

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

(22) Data de pedido: <b>1996.12.18</b>	(73) Titular(es): <b>ANGIODEVICE INTERNATIONAL GMBH</b> <b>BUNDESPLATZ 1 6304 ZUG</b> <b>CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>1995.12.18 US 573799</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2006.09.27</b>	(72) Inventor(es): <b>WOONZA M. RHEE</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2013.04.10</b> <b>134/2013</b>	(74) Mandatário: <b>FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE</b> <b>ATAYDE</b> <b>AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES DE POLÍMEROS RETICULADOS E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES DE POLÍMEROS RETICULADOS QUE COMPREENDEM UM PRIMEIRO POLÍMERO SINTÉTICO CONTENDO MÚLTIPLOS GRUPOS NUCLEOFÍLICOS COVALENTEMENTE LIGADO A UM SEGUNDO POLÍMERO SINTÉTICO CONTENDO MÚLTIPLOS GRUPOS ELECTROFÍLICOS. O PRIMEIRO POLÍMERO SINTÉTICO É, DE PREFERÊNCIA, UM POLIPÉPTIDO SINTÉTICO OU UM POLIETILENOGLICOL QUE TENHA SIDO MODIFICADO PARA CONTER VÁRIOS GRUPOS NUCLEOFÍLICOS, TAIS COMO GRUPOS AMINO PRIMÁRIOS (-NH<sub>2</sub>) OU TIOL (-SH). O SEGUNDO POLÍMERO SINTÉTICO PODE SER UM POLÍMERO SINTÉTICO HIDROFÍLICO OU HIDROFÓBICO QUE CONTÉM, OU QUE TENHA SIDO DERIVATIZADO PARA CONTER, DOIS OU MAIS GRUPOS ELECTROFÍLICOS, TAIS COMO GRUPOS SUCCINIMIDILO. AS COMPOSIÇÕES PODEM AINDA INCLUIR OUTROS COMPONENTES, TAIS COMO POLISSACÁRIDOS OU PROTEÍNAS DE OCORRÊNCIA NATURAL (TAIS COMO GLICOSAMINOGLICANOS OU COLAGÉNIO) E/OU AGENTES BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS. TAMBÉM SÃO REVELADOS MÉTODOS PARA A UTILIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES POLIMÉRICAS RETICULADAS PARA EFECTUAR A ADESÃO ENTRE UMA PRIMEIRA SUPERFÍCIE E UMA SEGUNDA SUPERFÍCIE; PARA EFECTUAR O AUMENTO DE TECIDOS; PARA IMPEDIR A FORMAÇÃO DE ADESÕES CIRÚRGICAS; E PARA O REVESTIMENTO DE UMA SUPERFÍCIE DE UM IMPLANTE SINTÉTICO.

## RESUMO

### "COMPOSIÇÕES DE POLÍMEROS RETICULADOS E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO"

A presente invenção refere-se a composições de polímeros reticulados que compreendem um primeiro polímero sintético contendo múltiplos grupos nucleofílicos covalentemente ligado a um segundo polímero sintético contendo múltiplos grupos electrofílicos. O primeiro polímero sintético é, de preferência, um polipéptido sintético ou um polietilenoglicol que tenha sido modificado para conter vários grupos nucleofílicos, tais como grupos amino primários (-NH<sub>2</sub>) ou tiol (-SH). O segundo polímero sintético pode ser um polímero sintético hidrofílico ou hidrofóbico que contém, ou que tenha sido derivatizado para conter, dois ou mais grupos electrofílicos, tais como grupos succinimidilo. As composições podem ainda incluir outros componentes, tais como polissacáridos ou proteínas de ocorrência natural (tais como glicosaminoglicanos ou colagénio) e/ou agentes biologicamente activos. Também são revelados métodos para a utilização das composições poliméricas reticuladas para efectuar a adesão entre uma primeira superfície e uma segunda superfície; para efectuar o aumento de tecidos; para impedir a formação de adesões cirúrgicas; e para o revestimento de uma superfície de um implante sintético.

## DESCRIÇÃO

### "COMPOSIÇÕES DE POLÍMEROS RETICULADOS E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO"

Esta invenção refere-se genericamente a composições de polímeros reticulados compreendendo um primeiro polímero sintético contendo múltiplos grupos nucleofílicos que é reticulado utilizando um segundo polímero sintético contendo múltiplos grupos electrofílicos.

A Patente Norte Americana No. 5,162,430, emitida em 10 de Novembro de 1992, de Rhee et al., e igualmente propriedade da cessionária da presente invenção, descreve conjugados de colagénio-polímero sintético preparados pela ligação covalente do colagénio a polímeros hidrofílicos sintéticos, tais como vários derivados de polietilenoglicol.

Igualmente propriedade da Requerente, a Patente Norte Americana No. 5,324,775, emitida em 28 de Junho de 1994, de Rhee et al., descreve vários polímeros inseridos, biocompatíveis e de ocorrência natural (tais como polissacáridos), covalentemente ligados a polímeros de polietilenoglicol sintéticos, hidrofílicos e não-imunogénicos.

A Patente Norte Americana No. 5,328,955, igualmente propriedade da Requerente, emitida em 12 de Julho de 1994, de Rhee et al., descreve várias formas activadas de polietilenoglicol e várias ligações que podem ser utilizadas para produzir conjugados de colagénio-polímero sintético possuindo uma variedade de propriedades físicas e químicas.

De propriedade comum, o Pedido de Patente co-pendente N°. de Série 08/403,358, depositado em 14 de Março de 1995, revela uma composição de biomaterial reticulado que é preparada utilizando um agente de reticulação hidrofóbico, ou uma mistura de agentes de reticulação hidrofílicos e hidrofóbicos. Os agentes de reticulação hidrofóbicos preferidos incluem qualquer polímero hidrofóbico que contém, ou pode ser derivatizado quimicamente para conter, dois ou mais grupos succinimidilo.

De propriedade comum, o pedido de Patente co-pendente N°. de Série 08/403,360, depositado em 14 de Março de 1995, descreve uma composição útil na prevenção de aderências cirúrgicas compreendendo um material de substrato e um agente de ligação anti-adesão, em que o material de substrato compreende, de preferência, colagénio e o agente de ligação compreende, de preferência, pelo menos um grupo funcional tecido-reactivo e pelo menos um grupo funcional substrato-reactivo.

De propriedade comum, o Pedido de Patente dos Estados Unidos N°. de Série 08/476,825, depositado em 7 de Junho de 1995, de Rhee et al., descreve composições bioadesivas compreendendo colagénio reticulado utilizando um polímero hidrofílico sintético multifuncionalmente activado, bem como métodos de utilização de tais composições para efectuar a adesão entre uma primeira superfície e uma segunda superfície, em que pelo menos uma das primeira e segunda superfícies é de preferência uma superfície de tecido nativo.

A publicação da patente japonesa No. 07090241 descreve uma composição utilizada para a adesão temporária de um material de lente a um suporte, para montar o material num dispositivo de maquinaria, compreendendo uma mistura de polietilenoglicol, com um peso molecular médio na gama dos 1000-5000, e poli-N-

vinilpirrolidona, com um peso molecular médio na gama de 30.000-200.000.

West e Hubbell, *Biomaterials* (1995) 16:1153-1156, revelam a prevenção de aderências pós-operatórias pela utilização de um hidrogel de diacrilato de polietilenoglicol-co-ácido láctico preparado por fotopolimerização e um hidrogel de polietilenoglicol-co-polipropilenoglicol preparado por reticulação física, Poloxamer 407 ®.

A Patente GB 697,334 revela a preparação de poliésteres, poliamidas ou poliesteramidas de elevado peso molecular. A Patente EP-A-0680990 descreve matrizes de colagénio-polímero sintético, preparadas utilizando uma reacção de várias etapas. A Patente EP-A-0732109 divulga a utilização de agentes de reticulação hidrofóbicos para preparar composições de biomaterial reticulado. A Patente WO-A-96/21469 descreve derivados multi-ramificados, monofuncionais, e hidroliticamente estáveis de poli(etileno-glicol) e polímeros relacionados para a modificação de superfícies e moléculas.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo um polímero multi-nucleofílico que compreende dois ou mais grupos amino primários e um polímero multi-electrofílico compreendendo dois ou mais grupos succinimidilo, em que o polímero multi-nucleofílico e o polímero multi-electrofílico reagem covalentemente para formar uma estrutura reticulada tridimensional, e em que o polímero multi-nucleofílico é uma polilisina, e em que o polímero multi-nucleofílico contém, pelo menos, três grupos nucleofílicos e o polímero multi-electrofílico contém pelo menos três grupos electrofílicos.

Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona a utilização de uma composição como definido em

qualquer uma das reivindicações N°.1-N°.14, no fabrico de um fio ou espiral desidratados para libertação através de um catéter para um local de malformação vascular.

As concretizações preferidas estão definidas nas sub-reivindicações.

Uma característica da invenção consiste no facto de as composições de polímeros reticulados serem oftalmicamente claras, tornando as composições e métodos da invenção particularmente adequados para utilização em aplicações oftálmicas, em que a claridade óptica é um requisito. Além disso, as composições da invenção são constituídas por componentes biocompatíveis, não-imunogénicos que não libertam produtos de reacção tóxicos, potencialmente inflamatórios ou imunogénicos no local de administração tecidual.

Outra característica da invenção é que as composições poliméricas reticuladas têm uma elevada resistência à compressão e elevada capacidade de intumescência, isto é, uma composição que tenha sido seca irá intumescer até três vezes (ou mais) o seu tamanho em seco após a re-hidratação, e é mais "elástica". Uma vez que estes polímeros são, geralmente, muito hidrofílicos, eles são mais facilmente injectados, isto é, a composição reticulada permanece como uma "massa coesiva" quando injectada através de uma agulha de calibre fino (27-30 de calibre).

Ainda uma outra característica da invenção é que os grupos nucleofílicos do primeiro polímero sintético podem ligar-se covalentemente a grupos amino primários dos resíduos de lisina das moléculas de colagénio a nível do local de administração tecidual, "ancorando biologicamente", efectivamente, a composição ao tecido hospedeiro.

Uma característica da invenção é que os componentes das composições são não-imunogénicos e não necessitam de um "teste cutâneo" antes do início do tratamento, ao contrário do que acontece com as composições de colagénio xenogénicas actualmente disponíveis, tais como as fabricadas a partir de peles de bovino.

Outra característica da invenção é que, ao contrário do colagénio, as composições da invenção não estão sujeitas a clivagem enzimática por metaloproteínases de matriz, tais como a colagenase, e portanto não são facilmente degradáveis *in vivo* e, como tal, espera-se terem uma maior persistência a longo prazo *in vivo* do que as composições de colagénio da técnica anterior.

Ainda uma outra característica é que, quando os grupos de cada um dos polímeros utilizados reagem para formar uma ligação amida, o fabrico das composições do presente invento pode ser altamente controlado, tornando mais consistente a qualidade dos produtos.

A Figura de Referência 1 mostra a força de compressão versus o deslocamento para os discos (dimensões aproximadas: 5 mm de espessura x 5mm de diâmetro) das composições de polímero reticulado compreendendo tetra-amino-PEG (PM 10.000) reticulado utilizando SE-PEG tetrafuncionalmente activado (PM 10.000), medida usando o aparelho Instron Universal Tester, modelo 4202, a uma taxa de compressão de 2 mm por minuto.

A Figura de Referência 2 mostra a força de compressão versus o deslocamento para discos (dimensões aproximadas: 5 mm de espessura x 5 mm de diâmetro) de composições de polímero reticulado compreendendo tetra-amino-PEG (PM 10.000) reticulado utilizando SC-PEG trifuncionalmente activado (PM 5000), medida utilizando o aparelho Instron Universal Tester, modelo 4202, com uma taxa de compressão de 2 mm por minuto. A Figura de Referência

3 mostra a estrutura química de dois polietilenoglicóis comercialmente disponíveis contendo múltiplos grupos amino primários.

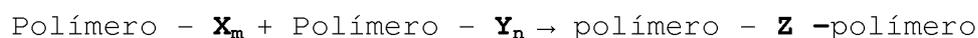
As Figuras de Referência 4 a 13 mostram a formação de diversas composições de polímeros sintéticos reticulados a partir de polímeros hidrofílicos.

As Figuras de Referência 14 a 18 mostram a formação de diversas composições de polímeros sintéticos reticulados a partir de polímeros hidrofóbicos.

De acordo com a presente invenção, as composições de polímero reticulado são preparadas por reacção de um primeiro polímero sintético, que contém dois ou mais grupos nucleofílicos, com um segundo polímero sintético, que contém dois ou mais grupos electrofílicos capazes de ligação covalente com os grupos nucleofílicos no primeiro polímero sintético.

Os componentes da presente invenção são não-imunogénicos e, como tal, não necessitam de um "teste cutâneo" antes de iniciar o tratamento, ao contrário do que acontece com o colagénio xenogénico. Além disso, ao contrário de colagénio, as composições da invenção não estão sujeitos a clivagem enzimática por metaloproteínases de matriz (eg., colagenase) e espera-se, por conseguinte, que tenham uma maior persistência a longo prazo *in vivo* que as composições de colagénio actualmente disponíveis.

O conceito subjacente ao presente invento é que um polímero sintético contendo múltiplos grupos nucleofílicos (abaixo representados como "X") irá reagir com um polímero sintético contendo múltiplos grupos electrofílicos (abaixo representados como "Y"), resultando numa rede polimérica com ligações covalentes, como se segue:



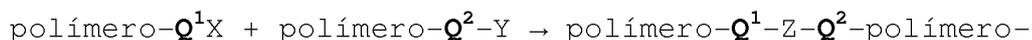
em que o polímero-Xm é uma polilisina;  $m > 2$  e  $n > 2$ ;

$Y = -CO_2N(COCH_2)_2, -CO_2H, -CHO, -CHOCH_2, .N=C=O,$   
 $-SO_2CH=CH_2, -N(COCH)_2, -S-S-(C_5H_4N),$  etc, e pode ser o mesmo  
 ou diferente; e o polímero-Yn contém dois ou mais grupos  
 succinimidilo;

Z = grupo funcional resultante da união de um grupo  
 nucleofílico (X) e um grupo electrofílico (Y).

A estrutura do polímero multi-electrofílico corresponde  
 preferivelmente a um óxido de alquileno, em particular, óxido de  
 etileno, óxido de propileno e suas misturas.

O grupo Y funcional requerido é normalmente acoplado à  
 estrutura do polímero por um grupo de ligação (representado  
 abaixo como "Q"), muitos dos quais são conhecidos ou possíveis.  
 Existem muitas maneiras de preparar os diversos polímeros  
 funcionalizados, alguns dos quais estão listados abaixo:



<u>em que Q =</u>	<u>estrutura completa =</u>
-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	polímero-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -X
-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	polímero-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -X
-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	polímero-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -X
-O <sub>2</sub> C-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	polímero-O <sub>2</sub> C-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -X
-O <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -	polímero-O <sub>2</sub> C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -X
-O <sub>2</sub> C-CR <sup>1</sup> H-	polímero-O <sub>2</sub> C-CRH-X
-OR <sup>2</sup> -CO-NH-	polímero-O-R-CO-NH-X

em que  $n = 1-10$  em cada caso, e em que o polímero-Q1-X é uma polilisina;

$R^1 = H, CH_3, C_2H_5, \text{ etc};$

$R^2 = CH_2, CO-NH-CH_2CH_2.$

Por exemplo, quando  $Q^2 = OCH_2CH_2$  (Não há  $Q^1$  neste caso);  $Y = -CO_2N(COCH_2)_2$ ; e  $X = -NH_2$ , as reacções resultantes e os grupos Z seriam como se segue:

Polímero- $NH_2$  + polímero- $OCH_2CH_2CO_2-N(COCH_2)_2 \rightarrow$  polímero-  $NH-OCH=CH_2CO$ -polímero (amida)

Um grupo adicional, abaixo representado por "D", pode ser inserido entre o polímero e o grupo de ligação para aumentar a degradação da composição de polímero reticulado *in vivo*, por exemplo, para uso em aplicações de libertação de fármacos.

polímero - **D**-Q-X + polímero - **D**-Q-Y  $\rightarrow$  polímero - **D**-Q-Z-Q-**D** - polímero-

Alguns grupos "D" biodegradáveis úteis incluem lactido, glicolido,  $\epsilon$ -caprolactona, poli ( $\alpha$ -hidroxiácido), poli(aminoácidos), poli(anidrido), e diversos di- ou tripéptidos.

### **Polímeros sintéticos**

A fim de preparar as composições da presente invenção, é primeiro necessário fornecer um primeiro polímero sintético e um segundo polímero sintético capaz de ligação covalente com os grupos nucleofílicos no segundo polímero sintético, de acordo com a reivindicação N°.1.

Tal como aqui utilizado, o termo "polímero" refere-se *inter alia* a polialquilos, poliaminoácidos e polissacáridos. Além disso, para utilização externa ou por via oral, o polímero pode ser ácido poliacrílico ou Carbopol.

Tal como aqui utilizado, o termo "polímero sintético" refere-se a polímeros que não são de ocorrência natural e que são produzidos por meio de síntese química. Como tal, as proteínas de ocorrência natural, como o colagénio, e os polissacáridos de ocorrência natural, como o ácido hialurónico, são especificamente excluídos. Estão incluídos o colagénio sintético, o ácido hialurónico sintético e os derivados destes. Os polímeros sintéticos que contenham grupos nucleofílicos ou electrofílicos também são aqui referidos como "polímeros sintéticos multifuncionalmente activados". O termo "multifuncionalmente activado" (ou, simplesmente, "activado") refere-se a polímeros sintéticos que possuem, ou que tenham sido modificados quimicamente para possuir, dois ou mais grupos nucleofílicos ou electrofílicos, que são capazes de reagir entre si (*i.e.*, os grupos nucleofílicos reagem com os grupos electrofílicos) para formar ligações covalentes. Os tipos de polímeros sintéticos multifuncionalmente activados incluem polímeros difuncionalmente activados, tetrafuncionalmente activados e de ramificações em estrela.

Os polímeros sintéticos multifuncionalmente activados para uso na presente invenção devem conter pelo menos três grupos funcionais para que possam formar uma estrutura reticulada tridimensional com polímeros sintéticos contendo múltiplos grupos nucleofílicos (por exemplo, "polímeros multi-nucleofílicos"). Por outras palavras, os polímeros devem ser, pelo menos, trifuncionalmente e, de preferência, tetrafuncionalmente activados.

### **Polímeros Sintéticos Contendo Múltiplos Grupos Nucleofílicos**

O polímero multi-nucleofílico é uma polilisina, que é um polímero sinteticamente produzido do aminoácido lisina (PM 145). Foram preparadas poli(lisina)s contendo entre 6 a 4000 grupos amino primários, o que corresponde a pesos moleculares de 870 a 580.000.

As poli(lisina)s para utilização na presente invenção têm, de preferência, um peso molecular compreendido no intervalo de 1.000 a 300.000; mais preferencialmente, dentro da gama de 5.000 a 100.000; com maior preferência, dentro da gama de 8.000 a 15.000. As poli(lisina)s de diferentes pesos moleculares são comercializadas pela companhia Peninsula Laboratories, Inc. (Belmont, CA).

### **Polímeros sintéticos contendo múltiplos grupos electrofílicos**

Os polímeros sintéticos contendo múltiplos grupos electrofílicos são também aqui referidos como "polímeros multi-electrofílicos." Para utilização na presente invenção, os polímeros sintéticos multifuncionalmente activados devem conter, pelo menos, três grupos electrofílicos para que possam formar uma estrutura reticulada tridimensional com polímeros multi-nucleofílicos.

Os polímeros multi-electrofílicos para utilização nas composições da invenção são polímeros que contêm dois ou mais grupos succinimidilo capazes de formar ligações covalentes com grupos electrofílicos nas outras moléculas. Os grupos succinimidilo são altamente reactivos com os materiais contendo grupos amino primários ( $-NH_2$ ), tais como PEG multi-amino, poli(lisina) ou colagénio. Os grupos succinimidilo são ligeiramente menos reactivos com os materiais que contêm grupos

tiol (-SH), tais como PEG multi-tiol ou polipeptidos sintéticos contendo múltiplos resíduos de cisteína.

Tal como aqui utilizado, o termo "contendo dois ou mais grupos succinimidilo" pretende englobar os polímeros comercialmente disponíveis que contêm dois ou mais grupos succinimidilo, bem como aqueles que foram quimicamente derivatizados para conter dois ou mais grupos succinimidilo. Tal como aqui utilizado, o termo "grupo succinimidilo" destina-se a englobar os grupos sulfosuccinimidilo e outras variações semelhantes do grupo succinimidilo "genérico". A presença da porção molecular de sulfito de sódio no grupo sulfosuccinimidilo serve para aumentar a solubilidade do polímero.

### **Polímeros hidrofílicos**

Os polímeros hidrofílicos e, em particular, vários polietilenoglicóis, são preferidos para utilização nas composições da presente invenção. Tal como aqui utilizado, o termo "PEG" refere-se a polímeros tendo a estrutura repetitiva  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ .

As estruturas de algumas formas específicas, tetrafuncionalmente activadas de PEG são apresentadas nas Figuras 4 a 13, assim como os produtos de reacção gerais obtidos por reacção de PEGs tetrafuncionalmente activados com PEGs multi-amino. Tal como representado nas Figuras, o grupo succinimidilo é uma estrutura em anel de cinco membros representada como  $-\text{N}(\text{COCH}_2)_2$ . Nas Figuras 4 a 13, o símbolo  $\wedge\wedge$  indica uma ligação aberta. A Figura de Referência 4 apresenta a reacção de PEG-glutarato de succinimidilo tetrafuncionalmente activado, aqui referido como SG-PEG, com PEG multi-amino, e o produto de reacção assim obtido.

Outra forma activada de PEG é referida como PEG-propionato de succinimidilo (SE-PEG). A fórmula estrutural para o SE-PEG tetrafuncionalmente activado e o produto da reacção obtido por reacção do mesmo com o PEG multi-amino são mostradas na Figura de Referência 5. Numa fórmula estrutural geral para o composto, o índice 3 é substituído por um "m". Na concretização mostrada na Figura 4,  $m = 3$ , sendo que existem três grupos  $\text{CH}_2$  repetidos em cada lado do PEG.

A estrutura na Figura 5 resulta num conjugado que inclui uma ligação "éter" menos sujeita a hidrólise. Isto é diferente do conjugado apresentado na Figura 4, em que é fornecida uma ligação éster. A ligação éster é submetida a hidrólise sob condições fisiológicas.

Ainda outra forma funcionalmente activada de polietileno-glicol, em que  $m=2$ , é mostrada na Figura de Referência 6, assim como o conjugado formado pela reacção do PEG tetrafuncionalmente activado com um PEG multi-amino.

É fornecido outro PEG funcionalmente activado, semelhante aos compostos das Figuras 5 e 6, quando  $m = 1$ . A fórmula estrutural do PEG tetrafuncionalmente activado e o conjugado resultante formado pela reacção do PEG activado com o PEG multi-amino são mostrados na Figura de Referência 7. É de notar que este conjugado inclui tanto um éter como uma ligação peptídica. Estas ligações são estáveis sob condições fisiológicas.

Outra forma funcionalmente activada de PEG é referida como PEG succinimidil-succinamida (SSA-PEG). A fórmula estrutural para a forma tetrafuncionalmente activada deste composto e o produto da reacção obtido por reacção do mesmo com o PEG multi-amino é mostrada na Figura 8. Na estrutura mostrada na Figura de Referência 8,  $m = 2$ ; no entanto, os compostos relacionados, em

que  $m = 1$  ou  $m = 3-10$ , também podem ser utilizados nas composições da invenção.

A estrutura da Figura 8 resulta num conjugado que inclui uma ligação "amida" que, tal como a ligação éter descrita anteriormente, é menos sujeita a hidrólise e, por conseguinte, é mais estável do que uma ligação éster.

Ainda outra forma activada de PEG é fornecida quando  $m = 0$ . Este composto é referido como PEG-carbonato de succinimidilo (SC-PEG). A fórmula estrutural do SC-PEG tetrafuncionalmente activado e o conjugado formado pela sua reacção com PEG multi-amino são mostrados na Figura de Referência 9.

Tal como discutido acima, os derivados de polietilenoglicol activados preferidos para utilização na presente invenção contêm grupos succinimidilo como grupo reactivo. Contudo, diferentes grupos de activação podem ser ligados a locais ao longo da extensão da molécula de PEG. Por exemplo, o PEG pode ser derivatizado para formar o PEG-propionaldeído funcionalmente activado (A-PEG), sendo a sua forma tetrafuncionalmente activada mostrada na Figura 10, assim como o conjugado formado pela reacção de A-PEG com o PEG multi-amino. A ligação mostrada na Figura de Referência 10 é referida como uma ligação  $-(CH_2)_m-NH-$ , em que  $m = 1 - 10$ .

Ainda outra forma de polietilenoglicol activado é o PEG-glicidiléter (E-PEG) funcionalmente activado, do qual o composto tetrafuncionalmente activado é mostrado na Figura de Referência 11, assim como o conjugado formado pela reacção do mesmo com PEG multi-amino.

Outro derivado activado do polietilenoglicol é o PEG-isocianato (I-PEG) funcionalmente activado, que é mostrado na

Figura de Referência 12, juntamente com o conjugado formado pela reacção do mesmo com PEG multi-amino.

Outro derivado activado do polietilenoglicol é o PEG-vinilsulfona (V-PEG) funcionalmente activado, que é mostrado na Figura de Referência 13, abaixo, juntamente com o conjugado formado pela reacção do mesmo com PEG multi-amino.

Os polietilenoglicóis multifuncionalmente activados preferidos para utilização nas composições da presente invenção são os polietilenoglicóis contendo grupos succinimidilo, tais como o SG-PEG e o SE-PEG (mostrados nas Figuras 4-7), de preferência nas formas trifuncionalmente ou tetrafuncionalmente activadas.

Muitas das formas activadas de polietilenoglicol acima descritas são agora comercializadas pelas companhias Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama, e Union Carbide, South Charleston, West Virginia.

### **Polímeros Hidrofóbicos**

Podem também utilizar-se polímeros hidrofóbicos para preparar as composições da presente invenção. Os polímeros hidrofóbicos para uso na presente invenção contêm, ou podem ser derivatizados para conter, pelo menos três grupos electrofílicos, tais como grupos succinimidilo, e de preferência contêm quatro grupos electrofílicos. Tal como aqui utilizado, o termo "polímero hidrofóbico" refere-se a polímeros que contêm uma proporção relativamente pequena de átomos de oxigénio ou azoto.

Os polímeros hidrofóbicos que já contêm dois ou mais grupos succinimidilo incluem suberato de dissuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS<sup>3</sup>), ditio-bis (succinimidilpropionato) (DSP), bis(2-

succinimidooxicarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES), e 3,3'- ditio-bis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSP), e seus análogos e derivados. Os polímeros acima referidos são comercializados pela Pierce (Rockford, IL), sob os N°s de catálogo 21555, 21579, 22585, 21554 e 21577, respectivamente. As fórmulas estruturais para os polímeros acima mencionados, bem como produtos de reacção gerais obtidos por reacção de cada um destes polímeros com PEG amino, são apresentados abaixo nas Figuras 14-18, respectivamente.

Os polímeros hidrofóbicos preferidos para utilização na presente invenção possuem geralmente uma cadeia de carbono que não é maior do que 14 átomos de carbono. Os polímeros com cadeias de carbono substancialmente mais longas do que 14 átomos de carbono têm geralmente uma solubilidade muito baixa em soluções aquosas e, como tal, têm tempos de reacção muito longos quando misturados com as soluções aquosas de polímeros sintéticos contendo múltiplos grupos nucleofílicos.

### **Derivatização de Polímeros para Conter Grupos Funcionais**

Certos polímeros, tais como poliácidos, podem ser derivatizados para conter pelo menos três grupos funcionais, tais como grupos succinimidilo. Os poliácidos para utilização na presente invenção incluem ácido tricarbóxico baseado em trimetilolpropano, ácido tetracarboxílico baseado em di(trimetilolpropano), ácido heptanodióico, ácido octanodióico (ácido subérico), e ácido hexadecanodióico (ácido tápsico). Muitos destes poliácidos são comercializados pela DuPont Chemical Company.

De acordo com um método geral, os poliácidos podem ser quimicamente derivatizados para conter pelo menos três grupos

succinimidilo por reacção com uma quantidade molar adequada de N-hidroxissuccinimida (NHS) na presença de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Os poliálcoois como o trimetilolpropano e o di(trimetilolpropano) podem ser convertidos para a forma de ácido carboxílico usando vários métodos, sendo ainda posteriormente derivatizados por reacção com NHS na presença de DCC para produzir polímeros trifuncionalmente e tetrafuncionalmente activados, respectivamente, como descrito no Pedido de Patente co-pendente de propriedade comum com o N° de Série 08/403,358.

As poliaminas, como a etilenodiamina ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), tetrametilenodiamina ( $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ ), pentametilenodiamina (cadaverina) ( $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$ ), hexametilenodiamina ( $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ ), bis(2-hidroxiethyl)amina ( $\text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ ), bis(2-aminoethyl)amina ( $\text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ ) e tris(2-aminoethyl)amina ( $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3$ ), podem ser quimicamente derivatizadas até poliácidos, os quais podem então ser derivatizados até conterem pelo menos três grupos succinimidilo por reacção com as quantidades molares adequadas de N-hidroxissuccinimida na presença de DCC, tal como descrito no pedido de Patente dos EUA número de série 08/403,358. Muitas destas poliaminas estão comercialmente disponíveis a partir da DuPont Chemical Company.

### **Preparação de Composições de Polímero Reticulado**

Num método geral para a preparação das composições de polímero reticulado da invenção, um primeiro polímero sintético contendo múltiplos grupos nucleofílicos é misturado com um segundo polímero sintético contendo múltiplos grupos electrofílicos. A formação de uma estrutura reticulada tridimensional ocorre em resultado da reacção entre os grupos

nucleofílicos no primeiro polímero sintético e os grupos electrofílicos no segundo polímero sintético.

Daqui em diante, o termo "primeiro polímero sintético" será usado para referir um polímero sintético contendo pelo menos três grupos nucleofílicos, e o termo "segundo polímero sintético" será usado para referir um polímero sintético que contém pelo menos três grupos electrofílicos. As concentrações do primeiro polímero sintético e do segundo polímero sintético utilizados para preparar as composições da presente invenção irão variar dependendo de uma série de factores, incluindo os tipos e pesos moleculares dos polímeros sintéticos particulares utilizados e a aplicação final pretendida.

Uma vez que os polímeros contendo múltiplos grupos electrofílicos também reagem com a água, o segundo polímero sintético é geralmente armazenado e utilizado em forma estéril e seca, de modo a evitar a perda da capacidade de reticulação devido à hidrólise que ocorre normalmente após a exposição de tais grupos electrofílicos aos meios aquosos. Os processos para a preparação de polímeros hidrofílicos sintéticos contendo múltiplos grupos eletrofílicos em forma estéril e seca estão apresentados no Pedido de Patente Norte Americano N°. de Série 08/497,573, depositado em 30 de Junho de 1995. Por exemplo, o polímero sintético seco pode ser moldado por compressão numa folha ou membrana fina, que pode depois ser esterilizada utilizando radiação gama ou, de preferência, irradiação com feixe de electrões. A membrana ou folha seca resultante pode ser cortada no tamanho desejado, ou dividida em partículas de tamanho menor.

Os polímeros que contêm múltiplos grupos nucleofílicos não são geralmente reactivos à água e podem, portanto, ser armazenados em solução aquosa.

As composições de polímeros reticulados também podem ser preparadas para conter vários agentes de imagiologia, tais como iodo ou sulfato de bário, ou flúor, de modo a ajudar na visualização das composições após a administração através de raios-X, ou  $^{19}\text{F}$ -MRI, respectivamente.

### **Incorporação de Outros Componentes no Polímero Reticulado Sintético**

Adicionalmente, poderão incorporar-se proteínas de ocorrência natural, tais como o colagénio, e derivados de vários polissacáridos de ocorrência natural, como os glicosaminoglicanos, nas composições da invenção. Quando estes outros componentes também contêm grupos funcionais que irão reagir com os grupos funcionais dos polímeros sintéticos, a sua presença durante a mistura e/ou reticulação do primeiro e segundo polímeros sintéticos irá resultar na formação de uma matriz reticulada de polímero sintético-polímero de ocorrência natural. Em particular, quando o polímero de ocorrência natural (proteína ou polissacárido) também contêm grupos nucleofílicos, tais como grupos amino primários, os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético irão reagir com os grupos amino primários desses componentes, tal como com os grupos nucleofílicos do primeiro polímero sintético, o que faz com que estes outros componentes se tornem parte da matriz polimérica.

Em geral, os glicosaminoglicanos devem ser quimicamente derivatizados por desacetilação, dessulfatação, ou ambos, de forma a que contenham grupos amino primários disponíveis para

reação com os grupos electrofílicos das moléculas de polímero sintético. Os glicosaminoglicanos que podem ser derivatizados de acordo com um ou ambos os métodos acima mencionados incluem os seguintes: ácido hialurónico, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B (sulfato de dermatano), sulfato de condroitina C, quitina (que pode ser derivatizada para quitosano), sulfato de queratano, queratossulfato e heparina. A derivatização dos glicosaminoglicanos por desacetilação e/ou dessulfatação e a ligação covalente dos derivados de glicosaminoglicanos resultantes com polímeros hidrofílicos sintéticos é descrita em maior detalhe no Pedido de Patente Norte Americana de propriedade comum da requerente com o N° de Série 08/146,843, depositado em 3 de Novembro de 1993.

Do mesmo modo, os grupos electrofílicos no segundo polímero sintético irão reagir com grupos amino primários dos resíduos de lisina ou grupos tiol dos resíduos de cisteína de certas proteínas de ocorrência natural. As proteínas ricas em lisina, tais como o colagénio e seus derivados, são especialmente reactivas com os grupos electrofílicos de polímeros sintéticos. Tal como aqui utilizado, o termo "colagénio" pretende abranger qualquer tipo de colagénio, derivado de qualquer fonte, incluindo, mas não se limitando a, colagénio extraído de um tecido ou produzido de forma recombinante, análogos de colagénio, derivados de colagénio, colagénios modificados e colagénios desnaturados tais como gelatina. A ligação covalente do colagénio a polímeros hidrofílicos sintéticos está descrita em pormenor na Patente Norte Americana No. 5,162,430, de propriedade comum da requerente, emitida em 10 de Novembro de 1992, de Rhee et al..

Em geral, pode utilizar-se colagénio proveniente de qualquer fonte nas composições do invento; por exemplo, o colagénio pode

ser extraído e purificado a partir de uma fonte humana ou de outro mamífero, tal como córion de bovino ou de suíno e placenta humana, ou pode ser produzido de forma recombinante ou de outro modo. A preparação de uma solução de colagénio purificado, substancialmente não antigénico, a partir de pele bovina é bem conhecida neste campo técnico. A Patente Norte Americana No. 5,428,022, de propriedade comum da requerente, emitida em 27 de Junho de 1995, de Palefsky et al., descreve métodos de extracção e purificação de colagénio a partir da placenta humana. Também de propriedade comum da requerente, o Pedido de Patente Norte Americano co-pendente com o No. de Série 08/183,648, depositado em 18 de Janeiro de 1994, descreve métodos para a produção de colagénio humano recombinante no leite de animais transgénicos, incluindo vacas transgénicas. O termo "colagénio" ou "material de colagénio", tal como aqui utilizado, refere-se a todas as formas de colagénio, incluindo as que tenham sido processadas ou de outra forma modificadas.

Pode utilizar-se nas composições do invento colagénio de qualquer tipo, incluindo, mas não se limitando a, os tipos I, II, III, IV ou qualquer combinação dos mesmos, embora seja geralmente preferido o colagénio do tipo I. Quer o colagénio atelopéptido como o colagénio contendo telopéptidos podem ser utilizados; no entanto, quando é utilizado colagénio proveniente de uma fonte xenogénica, tal como o colagénio de bovino, o colagénio atelopéptido é geralmente preferido, devido à sua imunogenicidade reduzida em comparação com o colagénio contendo telopéptidos.

Para utilização nas composições da invenção é preferido o colagénio que não tenha sido previamente reticulado por meio de métodos tais como calor, irradiação ou agentes químicos de reticulação, apesar de poder ser utilizado colagénio previamente

reticulado. É possível adquirir colagénio fibrilar atelopéptido não reticulado à Collagen Corporation (Palo Alto, CA), a concentrações de colagénio de 35 mg/ml e 65 mg/ml, sob as marcas comerciais Zyderm® I Collagen e Zyderm II Collagen, respectivamente. O colagénio fibrilar atelopéptido reticulado por glutaraldeído pode ser adquirido à Collagen Corporation, a uma concentração de colagénio de 35 mg/ml, sob a marca registada Zyplast® Collagen.

Os colagénios para utilização na presente invenção encontram-se, geralmente, em suspensão aquosa a uma concentração entre 20 mg/ml e 120 mg/ml; de preferência, entre 30 mg/ml e 90 mg/ml.

Embora seja preferido o colagénio intacto, o colagénio desnaturado, vulgarmente conhecido como gelatina, pode também ser utilizado nas composições do invento. A gelatina pode ter a vantagem adicional de ser mais rapidamente biodegradável do que o colagénio.

Devido à sua consistência pegajosa, é geralmente preferido o colagénio não fibrilar para utilização nas composições da invenção que se destinam a ser utilizadas como bioadesivos. O termo "colagénio não fibrilar" refere-se a qualquer material de colagénio não modificado ou modificado que se encontre numa forma substancialmente não fibrilar a um pH de 7, como indicado pela claridade óptica de uma suspensão aquosa do colagénio.

O colagénio que se encontre já em forma não fibrilar pode ser utilizado nas composições da invenção. Tal como aqui utilizado, o termo "colagénio não fibrilar" destina-se a abranger tipos de colagénio que são não fibrilares na forma nativa, bem como colagénios que foram quimicamente modificados de modo a permanecerem na forma não fibrilar a pH neutro ou perto do pH

neutro. Os tipos de colagénio que são não fibrilares (ou microfibrilares) na forma nativa incluem os tipos IV, VI e VII.

Os colagénios quimicamente modificados que estão na forma não fibrilar a um pH neutro incluem o colagénio succinilado e o colagénio metilado, ambos os quais podem ser preparados de acordo com os métodos descritos na Patente Norte Americana N°. 4,164,559, emitida em 14 de Agosto de 1979, de Miyata et al.. Devido à sua viscosidade inerente, o colagénio metilado é particularmente preferido para utilização em composições bioadesivas, tal como descrito no Pedido de Patente Norte Americana No. de Série 08/476,825, também propriedade da requerente.

Os colagénios para utilização nas composições de polímeros reticulados da presente invenção poderão inicialmente estar na forma fibrilar, sendo então tornados não fibrilares pela adição de um ou mais agentes de dissociação de fibras. O agente de dissociação de fibras deve estar presente numa quantidade suficiente para tornar o colagénio substancialmente não fibrilar a um pH de 7, como descrito acima. Os agentes de dissociação de fibras a utilizar na presente invenção incluem vários álcoois biocompatíveis, aminoácidos, sais inorgânicos e carboidratos, sendo particularmente preferidos os álcoois biocompatíveis. Os álcoois biocompatíveis preferidos incluem glicerol e propilenoglicol. Os álcoois não biocompatíveis, tais como etanol, metanol e isopropanol, não são preferidos para utilização na presente invenção, devido aos seus efeitos potencialmente nocivos no corpo do paciente que os recebe. Os aminoácidos preferidos incluem arginina. Os sais inorgânicos preferidos incluem cloreto de sódio e cloreto de potássio. Embora os carboidratos de carbono - tais como diversos açúcares, incluindo a sacarose -

possam ser utilizados na prática da presente invenção, eles não são tão preferidos como os outros tipos de agentes de dissociação de fibras por poderem ter efeitos citotóxicos *in vivo*.

Por ser opaco e menos pegajoso do que o colagénio não fibrilar, o colagénio fibrilar é menos preferido para utilização em composições bioadesivas. No entanto, tal como descrito na Patente Norte Americana N°. de Série 08/476,825, o colagénio fibrilar, ou misturas de colagénio não fibrilar e fibrilar, podem ser preferidos para o uso em composições adesivas para as quais se pretenda uma persistência a longo prazo *in vivo*, se a claridade óptica não for um requisito.

Para as composições destinadas à utilização no aumento de tecidos, o colagénio fibrilar é preferível porque tende a formar geles reticulados mais fortes e com uma maior persistência a longo prazo *in vivo* do que os preparados utilizando colagénio não fibrilar.

Em geral, o colagénio é adicionado ao primeiro polímero sintético; em seguida, o colagénio e primeiro polímero sintético são muito bem misturados para obter uma composição homogénea. O segundo polímero sintético é então adicionado e misturado na mistura colagénio/primeiro polímero sintético, onde se irá ligar covalentemente aos grupos amino primários ou grupos tiol do primeiro polímero sintético e aos grupos amino primários do colagénio, resultando na formação de uma estrutura reticulada homogénea. Vários derivados de glicosaminoglicano desacetilados e/ou dessulfatados podem ser incorporados na composição de um modo semelhante ao acima descrito para o colagénio.

Para utilização na adesão de tecidos, como discutido a seguir, poderá também ser desejável incorporar proteínas tais

como a albumina, a fibrina ou o fibrinogénio na composição do polímero reticulado para promover a adesão celular.

Além disso, a introdução de hidrocolóides, tais como carboximetilcelulose, pode promover a adesão de tecidos e/ou a capacidade de intumescimento.

### **Administração das Composições de Polímeros Reticulados Sintéticos**

As composições da presente invenção podem ser administradas antes, durante ou depois da reticulação do primeiro e do segundo polímeros sintéticos. Certas utilizações, que são discutidas em maior detalhe abaixo, tais como o aumento dos tecidos, podem requerer que as composições sejam reticuladas antes da administração, enquanto que outras aplicações, tais como a adesão de tecidos, requerem que as composições sejam administradas antes que a reticulação tenha atingido o "equilíbrio". O ponto em que a reticulação atinge o equilíbrio é aqui definido como o ponto em que a composição já não é pegajosa ou adesiva ao toque.

A fim de administrar a composição antes da reticulação, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético podem ser contidos dentro de tambores separados de uma seringa de dois compartimentos. Neste caso, os dois polímeros sintéticos não se misturam de facto até à altura em que os dois polímeros são extrudidos a partir da ponta da agulha da seringa para o tecido do paciente. Isto permite que a grande maioria da reacção de reticulação ocorra *in situ*, evitando-se o problema do bloqueio da agulha que ocorre normalmente se os dois polímeros sintéticos forem misturados muito cedo e se a reticulação entre os dois componentes já estiver muito avançada antes da libertação a partir da agulha de uma seringa. A utilização de uma seringa de dois compartimentos, tal como descrito acima, permite a

utilização de agulhas de menor diâmetro, o que é vantajoso quando se pretende realizar o aumento dos tecidos moles em tecido facial delicado, tal como o que rodeia os olhos.

Em alternativa, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético podem ser misturados, de acordo com os métodos descritos acima, antes do seu fornecimento ao local de tecido, sendo em seguida injectados no local desejado do tecido imediatamente (de preferência, dentro de cerca de 60 segundos) após a mistura.

Numa outra forma de realização da invenção, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético são misturados, sendo em seguida extrudidos e deixados a reticular sobre uma folha ou outra forma sólida. O sólido reticulado é, então, desidratado para remover substancialmente toda a água não ligada. O sólido seco resultante pode ser moído ou triturado em partículas, sendo então suspenso num veículo líquido não aquoso, incluindo ácido hialurónico, sulfato de dextrano, dextrano, colagénio succinilado não reticulado, colagénio metilado não reticulado, glicogénio, glicerol, dextrose, maltose, triglicéridos de ácidos gordos (tais como óleo de milho, óleo de soja e óleo de sésamo) e fosfolípido de gema de ovo. A suspensão de partículas pode ser injectada através de uma agulha de pequeno calibre para um local de tecido. Uma vez no interior do tecido, as partículas de polímero reticulado irão rehidratar-se e intumescer, aumentando de tamanho pelo menos cinco vezes.

### **Utilização de Polímeros Sintéticos Reticulados para Libertar Compostos Carregados**

Fazendo variar as quantidades molares relativas do primeiro polímero sintético e do segundo polímero sintético, é possível

alterar a carga total da composição de polímero reticulado resultante, a fim de preparar uma matriz para a libertação de um composto carregado (tal como uma proteína ou fármaco). Como tal, a libertação de proteínas carregadas ou fármacos, que normalmente se difundiriam rapidamente para fora de uma matriz transportadora neutra, pode ser controlada.

Por exemplo, se for utilizado um excesso molar de um primeiro polímero sintético contendo múltiplos grupos nucleofílicos, a matriz resultante terá uma carga total positiva e poderá ser usada para ligar ionicamente e libertar compostos com carga negativa. Os exemplos de compostos carregados negativamente que podem ser libertados a partir destas matrizes incluem vários fármacos, células, proteínas e polissacáridos. Os colagénios com carga negativa, como o colagénio succinilado, e os derivados de glicosaminoglicanos, tais como o hialuronato de sódio, sulfato de queratano, queratossulfato, sulfato sódico de condroitina A, sulfato sódico de dermatano B, sulfato sódico de condroitina C, heparina, sulfato de condroitina C esterificada e heparina esterificada, podem ser eficazmente incorporados na matriz de polímero reticulado tal como descrito acima.

Se for utilizado um excesso molar de um segundo polímero sintético contendo múltiplos grupos electrofílicos, a matriz resultante tem uma carga total negativa e pode ser utilizada para ligar ionicamente e libertar compostos carregados positivamente. Os exemplos de compostos carregados positivamente que podem ser libertados a partir destas matrizes incluem vários fármacos, células, proteínas e polissacáridos. Os colagénios carregados positivamente, como o colagénio metilado, e os derivados de glicosaminoglicanos, tais como o ácido hialurónico esterificado e desacetilado, sulfato de condroitina A esterificado, desacetilado

e dessulfatado, sulfato de condroitina C esterificado, desacetilado e dessulfatado, sulfato de queratano desacetilado e dessulfatado, queratossulfato desacetilado e dessulfatado, heparina esterificada dessulfatada, e quitosano, podem ser eficazmente incorporados na matriz de polímero reticulado tal como acima descrito.

### **Utilização de Polímeros Sintéticos Reticulados para Libertação de Agentes Biologicamente Activos**

As composições de polímeros reticulados segundo a presente invenção podem também ser utilizadas para a libertação localizada de vários fármacos e outros agentes biologicamente activos. Os agentes biologicamente activos, tais como factores de crescimento, podem ser libertados a partir da composição para um local de tecido, a fim de facilitar a cicatrização e a regeneração de tecidos.

O termo "agente biologicamente activo" ou "agente activo", tal como aqui utilizado, refere-se a moléculas orgânicas que exercem efeitos biológicos *in vivo*. Os exemplos de agentes activos incluem, sem limitação, enzimas, agonistas ou antagonistas de receptores, hormonas, factores de crescimento, medula óssea autóloga, antibióticos, agentes antimicrobianos e anticorpos. O termo "agente activo" também se destina a abranger vários tipos de células e genes que podem ser incorporados nas composições da invenção. O termo "agente activo" destina-se também a abranger combinações ou misturas de dois ou mais agentes activos, tal como definido acima.

Os agentes activos preferidos para utilização nas composições da presente invenção incluem factores de crescimento, tais como factores de crescimento transformadores (TGF), factores

de crescimento de fibroblastos (FGFs), factores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), factores de crescimento da epiderme (EGFs), péptidos activadores do tecido conjuntivo (CTAPS), factores osteogénicos, e análogos biologicamente activos, fragmentos e derivados de tais factores de crescimento. Os membros da família de supergenes dos factores de crescimento transformadores (TGF), que são proteínas reguladoras multifuncionais, são particularmente preferidos. Os membros da família de supergenes TGF incluem os factores de crescimento transformadores beta (por exemplo, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3); proteínas morfogenéticas do osso (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); factores de crescimento de ligação à heparina (por exemplo, o factor de crescimento de fibroblastos (FGF), factor de crescimento da epiderme (EGF), factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), factor de crescimento semelhante à insulina (IGF)); inibinas (por exemplo, Inibina A, Inibina B); factores de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-1), e activinas (por exemplo, Activina A, Activina B, Activina AB).

Os factores de crescimento podem ser isolados a partir de fontes nativas ou naturais, tais como a partir de células de mamífero, ou podem ser preparados sinteticamente, por exemplo, por técnicas de DNA recombinante ou através de diversos processos químicos. Além disso, podem ser utilizados análogos, fragmentos ou derivados desses factores, desde que exibam pelo menos alguma da actividade biológica da molécula nativa. Por exemplo, os análogos podem ser preparados por expressão de genes alterados por mutagénese específica de local ou outras técnicas de engenharia genética.

Os agentes biologicamente activos podem ser incorporados na composição de polímero sintético reticulado por mistura. Alternativamente, os agentes podem ser incorporados na matriz de polímero reticulado, como descrito acima, por ligação destes agentes com os grupos funcionais dos polímeros sintéticos. Os processos para ligação covalente de agentes biologicamente activos, tais como factores de crescimento, utilizando polietilenoglicóis funcionalmente activados são descritos na Patente Norte Americana de propriedade comum da requerente N°. 5,162,430, emitida em 10 de Novembro de 1992, de Rhee et al.. Tais composições incluem preferencialmente ligações que podem ser facilmente biodegradadas, por exemplo, como resultado da degradação enzimática, daí resultando a libertação do agente activo para o tecido-alvo, sobre o qual irá exercer o efeito terapêutico desejado.

Um método simples para a incorporação de agentes biologicamente activos contendo grupos nucleofílicos na composição de polímero reticulado consiste em misturar o agente activo com o primeiro polímero sintético (ou mistura de primeiro polímero sintético/colagénio), antes da adição do segundo polímero sintético. Este procedimento irá resultar na ligação covalente do agente activo à composição de polímero reticulado, produzindo uma composição de libertação prolongada altamente eficaz.

O tipo e quantidade de agente activo utilizado vai depender, entre outros factores, do local e condição particular a serem tratados e da actividade biológica e farmacocinética do agente activo escolhido.

## Utilização de Polímeros Sintéticos Reticulados para Libertar Células ou Genes

As composições de polímeros reticulados da presente invenção podem também ser utilizadas para libertar vários tipos de células vivas ou genes para um local desejado de administração, a fim de formar um novo tecido. O termo "genes", tal como aqui utilizado, pretende englobar material genético proveniente de fontes naturais, ácidos nucleicos sintéticos, DNA, DNA anti-senso e RNA.

Quando se pretende a utilização para libertação de células, por exemplo, as células estaminais do mesênquima podem ser libertadas para produzir células do mesmo tipo das do tecido no qual elas são libertadas. As células estaminais do mesênquima não são diferenciadas e, portanto, podem diferenciar-se para formar vários tipos de células novas em consequência da presença de um agente activo ou dos efeitos (químicos, físicos, etc) do ambiente local do tecido. Os exemplos de células estaminais do mesênquima incluem osteoblastos, condrócitos e fibroblastos. Os osteoblastos podem ser libertados no local de um defeito do osso para produzir osso novo; os condrócitos podem ser libertados no local de um defeito da cartilagem para produzir uma nova cartilagem; os fibroblastos podem ser libertados para produzirem colagénio sempre que seja necessário um novo tecido conjuntivo; as células neuroectodérmicas podem ser libertadas para formar novo tecido nervoso; as células epiteliais podem ser libertadas para formar novos tecidos epiteliais, tais como fígado, pâncreas, etc.

As células ou os genes poderão ser alogénicos ou xenogénicos na origem. Por exemplo, as composições podem ser usadas para libertar as células ou genes de outras espécies que foram geneticamente modificadas. Porque as composições da invenção não são facilmente degradadas *in vivo*, as células e os genes retidos

dentro das composições de polímeros reticulados serão isolados a partir de células do próprio paciente e, como tal, não irão provocar uma resposta imune no paciente. A fim de reter as células ou os genes dentro de uma matriz de polímero reticulado, o primeiro polímero e as células ou os genes podem ser pré-misturados, sendo então misturado o segundo polímero com a primeira mistura de polímero/célula ou gene para formar uma matriz reticulada, aprisionando-se dessa forma as células ou os genes no interior da matriz.

Como discutido acima para agentes biologicamente activos, quando utilizados para libertar células ou genes, os polímeros sintéticos também contêm, de preferência, grupos biodegradáveis para ajudar na libertação controlada das células ou de genes para o local de libertação previsto.

### **Utilização dos Polímeros Sintéticos Reticulados como Bioadesivos**

Descobrimos que as composições preferidas da invenção tendem a ter uma adesividade invulgarmente elevada, o que as torna particularmente adequadas para utilização como bioadesivos, por exemplo, para utilização em cirurgia. Tal como aqui utilizados, os termos "bioadesivo", "adesivo biológico" e "adesivo cirúrgico" são utilizados indiferentemente para referir composições biocompatíveis capazes de efectuar a fixação temporária ou permanente entre as superfícies de dois tecidos nativos, ou entre uma superfície de tecido nativo e a superfície de um tecido não-nativo ou uma superfície de um implante sintético.

Num método geral para efectuar a fixação de uma primeira superfície a uma segunda superfície, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético são aplicados a uma primeira superfície, e, em seguida, a primeira superfície é

colocada em contacto com uma segunda superfície para efectuar a adesão entre a primeira superfície e a segunda superfície. De preferência, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético são primeiramente misturados para iniciar a reticulação sendo seguidamente libertados para uma primeira superfície antes de ter ocorrido uma reticulação substancial entre os grupos nucleofílicos do primeiro polímero sintético e os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético. A primeira superfície é em seguida posta em contacto com a segunda superfície, de preferência imediatamente, para efectuar a adesão entre as duas superfícies. Pelo menos uma das primeira e segunda superfícies é, de preferência, uma superfície de tecido nativo.

Por exemplo, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético são geralmente fornecidos em seringas separadas, cujos conteúdos são então misturados, utilizando técnicas de mistura seringa-a-seringa, imediatamente antes da libertação para uma primeira superfície. O primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético são, de preferência, misturados durante um mínimo de 20 (de preferência, 20 a 100; mais preferencialmente, de 30 a 60) passagens para assegurar a mistura adequada. Como a reticulação entre os grupos reactivos correspondentes nos dois polímeros sintéticos é geralmente iniciada durante o processo de mistura, é importante libertar a mistura de reacção para a primeira superfície logo que possível após a mistura.

A mistura reaccional pode ser extrudida sobre a primeira superfície a partir da abertura de uma seringa ou outro dispositivo de extrusão apropriado. Após a aplicação, a mistura de reacção extrudida pode ser espalhada sobre a primeira superfície com uma espátula, se necessário. Em alternativa, o

primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético podem ser misturados em conjunto num prato ou recipiente de mistura adequado, sendo em seguida aplicados à primeira superfície por meio de uma espátula.

Num outro método para a preparação da mistura de reacção, o primeiro polímero sintético e o segundo polímero sintético estão contidos em câmaras separadas de uma lata ou frasco de spray com bocal, ou outro dispositivo de pulverização apropriado. Neste cenário, o primeiro e segundo polímeros não se misturam realmente até serem expulsos em conjunto a partir do bocal do dispositivo de pulverização. Após a aplicação da mistura de reacção sobre uma superfície contendo colagénio, a primeira superfície é colocada em contacto com uma segunda superfície. Se as duas superfícies forem postas em contacto antes que tenha ocorrido uma reticulação substancial entre o polímero sintético e o agente de reticulação, os grupos reactivos do agente de reticulação também se ligarão covalentemente aos grupos amino primários dos resíduos de lisina das moléculas de colagénio presentes em qualquer uma das superfícies ou em ambas, proporcionando uma adesão melhorada.

As duas superfícies podem ser mantidas juntas manualmente, ou utilizando quaisquer outros meios adequados, enquanto a reacção de reticulação prossegue até à sua conclusão. A reticulação estará tipicamente completa passados 5 a 60 minutos da mistura do primeiro e do segundo polímeros sintéticos. No entanto, o tempo necessário para a reticulação completa ocorrer é dependente de um número de factores, incluindo os tipos e pesos moleculares dos dois polímeros sintéticos e, mais particularmente, as concentrações dos dois polímeros sintéticos (isto é, maiores concentrações resultam em tempos de reticulação mais rápidos).

Pelo menos uma das primeira e segunda superfícies é, de preferência, uma superfície de tecido nativo. Tal como aqui utilizado, o termo "tecido nativo" refere-se a tecidos biológicos que são nativos do corpo do paciente específico a ser tratado. Tal como aqui utilizado, o termo "tecido nativo" destina-se a incluir tecidos biológicos que foram elevados ou removidos de uma parte do corpo de um paciente para implantação numa outra parte do corpo do mesmo doente (tal como autoenxertos de ossos, autoenxertos de retalhos de pele, etc.). Por exemplo, as composições da invenção podem ser utilizadas para fazer aderir um pedaço de pele de uma parte do corpo de um paciente a outra parte do corpo, tal como no caso de uma vítima de queimadura.

A outra superfície pode ser uma superfície de tecido nativo, uma superfície de tecido não-nativo ou uma superfície de um implante sintético. Tal como aqui utilizado, o termo "tecido não-nativo" refere-se a tecidos biológicos que foram removidos do corpo de um paciente dador (que pode ser da mesma espécie ou de uma espécie diferente da do doente receptor) para implantação no corpo de um doente receptor (por exemplo, transplantes de tecidos e de órgãos). Por exemplo, as composições de polímero reticulado da presente invenção podem ser utilizadas para fazer aderir uma córnea de doador ao olho de um doente receptor.

Tal como aqui utilizado, o termo "implante sintético" refere-se a qualquer material biocompatível destinado à implantação no corpo de um paciente que não esteja abrangido pelas definições acima apresentadas para tecido nativo e tecido não-nativo. Os implantes sintéticos incluem, por exemplo, vasos sanguíneos artificiais, válvulas cardíacas, órgãos artificiais, próteses ósseas, lenticulas implantáveis, enxertos vasculares, stents, e combinações de stent/enxerto, etc.

## **Utilização de Polímeros Sintéticos Reticulados em Aplicações Oftálmicas**

Devido à sua transparência óptica, as composições de polímero reticulado da invenção que não contêm colagénio são particularmente bem adaptadas para utilização em aplicações oftálmicas. Por exemplo, pode fazer-se aderir uma lentícula sintética para a correcção da visão à camada de Bowman da córnea do olho de um paciente utilizando os métodos da presente invenção. Conforme divulgado na Patente Norte Americana, propriedade comum da Requerente, com o N.º. de Série 08/147,227, depositada em 3 de Novembro de 1993, de Rhee et al., um colagénio quimicamente modificado (tal como o colagénio succinilado ou metilado) que está na forma substancialmente não-fibrilar a um pH de 7 pode ser reticulado usando um polímero hidrofílico sintético, sendo em seguida moldado numa forma lenticular desejada e deixado a completar a reticulação. A lentícula de colagénio reticulado resultante pode então ser depositada sobre a camada de Bowman de uma córnea sem epitélio do olho de um paciente, utilizando os métodos da presente invenção. Ao aplicar a mistura de reacção compreendendo o primeiro e segundo polímeros sintéticos na superfície anterior da córnea, fazendo contactar, em seguida, a superfície anterior da córnea com a superfície posterior da lentícula antes de ter ocorrido uma reticulação substancial, os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético irão também ligar-se covalentemente às moléculas de colagénio do tecido da córnea e da lentícula para ancorar firmemente a lentícula no lugar. (Alternativamente, a mistura de reacção pode ser aplicada em primeiro lugar à superfície posterior da lentícula, que é então posta em contacto com a superfície anterior da córnea.)

As composições da presente invenção também são adequadas para utilização na substituição do vítreo.

### **Uso de Composições de Polímeros Sintéticos Reticulados no Aumento de Tecidos**

As composições de polímeros reticulados da invenção pode também ser utilizadas para o aumento de tecidos moles ou duros no corpo de um sujeito mamífero. Neste campo, estas composições poderão ser melhores do que o actualmente comercializado produto de materiais à base de colagénio para aumento dos tecidos moles, por serem menos imunogénicas e mais persistentes. Os exemplos de aplicações para aumento de tecidos moles incluem o aumento de esfíncteres (por exemplo, urinário, anal, esofágico) e o tratamento de rugas e cicatrizes. Os exemplos de aplicações de aumento de tecidos duros incluem a reparação e/ ou a substituição de osso e/ou de tecido cartilaginoso.

As composições da invenção são particularmente adequadas para utilização como material de substituição para o fluido sinovial nas articulações osteoartríticas, sendo que as composições de polímero reticulado servem para reduzir a dor articular e melhorar a função articular por restaurarem uma estrutura de hidrogel mole na articulação. As composições de polímeros reticulados também podem ser usadas como material de substituição para o núcleo pulposo de um disco intervertebral danificado. Como tal, o núcleo pulposo do disco danificado é primeiro removido e, em seguida, a composição de polímero reticulado é injectada ou de outro modo introduzida no centro do disco. A composição pode ser reticulada antes da introdução no disco ou deixada reticular *in situ*.

Num método geral para efectuar o aumento de tecidos dentro do corpo de um mamífero, o primeiro e segundo polímeros sintéticos são injectados simultaneamente num local de tecido com necessidade de aumento através de uma agulha de pequeno calibre (por exemplo, calibre de 25-32). Uma vez dentro do corpo do paciente, os grupos nucleofílicos do primeiro polímero sintético e os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético irão reagir entre si para formar uma estrutura de polímero reticulado *in situ*. Os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético podem também reagir com grupos amino primários dos resíduos de lisina das moléculas de colagénio do próprio tecido do paciente, fornecendo a "ancoragem biológica" das composições ao tecido hospedeiro.

#### **Utilização das Composições de Polímeros Sintéticos Reticulados para Prevenir Aderências**

Uma outra utilização das composições de polímero reticulado da invenção é o de revestimento de tecidos, a fim de evitar a formação de aderências pós-cirurgia ou a lesão dos tecidos ou órgãos internos. Num método geral de revestimento de tecidos para prevenir a formação de aderências pós-cirurgia, os primeiro e segundo polímeros sintéticos são misturados e, em seguida, uma fina camada da mistura reaccional é aplicada aos tecidos que compreendem, rodeiam, e/ou estão adjacentes ao local cirúrgico antes de ter ocorrido uma reticulação substancial entre os grupos nucleofílicos do primeiro polímero sintético e os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético. A aplicação da mistura de reacção ao local de tecido pode ser efectuada por extrusão, escovagem, pulverização (como descrito acima), ou por quaisquer outros meios convenientes.

Após a aplicação da mistura de reacção ao local cirúrgico, permite-se que a reticulação continue *in situ* antes do encerramento da incisão cirúrgica. Após a reticulação ter atingido o equilíbrio, os tecidos que são colocados em contacto com os tecidos revestidos não irão aderir aos tecidos revestidos. Neste ponto, o local cirúrgico pode ser fechado utilizando meios convencionais (suturas, etc.)

Em geral, as composições que atinjam a reticulação completa dentro de um período de tempo relativamente curto (*isto é*, 5-15 minutos após a mistura do primeiro polímero sintético e do segundo polímero sintético) são preferidas para utilização na prevenção de aderências cirúrgicas, por permitirem um fecho relativamente rápido do local cirúrgico após a conclusão do procedimento cirúrgico.

### **Utilização dos Polímeros Sintéticos Reticulados para Revestir Implantes**

Uma outra utilização das composições de polímero reticulado da invenção é a de material de revestimento para implantes sintéticos. Num método geral para revestimento duma superfície de um implante sintético, os primeiro e segundo polímeros sintéticos são misturados e, em seguida, uma fina camada da mistura de reacção é aplicada a uma superfície do implante antes que tenha ocorrido uma reticulação substancial entre os grupos nucleofílicos do primeiro polímero sintético e os grupos electrofílicos do segundo polímero sintético. A fim de minimizar a reacção celular e fibrosa ao implante revestido, a mistura da reacção é de preferência preparada de modo a ter uma carga total neutra. A aplicação da mistura de reacção à superfície do implante pode ser efectuada por extrusão, escovagem, pulverização

(como descrito acima), ou por quaisquer outros meios convenientes. Após a aplicação da mistura de reacção à superfície do implante, permite-se que a reticulação continue até que se alcance a reticulação completa.

Embora este método possa ser utilizado para revestir a superfície de qualquer tipo de implante sintético, é especialmente útil para implantes em que a trombogenicidade reduzida é uma consideração importante, tal como nos vasos sanguíneos artificiais e nas válvulas cardíacas, enxertos vasculares, stents vasculares e combinações de stent/enxerto. O método também pode ser utilizado para revestir membranas cirúrgicas implantáveis (por exemplo, polipropileno monofilamentar) ou redes (por exemplo, para utilização na reparação de hérnias). Os implantes mamários podem também ser revestidos utilizando o método acima, a fim de minimizar a contractura capsular.

As composições da presente invenção também podem ser utilizadas para revestimento de lenticulas, as quais podem ser feitas a partir de polímeros tanto de ocorrência natural como sintéticos.

### **Utilização de Polímeros Sintéticos Reticulados para Tratar Aneurismas**

As composições de polímeros reticulados da invenção podem ser extrudidas ou moldadas na forma de um fio ou espiral e em seguida desidratadas. O fio ou espiral desidratados resultantes podem ser encaminhados através de um catéter para o local de uma malformação vascular, como um aneurisma, para efeitos de oclusão vascular e, em última análise, reparação do defeito. O fio ou espiral desidratados podem ser fornecidos num tamanho compacto e

irão rehidratar-se dentro do vaso sanguíneo, intumescendo várias vezes em tamanho por comparação com o seu estado desidratado, embora mantendo a sua forma original.

### **Outras Utilizações dos Polímeros Sintéticos Reticulados**

Como discutido no Pedido de Patente de propriedade comum da Requerente N° de Série 08/574,050, depositada em 18 de Dezembro de 1995, que é aqui incorporada por referência, as composições de polímero reticulado da invenção podem ser utilizadas para bloquear ou preencher vários lúmenes e espaços vazios no corpo de um mamífero. As composições também podem ser usadas como bioselantes para selar fissuras ou fendas num tecido ou estrutura (tal como um vaso), ou junções entre tecidos ou estruturas adjacentes, para prevenir o derrame de sangue ou de outros fluidos biológicos.

As composições de polímeros reticulados também podem ser usadas como um dispositivo de preenchimento de um grande espaço quando se pretende o deslocamento de um órgão numa cavidade do corpo durante procedimentos cirúrgicos ou de radiação, por exemplo, para proteger os intestinos durante um curso de radiação prevista para a pélvis.

As composições de polímeros reticulados da invenção podem também ser usadas para revestir a superfície interior de um lúmen fisiológico, como por exemplo um vaso sanguíneo ou uma trompa de Falópio, servindo assim como selante para prevenir a re-estenose do lúmen após tratamento médico, tal como, por exemplo, cateterismo com balão para remover os depósitos de placa arterial provenientes da superfície interior de um vaso sanguíneo, ou a remoção de tecido de cicatriz ou tecido endometrial do interior de uma trompa de Falópio. Uma camada fina da mistura de reacção é

preferencialmente aplicada na superfície interior do vaso (por exemplo, por meio de catéter), imediatamente após a mistura dos primeiro e segundo polímeros sintéticos. Porque as composições da invenção não são facilmente degradáveis *in vivo*, o potencial de re-estenose devido à degradação do revestimento é minimizado. A utilização de composições de polímeros reticulados com uma carga total neutra minimiza ainda mais o potencial de re-estenose.

### **EXEMPLOS**

Os exemplos seguintes são apresentados de modo a proporcionar aos técnicos de perícia média neste campo uma divulgação e uma descrição completa de como produzir as formas de realização preferidas dos conjugados, composições e dispositivos. Foram feitos esforços para garantir a exactidão em relação aos números utilizados (p.ex., quantidades, temperatura, peso molecular, etc.), mas deverá ter-se em conta a possibilidade de existirem alguns erros experimentais e desvios. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, peso molecular é o peso molecular médio ponderado, a temperatura é em graus centígrados e a pressão é a atmosférica ou próxima desta.

#### **Exemplo 1 (Exemplo de Referência)**

##### **(Preparação de Composições Reticuladas de PEG Multi-amino)**

0,15 gramas de PEG di-amino (PM 3400, obtido a partir da Shearwater Polymers, Huntsville, AL) em 250 µl de água foram misturados com 0,1 g de SC-PEG trifuncionalmente activado (PM 5000, também obtido a partir de Shearwater Polymers) utilizando uma mistura seringa-a-seringa. A mistura de reacção foi extrudida

sobre uma placa de Petri e formou um gel suave à temperatura ambiente.

Misturou-se 0,15 gramas de PEG di-amino em 250  $\mu$ l de água com 0,1 g de SE-PEG tetrafuncionalmente activado (também da Shearwater Polymers), utilizando uma mistura seringa-a-seringa. A mistura reaccional foi extrudida sobre uma placa de Petri e formou um gel suave à temperatura ambiente.

### **Exemplo 2 (Exemplo de Referência)**

#### **(Preparação de Composições Reticuladas de PEG Multi-amino)**

Foram preparadas as seguintes soluções de stock de vários PEGs di-amino:

Dissolveu-se dez (10) gramas de Jeffamine ED-2001 (obtida da Texaco Chemical Company, Houston, TX) em 9 ml de água.

Dissolveu-se dez (10) gramas de Jeffamine ED-4000 (também obtida da Texaco Chemical Company) em 9 ml de água.

Dissolveu-se 0,1 gramas de PEG di-amino (PM 3400, obtido a partir de Shearwater Polymers, Huntsville, AL) em 300 mL de água.

Cada uma das três soluções de PEG di-amino acima preparadas foi misturada com soluções aquosas de SC-PEG trifuncionalmente activado (TSC-PEG, PM 5000, também obtido a partir da Shearwater Polymers), conforme apresentado na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Preparação de Composições de Polímero Reticulado

PEG di-amino	TSC-PEG + Solvente Aquoso
50 $\mu$ l	0 mg + 50 $\mu$ l de água
50 $\mu$ l	10 mg + 50 $\mu$ l de PBS
50 $\mu$ l	10 mg + 100 $\mu$ l PBS

PEG di-amino	TSC-PEG + Solvente Aquoso
250 µl	50 mg + 500 µl de PBS

As soluções de PEG di-amino e TSC-PEG foram misturadas utilizando uma mistura seringa-a-seringa. Cada um dos materiais foi extrudido da seringa e deixado a consolidar durante 1 hora a 37°C. Cada um dos materiais formou um gel. Em geral, os geles tornaram-se mais macios com o aumento do teor de água; os geles contendo a menor quantidade de solvente aquoso (água ou PBS) eram os mais firmes.

### **Exemplo 3 (Exemplo de Referência)**

#### **(Caracterização das Composições Reticuladas de PEG multi-amino)**

Cinquenta (50) miligramas de PEG tetra-amino (10.000 PM, obtido da Shearwater Polymers, Huntsville, AL) em 0,5 ml de PBS foram misturados, utilizando uma mistura seringa-a-seringa, com 50 mg de SE-PEG tetrafuncionalmente activado ("tetra SE-PEG", PM 10.000, também obtido a partir da Shearwater Polymers) em 0,5 ml de PBS ou SC-PEG trifuncionalmente activado ("tri SC-PEG", PM 5000, também obtido a partir da Shearwater Polymers), em 0,5 ml de PBS.

Seringas contendo cada uma das duas misturas foram incubadas a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Ambas as composições formaram geles elásticos. Os geles foram empurrados para fora das seringas e cortados em discos com 5-6 mm de espessura e um diâmetro de 5 mm, para utilização em ensaios de compressão e capacidade de intumescimento, como descrito abaixo.

Mediu-se a força de compressão versus o deslocamento para os dois geles usando o Instron Universal Tester, Modelo 4202, a uma

taxa de compressão de 2 mm por minuto, utilizando discos dos dois geles preparados conforme descrito acima. As Figuras 1 e 2 apresentam a força de compressão (em Newtons) versus o deslocamento do gel (em milímetros) para os geles preparados usando tetra SE-PEG e tri SC-PEG, respectivamente.

Sob forças de compressão tão elevadas como 30 - 35 Newtons, os geles não quebraram, mas mantiveram-se elásticos.

Os discos de cada um dos dois geles, preparados como acima descrito, foram pesados e as dimensões (diâmetro e comprimento) medidas. Os discos foram então imersos em PBS e incubados a 37°C. Após três dias de incubação, os discos foram retirados do PBS, pesados e medidos. Os resultados dos testes da capacidade de intumescimento são apresentados na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2. Teste da Capacidade de Intumescimento da Composição Reticulada de PEG Multi-amino

Agente de reticulação	Peso do Gel (em gramas)		Dimensões (em mm) (diâmetro/espessura)	
	Antes do Intumescimento	Depois do Intumescimento	Antes do Intumescimento	Depois do Intumescimento
Tetra SE-PEG	0,116	0,310	5,0/5,0	7,1/8,1
Tri SC-PEG	0,131	0,287	5,0/6,0	6,4/8,5

Como mostrado acima, os geles intumesceram duas a três vezes em peso, apresentando também um intumescimento médio de cerca de 50% no diâmetro e na espessura.

#### **Exemplo 4**

##### **(Preparação de Composições Reticuladas de Poli(lisina))**

Dez (10) miligramas de bromidrato de poli-L-lisina (PM 8000, obtidos a partir de Península Laboratories, Belmont, CA), em 0,1 ml de tampão fosfato (0,2 M, pH=6,6), foram misturados com 10 mg de SE-PEG tetrafuncionalmente activados (PM 10.000, obtidos a partir de Shearwater Polymers, Huntsville, AL), em 0,1 ml de PBS. A composição formou um gel macio quase imediatamente.

#### **Exemplo 5 (Exemplo de Referência)**

##### **(Preparação e Teste Mecânico de Composições Reticuladas de PEG multi-amino)**

Os geles compreendendo PEG tetra-amino (PM 10.000, obtido da Shearwater Polymers, Huntsville, AL) e 1-4% (em peso) de SE-PEG tetrafuncionalmente activado ("tetra SE-PEG", PM 10,000, também obtido a partir da Shearwater Polymers) foram preparados misturando o PEG tetra-amino (a uma concentração de 25 mg/ml em água) com o tetra SE-PEG (em PBS) numa placa de Petri. As misturas de PEG tetra-amino/SE-PEG resultantes foram incubadas durante 16 horas a 37°C.

A mistura contendo 1% de SE-PEG não forma um gel, devido à baixa concentração de SE-PEG. A mistura contendo 2% de SE-PEG formou um gel em algum momento durante o período de incubação de 16 horas. As misturas contendo 3% e 4% de SE-PEG formaram geles dentro de aproximadamente 4-6 minutos após a mistura. O gel contendo 2% de SE-PEG era facilmente extrudível através de uma agulha de calibre 30; o gel contendo 3% de SE-PEG pôde ser extrudido através de uma agulha de calibre 27.

Foi avaliado o efeito da temperatura elevada na formação do gel. Geles compreendendo PEG tetra-amino e 2,5% (em peso) de tetra SE-PEG foram preparados e incubados a temperaturas de 37°C e 40-50°C. Descobriu-se que a temperatura elevada tinha um efeito significativo sobre o tempo de gelificação: a mistura de PEG tetra-amino/SE-PEG incubada a 37°C formou um gel dentro de aproximadamente 20-25 minutos, enquanto as misturas incubadas a 40-50°C formaram geles dentro de aproximadamente 5 minutos. Ambos os geles foram extrudíveis através de uma agulha de calibre 27.

**Foi avaliado o efeito do pH na formação de gel. Geles compreendendo PEG tetra-amino e 2,5% (em peso) de tetra SE-PEG foram preparados como apresentado na Tabela 3, abaixo.**

Tabela 3. Efeito do pH na Formação de Geles das Formulações de PEG Tetra-amino /Tetra SE-PFG

pH de PEG Tetra-amino	pH de Tetra SE-PEG	pH da mistura resultante	Tempo de Gelificação	Temp. de gelificação
10	4.1	6.9	10-15 minutos	45°C
10	7.0	7.2	<5 minutos	45°C

A capacidade de extrusão através de uma agulha de calibre 27 foi avaliada para os geles compreendendo PEG tetra-amino e 1-3% (em peso) de tetra SE-PEG. Os geles foram contidos dentro de seringas de 1 cc. A força necessária para comprimir o êmbolo da seringa, a uma taxa de 5 centímetros por minuto, foi medida utilizando o Instron Universal Tester, Modelo 4202. Os resultados dos testes de extrusão estão apresentados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4. Extrusão de Geles de PEG Tetra-amino /Tetra SE-PEG  
Através de uma Agulha de Calibre 27

Concentração de SE-PEG (em peso)	Força de Extrusão (N)
1,5-2%	10-11
2-2,5%	52
2,5-3%	88

As forças de extrusão de 100 N ou menos são consideradas aceitáveis para a injeção manual sem o auxílio de um dispositivo auxiliar para a seringa.

A resistência à tracção (*i.e.*, a elasticidade) de geles de 3 mm de espessura compreendendo PEG tetra-amino e 2,5, 5 e 10% (em peso) de tetra SE-PEG foi medida utilizando o Instron Universal Tester, Modelo 4202. Os geles de diversos comprimentos iniciais foram esticados a uma razão de 10 milímetros por minuto. O comprimento de cada gel, a deformação de ruptura (alteração no comprimento como percentagem do comprimento inicial), e a força de ruptura são apresentados na Tabela 5, abaixo.

Tabela 5. Resistência à Tracção de Geles de PEG Tetra-amino/  
Tetra SE-PEG

Conc. SE-PEG (% em peso)	Comprimento inicial (cm)	Deformação de ruptura	Força de ruptura (N)
10	1.4	139%	0,4
10	1.9	99%	0,5
10	2,5	78%	0,5
5	1.3	111%	0,2

Conc. SE-PEG (% em peso)	Comprimento inicial (cm)	Deformação de ruptura	Força de ruptura (N)
5	1.3	99%	0,2
5	1.6	94%	0,2
2,5	1.0	237%	<0,1
2,5	1.5	187%	<0,1
2,5	1.7	129%	<0,1

Os geles contendo tetra SE-PEG a 5 e 10% duplicaram aproximadamente de comprimento antes de quebrar. Os geles contendo SE-PEG a 2,5% triplicaram aproximadamente de comprimento antes de quebrar, mas foram consideravelmente mais fracos (*i.e.*, a força de ruptura foi menor) do que os geles mais altamente reticulados.

#### **Exemplo 6 (Exemplo de Referência)**

##### **(Efeito do pH na Formação de Geles das Formulações de PEG Tetra-amino/Tetra SE-PEG)**

Prepararam-se geles compreendendo várias concentrações de PEG tetra-amino e tetra SE-PEG, a pH 6, 7 e 8, em placas de Petri. Após a mistura de PEG tetra-amino e tetra SE-PEG, as placas foram repetidamente osciladas; o tempo de gelificação foi considerado o ponto em que a formulação deixou de fluir. O efeito do pH no tempo de gelificação das diferentes formulações de PEG tetra-amino/ tetra SE-PEG à temperatura ambiente é apresentado na Tabela 6, abaixo.

Tabela 6. Efeito do pH sobre a Formação de Gel das Formulações de PEG Tetra-amino/Tetra SE-PEG

Conc. PEG Tetra-amino (mg/ml)	Conc. Tetra SE-PEG (mg/ml)	pH	Tempo de Gelificação
20	20	6	>90,0 min
20	20	7	20,0 min
20	20	8	1,4 min
50	50	6	24,0 min
50	50	7	3,5 min
50	50	8	10,0 seg
100	100	6	9,0 min
100	100	7	47,0 seg
100	100	8	10,0 seg
200	200	6	2,0 min
200	200	7	9,0 seg
200	200	8	5,0 seg

O tempo necessário para a formação do gel diminuiu com o aumento do pH e o aumento das concentrações de PEG tetra-amino e tetra SE-PEG.

**Exemplo 7 (Exemplo de Referência)**

**(Cultura de Células na Matriz Reticulada de PEG Multi-amino)**

Trinta (30) miligramas de PEG tetra-amino (PM 10.000, obtido a partir da Shearwater Polymers, Huntsville, AL) foram

dissolvidos em 0,6 ml de PBS e depois filtrados em esterilidade. Trinta (30) miligramas de SE-PEG tetrafuncionalmente ativado ("tetra SE-PEG", 10,000 PM, também obtido a partir de Shearwater Polymers) foram dissolvidos em 0,6 ml de PBS e depois filtrados em esterilidade.

As soluções de PEG tetra-amino e tetra SE-PEG foram misturadas com um pellet contendo células de fibroblastos da pele humana ("HSF"), (CRL #1885, passagem 4, obtidos da American Tissue Type Culture Collection, Rockville, MD). Distribuíram-se duzentos e cinquenta (250) microlitros da solução resultante de PEG tetra-amino/tetra SE-PEG (PEG-PEG) contendo as células por cada um de dois poços de uma placa de cultura de 48 poços e deixou-se a gelificar durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. Um (1) mililitro de Meio Eagle Modificado por Dulbecco (suplementado com 10% de soro bovino fetal, L-glutamina, penicilina-estreptomicina e aminoácidos não essenciais) foi adicionado a cada um dos dois poços. A concentração de células era de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células por mililitro de solução de PEG tetra-amino/tetra SE-PEG, ou  $7,5 \times 10^5$  células por poço.

Para preparar um controlo, um pellet de células HSF foi suspenso em 1,2 ml de meio completo. Duzentos e cinquenta (250) microlitros da mistura de controlo foram dispensados para cada um de três poços na mesma placa de cultura de 48 poços, como utilizado acima. Estimou-se que cada poço continha cerca de  $7,5 \times 10^5$  células. A cada poço foi acrescentado meio fresco todos os dias.

Inicialmente, os geles de PEG tetra-amino/tetra SE-PEG contendo células eram claros e as células foram consideradas densamente povoadas e morfológicamente esferoidais, o que indica que houve pouca adesão entre as células e o gel PEG/PEG (as

células normalmente assumem uma morfologia achatada, fusiforme quando aderem a um substrato, tal como ao plástico tratado das placas de cultura de tecidos). Depois de três (3) dias de incubação a 37°C, descobriu-se que os meios nos poços contendo os geles de PEG/PEG apresentavam uma cor mais clara (o Meio Eagle Modificado por Dulbecco é normalmente de cor vermelha), indicando uma mudança de pH nos meios. Isto indicou que as células estavam vivas e a alimentar-se. Aos 7 dias de incubação a 37°C, as células eram ainda esferoidais na morfologia (indicando a ausência de aderência ao gel) e os meios tinham clareado ainda mais, o que indica que as células eram ainda viáveis e continuavam a alimentar-se.

Ao dia 7, o conteúdo de cada poço foi colocado numa solução de formalina a 10% para avaliação histológica. De acordo com a avaliação histológica, uma percentagem estimada de 75% das células nos poços contendo os geles de PEG/PEG pareciam estar vivas, mas não pareciam estar a reproduzir-se.

Os resultados desta experiência indicam que as células HSF são viáveis nos geles reticulados de PEG tetra-amino/tetra SE-PEG, mas não pareceram aderir ao gel e não pareceram reproduzir-se enquanto retidas no interior da matriz de gel. Como descrito acima, a aderência ou a não aderência das células a um material de substrato pode influenciar a morfologia das células. Em certos tipos de células, a morfologia celular pode, por sua vez, influenciar determinadas funções celulares. Portanto, a não aderência das células à matriz de gel PEG-PEG pode ser uma vantagem na distribuição de tipos celulares particulares cuja função é influenciada pela morfologia celular. Por exemplo, a capacidade das células de cartilagem para produzir materiais da matriz extracelular é influenciada pela morfologia celular:

quando as células estão na configuração achatada, fusiforme, as células estão em modo reprodutivo; quando as células estão na configuração esferoidal, a reprodução pára e as células começam a produzir componentes da matriz extracelular.

Uma vez que os geles PEG-PEG não são prontamente degradados *in vivo*, os geles podem ser particularmente úteis em aplicações de administração de células em que é desejável que as células permaneçam aprisionadas dentro da matriz por períodos de tempo prolongados.

Lisboa, 10 de Julho de 2013

## REIVINDICAÇÕES

**1.** Uma composição compreendendo um polímero multi-nucleofílico que compreende dois ou mais grupos amino primários e um polímero multi-electrofílico compreendendo dois ou mais grupos succinimidilo, caracterizada por o polímero multi-nucleofílico e o polímero multi-electrofílico reagirem covalentemente para formar uma estrutura reticulada tridimensional, e em que o polímero multi-nucleofílico é uma polilisina, e em que o polímero multi-nucleofílico contém, pelo menos, três grupos nucleofílicos e o polímero multi-electrofílico contém, pelo menos, três grupos electrofílicos.

**2.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizada por a poli(lisina) compreender entre 6 e 4000 grupos amino primários.

**3.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizada por a polilisina ter um peso molecular no intervalo de 1.000 a 300.000.

**4.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizada por a polilisina ter um peso molecular no intervalo de 5.000 a 100.000.

**5.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizada por a polilisina ter um peso molecular no intervalo de 8.000 a 15.000.

**6.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizada por o polímero multi-electrofílico ser um polímero hidrofílico.

**7.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.6, caracterizada por o polímero hidrofílico ser um polietilenoglicol (PEG) activado.

**8.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.7, caracterizado por o PEG activado ser o PEG-glutarato de succinimidilo (SG-PEG).

**9.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.7, caracterizada por o PEG activado ser o PEG-propionato de succinimidilo (SE-PEG).

**10.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.7, caracterizada por o PEG activado ser o PEG-succinimidilsuccinamida (SSA-PEG).

**11.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.7, caracterizada por o PEG activado ser o PEG-carbonato de succinimidilo (SC-PEG).

**12.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.7, caracterizada por o PEG activado ser um polímero ramificado em estrela.

**13.** As composições, de acordo com as reivindicações N.º.7, N.º.8 e N.º.9, caracterizadas por o PEG activado estar numa forma trifuncionalmente activada.

**14.** As composições, de acordo com reivindicações N.º.7-N.º.11, caracterizadas por o PEG activado estar numa forma tetrafuncionalmente activada.

**15.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.1, caracterizada por compreender ainda um agente de imagiologia.

**16.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.15, caracterizada por o agente de imagiologia ser seleccionado a partir do grupo constituído por sulfato de bário ou sulfato de iodo, para visualização após a administração a um paciente por meio de raios-X.

**17.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.15, caracterizada por o agente de imagiologia ser o flúor, para

visualização após a administração a um paciente através de  $^{19}\text{F}$ -MRI.

**18.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.1, caracterizada por compreender ainda uma proteína ou polissacárido.

**19.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.18, caracterizada por a proteína ser um colagénio.

**20.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.19, caracterizada por o colagénio ser um colagénio intacto não-fibrilar.

**21.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.20, caracterizada por o colagénio ser um colagénio quimicamente modificado não fibrilar.

**22.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.20, caracterizada por o colagénio ser escolhido a partir de colagénio metilado e colagénio succinilado.

**23.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.18, caracterizada por a proteína ser seleccionada a partir de albumina, fibrina ou fibrinogénio.

**24.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.18, caracterizada por o polissacárido ser um glicosaminoglicano.

**25.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.20, caracterizada por o glicosaminoglicano ser derivatizado para conter grupos amino primários disponíveis para reacção com grupos electrofílicos.

**26.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.21, caracterizada por o glicosaminoglicano ser derivatizado por desacilação, dessulfatação, ou ambos.

**27.** A composição, de acordo com a reivindicação N.º.22, caracterizada por o glicosaminoglicano ser seleccionado a partir

do grupo que consiste em ácido hialurónico, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B (sulfato de dermatano), sulfato de condroitina C, quitina, sulfato de queratano, queratossulfato e heparina.

**28.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizada por compreender, adicionalmente, um agente biologicamente activo.

**29.** A composição, de acordo com a reivindicação N°.28, caracterizada por o agente biologicamente activo ser seleccionado a partir do grupo consistindo em enzimas, agonistas ou antagonistas de receptores, hormonas, factores de crescimento, medula óssea autóloga, antibióticos, agentes antimicrobianos, anticorpos, células, genes, e combinações ou misturas de dois ou mais agentes activos.

**30.** Utilização da composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1-N°.14, caracterizada por ser utilizada no fabrico de um fio ou espiral desidratados para libertação através de catéter para um local de malformação vascular.

**31.** A utilização, de acordo com a reivindicação N°.30, caracterizada por a malformação vascular ser um aneurisma.

Lisboa, 10 de Julho de 2013

Compressão de disco de 5mm (5mm de diâmetro) a 2mm/min

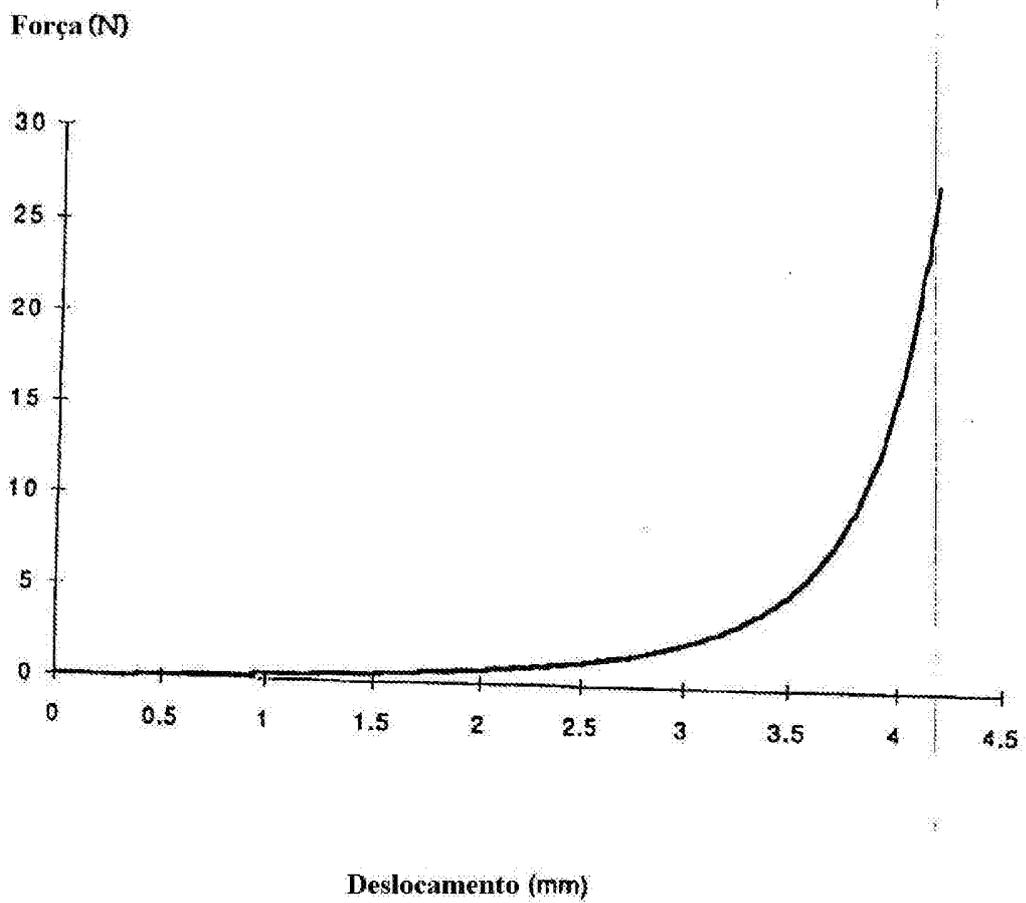


Fig. 1

Compressão de disco de 5mm (5mm de diâmetro) a 2mm/min

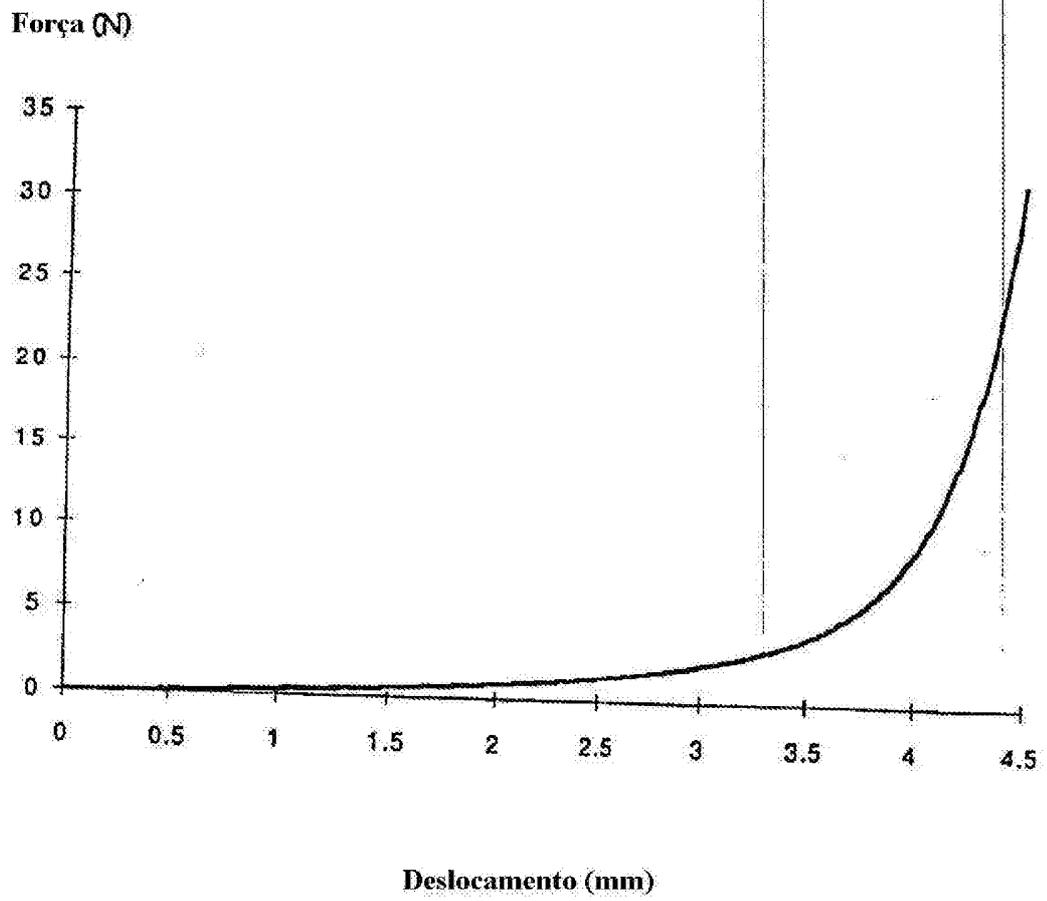


Fig. 2

## Diamina

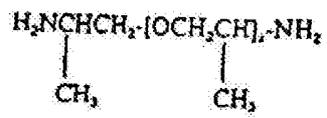


Fig. 3a

## Triamina

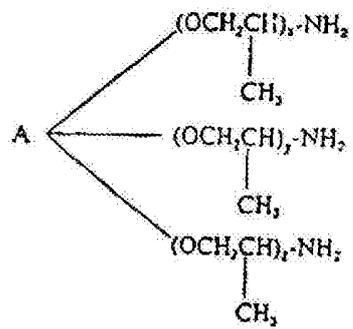
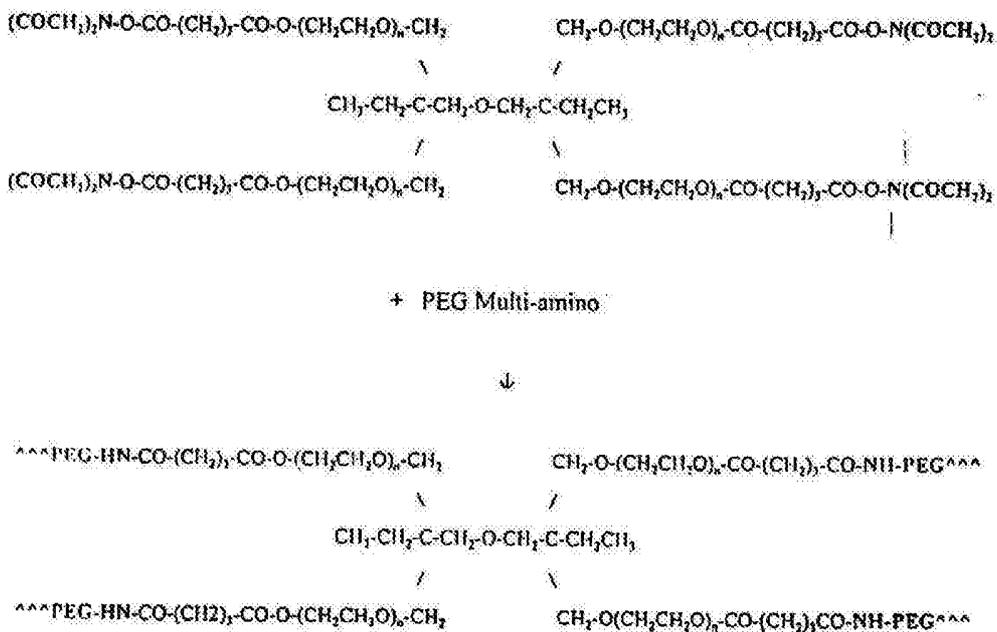


Fig 3b

**SG-PEG: PEG- Glutarato de Succinimidilo Tetrafuncionalmente Activado**



**Fig. 4**

## SE-PEG, m=3: PEG-Butilato de Succinimidilo (Ligação Éter) Tetrafuncionalmente Activado

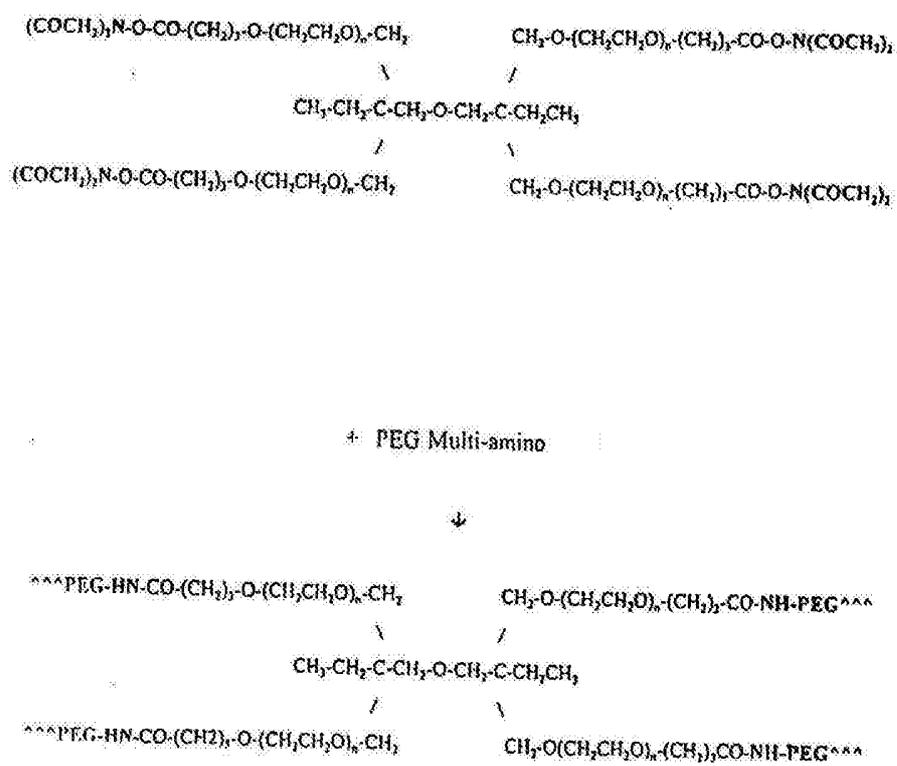


Fig. 5

## SE-PEG, m=2 PEG-Butilato de Succinimidilo (Ligação Éter) Tetrafuncionalmente Activado

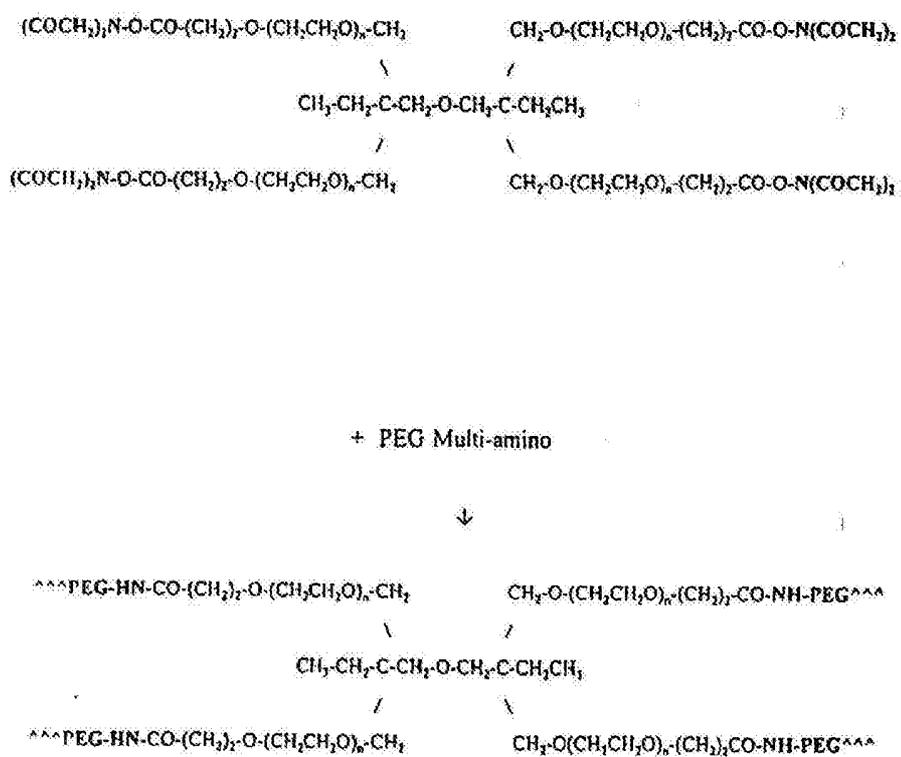


Fig. 6

## SE-PEG, m=1 PEG-Acetato de Succinimidilo (Ligação Éter) Tetrafuncionalmente Activado

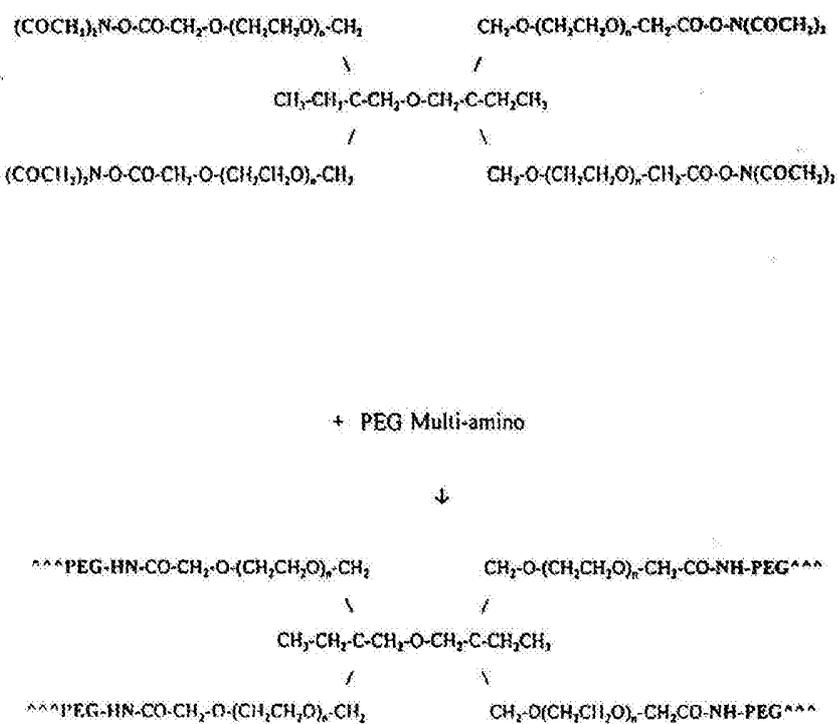


Fig. 7

SSA-PEG, m=2: PEG Succinimidil-Succinamida Tetrafuncionalmente Activado

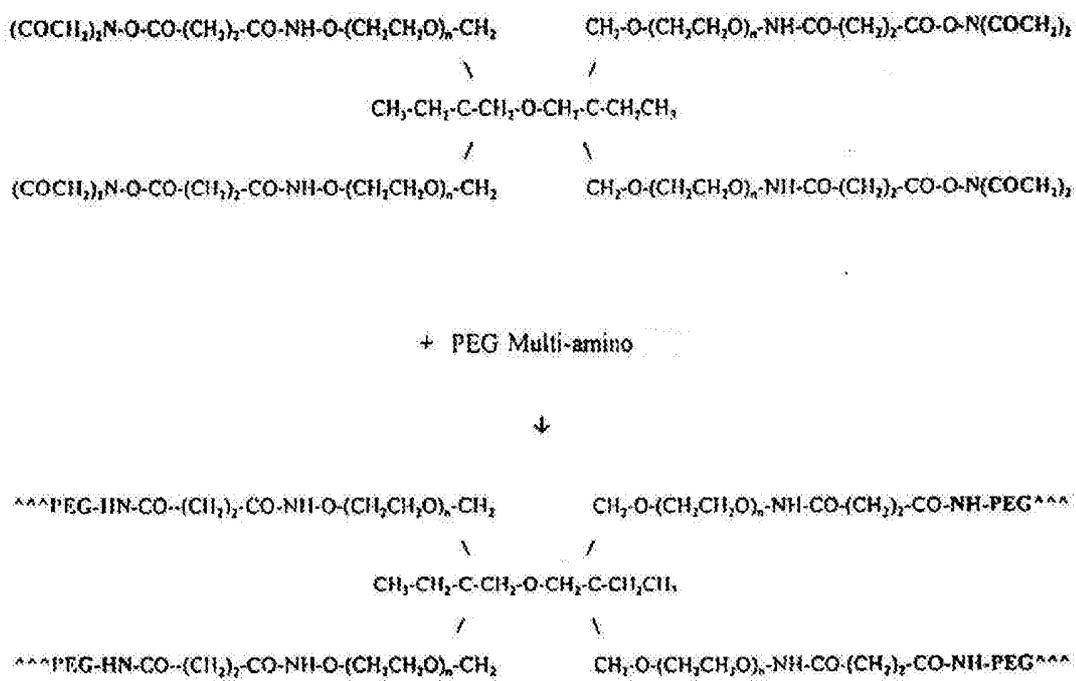


Fig. 8

## SC-PEG, m=0: PEG-Carbonato de Succinimidilo Tetrafuncionalmente Activado

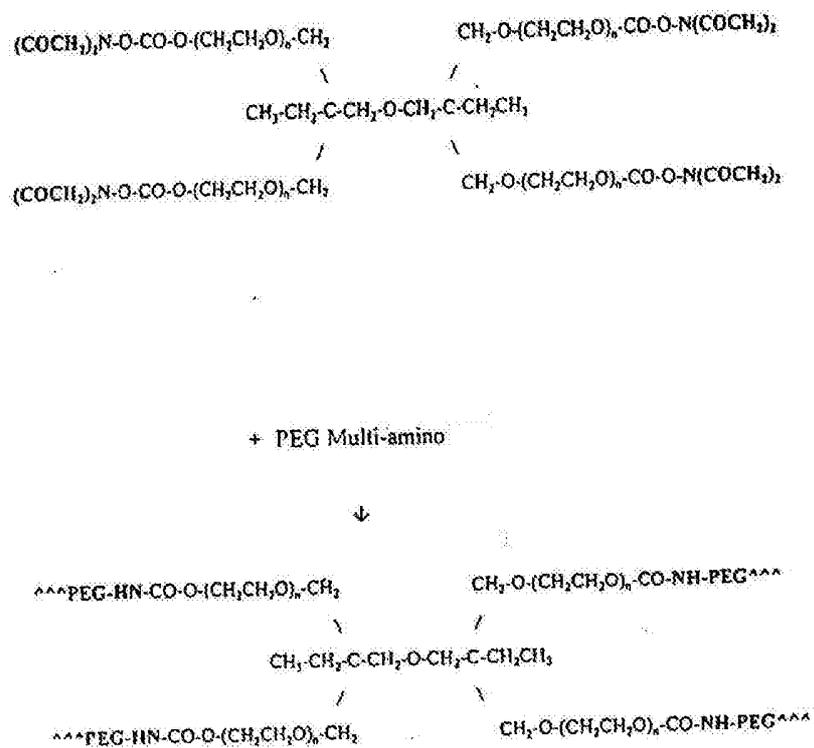


Fig. 9

**A-PEG: PEG-propionAldeido Tetrafuncionalmente Activado**

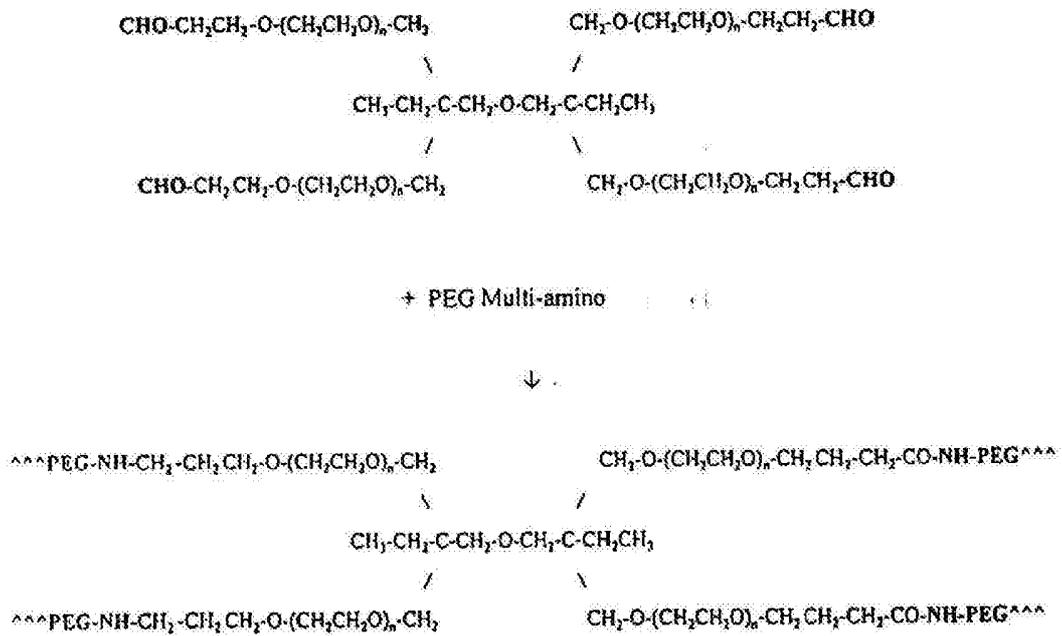


Fig. 10

## E-PEG: PEG-GlicidilÉter Tetrafuncionalmente Activado

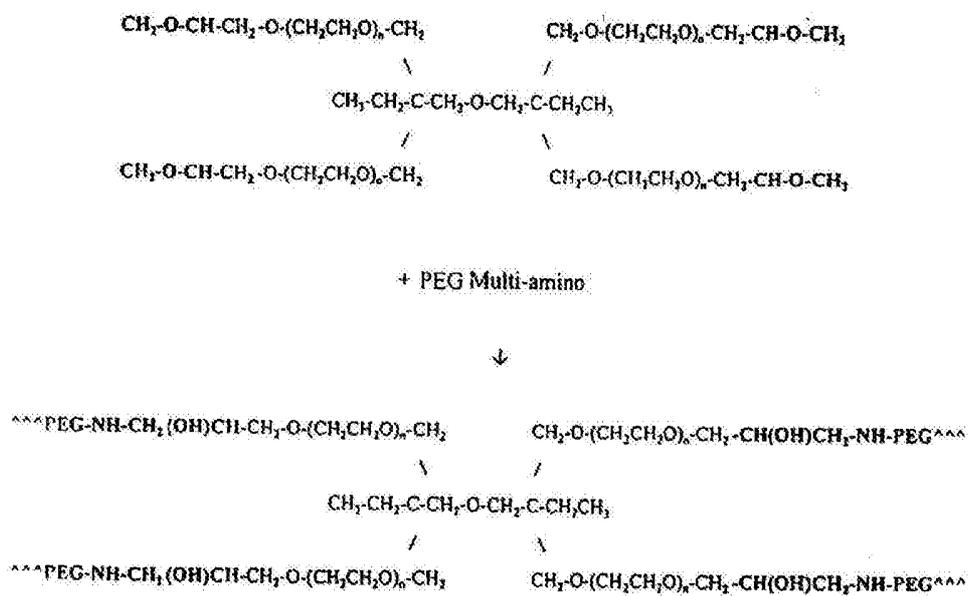


Fig. 11

## I-PEG: PEG-Isocianato Tetrafuncionalmente Activado

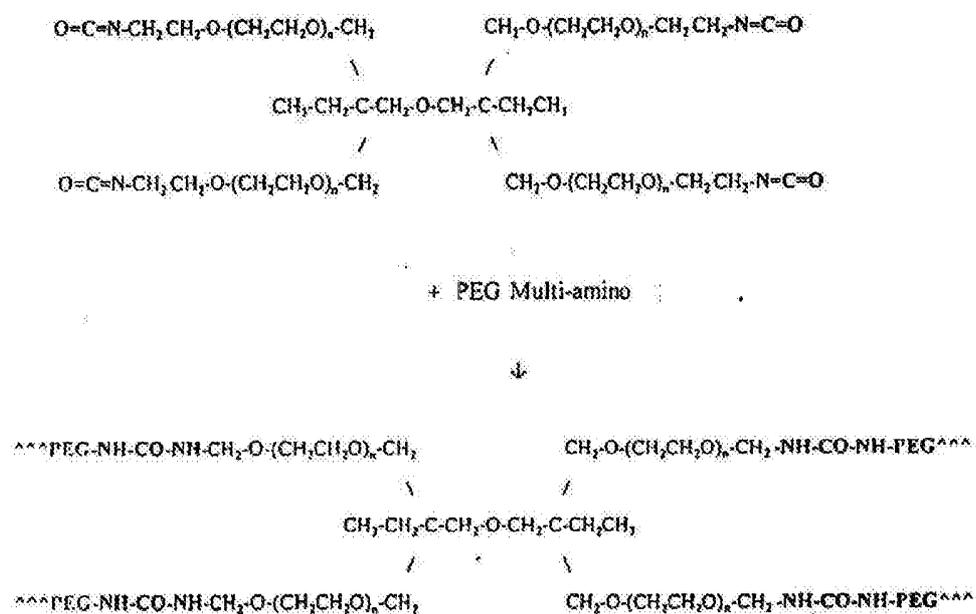


Fig. 12

V-PEG: PEG-Vinilsulfona Tetrafuncionalmente Activado

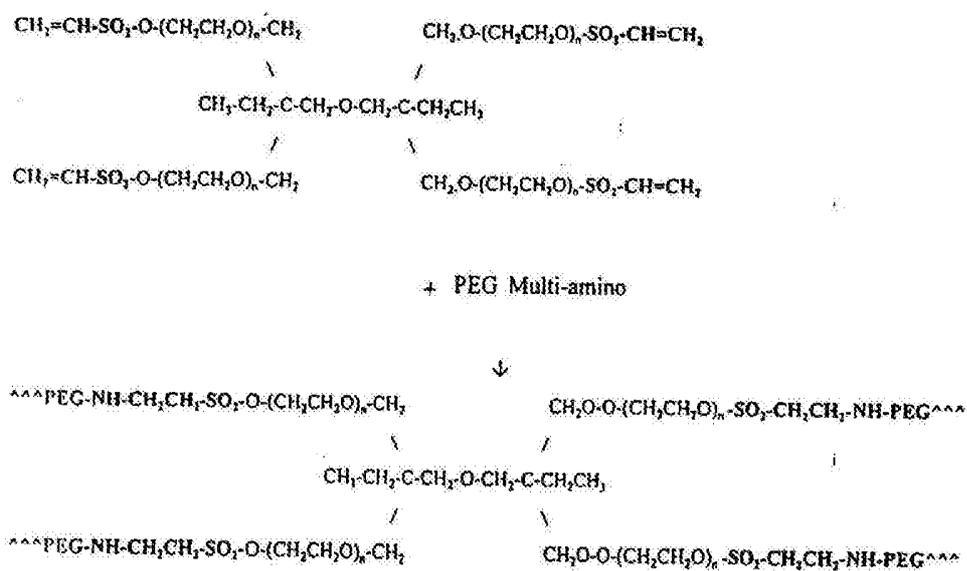


Fig. 13

## Suberato de Disuccinimidilo (DSS)

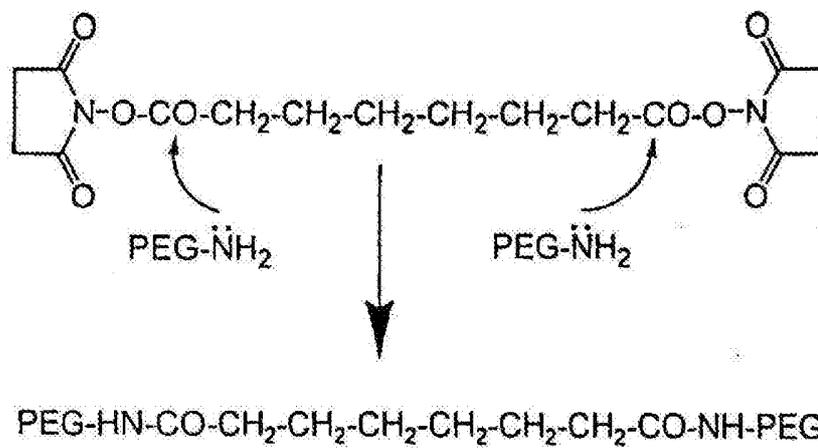


Fig. 14

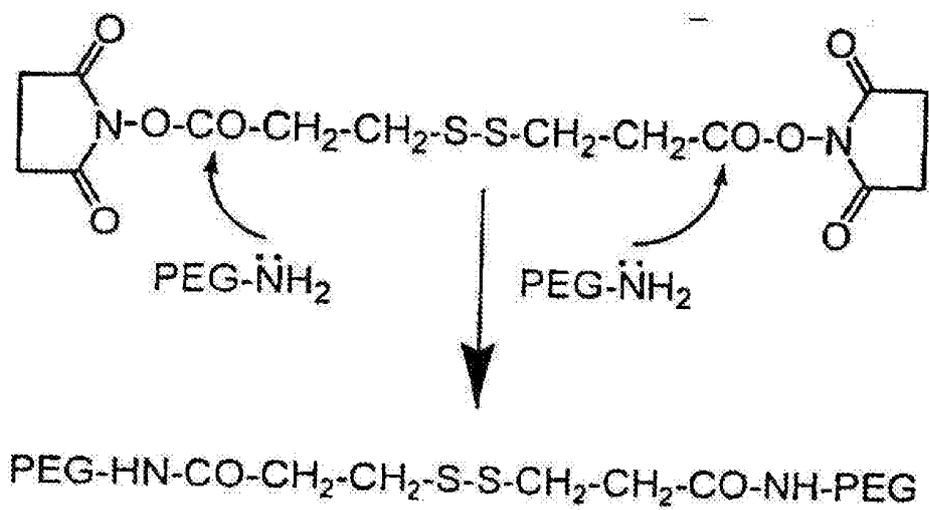
**Ditio-bis(succinimidilpropionato) (DSP)**

Fig. 15

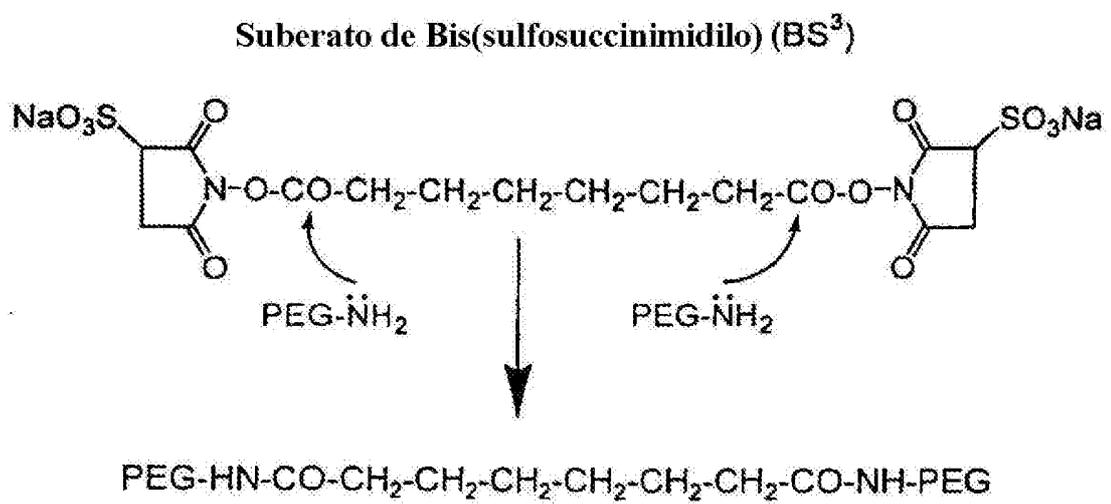


Fig. 16

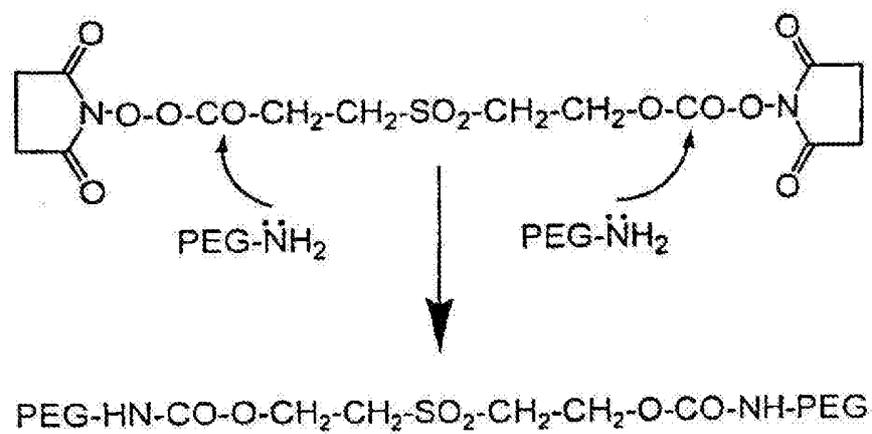
**Bis(2-succinimidooxycarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES)**

Fig. 17

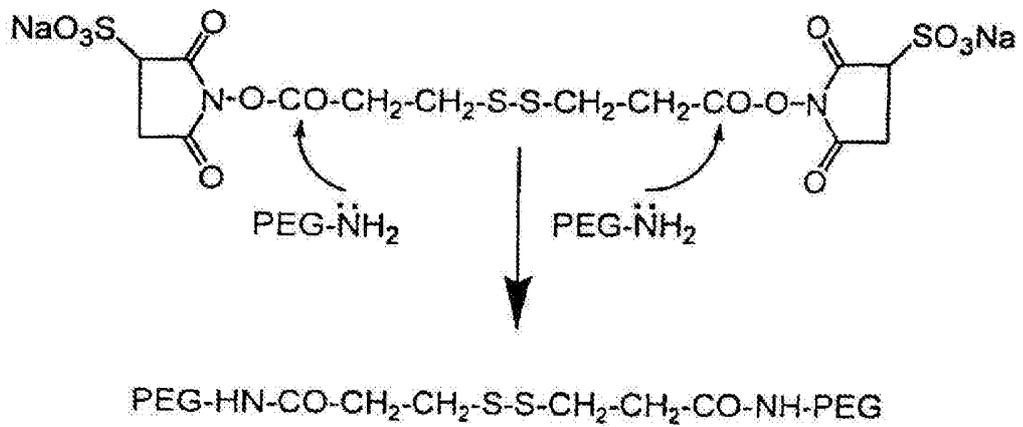
**3,3'-Dithio-bis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP)**

Fig. 18