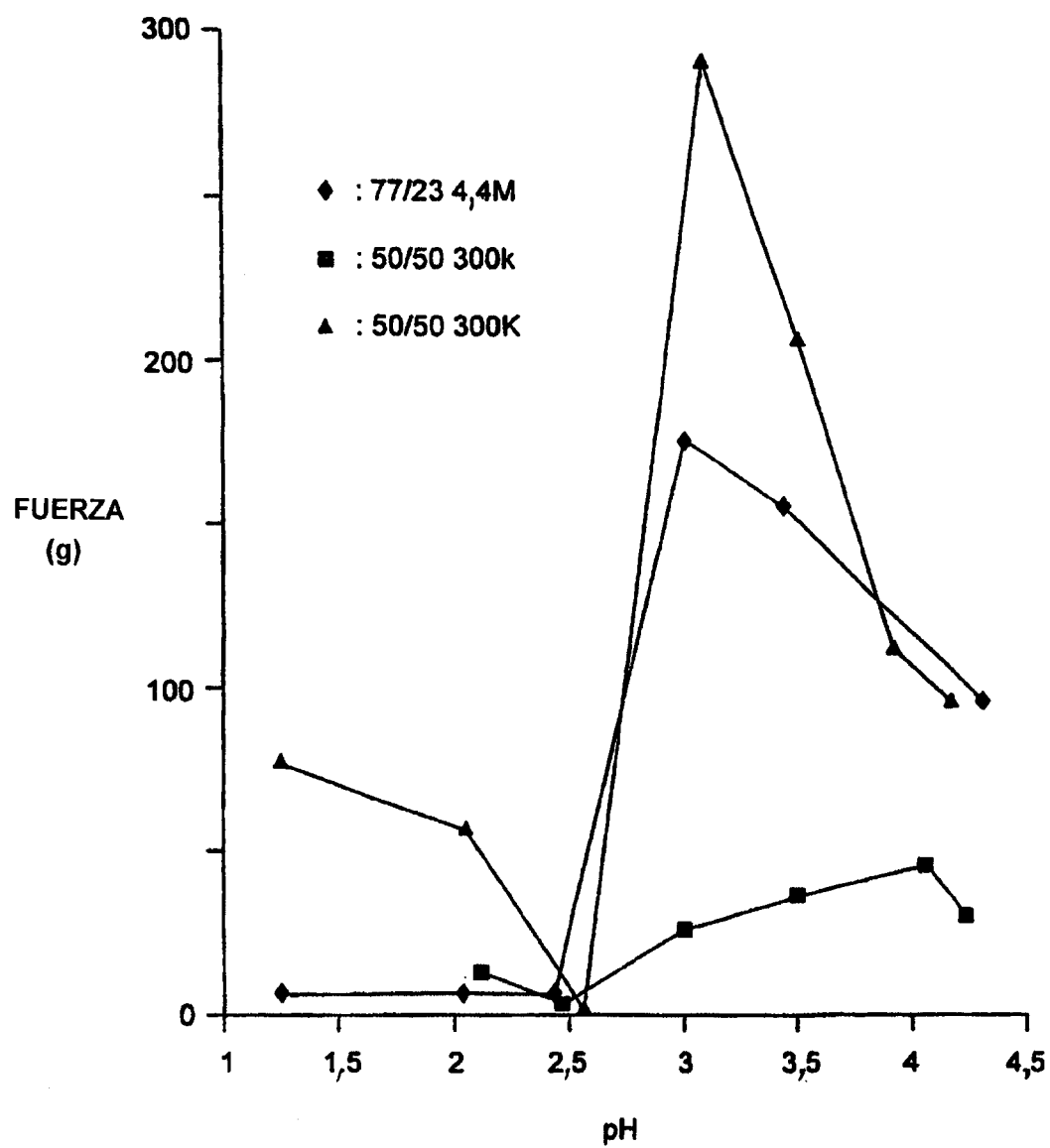


FIG.-13a

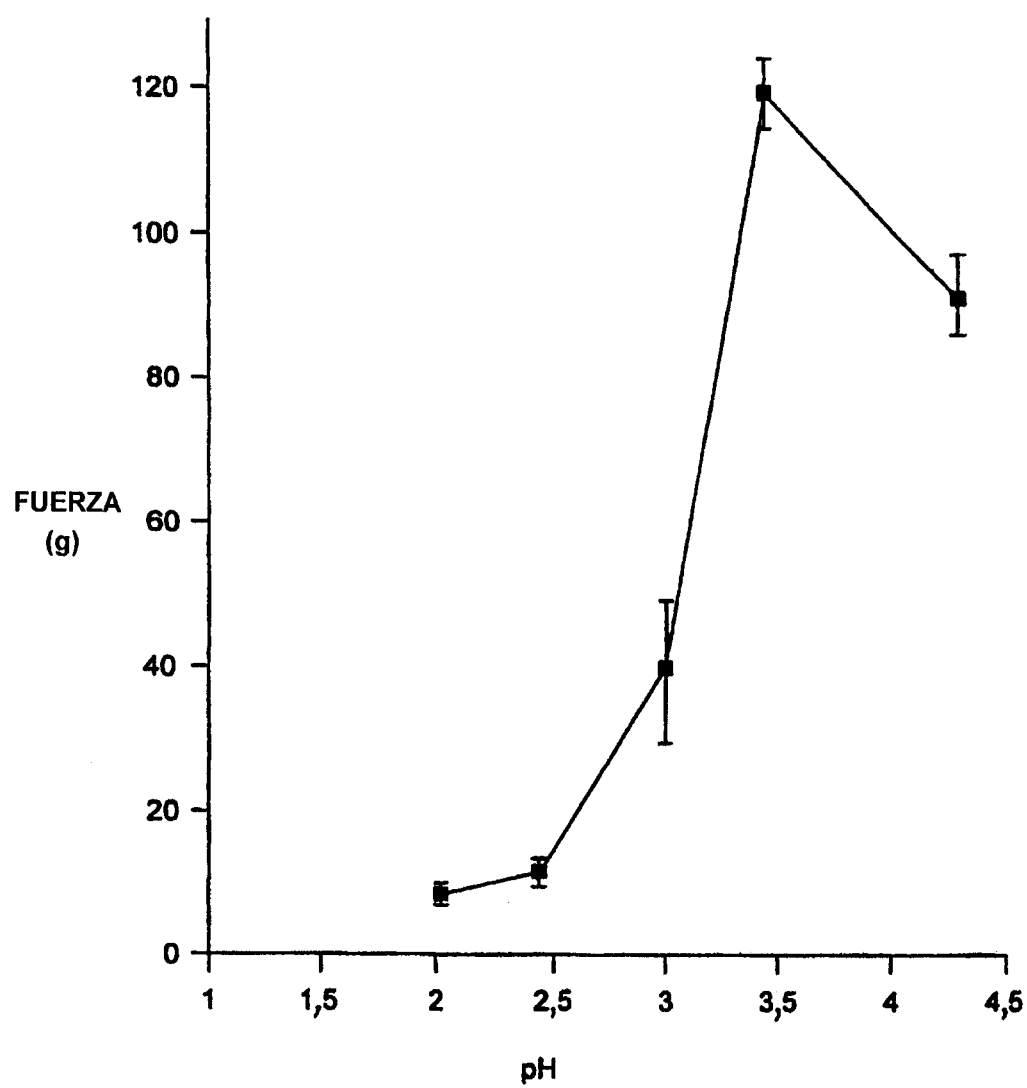


FIG.-13b

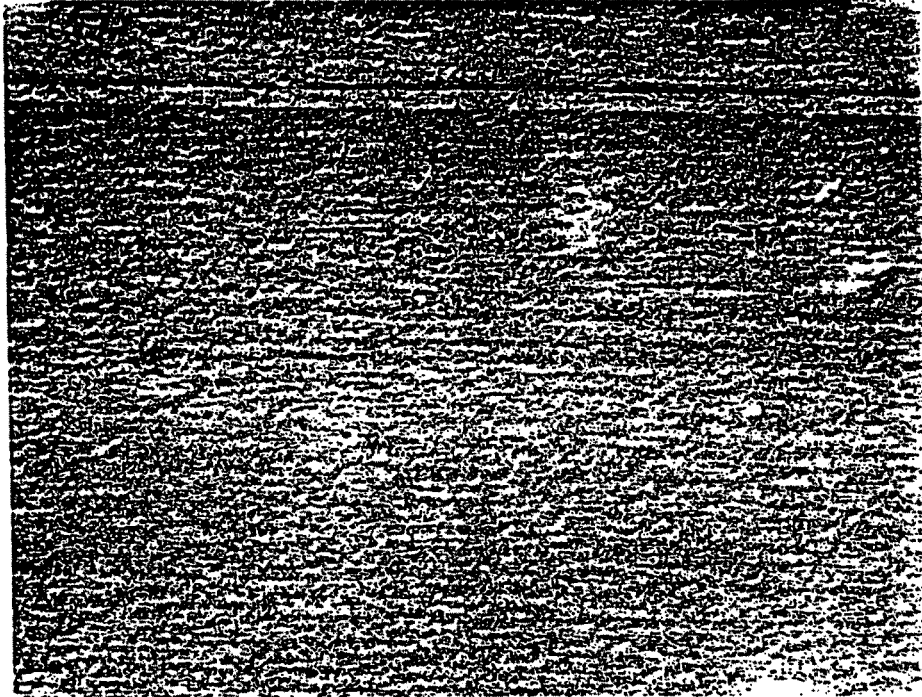


FIG. 14a

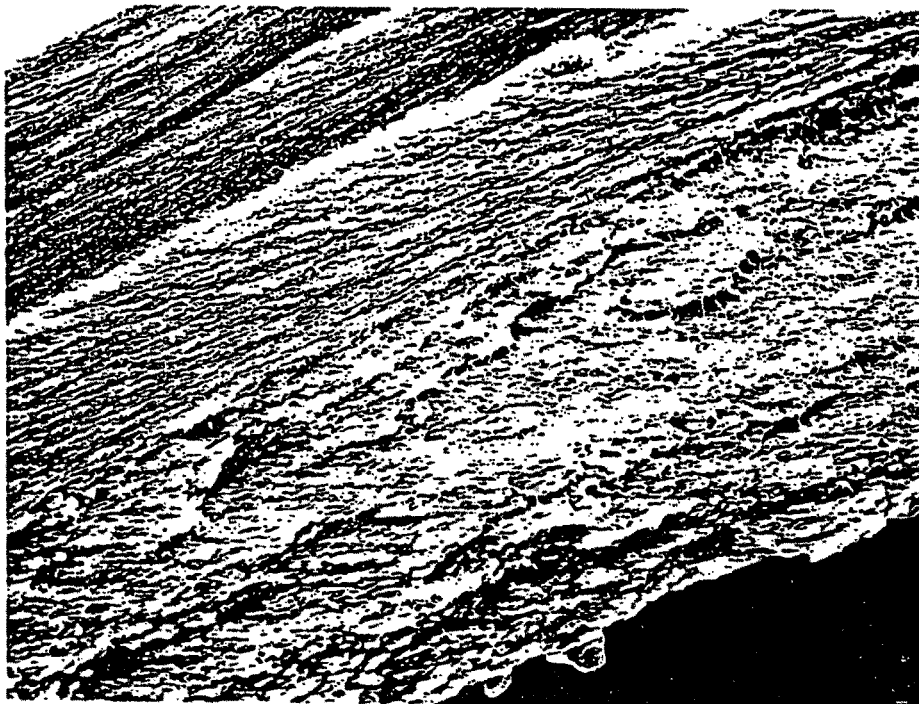


FIG. 14b

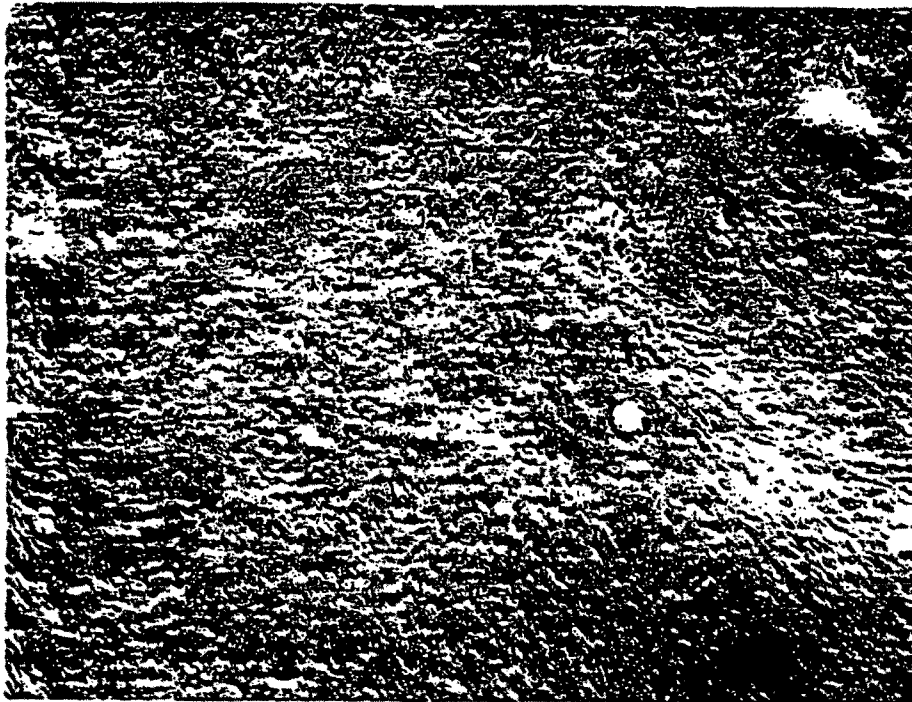


FIG. 15a



FIG. 15b



FIG. 16a

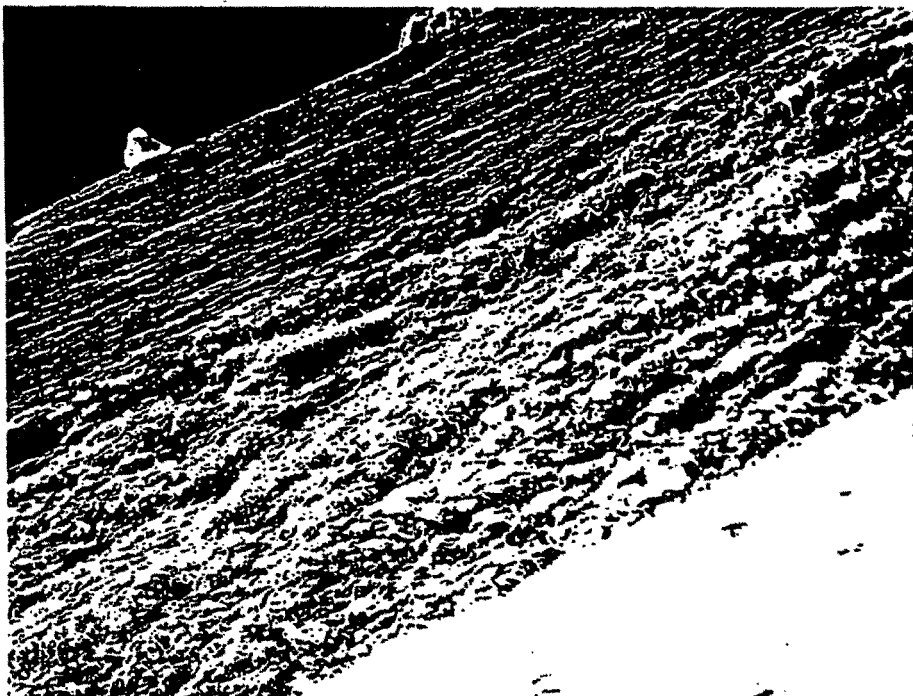


FIG. 16b

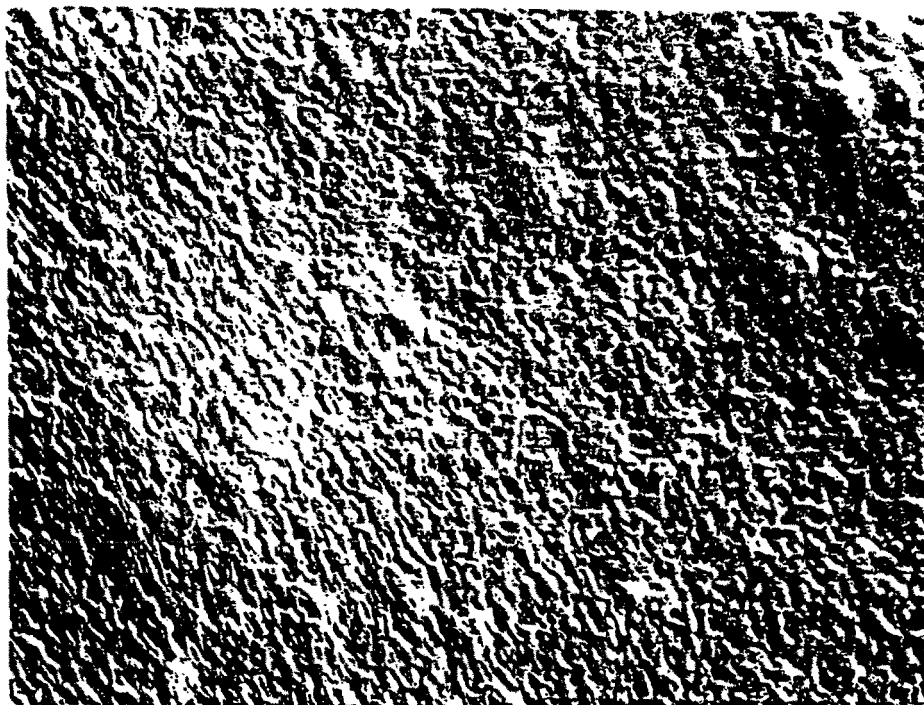


FIG. 17a

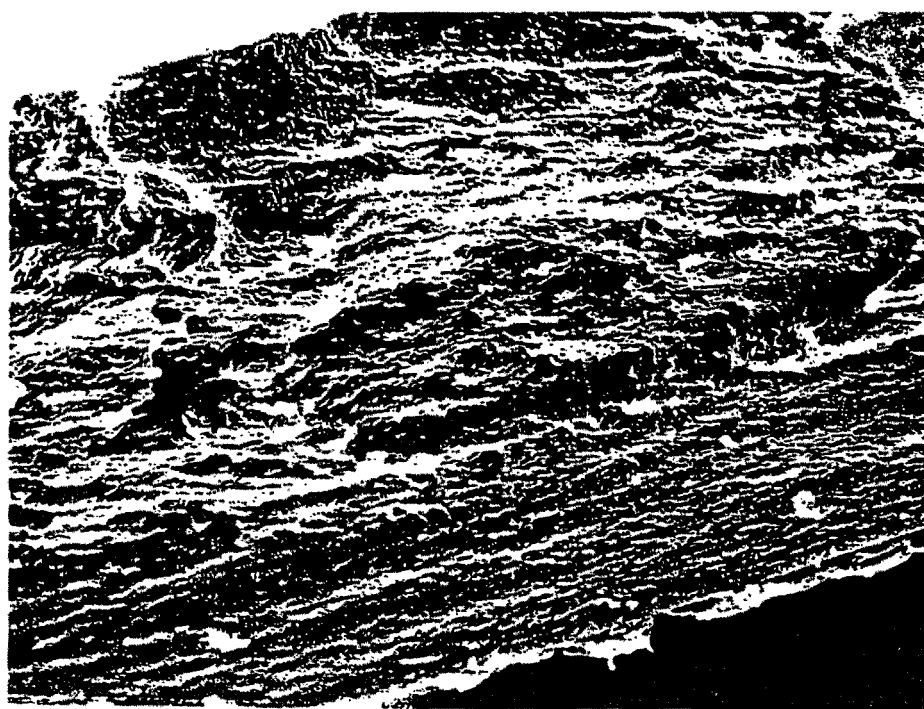


FIG. 17b

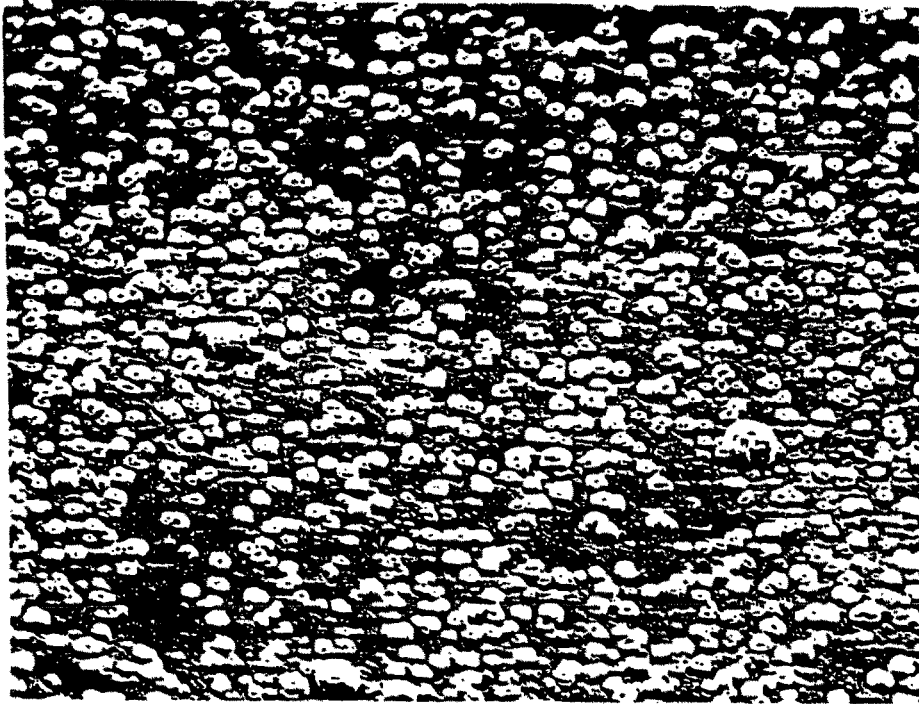


FIG. 18a

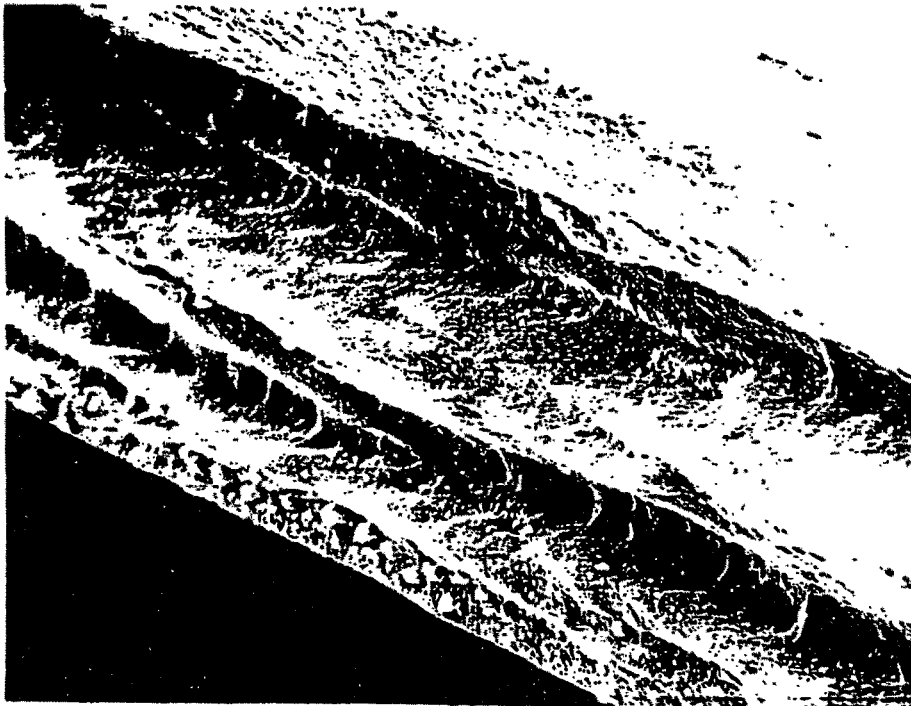


FIG. 18b

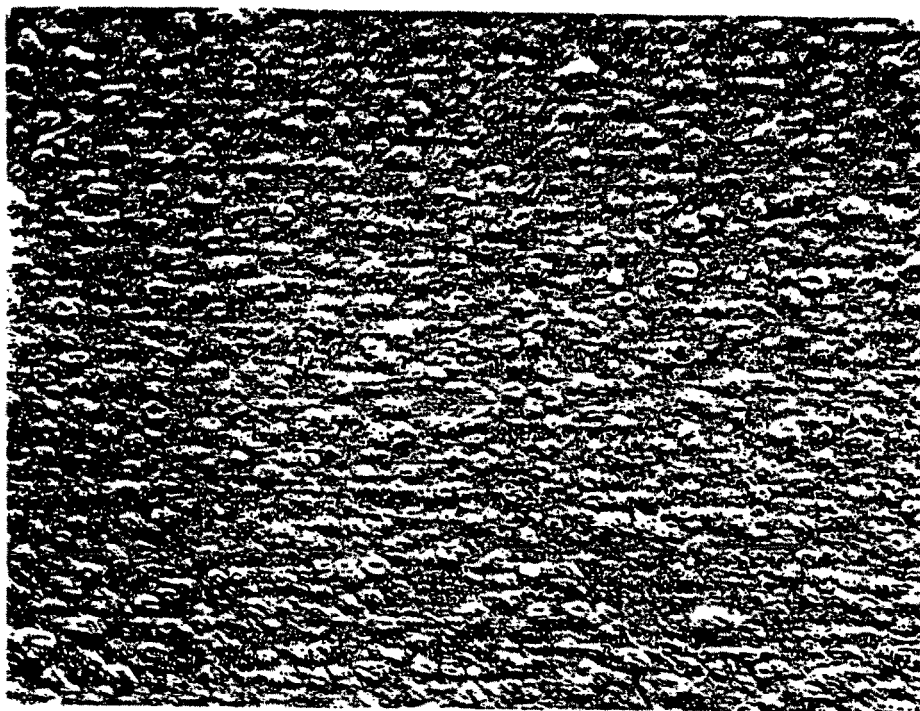


FIG. 19a

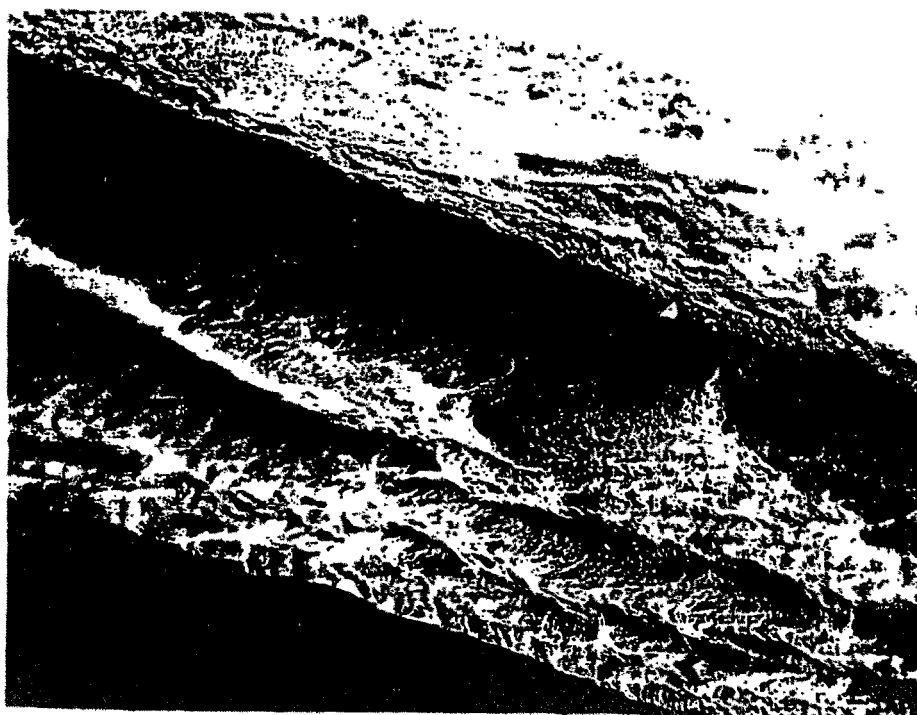


FIG. 19b

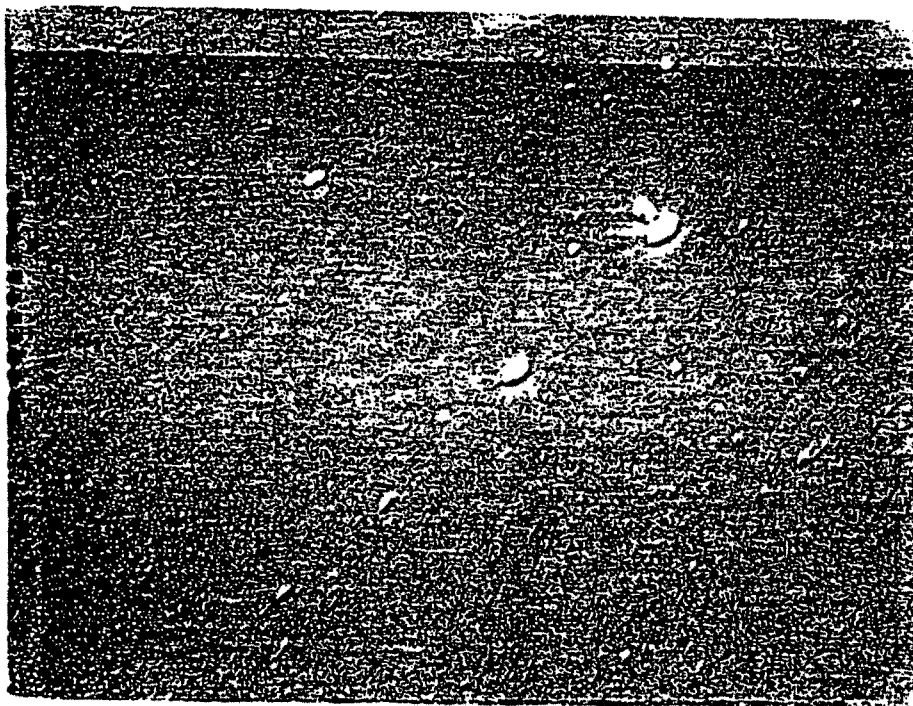


FIG. 20a

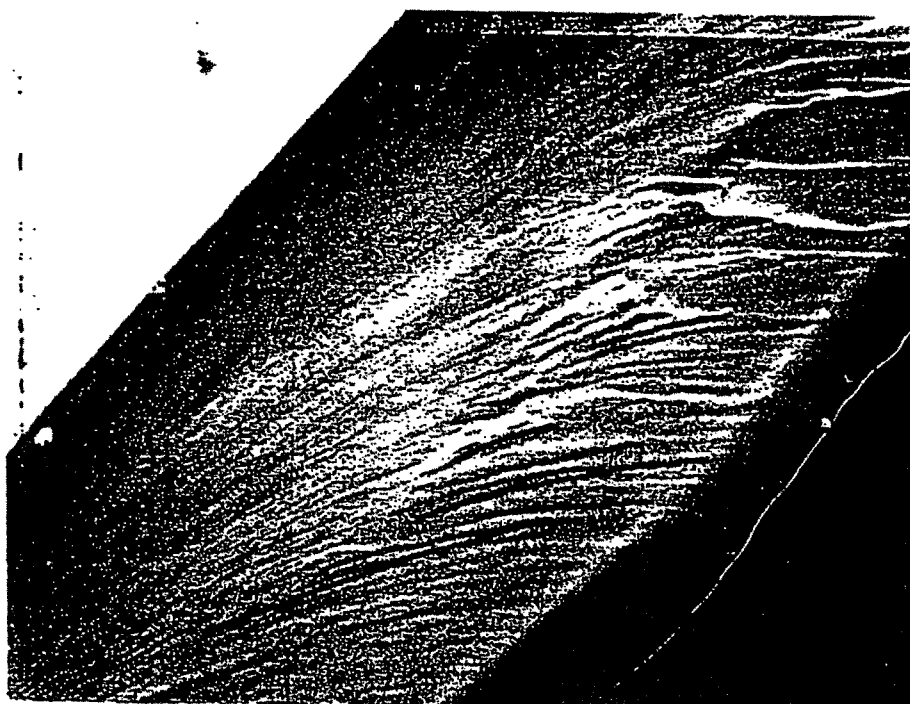


FIG. 20b

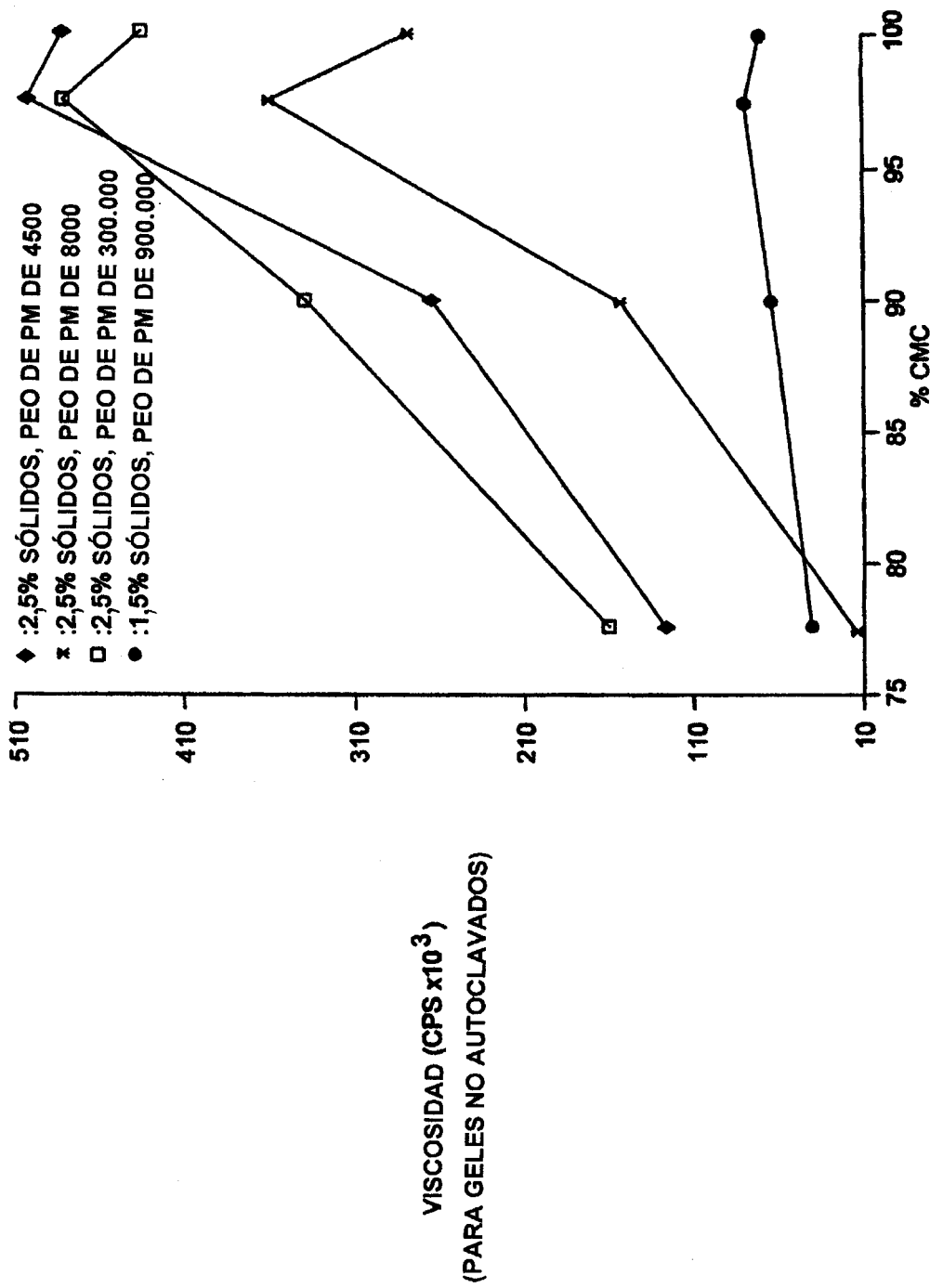


FIG.-21

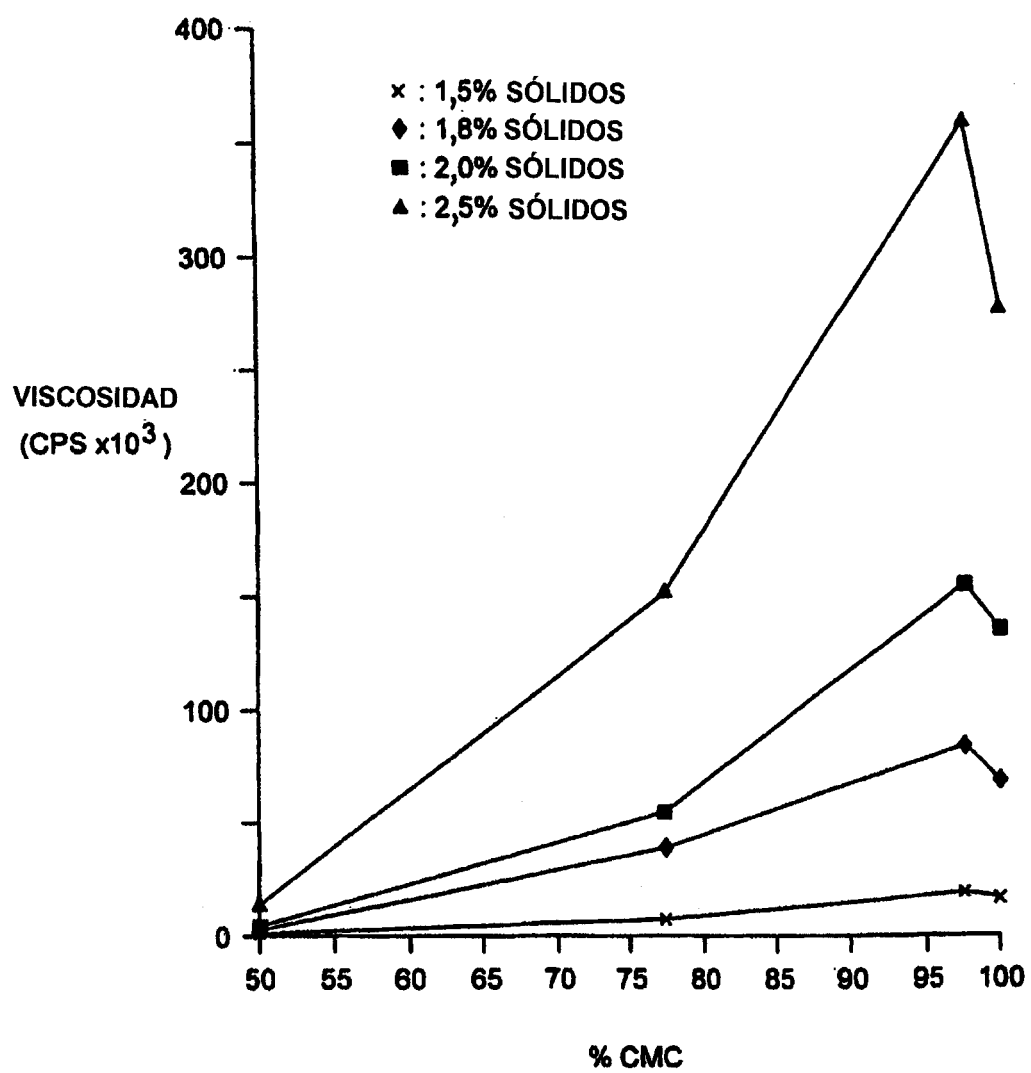


FIG.-22

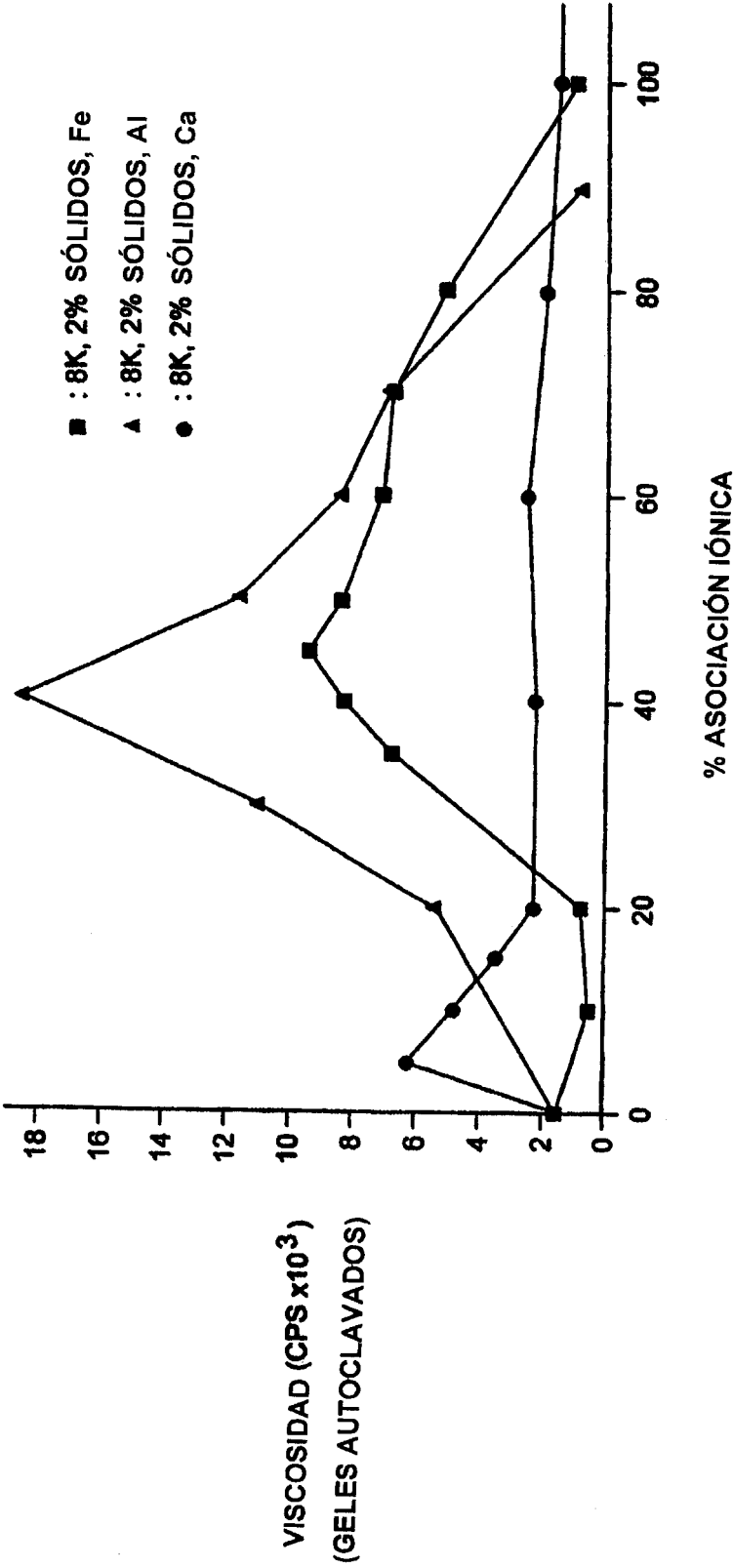


FIG.-23

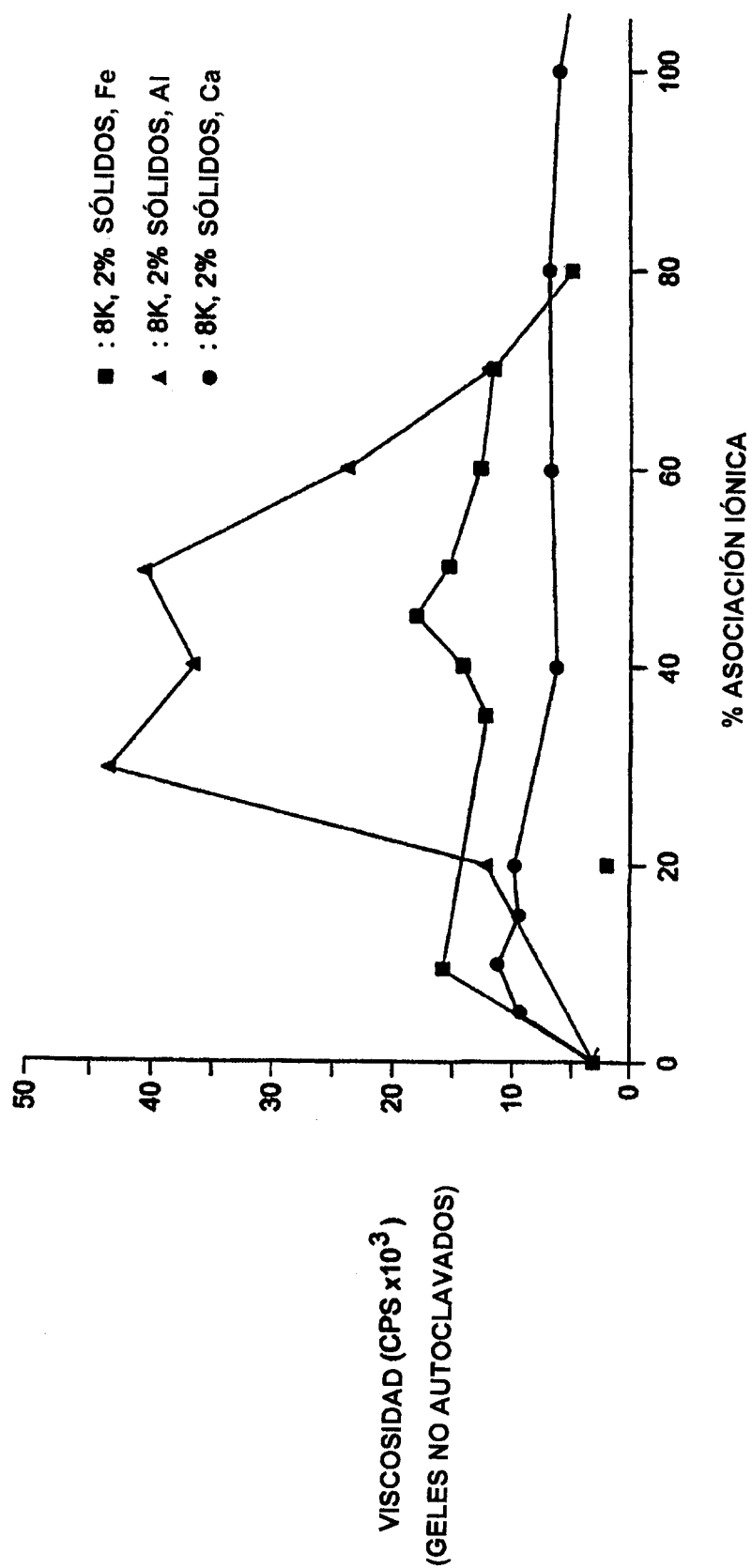


FIG.-24

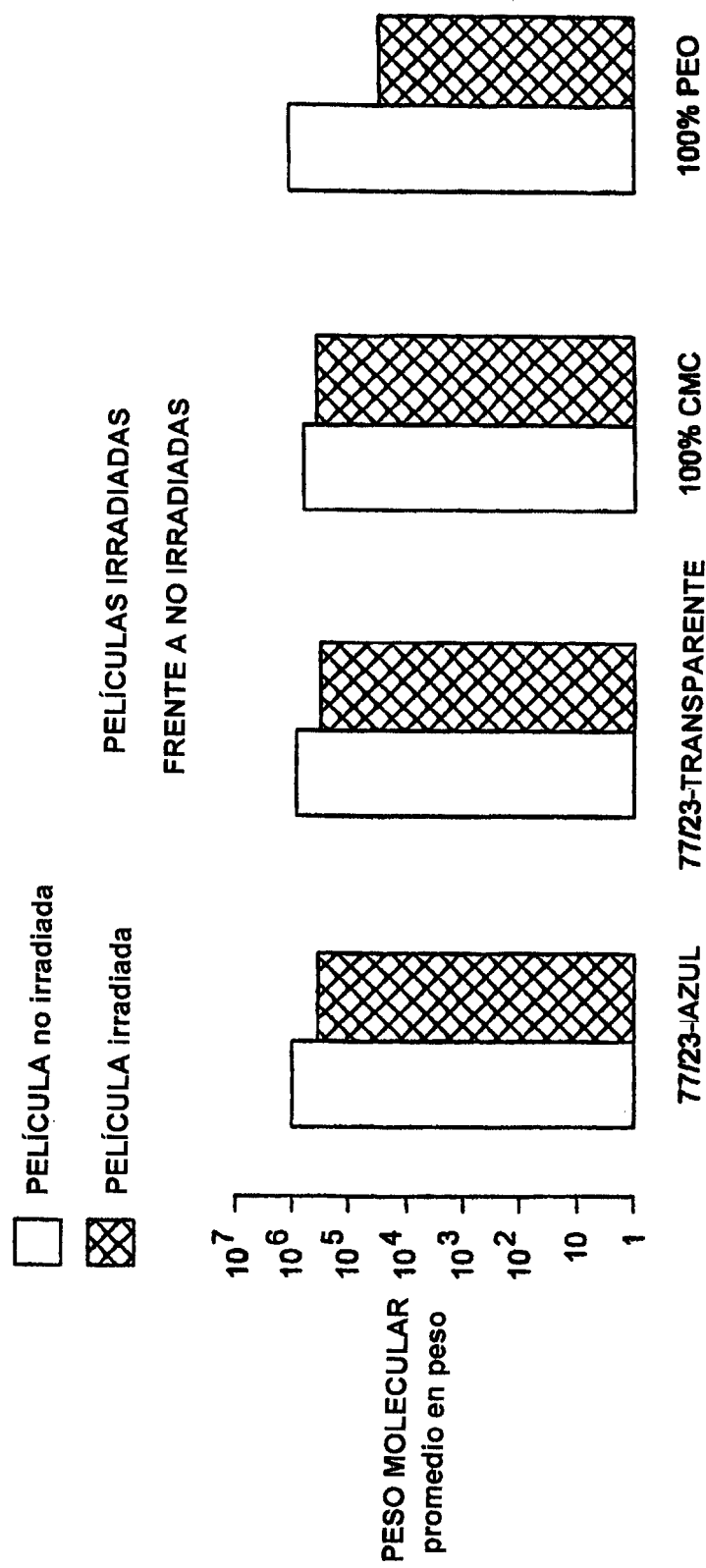


FIG.-25a

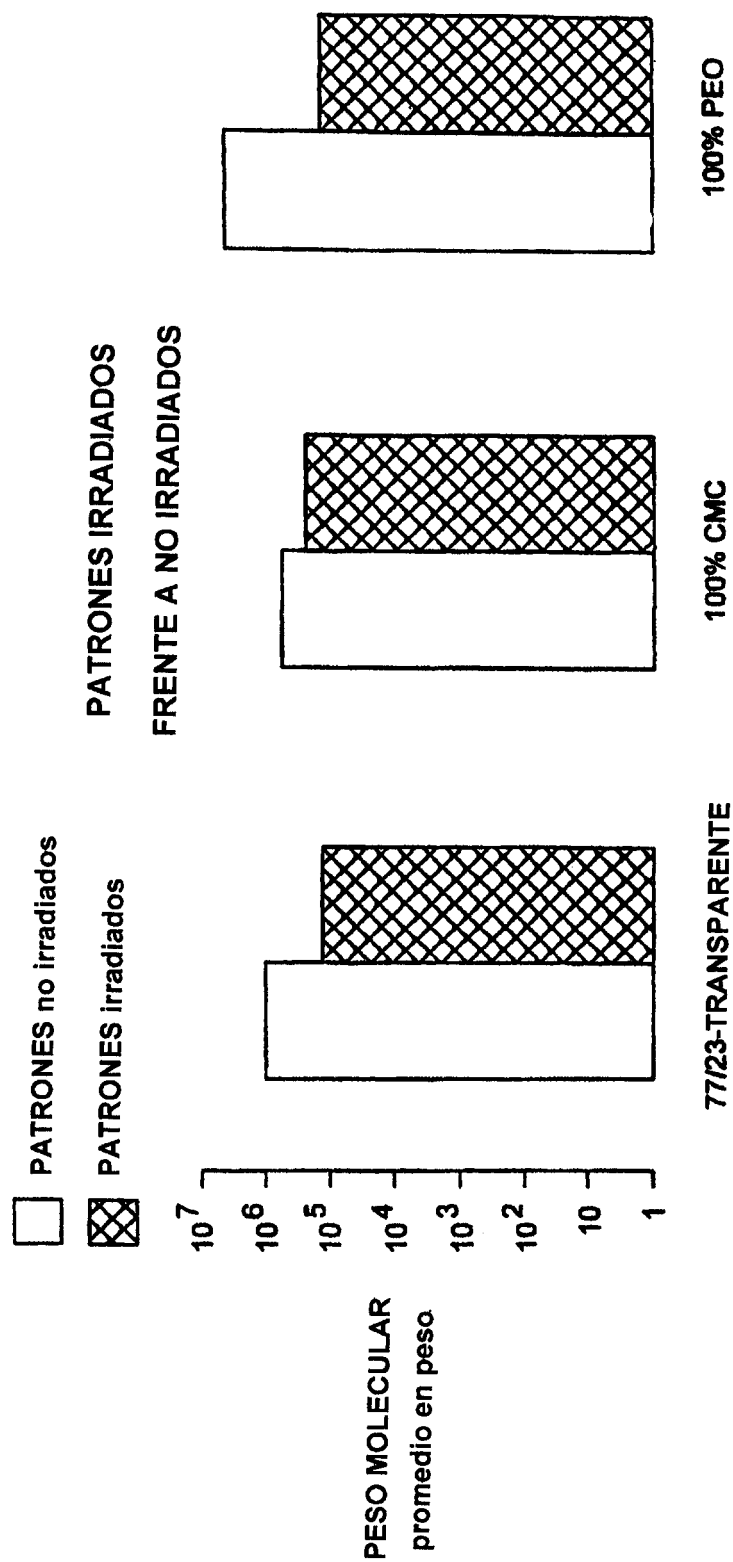


FIG.-25b

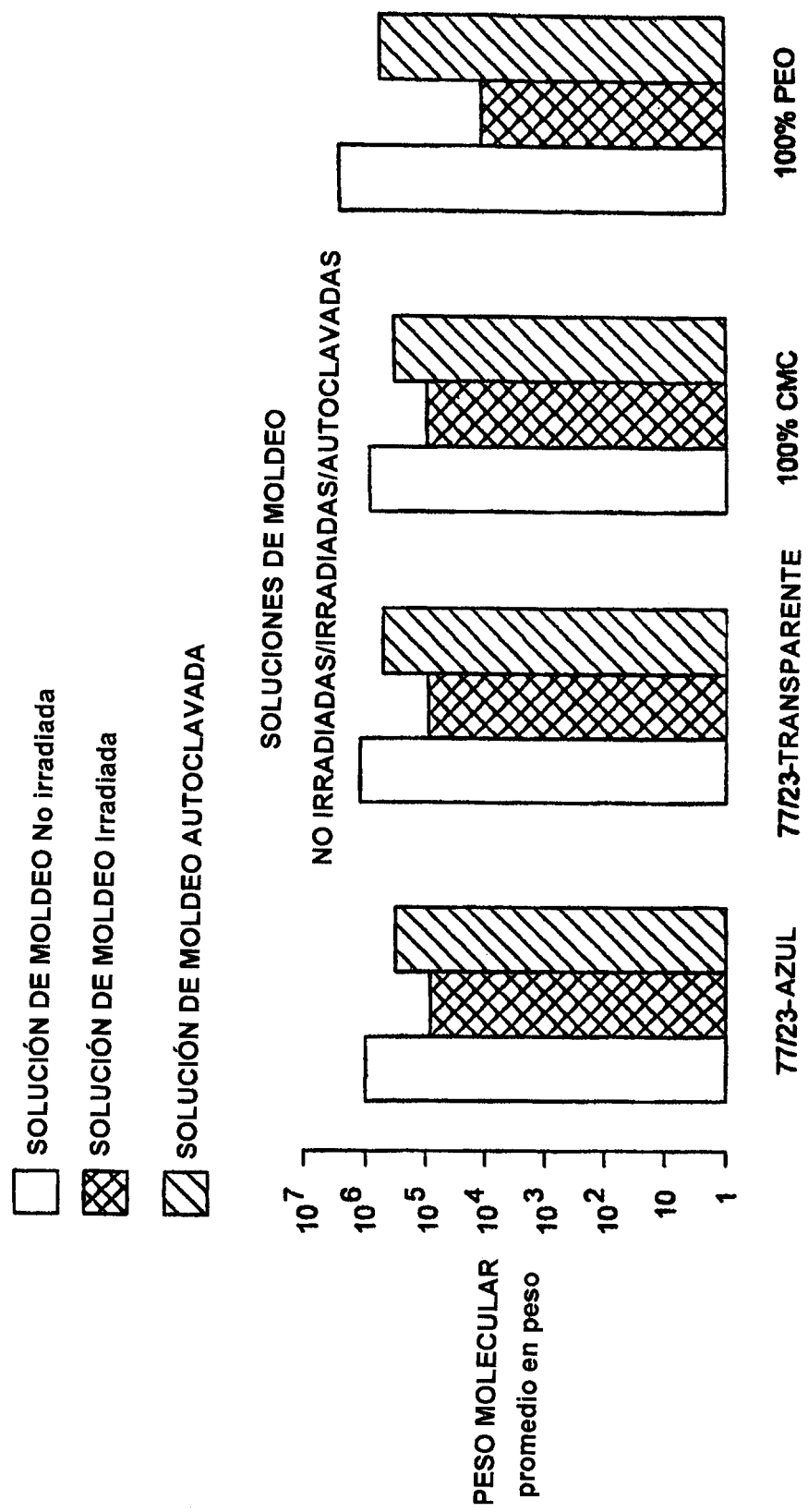


FIG.-25c