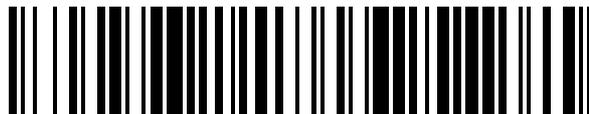


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 241 374**

21 Número de solicitud: 201931847

51 Int. Cl.:

C08G 83/00 (2006.01) **A61L 24/04** (2006.01)

C09J 135/04 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01)

A61K 31/785 (2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

11.10.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.02.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (100.0%)
CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN MARTÍNEZ, José Miguel y
SANTIN, Matteo**

54 Título: **BIOMATERIAL POLIMÉRICO Y USO DEL MISMO**

ES 1 241 374 U

DESCRIPCIÓN

Biomaterial polimérico y uso del mismo

5 La presente invención se refiere a un nuevo biomaterial polimérico y a su uso como adhesivo y/o sellante de tejidos tanto de animales como de humanos. Por tanto, la presente invención se puede encuadrar en el campo de la medicina y/o veterinaria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Los adhesivos y los sellantes médicos y veterinarios se usan en clínica y cirugía como una alternativa o como coadyuvantes a otros métodos de cierre de heridas tales como la sutura y el empleo de grapas, entre otros. El empleo de los adhesivos y los sellantes permite además detener rápidamente el sangrado de las heridas en accidentes y emergencias hospitalarias, así como reducen o eliminan completamente la formación de cicatrices.

15

Una gran parte de los sellantes y adhesivos actuales para uso médico y veterinario están basados en polímeros sintéticos, polímeros derivados de productos naturales o una combinación de ambos. Entre los adhesivos y sellantes obtenidos a partir de polímeros sintéticos destacan los policianoacrilatos y los poliuretanos, mientras que entre los obtenidos a partir de polímeros naturales se encuentran los basados en proteínas (por ejemplo, la fibrina) y los basados en polisacáridos (por ejemplo, el quitosán).

20

25

Los adhesivos y sellantes derivados de polímeros sintéticos presentan notables ventajas frente a los basados en polímeros naturales, entre las que se incluyen su relativamente bajo coste, su buena reproducibilidad en el escalado industrial, sus altas propiedades mecánicas y adhesivas, y la ausencia de riesgos de transmisión de enfermedades. Sin embargo, su biocompatibilidad es limitada al ser considerados como cuerpos extraños por las células inflamatorias de los tejidos circundantes que unen, además de generar sub-productos de degradación que son tóxicos (por ejemplo, la liberación de formaldehído durante la degradación de los policianoacrilatos), pudiendo causar necrosis tisular. Por otra parte, las propiedades mecánicas de los adhesivos y los sellantes derivados de polímeros sintéticos son muy diferentes a las de los tejidos que unen o sellan, siendo generalmente más rígidos, lo que conlleva la eliminación

30

35

prematura del adhesivo o del sellante y el riesgo de generar un cierre incompleto de las heridas. Además, durante la polimerización de los adhesivos y sellantes de cianoacrilato, se produce una reacción muy exotérmica con el agua y la sangre que genera un importante aumento local de la temperatura en los tejidos circundantes que conlleva la formación de necrosis o la muerte de los mismos.

Los adhesivos y los sellantes derivados de polímeros naturales presentan reducidos riesgos de toxicidad y sus propiedades mecánicas son más parecidas a las de los tejidos que unen. Sin embargo, sus propiedades adhesivas son limitadas, su velocidad de degradación es relativamente rápida, pueden generar respuestas autoinmunes, y, si proceden de animales, pueden presentar riesgos de transmisión de enfermedades.

Desde una perspectiva clínica y comercial, los adhesivos y los sellantes sintéticos resultan atractivos por su alta capacidad adhesiva, tiempo de curado o reticulación controlable, potencial biocompatibilidad (ausencia de toxicidad y de respuesta inmunológica, capacidad de cerrar heridas sin dejar cicatriz) y por sus buenas propiedades mecánicas.

Se han propuesto diferentes estrategias para el desarrollo de polímeros sintéticos para adhesivos y/o sellantes en medicina y veterinaria. En esta línea, se han propuesto diferentes modificaciones de policianocrilatos, poliuretanos y polietilen glicoles para mejorar sus propiedades mecánicas (es decir, reducir su rigidez) y reducir su toxicidad.

Son relevantes para esta invención los métodos basados en el uso de dendrones. Los dendrones son macromoléculas tridimensionales con muchas ramificaciones regularmente ordenadas que poseen muy baja polidispersidad y alto grado de funcionalización. Los dendrones están constituidos por tres partes: una cadena principal (o núcleo), bloques o ramificaciones que crecen a partir del núcleo que contienen diferentes capas internas de unidades repetitivas, y grupos funcionales de diferente naturaleza química en los extremos de las ramificaciones más externas (Tomalia, D.A. Dendrons/dendrimers: quantized, nano-element like building blocks for soft-soft and soft-hard nano-compound synthesis. *Soft Matter*. 2010, 6, 456).

Aunque los dendrones se pueden obtener a partir de distintos monómeros, los dendrones de poli (epsilon-lisina) se han propuesto particularmente en el campo

biomédico como estructuras proteicas de soporte (*scaffolds*) y como soportes (*carriers*) para la liberación controlada de genes, fármacos y agentes de contraste en resonancia magnética nuclear (Al Jamal, K. T., Ramaswamy, C., Florence, A. T., Supramolecular structures from dendrons and dendrimers. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005, 57, 2238; Tomalia, D.A. Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today.* 2001, 6, 427). De hecho, se ha demostrado la capacidad de los dendrones catiónicos de poli (epsilon-lisina) para reducir el crecimiento de tumores in vivo (Wells, N. J., Basso A., Bradley M. Solid-phase dendrimer synthesis. *Biopolymers.* 1999, 47, 381).

10

En los dendrones peptídicos (es decir, semi-dendrímeros, ya que no poseen una estructura esférica sino semi-esférica) desarrollados por la Universidad de Brighton, la cadena principal puede incluir secuencias peptídicas lineales cortas que permiten facilitar su anclaje a la superficie de distintos materiales y sustratos. Las ramificaciones de los dendrones pueden diseñarse para dotarlos de una función biológica específica (WO/2008/068531). Así, la inclusión de funcionalidades de fosfoserina en los dendrones permite mimetizar la función de la fosfatidilserina, uno de los catalizadores más potentes para favorecer la biomineralización de los huesos. El aumento de la densidad de centros de nucleación (16 funcionalidades por molécula para generar 3 generaciones en los dendrones) en la superficie de implantes de titanio aumenta la nucleación de fosfatos de calcio y la adhesión de osteoblastos (Meikle, S.T. *et al.* Osteoconductive phosphoserine-modified poly(ϵ -lysine) dendrons: synthesis, titanium oxide surface functionalization and response of osteoblast-like cell lines. *J. R. Soc. Interface* 2012 10, 79), así como facilita la diferenciación de células madre y osteoblásticas (Galli, C. *et al.* Biomimetic coating with phosphoserine-tethered poly (epsilon-lysine) dendrons on titanium surfaces enhances Wnt and osteoblastic differentiation. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2012, 1–7, doi: 10.1111/clr.12075). Esta misma estrategia se ha usado para el control de la angiogénesis en la vascularización de estructuras de soporte (*scaffolds*) de biopolímeros que contienen dendrones con secuencias antagonistas VEGF (Meikle, S.T. *et al.* Synthesis, characterisation and in vitro anti-angiogenic potential of dendron VEGF blockers. *Macromol. Biosci.*, 2011, 11, 1761–1765).

20
25
30
35

A fin de solventar los inconvenientes de los adhesivos conocidos en el estado de la técnica, la presente invención propone un nuevo biomaterial para su uso como adhesivo o sellante de tejidos que presenta óptimas propiedades como son la compatibilidad con

tejidos vivos, elevada capacidad adhesiva, flexibilidad adaptable al tejido que une, ausencia de toxicidad y propiedades de regeneración tisular.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un biomaterial polimérico caracterizado porque comprende el producto de reacción de un cianoacrilato con un dendrón; donde dicho dendrón comprende:

- un núcleo formado por un aminoácido o péptido,
- 10 • al menos dos ramificaciones, cada una formada por aminoácidos unidos entre sí por enlace peptídico y dichas ramificaciones comprenden en sus extremos grupos funcionales nucleófilos seleccionados de la siguiente lista: amino (-NH₂), hidroxilo (-OH), sulfidrilo (-SH) e imidazol y
- una base o raíz formada por un aminoácido o péptido no reactivo con el
- 15 cianoacrilato,

donde el núcleo está unido covalentemente a cada una de las ramificaciones y a la base o raíz,

y donde el dendrón comprende al menos tres generaciones de ramificaciones.

20 Los grupos funcionales de los extremos de las ramificaciones son grupos químicos de aminoácidos que reaccionan con monómeros de cianoacrilato formando enlaces covalentes. Estos grupos son grupos amino (como por ejemplo, del aminoácido lisina), sulfidrilo (-SH) (como por ejemplo, del aminoácido cisteína), imidazol (como por ejemplo, del aminoácido arginina) o hidroxilo (como por ejemplo, del aminoácido glicina);

25 preferiblemente los grupos funcionales de los extremos de las ramificaciones son grupos amina (-NH₂). En la presente invención, los extremos de las ramificaciones se refieren a los extremos libres de las mismas.

Preferiblemente, las ramificaciones están formadas a partir de aminoácidos seleccionados de la siguiente lista: arginina, asparagina, glutamina, histidina, lisina,

30 triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina o combinaciones de ellos. Más preferiblemente, lisina.

Preferiblemente, el núcleo comprende un aminoácido a partir del cual crecen las ramificaciones unidas covalentemente, estando dicho aminoácido seleccionado de la

35 lista que comprende: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina,

glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina. Más preferiblemente, lisina. El núcleo también puede comprender un péptido formado por dichos aminoácidos o combinaciones de ellos.

5

Los aminoácidos o péptidos que forman la base o raíz son aminoácidos o péptidos que pueden generar interacciones hidrofóbicas o interacciones π - π^* , de manera que no sean reactivos con el monómero de cianoacrilato, lo que imparte flexibilidad al cianoacrilato polimerizado. En el caso de que la base o raíz esté formada por un aminoácido, éste puede ser fenilalanina, triptófano, metionina, tirosina, histidina, valina o isoleucina, preferiblemente fenilalanina o triptófano. En el caso de que la base o raíz esté formada por un péptido, éste comprende preferiblemente aminoácidos seleccionados de la lista siguiente: fenilalanina, triptófano, metionina, tirosina, histidina, valina e isoleucina, más preferiblemente fenilalanina o triptófano. Aún más preferiblemente, el péptido que forma la base o raíz es un dipéptido formado por dos aminoácidos mencionados anteriormente o combinaciones de ellos.

10

15

20

El cianoacrilato polimeriza fácilmente en presencia de los dendrones dando lugar al producto polimérico en base a cianoacrilato (que es el monómero que polimeriza) en el que los dendrones están incorporados debido a que éstos comprenden funcionalidades adecuadas para reaccionar con el cianoacrilato.

25

Los grupos funcionales de las ramificaciones más externas de los dendrones actúan como nucleófilos (preferiblemente los grupos amina) que inicia la polimerización de los monómeros de cianoacrilato y, además, presentan grupos funcionales capaces de interactuar con células vivas como, por ejemplo, la secuencia de tres aminoácidos – RGD-NH₂. La base o raíz del dendrón posee aminoácidos capaces de crear interacciones hidrofóbicas o interacciones π - π^* , las cuales se introducen para mejorar la flexibilidad del policianoacrilato reticulado y facilitar la degradación más rápida del mismo en el cuerpo o tejido sobre el que se aplique.

30

En una realización preferida, el cianoacrilato es seleccionado de entre cianoacrilato de metilo, cianoacrilato de etilo, cianoacrilato de n-butilo, cianoacrilato de isobutilo, cianoacrilato de n-hexilo, cianoacrilato de isohexilo, y cianoacrilato de n-octilo, o mezclas de los mismos; más preferiblemente, el cianoacrilato es cianoacrilato de etilo.

En una realización preferida, el dendrón comprende tres, cuatro o cinco generaciones

de ramificaciones.

En una realización más preferida, el dendrón presenta la estructura mostrada en la figura 1 en la que se expresa con el número 1 a la base, con el número 2 al núcleo a partir del que crecen las ramificaciones, y con el número 3 a las ramificaciones.

- 5 En una realización preferida, la reacción del cianoacrilato con un dendrón se produce por adición de cianoacrilato a una solución del dendrón en un disolvente seleccionado de: etanol, agua, disolución acuosa tal como tampón salino o tampón fisiológico, o mezclas de los mismos; preferiblemente etanol.
- 10 En una realización preferida de la invención, la solución del dendrón en el disolvente (etanol, agua, disolución acuosa tal como tampón salino o tampón fisiológico, o mezclas de los mismos, preferiblemente etanol) comprende una proporción en peso dendrón:disolvente que varía entre 1:20 y 1:5 en peso. De esta manera, la cantidad de dendrón en el producto final (biomaterial polimérico) supondrá entre el 1-5 % en peso
- 15 aproximadamente. Luego, en una realización preferida, el dendrón que reacciona representa entre el 1 y el 5 % en peso del biomaterial polimérico.

En una realización preferida, la solución del dendrón en el disolvente se prepara en un baño de ultrasonidos.

- 20 En una realización preferida de la invención, la cantidad de cianoacrilato añadida sobre la solución de dendrón está en una proporción en peso solución:cianoacrilato de entre 1:2 y 1:6, más preferiblemente 1:4.

- 25 En una realización preferida de la invención, se añade también agua destilada a la mezcla de solución de dendrón y cianoacrilato para acelerar el curado (reacción de polimerización) en una cantidad de entre 0,2 y 2 % en peso respecto a la cantidad total de la mezcla de solución de dendrón y cianoacrilato, preferentemente 1 % en peso.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un biomaterial polimérico como el descrito en el primer aspecto de la invención. El procedimiento comprende las etapas de:

- 30 a) preparación de una solución del dendrón según se ha definido anteriormente en el primer aspecto de la invención en un disolvente seleccionado de: etanol, agua, disolución acuosa tal como tampón salino o tampón fisiológico, o mezclas de los

mismos, preferiblemente etanol,

b) adición de un cianoacrilato, a la solución preparada en la etapa a).

En una realización preferida, tras la adición del cianoacrilato, la mezcla de reacción se agita para homogeneizarla durante un tiempo comprendido entre 3 y 10 segundos, más
5 preferiblemente 10 segundos. Preferiblemente la agitación se realiza de forma manual.

En una realización preferida, el cianoacrilato es seleccionado de entre cianoacrilato de metilo, cianoacrilato de etilo, cianoacrilato de n-butilo, cianoacrilato de isobutilo, cianoacrilato de n-hexilo, cianoacrilato de isohexilo, y cianoacrilato de n-octilo, o mezclas de los mismos; más preferiblemente, el cianoacrilato es cianoacrilato de etilo.

10 En una realización preferida de la invención, la solución de la etapa a) se prepara añadiendo dendrón y un disolvente (etanol, agua, disolución acuosa tal como tampón salino o tampón fisiológico, o mezclas de los mismos) en una proporción dendrón: disolvente que varía entre 1:20 y 1:5 en peso. De esta manera, la cantidad de dendrón en el producto final (biomaterial polimérico) supondrá entre el 1-5 % en peso
15 aproximadamente.

En una realización preferida, la solución de la etapa a) se prepara en un baño de ultrasonidos.

En una realización preferida de la invención, la cantidad de cianoacrilato añadida sobre la solución preparada en la etapa a) está en una proporción en peso solución preparada
20 en la etapa a):cianoacrilato de entre 1:2 y 1:6, más preferiblemente 1:4.

En una realización preferida de la invención, en la etapa b) se añade también agua destilada en una cantidad de entre 0,2 y 2 % en peso con respecto a la cantidad total de solución de dendrón y cianoacrilato, preferiblemente 1 % en peso.

En una realización preferida, el procedimiento comprende, además de la adición de
25 cianoacrilato de la etapa b), la adición simultánea (junto con el cianoacrilato) de al menos un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: una proteína o polipéptido, un aminoácido, un ácido nucleico, un polinucleótido, un carbohidrato, un polisacárido o combinaciones de ellos, sobre la solución preparada en la etapa a).

En una realización preferida, el procedimiento comprende, además de la adición de
30 cianoacrilato de la etapa b), la adición simultánea (junto con el cianoacrilato) de un

agente terapéutico que se selecciona del grupo que consiste en agentes antibacterianos, antifúngicos, agentes anticancerígenos, antibióticos y fármacos antiinflamatorios.

5 En una realización preferida, la preparación del dendrón utilizado en la etapa a) comprende:

- la reacción en fase sólida sobre un soporte en un reactor de microondas o en un reactor químico estándar del aminoácido o péptido que forma la base o raíz y el otro aminoácido o péptido que forma el núcleo,
- la reacción de ensamblaje del núcleo unido a la base o raíz con los aminoácidos que forman las ramificaciones en un reactor de microondas o en un reactor 10 químico estándar.

Este procedimiento de preparación del dendrón es el habitualmente utilizado en el estado de la técnica y ampliamente conocido para un experto en la materia, tal y como se describe en las página 2 y 3, párrafos [0027] a [0050] del ejemplo 1 del documento 15 US 2011/0046346 A1 (de Andrew W. Lloyd et al. titulado *Biomaterials with functionalized surfaces*). De manera más detallada, los dendrones se sintetizan mediante un método en fase sólida, usando una resina como soporte, realizándose la síntesis en un reactor de microondas o en un reactor químico estándar. Se realiza la preparación del dendrón por reacción en fase sólida sobre el soporte del aminoácido o péptido que forma la base 20 o raíz del dendrón y el otro aminoácido o péptido que forma el núcleo a partir del cual crecen las ramificaciones. La resina soporte se hincha con dimetilformamida (DMF) dentro del recipiente de reacción, eliminándose el disolvente posteriormente. En un vial de vidrio aparte se añade DMF a una amida Rink, solubilizándola en un baño de ultrasonidos durante unos segundos. Esta mezcla se adiciona al recipiente de reacción 25 y, a continuación se añade el agente activador HBTU (o-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro fosfato) en DMF, seguido de la adición de agente activador DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) en DMF. La mezcla se agita con un agitador magnético, realizando la reacción de acoplamiento de la amida Rink a la resina soporte en un reactor de microondas o en un reactor químico estándar, eliminando el disolvente 30 posteriormente. Para iniciar el proceso de síntesis del dendrón se precisa desproteger la amina Rink con una disolución de piperidina en DMF, repitiendo los pasos de reacción en el reactor de microondas o en el reactor químico estándar y la eliminación posterior del disolvente. Se adiciona Fmoc-aminoácido que va a formar la raíz al reactor de

microondas o al reactor químico estandar para anclarlo a la amida Rink en las mismas condiciones de reacción anteriores. Este mismo proceso se repite adicionando otro Fmoc-aminoácido para formar la raíz. Cada Fmoc-aminoácido se adiciona de uno en uno, desprotegiéndolo adicionando piperidina en DMF, antes de adicionar el siguiente, para formar el núcleo y, posteriormente, las ramificaciones. Una vez terminada la adición de Fmoc-aminoácido, se realiza el desanclado del péptido/dendróon del soporte. El desanclado del producto final del soporte se realiza a temperatura ambiente empleando mezclas de desanclado adecuadas basadas en ácido trifluoroacético (TFA) y moléculas generadoras de radicales libres (tales como 1,2 etanoditiol, triisopropilsilano o fenol) (TIPS). Tras varias horas de incubación, la solución se pasa a través de una pipeta Pasteur rellena con lana de vidrio y se recoge el péptido en un tubo que contiene dietiléter seco, centrifugando y decantando el dietiléter. Este procedimiento se repite dos veces más extrayendo el dendróon en el precipitado. El dendróon se seca en frío, se disuelve en etanol y se filtra.

15

La presente invención también se refiere al biomaterial polimérico obtenido por el procedimiento anterior.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del biomaterial polimérico de la presente invención en medicina o veterinaria. En particular, se refiere a su uso como adhesivo y/o sellante de tejidos (animales o humanos). Por tanto, el biomaterial polimérico de la presente invención es útil, por ejemplo, en el tratamiento y cuidado de heridas, en el cierre de heridas por accidente, en cirugías médicas, cosméticas y plásticas, reparación de uñas rotas, etc.

El biomaterial polimérico se genera preferiblemente *in situ* sobre la propia herida que se quiera cerrar o sellar, adicionando simultáneamente sobre ella la solución de dendróon y el cianoacrilato, de manera que, al contacto con el agua del cuerpo o la sangre se produce la reacción de polimerización del cianoacrilato, la cual se acelera en presencia de los dendrones y del agua o sangre del cuerpo, formándose el biomaterial polimérico correspondiente sobre la herida a cerrar o sellar. El biomaterial polimérico se va endureciendo (proceso de curado) a medida que la reacción de polimerización transcurre, quedando al final una fina capa del mismo sobre la herida o tejido en cuestión.

El biomaterial polimérico de la presente invención presenta un rápido curado y

reticulación, moderada liberación de calor durante el curado dentro del rango que permite su compatibilidad con tejidos vivos, elevada capacidad adhesiva, buena flexibilidad adaptable al tejido que une, ausencia de toxicidad y propiedades de regeneración tisular.

- 5 Un último aspecto de la invención se refiere a un kit para cerrar o sellar heridas, laceraciones o unir tejidos (humanos o animales) caracterizado porque incluye al menos:
- un cianoacrilato
 - un dendrón como se ha definido en el primer aspecto de la invención.
- 10 Preferiblemente, el kit comprende una disolución del dendrón en etanol, agua, disolución acuosa tal como tampón salino o tampón fisiológico, o mezclas de los mismos, preferiblemente etanol.

En una realización preferida del kit, el cianoacrilato es seleccionado de entre cianoacrilato de metilo, cianoacrilato de etilo, cianoacrilato de n-butilo, cianoacrilato de isobutilo, cianoacrilato de n-hexilo, cianoacrilato de isohexilo, y cianoacrilato de n-octilo, o mezclas de los mismos; más preferiblemente, el cianoacrilato es cianoacrilato de etilo.

En una realización preferida, el kit de aplicación del adhesivo consiste en una jeringa monodosis desechable (es decir de un solo uso) de dos cuerpos de polipropileno, uno de los cuales contiene el cianoacrilato y el otro una solución de dendrón en etanol; en el extremo de la jeringa se encuentra un tornillo sinfín que permite el mezclado de los dos componentes *in situ* en el momento de la aplicación a una herida, laceración o incisión en un tejido (humano o animal). Preferiblemente, la jeringa de dos cuerpos y el tornillo sinfín se empaquetarán en un blíster de aluminio opaco esterilizado mediante óxido de etileno.

25 Alternativamente, el kit de aplicación del adhesivo comprende una ampolla de polipropileno monodosis desechable (es decir de un solo uso) de dos compartimentos separados que se pueden mezclar mediante la aplicación de presión en la zona separadora de los dos compartimentos; en un extremo de la ampolla existe un vástago aplicador de polipropileno que puede ser abierto con facilidad para facilitar la aplicación del adhesivo a una herida, laceración o incisión en un tejido (humano o animal). Preferiblemente, la ampolla de dos compartimentos se empaquetará en un blíster de aluminio opaco esterilizado mediante óxido de etileno.

Es conocido en el estado de la técnica la formación de materiales adhesivos por polimerización de cianoacrilato para formar una capa sólida, pero, en la presente invención, la inclusión de los dendrones bifuncionales a los adhesivos y/o sellantes en base a cianoacrilato presenta importantes ventajas:

- 5 1- Aumento de la velocidad de polimerización en contacto con un entorno biológico.
- 2- Reducción de la reacción exotérmica durante el proceso de polimerización de los cianoacrilatos en presencia de agua o sangre, evitando riesgos de muerte tisular (por ejemplo, necrosis).
- 3- Mejora de la reactividad de los monómeros de cianoacrilato al eliminarse
10 compuestos tóxicos secundarios de su polimerización que no reaccionan habitualmente con los mismos.
- 4- Incremento de la flexibilidad de los adhesivos y/o sellantes polimerizados, lo que evita su desprendimiento prematuro al transcurrir el tiempo desde su aplicación.
- 5- Mejora la integración tisular y la re-sorción del adhesivo y/o del sellante
15 polimerizado, permitiendo mejoras estéticas (es decir, ausencia de cicatrices) e incrementando la funcionalidad de dichos adhesivos y/o sellantes.
- 6- El adhesivo y/o sellante derivado de los dendrones bifuncionales y cianoacrilato, tras ser polimerizado, posee una flexibilidad mayor que la del adhesivo sin
20 dendrones y su flexibilidad se adapta a la de un tejido blando típico, puede sufrir re-sorción durante el proceso de reparación del tejido y la re-sorción del producto polimerizado no genera sub-productos tóxicos.

Definiciones:

- 25 El término "aminoácido" en la presente invención se refiere a una molécula orgánica que comprende al menos un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$).
El término "péptido" en la presente invención se refiere a una cadena de entre 2 y 20 aminoácidos unidos entre sí por enlace peptídico.

- 30 El término "biomaterial" empleado en la presente invención hace referencia a un material apto para entrar en contacto con los tejidos de un sujeto con propósitos terapéuticos específicos, de diagnóstico, o con propósitos preventivos. Estos materiales deben ser biocompatibles. En la presente invención el biomaterial es polimérico, es decir, está formado por cadenas de cianoacrilato polimerizadas con moléculas de dendrones unidas covalentemente estando intercaladas entre las cadenas poliméricas de

cianoacrilato.

En el presente documento, el término “biocompatible” describe una sustancia que puede insertarse o inyectarse en un sujeto vivo sin causar una respuesta adversa. Por ejemplo,
5 no produce inflamación o rechazo agudo por el sistema inmunitario. Se reconocerá que “biocompatible” es un término relativo, y cabe esperar cierto grado de respuesta inmunitaria incluso para sustancias que son altamente compatibles con el tejido vivo. Una prueba *in vitro* para evaluar la biocompatibilidad de una sustancia es exponerla a las células; las sustancias biocompatibles normalmente no producirán muerte celular
10 significativa (por ejemplo, >20 %) a concentraciones moderadas.

El término “reticulación” o “curado” se usa para describir la capacidad de un compuesto o de un monómero para polimerizar químicamente.

Un “dendrón” se define aquí como una macromolécula hiper-ramificada de estructura
15 supramolecular en forma de árbol. Un dendrón típico consiste en una molécula núcleo, una base o raíz y unas ramificaciones que se generan a partir del núcleo. El número de puntos de ramificación desde el núcleo hasta los grupos terminales del dendrón es utilizado para caracterizar los dendrones y se conoce como el número de generaciones de los dendrones. Por ejemplo, un dendrón de generación 3 (G3) se refiere a un dendrón
20 con tres puntos de ramificación desde el núcleo (inclusive) hasta los grupos terminales del dendrón. El término “generación” también se puede definir como el número de ramificaciones iterativas que son necesarias para la preparación del dendrón. En los extremos de la generación más externa, existen grupos funcionales que pueden interaccionar o reaccionar con otras especies químicas.

25 Los dendrones se sintetizan a partir de diferentes tipos de monómeros que incluyen, pero no se limitan, a aminoácidos. El núcleo del dendrón puede comprender un aminoácido simple o un péptido con un grupo carboxílico y un grupo amina en su estructura, y cadenas laterales (R) propias de los aminoácidos. El aminoácido más común que se emplea en el núcleo es la lisina a partir del cual se generan las
30 ramificaciones por sus dos grupos amino en posiciones alfa y epsilon que se sitúan en sus extremos. Los métodos de síntesis de los dendrones son bien conocidos por expertos en la materia y se describen en los ejemplos de los documentos: B. D. Mather *et al.* “Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies”, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 487–531, y Andrew W. Lloyd *et al.* Biomaterials with
35 functionalized surfaces. US 2011/0046346 A1, 2011.

El término "funcionalidad" se refiere a los centros activos de una molécula, de manera que los términos "bifuncional" y "multifuncional" indican la existencia de más de un grupo funcional en una misma molécula o macromolécula. Del mismo modo se aplica al término "biofuncionalidad" que se refiere a una molécula o macromolécula que puede ser reconocida por un entorno biológico y que posee más de un grupo funcional en la misma. En esta invención, el término "biofuncionalidad" se refiere al de "bifuncionalidad" en el dendrón.

Un "dendrón bifuncional" es un dendrón que posee una molécula, aminoácido o péptido raíz y otra molécula, aminoácido o péptido en el núcleo, siendo este último la base de la estructura en forma de árbol, y en el que existen dos funcionalidades distintas en los extremos de las ramificaciones de generación de la estructura en forma de árbol. Así mismo, un "dendrón biofuncional" se refiere aquí a un dendrón que integra dos grupos funcionales distintos en su estructura molecular, bien en su núcleo, o bien en los extremos más externos de las ramificaciones de generación en forma de árbol.

Un "grupo nucleófilo" se define generalmente como un grupo funcional que es capaz de donar un par de electrones a un electrófilo con el que reacciona para generar un enlace polar. Algunos ejemplos de grupos nucleófilos relevantes en esta invención son, entre otros, los grupos amina, hidroxilo, sulfidrilo (-SH), e imidazol cuyo carácter nucleófilo es generalmente superior al del agua.

La definición aceptada de un "polímero" corresponde a una macromolécula formada por unidades que se repiten denominadas monómeros. Típicamente, un polímero contiene más de 100 unidades de monómero.

El término "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA) de longitud igual o superior a 2 nucleótidos (abreviado como nt) que puede ser de cadena sencilla o cadena doble.

Mediante el término "carbohidrato" se hace referencia en la presente invención a un compuesto orgánico de fórmula general $(CH_2O)_n$, en la cual n está comprendido entre 4 y 40, seleccionado entre monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, preferentemente monosacáridos.

En la presente invención, el término "polisacárido" se refiere a un polímero que comprende una cadena conformada principalmente por (al menos 90%) unidades

repetidas de monosacárido y/o unidades repetidas de un derivado de monosacárido. Ejemplos no limitantes incluyen almidones, almidones modificados, amilopectina, amilopectina modificada, amilosa, amilosa modificada, quitosán, quitina, goma guar, goma guar modificada, celulosa, celulosa modificada (por ejemplo, carboximetil
5 celulosa), polisacáridos oxidados, polisacáridos sulfatados, pectinas, goma arábica, agar-agar, alginatos y sus mezclas.

El término "unidad de monosacárido", se refiere a aldosas o cetosas cíclicas de 5 o 6 eslabones. Aldosas son, por ejemplo y sin limitarse, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa. Cetosas son, por
10 ejemplo y sin limitarse, ribulosa, xilulosa, fructosa, sorbosa y tagatosa.

El término "derivado de monosacárido" se refiere a cualquier unidad de monosacárido química o enzimáticamente modificada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para
15 los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIG. 1. Estructura típica del dendrón FFG3K. La referencia (1) se refiere a la base o raíz del dendrón, la (2) al núcleo y la (3) a cada ramificación.

25 FIG. 2. Cromatogramas HPLC del dendrón FFG3K después de separarlo del soporte (a) y tras ser purificado (b).

FIG. 3. Espectro de masas del dendrón FFG3K purificado.

30 FIG. 4. Espectro FTIR del dendrón FFG3K purificado.

FIG. 5. Espectro IR-ATR de cianoacrilato de etilo al transcurrir el tiempo.

FIG. 6. Cinética de polimerización de cianoacrilato de etilo (ECN) sin (a) y con 1% en peso (b), 3% en peso (c), y 5% en peso (d) de dendrones FFG3K.

FIG. 7. Termogramas de DSC (calorimetría diferencial de barrido) de policianoacrilato de etilo polimerizado (pECN) sin y con diferentes cantidades de dendrones FFG3K.

FIG. 8. Variación de la derivada del peso en función de la temperatura de policianoacrilato de etilo polimerizado (pECN) sin y con diferentes cantidades de dendrones FFG3K.

10

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

15

Ejemplo 1 – Síntesis y caracterización de los dendrones

Método de síntesis de los dendrones

Los dendrones bifuncionales estaban basados en un núcleo unido covalentemente a una molécula raíz de fenilalanina (o difenilalanina o cualquier aminoácido capaz de generar interacciones hidrofóbicas o interacciones pi-pi*), monómeros de lisina o péptidos sin y con una bifuncionalidad integrada (por ejemplo péptidos capaces de ser reconocidos por células vivas – Figura 1). Los dendrones bifuncionales se sintetizaron mediante un método de síntesis en fase sólida, usando la resina Tenta Gel S (-NH₂) (Iris Biotech GmbH, Reino Unido) como soporte, realizando el proceso de síntesis en un reactor de microondas (Biotage Initiator, Reino Unido). Se realizó la preparación del núcleo del dendrón por reacción en fase sólida sobre el soporte del aminoácido o péptido que forma la base o raíz y el otro aminoácido o péptido a partir del cual crecen las ramificaciones. La resina Tenta Gel S (-NH₂) se introdujo dentro del recipiente de reacción hinchándola con 7 ml de dimetilformamida (DMF) durante 15 minutos, eliminándose posteriormente el DMF mediante una bomba de vacío. En un vial de vidrio se añadieron 0,4 mmoles de una amida Rink (Iris Biotech GmbH, Reino Unido) junto con 2,5 ml de DMF, solubilizándola en un baño de ultrasonidos durante unos segundos. Esta mezcla se adicionó al recipiente de reacción y, a continuación se añadió 1 ml de una disolución 0,45 M en DMF del agente activador HBTU (o-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro fosfato), seguido de la adición de 0,5 ml de una disolución

35

en DMF al 33 % en peso del agente activador DIPEA (N,N-diisopropiletilamina); ambos agentes activadores fueron suministrados por Sigma Aldrich Co. Ltd (Reino Unido). La mezcla se agitó a 900 rpm con un agitador magnético, realizando la reacción de acoplamiento de la amida Rink a la resina soporte Tenta Gel S (-NH₂) en un reactor de microondas usando una potencia de 50 vatios y una temperatura de 70 °C durante 7 minutos. Posteriormente, se eliminó el disolvente mediante bomba de vacío, lavando el sólido tres veces con 7 ml de DMF y volviendo a eliminar el disolvente mediante bomba de vacío. Para iniciar el proceso de síntesis del dendrón se precisó desproteger la amina Rink adicionando 5 ml de una disolución al 20 % en volumen de piperidina (Sigma Aldrich Co. Ltd, Reino Unido) en DMF, repitiendo los pasos de reacción en el reactor de microondas usando una potencia de 50 vatios y una temperatura de 70 °C durante 7 minutos, eliminando posteriormente el disolvente mediante bomba de vacío y lavando tres veces con 7 ml de DMF. Se adicionó Fmoc-felilalanina al reactor y se ancló a la amida Rink en las mismas condiciones de reacción en el reactor de microondas. Este mismo proceso se repitió adicionando Fmoc-lisina, etc. Cada Fmoc-aminoácido se adicionó de uno en uno, desprotegiéndolo adicionando 5 ml de una disolución al 20 % en volumen de piperidina en DMF, antes de adicionar el siguiente.

Una vez terminada la adición de Fmoc-aminoácido, se realizó el desanclado del péptido/dendrón del soporte. Una de las mezclas de desanclado más usadas se basa en ácido trifluoroacético (TFA) suplementado con moléculas generadoras de radicales libres, ya que evitan la re-estructuración o la modificación de los centros reactivos del péptido tras ser desprotegido. Los grupos Fmoc que protegen a los aminoácidos de 50 mg del dendrón FFG3K se desanclaron a temperatura ambiente empleando dos mezclas distintas:

- 1- 94 % en volumen de TFA (Fisher Scientific, Reino Unido), 2.5 % en volumen de agua desionizada, 1 % en volumen de 1,2 etanoditiol (EDT) (Acros Organics, Reino Unido), y 2,5 % en volumen de triisopropilsilano (TIPS) (Sigma Aldrich Co. Ltd, Reino Unido).
- 2- 88 % en volumen de TFA, 5 % en peso de fenol (Sigma Aldrich Co. Ltd, Reino Unido), y 2 % en volumen de triisopropilsilano (TIPS) (Sigma Aldrich Co. Ltd, Reino Unido).

Todas las mezclas se prepararon justo antes de ser usadas. Tras tres horas de incubación, la solución se pasó a través de una pipeta Pasteur rellena con lana de vidrio

a una altura de 1 cm y se recogió el péptido en un tubo que contenía 20 ml de dietiléter seco (Fisher Scientific, Reino Unido). La solución se centrifugó en una centrífuga Denley BS400 (Reino Unido) a 3500 rpm durante 5 minutos, decantando el dietiléter del tubo. Se adicionaron 20 ml de dietiléter y la mezcla se agitó por vibración para separar la
 5 masa del péptido. Este procedimiento se repitió dos veces más, decantando finalmente todo el dietiléter. El péptido FFG3K se secó en frío en un equipo “freeze dried” (Christ Alpha2-4, Reino Unido), se disolvió en etanol (Fisher Scientific, Reino Unido) y se filtró sobre una jeringa de diámetro de poro de 0,22 μm (GE Healthcare Amersham, Reino Unido), antes de proceder a su caracterización.

10

Métodos de caracterización de los dendrones

Las biomoléculas grandes, incluyendo los dendrones, se suelen caracterizar mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), cromatografía de capa fina (TLC) y espectrometría de masas (MS). En particular, los métodos cromatográficos se emplean
 15 para concentrar y aislar el péptido de interés antes de ser analizado mediante MS para determinar su peso molecular.

Para analizar el dendron FFG3K, se introdujo en un cromatógrafo HPLC (Waters™ 717 plus Autosampler, Reino Unido) provisto de una columna hidrofóbica RP 18 (150 x 4,60
 20 mm, Luna 3u C18 100 Å, Phenomenex, Reino Unido) operando a 25 °C (Column chiller Model 7955, Jones Chromatography, Reino Unido). Se utilizó un detector ultravioleta (SPO-6A, Shimadzu, Reino Unido) y los cromatogramas se obtuvieron en las condiciones descritas en la Tabla 1, siendo analizados mediante un software de HPLC (Total Chrom-TC Navigator).

25

Tabla 1. Condiciones experimentales empleadas para obtener los cromatogramas HPLC de los dendrones.

Eluyentes	Disolvente A: Agua deionizada con 0,1 % en volumen de TFA Disolvente B: Acetonitrilo con 0,1 % en volumen de TFA
Volumen inyectado	20 μL

Gradiente	0-15 minutos : 95 % A + 5 % B a 20 % A + 80 % B 3 minutos : 20 % A + 80 % B 1 minuto : 0 % A + 100 % B 1 minuto : 95 % A + 5 % B
Velocidad de flujo	1 ml/minuto
Longitud de onda del detector UV (nm)	223

La cromatografía de capa fina (TLC) se emplea para separar distintos compuestos en base a su polaridad e interacción con una fase estacionaria de gel de sílice, así como para determinar la pureza de una muestra. Los dendrones se depositaron mediante un capilar muy delgado sobre una placa de TLC (Riedel-de Haen, Alemania), colocándola en una cámara de TLC que contenía 20 % en volumen de agua y 0,1 % en volumen de TFA (fase móvil). Se esperó hasta que el disolvente alcanzó el final de la placa de TLC, sacándose entonces de la cámara TLC. Las señales correspondientes a la distancia recorrida por cada compuesto se visualizaron mediante una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda 230 nm (UVP Chromato-vue Cabinet, USA). La relación entre la distancia recorrida por el dendrón y por el eluyente desde el origen de la placa se denomina R_f , valor que se calculó para el dendrón FFG3K.

El dendrón FFG3K se caracterizó mediante espectrometría de masas en modo tiempo de ionización por electrospray de vuelo, ESI-TOF MS (Bruker microTOF, Reino Unido) usando un procedimiento estandarizado. El péptido se disolvió en etanol y se bombeó a través de un capilar de acero inoxidable. Se aplicó un alto voltaje (4 kV) a la punta del capilar para permitir la dispersión de gotas altamente cargadas del péptido dentro de la cámara del equipo. Para facilitar la formación de las gotas, se introdujo una corriente de nitrógeno gaseoso a una presión de 0,4 bares coaxialmente al capilar de acero de inoxidable. Las gotas cargadas se desolvataron en diferentes etapas de descenso de la presión de manera que se formaron iones positivos, los cuales se transportaron en una cámara de iones hacia el ánodo situado en el otro extremo de la misma, siendo aceleradas dentro del espectrómetro de masas hacia el analizador. La cascada de iones que corresponde a cada analito se procesó en el detector del equipo y se transformó en valor de peso molecular.

Las medidas de masas se realizaron en un rango de 50 a 3000 Da. Los espectros de

masas obtenidos se expresaban como intensidad o abundancia relativa en el eje Y frente a la relación de la masa frente al número de iones cargados (m/z) en el eje X. Cada fragmento con un determinado peso molecular aparece como un pico individual, y el número de picos depende del peso molecular de las moléculas. En el modo de ionización positiva aparece un alto número de iones cargados que se suelen identificar con sus respectivas cargas (+2, +3, etc) o como $(M+nH)^{n+}$.

Finalmente, los dendrones se caracterizaron mediante espectroscopia infra-roja en un espectrómetro Bruker Alfa (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania), equipado con análisis por transformada de Fourier (FTIR).

Resultados experimentales

El cromatograma HPLC del dendrón FFG3K tras ser separado del soporte presentaba un pico intenso a un tiempo de retención de 12,55 minutos (Figure 2a). Tras ser purificado, el cromatograma HPLC del dendrón FFG3K presentó el mismo pico, pero se eliminaron impurezas (Figura 2b). Por otra parte, el cromatograma de capa fina mostró una única señal con un valor de R_f de 0,73. Además, el espectro de masas del dendrón FFG3K proporcionó un producto con valor de peso molecular de 1097,72 Da (Figura 3) que correspondía a un ión doblemente cargado - $(M+2H)^{2+}$ -, por lo que el peso molecular total era de 2193 Da. El peso molecular experimental obtenido fue muy próximo al teórico.

El espectro FTIR del dendrón FFG3K (Figura 4) mostró las bandas de grupos amida a 1663 y 1776 cm^{-1} , las bandas de grupos metileno a 1431 y 2938 cm^{-1} , las bandas de aminas primarias y secundarias a 1135, 1178 y 1534 cm^{-1} , y las bandas de anillo aromático a 881 cm^{-1} .

Ejemplo 2- Preparación del adhesivo y/o sellante de cianoacrilato

30 Métodos

Se prepararon diferentes adhesivos y/o sellantes de cianoacrilato de etilo (ECN) que contenían diferentes cantidades (1-5 % en peso) del dendrón preparado en el Ejemplo 1.

35 Diferentes cantidades (5,1 mg a 26,3 mg) de dendrón FFG3K se disolvieron en 100 mg

de etanol (1 a 5 % en peso de dendrón FFG3K) en un baño de ultrasonidos.

En una formulación típica de adhesivo y/o sellante, se mezclaron 400 mg de ECN con 100 mg de disolución etanólica de dendrones FFG3K, añadiendo 5 mg de agua
5 destilada. De este modo se obtuvieron los adhesivos y/o sellantes con diferentes cantidades de dendrones FFG3K (D) que se muestran en la Tabla 2.

10 Tabla 2. Composición de los adhesivos y/o sellantes de mezclas de cianoacrilato de etilo y dendrones FFG3K.

Adhesivo y/o sellante	ECN (% en peso)	Etanol (% en peso)	H ₂ O (% en peso)	Dendrón FFG3K (% en peso)
ECN	79,2	19,8	1	0
ECN+1%D	78,4	19,6	1	1
ECN+3%D	76,8	19,2	1	3
ECN+5%D	75,3	18,9	0,9	4,9

Las cinéticas de polimerización de las diferentes formulaciones de adhesivos y/o sellantes de cianoacrilato de etilo con diferentes cantidades de dendrones FFG3K se
15 siguieron mediante espectroscopia IR-ATR a partir de los espectros obtenidos tras diferentes tiempos desde la realización de la mezcla de ECN y de los dendrones FFG3K. Se empleó un espectrómetro Bruker Alfa (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania), equipado con análisis por transformada de Fourier (FTIR), trabajando en modo de reflectancia total atenuada (ATR); se empleó un prisma de germanio. El ángulo de
20 incidencia del haz fue de 45°, realizándose 60 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹. Para monitorizar la cinética de polimerización se eligieron las bandas a 1246 cm⁻¹ del grupo C-O-C (la cual aparece únicamente en el polímero y no está presente en el monómero ECN) y a 1739 cm⁻¹ del grupo C=O debida al grupo éster del monómero ECN (la intensidad de esta banda no se afecta por la polimerización). Así, se usó la relación
25 de las áreas de las bandas a 1246 cm⁻¹ y 1739 cm⁻¹ (I_{1246}/I_{1739}) a diferentes tiempos para

seguir la cinética de polimerización de los adhesivos y/o sellantes (cuanto mayor era el valor de I_{1246}/I_{1739} , mayor era el grado de conversión de monómero ECN en polímero pECN).

- 5 La exotermicidad de la reacción de curado de los adhesivos y/o sellantes de cianoacrilato de etilo sin y con dendrones FFG3K se monitorizó mediante un termopar.

La caracterización físico-química de los adhesivos y/o sellantes de ECN sin y con dendrones FFG3K polimerizados se siguió mediante calorimetría diferencial de barrido
10 (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

La temperatura de transición vítrea y las temperaturas y entalpías de descomposición de los policianoacrilatos de etilo sin y con dendrones FFG3K (pECNs) se determinaron mediante DSC en atmósfera de nitrógeno (flujo: 50 ml/min), empleando un equipo DSC
15 Q100 (TA Instruments, New Castle, USA). Se introdujeron 10 mg de pECN sin y con dendrones FFG3K en crisoles de aluminios cerrados herméticamente y se aumentó la temperatura desde 25 hasta 180 °C empleando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, para asegurar la polimerización total de los adhesivos y/o sellantes. Entonces, se disminuyó la temperatura hasta 25 °C empleando una velocidad de enfriamiento de
20 10 °C/min, y a continuación se realizó un segundo barrido de calentamiento desde 25 hasta 180 °C empleando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura de transición vítrea y las temperaturas y entalpías de descomposición de los pECNs se obtuvieron a partir de los termogramas DSC obtenidos durante el segundo barrido de calentamiento.

25

La estabilidad térmica y la estructura de los pECNs se determinaron mediante análisis termogravimétrico (TGA) en atmósfera de nitrógeno (flujo: 50 ml/min), empleando un equipo TGA Q500 (TA Instruments, New Castle, USA). Se introdujeron 10 mg de pECN en el crisol de platino del equipo TGA y se aumentó la temperatura desde 25 hasta 300
30 °C empleando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

La adherencia inmediata (es decir al transcurrir una hora desde la aplicación del adhesivo) de los adhesivos y/o sellantes de ECN sin y con dendrones FFG3K se evaluó mediante ensayos de cizalla simple (según la norma ASTM 2255-5) y de tensión (según
35 la norma ASTM 2458-5) de uniones piel de cerdo/ECN sin y con dendrones FFG3K/piel

de cerdo. Estos ensayos reproducen la adherencia instantánea de un adhesivo de cianoacrilato en las mismas condiciones de humedad presentes en una herida en piel humana cerrada por aplicación de un adhesivo.

- 5 Las probetas se obtuvieron a partir de trozos de piel de la parte superior de las patas delanteras de cerdos recién sacrificados que se cortaron según las dimensiones requeridas. Las probetas de piel de cerdo usadas para realizar las uniones adhesivas que se ensayaron a cizalla simple tenían unas dimensiones de 60 x 30 mm, mientras que las usadas para los ensayos de tensión tenían unas dimensiones de 30 x 30 mm.
- 10 Para dotarlas de un grado de humedad controlado y homogéneo, las probetas de piel de cerdo fueron sumergidas en 60 ml de suero salino fisiológico (Fleboplast, Grifols, Barcelona, España) a 37 °C durante 60 minutos. Transcurridos 10 segundos desde que las probetas se sacaron de la solución de suero salino fisiológico, su superficie se secó con papel de filtro durante otros 10 segundos, dejándose estabilizar al aire durante 30
- 15 segundos más. A continuación, se aplicaron 0,05 ml de adhesivo y/o sellante de ECN sin y con dendrones FFG3K sobre una de las probetas de piel de cerdo a unir (10 mm para las uniones que se ensayaron a cizalla simple y 30 mm para las uniones que se ensayaron a tensión), usando la punta de una jeringa para extender el adhesivo por toda la zona a unir, aplicando inmediatamente la otra probeta de piel de cerdo encima y
- 20 presionando manualmente con dos dedos durante 30 segundos. Las uniones adhesivas se dejaron curar durante una hora y entonces se ensayaron en una máquina universal de ensayos Instron 4411 (Instron Ltd., Buckinghamshire, Reino Unido), empleando una velocidad de separación de las mordazas de 5 mm/min para las uniones que se ensayaron a cizalla simple y de 50 mm/min para las uniones que se ensayaron a tensión.
- 25 Se realizaron al menos 10 réplicas de cada unión adhesiva, promediando los resultados obtenidos.

Resultados experimentales

- La figura 5 muestra los espectros IR-ATR de uno de los adhesivos de ECN con dendrones FFG3K tomados a diferentes tiempos desde que se expone a la humedad ambiente. Al aumentar el tiempo se produce la eliminación gradual de las bandas a 1188
- 30 y 1286 cm^{-1} y aparece una nueva banda del polímero pECN a 1246 cm^{-1} . Durante los 5 primeros minutos, el agua no reaccionó con el cianoacrilato, y tras 180 minutos no se completó la polimerización, siendo necesario esperar 48 horas. Por otra parte, las
- 35 bandas típicas de los dendrones no se observan en los espectros IR tras 48 horas de

polimerización indicando su completa integración en la estructura polimérica del policianoacrilato.

La cinética de polimerización de los adhesivos de ECN sin y con dendrones FFG3K se siguió mediante la variación de las áreas relativas de las bandas a 1246 cm⁻¹ y a 1739 cm⁻¹ (relación I_{1246}/I_{1739}) de los espectros IR-ATR en función del tiempo. La figura 6 muestra la variación del grado de curado de los adhesivos en función del tiempo, en la que se observa que la adición de dendrones FFG3K acelera la cinética de polimerización del cianoacrilato de etilo. De hecho, la adición de dendrones acelera la polimerización durante los primeros 10 minutos de polimerización, tanto más cuanto mayor es la cantidad de dendrones adicionada.

Los termogramas DSC del segundo barrido de calentamiento de los adhesivos de ECN sin y con dendrones FFG3K polimerizados se incluyen en la figura 7 y muestran una temperatura de transición vítrea (T_g) y el proceso de descomposición a alta temperatura. Mientras que el valor de la T_g del ECN polimerizado aparece a 153 °C (Tabla 4), los valores de T_g de ECN+dendrones FFG3K polimerizados aparecen a menores valores (121-142 °C), siendo tanto menores cuanto mayor es la cantidad de dendrones adicionada, indicando que la adición de dendrones FFG3K imparte flexibilidad al ECN polimerizado. Por otra parte, la Figura 7 muestra que el ECN polimerizado descompone en un solo paso a 223 °C con una entalpía de descomposición de 579 J/g (Tabla 4), mientras que los ECN+dendrones FFG3K polimerizados presentan dos descomposiciones a 155-175 °C y a 224-230 °C indicando la existencia de dos estructuras diferentes, una a menor temperatura debida a la interacción de los dendrones FFG3K con el ECN polimerizado y otra a mayor temperatura debida a la descomposición de las cadenas polimérica de ECN polimerizado. Además, las entalpías totales de descomposición de los polímeros ECN+dendrones FFG3K polimerizados son bastante menores que las del polímero ECN (Tabla 3), lo que indica una polimerización menos exotérmica. De hecho, la máxima temperatura alcanzada durante la polimerización del adhesivo ECN sin dendrones era de 80 °C, mientras que las de los adhesivos ECN que contenían dendrones FFG3K eran inferiores a 40 °C.

Tabla 3. Temperaturas de transición vítrea (T_g) y temperaturas (T_d) y entalpías (ΔH_d) de descomposición de los adhesivos y/o sellantes de cianoacrilato de etilo sin y con diferentes cantidades de dendrones FFG3K polimerizados. Experimentos de DSC.

Policianoacrilato	Tg (°C)	Td ₁ (°C)	Td ₂ (°C)	ΔHd ₁ (J/g)	ΔHd ₂ (J/g)
ECN	153	--	223	--	579
ECN+1%D	142	155	230	1	534
ECN+3%D	137	175	228	32	420
ECN+5%D	121	159	224	58	415

La figura 8 muestra la variación de la derivada de la pérdida de peso frente a la temperatura para los polímeros de ECN sin y con diferentes cantidades de dendrones FFG3K polimerizados. Las temperaturas y pérdidas de peso de las descomposiciones térmicas de los poliacianoacrilatos de etilo sin y con dendrones FFG3K se incluyen en la Tabla 4. Mientras que el poliacianoacrilato de etilo sin dendrones FFG3K presenta una única descomposición térmica a 198 °C, los policianoacrilatos de etilo con más del 1 % de dendrones FFG3K presentan dos descomposiciones térmicas a 40-121 °C y a 174-184 °C, lo que confirma la presencia de dos estructuras de distinto peso molecular en los mismos; la estructura que descompone a menor temperatura y que es minoritaria corresponde a la reacción de los dendrones con el cianoacrilato de etilo, y la estructura que descompone a mayor temperatura y que es mayoritaria corresponde a la polimerización del cianoacrilato de etilo. Por otra parte, la adición de más del 1 % de dendrones disminuye la temperatura de máxima descomposición térmica del policianoacrilato de etilo, indicando menor grado de reticulación y, por tanto, mayor flexibilidad.

Tabla 4. Valores de temperaturas y pérdidas de peso en las descomposiciones térmicas de los cianoacrilatos de etilo sin y con diferentes cantidades de dendrones FFG3K polimerizados.

Policianoacrilato	Temperatura de descomposición (°C)	Pérdida de peso (%)
ECN	198	100
ECN+1%D	198	100
ECN+3%D	84	9
	184	91
ECN+5%D	40-121	13
	174	87

Finalmente, los valores de adherencia inmediata obtenidos durante la realización de ensayos de cizalla y de tensión de uniones piel de cerdo/adhesivo ECN sin y con dendrones FFG3K/piel de cerdo se incluyen en las Tablas 5a y 5b respectivamente. La adición de 2 % de dendrones FFG3K aumenta notablemente la adhesión a cizalla del adhesivo de cianoacrilato de etilo y, en menor magnitud, la adhesión a tensión.

Tabla 5a. Valores de adherencia inmediata a cizalla (norma ASTM 2255-05) de uniones piel de cerdo/adhesivo ECN sin y con dendrones FFG3K/piel de cerdo realizadas con adhesivos de cianoacrilato de etilo sin y con 2 % de dendrones FFG3K.

Adhesivo y/o sellante	Adhesión a cizalla (kPa) ASTM 2255-05	Fallo de la unión
ECN	92±42	Rotura cohesiva del adhesivo
ECN+2%D	192±73	Rotura cohesiva del adhesivo

Tabla 5b. Valores de adherencia inmediata a tensión (norma ASTM 2458-05) de uniones piel de cerdo/adhesivo ECN sin y con dendrones FFGK3/piel de cerdo realizadas con adhesivos de cianoacrilato de etilo sin y con 2 % de dendrones FFG3K.

Adhesivo y/o sellante	Adhesión a tensión (kPa) ASTM 2458-05	Fallo de la unión
ECN	24±8	Rotura cohesiva del adhesivo
ECN+2%D	62±25	Rotura cohesiva del adhesivo

REIVINDICACIONES

1. Dendrón que comprende:
 - un núcleo formado por un aminoácido o péptido,
 - 5 • al menos dos ramificaciones, cada una formada por aminoácidos unidos entre sí por enlace peptídico y dichas ramificaciones comprenden en sus extremos grupos funcionales nucleófilos seleccionados de la siguiente lista: amino (-NH₂), hidroxilo (-OH), sulfidrilo (-SH) e imidazol y
 - una base o raíz formada por un aminoácido o péptido no reactivo con el
 - 10 cianoacrilato,donde el núcleo está unido covalentemente a cada una de las ramificaciones y a la base o raíz, y donde el dendrón comprende al menos tres generaciones de ramificaciones.

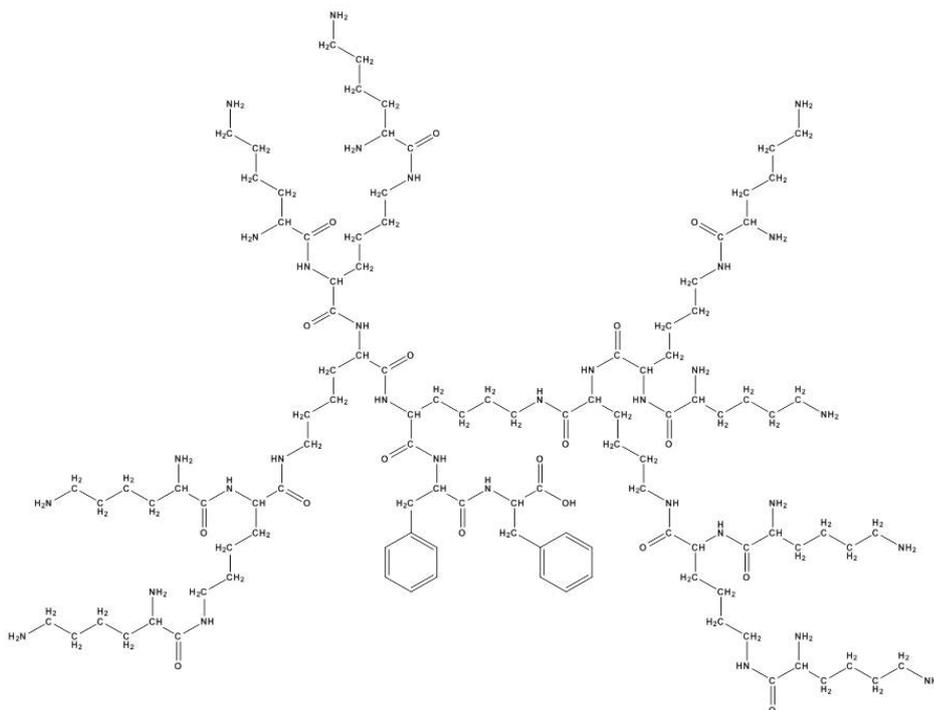
- 15 2. Biomaterial polimérico caracterizado porque comprende el producto de reacción de un cianoacrilato con el dendrón de la reivindicación 1.

3. Biomaterial polimérico según reivindicación 2 donde las ramificaciones están formadas por aminoácidos seleccionados de la siguiente lista: arginina, asparagina, glutamina, histidina, lisina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, 20 treonina, tirosina o combinaciones de ellos.

4. Biomaterial polimérico según reivindicación 2 o 3 donde el núcleo está formado por:
 - 25 - un aminoácido seleccionado de la lista que comprende: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina, o bien por
 - un péptido formado por aminoácidos seleccionados de la lista que comprende:
 - 30 alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano, valina y combinaciones de ellos.

5. Biomaterial polimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 donde la base 35 o raíz está formada por:

- un aminoácido seleccionado de la lista que comprende: fenilalanina, triptófano, metionina, tirosina, histidina, valina e isoleucina, o bien por
 - un péptido formado por aminoácidos seleccionados de la lista que comprende: fenilalanina, triptófano, metionina, tirosina, histidina, valina, isoleucina y combinaciones de ellos.
- 5
6. Biomaterial polimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde el dendrón comprende tres, cuatro o cinco generaciones de ramificaciones.
- 10 7. Biomaterial polimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 donde el cianoacrilato es seleccionado de entre cianoacrilato de metilo, cianoacrilato de etilo, cianoacrilato de n-butilo, cianoacrilato de isobutilo, cianoacrilato de n-hexilo, cianoacrilato de isohexilo, cianoacrilato de n-octilo, o mezclas de los mismos.
- 15 8. Biomaterial polimérico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde el dendrón presenta la siguiente estructura:



- 20 9. Biomaterial polimérico de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en medicina y/o veterinaria.

10. Uso del material descrito en la reivindicación 2 como adhesivo y/o sellante de tejidos.
11. Kit para cerrar o sellar heridas, laceraciones o unir tejidos caracterizado porque
5 comprende al menos:
- un cianoacrilato
- un dendrón como se ha definido en la reivindicación 1.
12. Kit, según reivindicación 11 que comprende una disolución del dendrón en etanol,
10 agua, tampón salino, tampón fisiológico, o mezclas de los mismos.

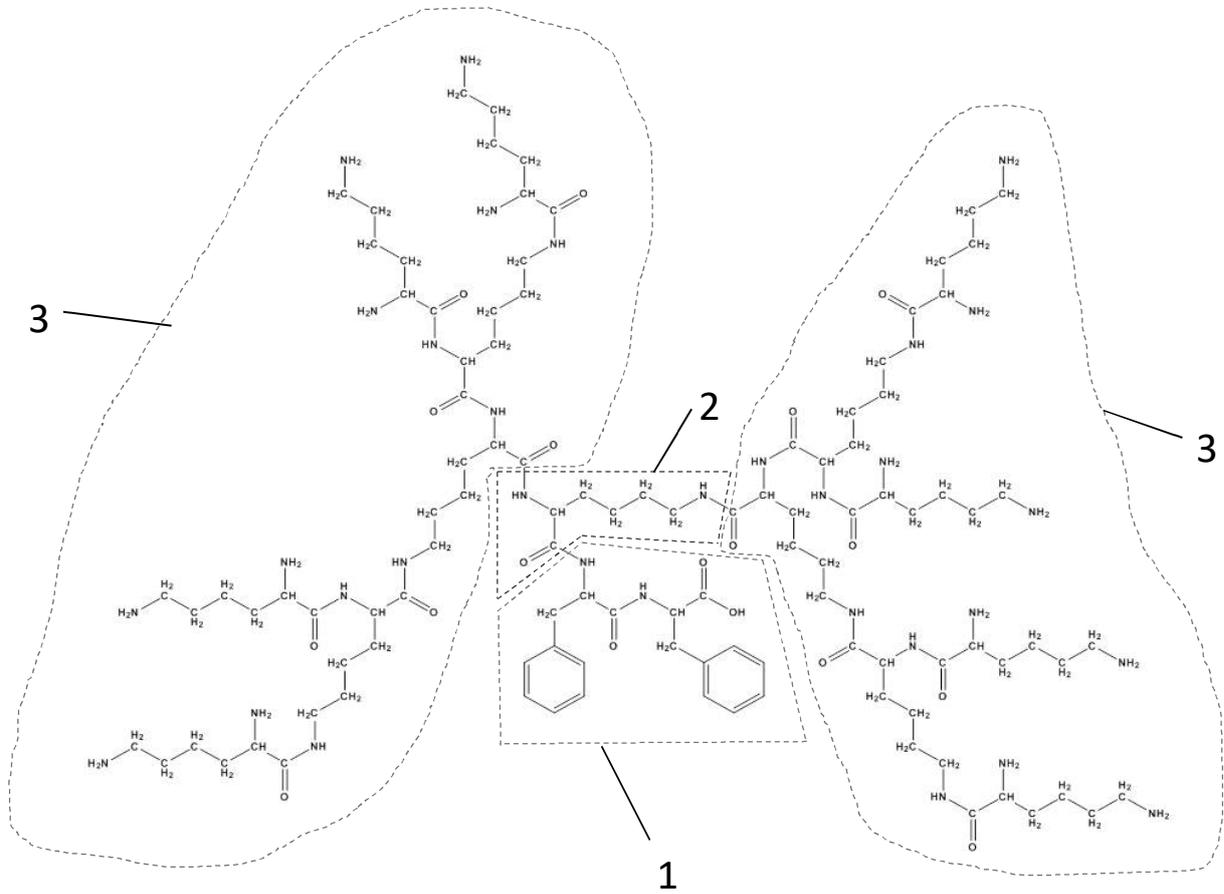


FIG. 1

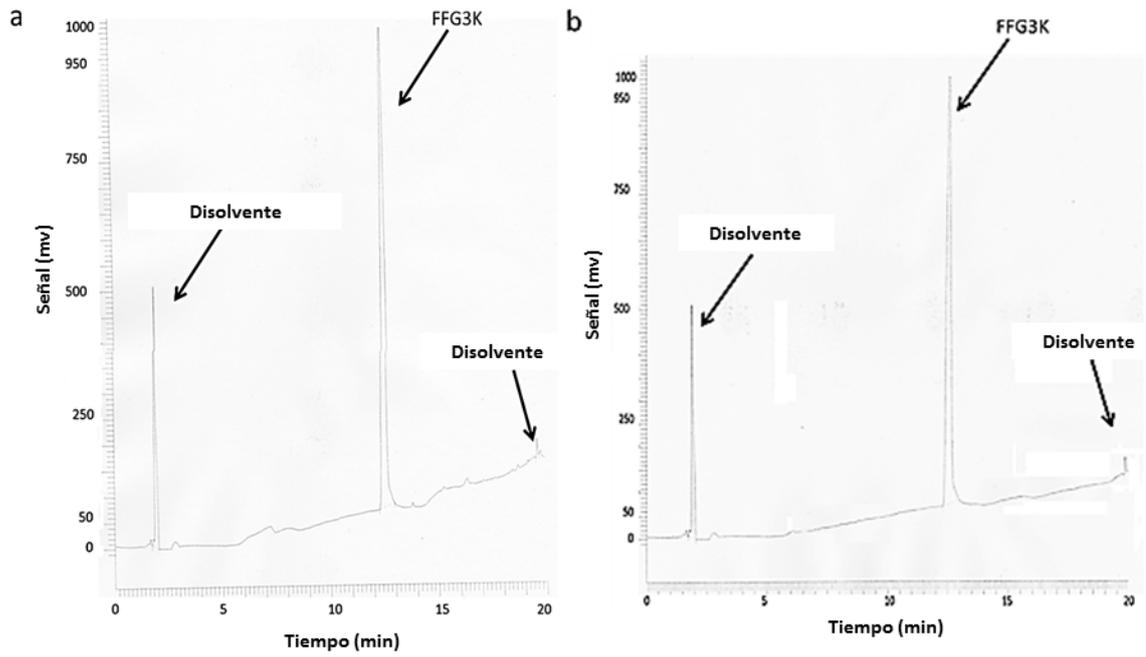


FIG. 2

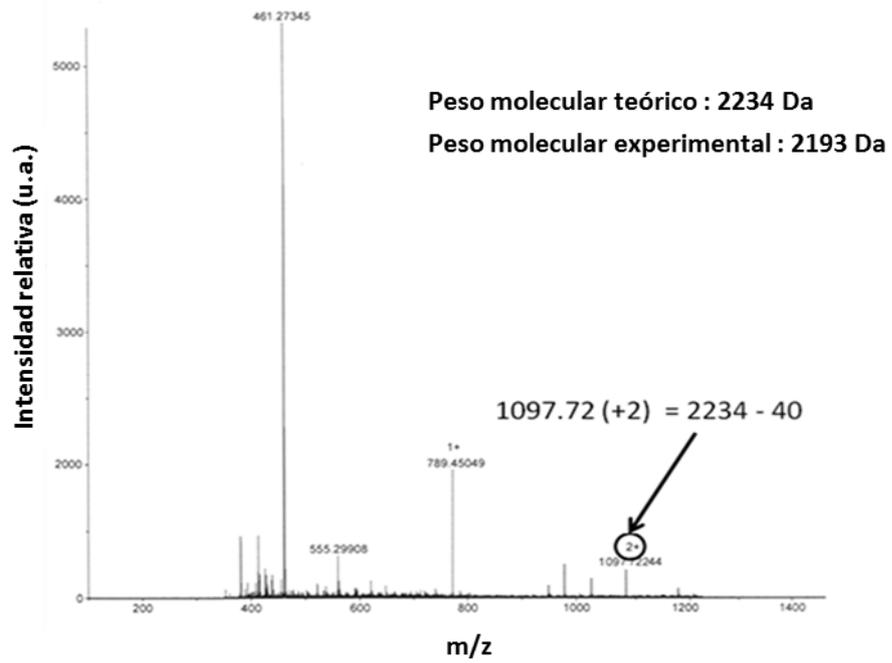


FIG. 3

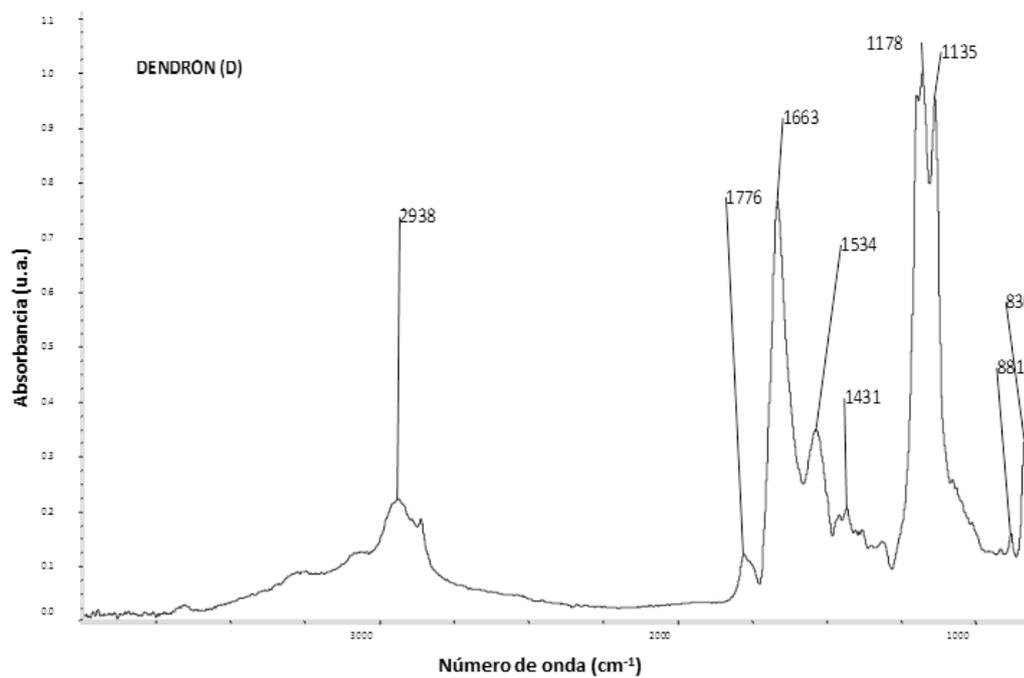


FIG. 4

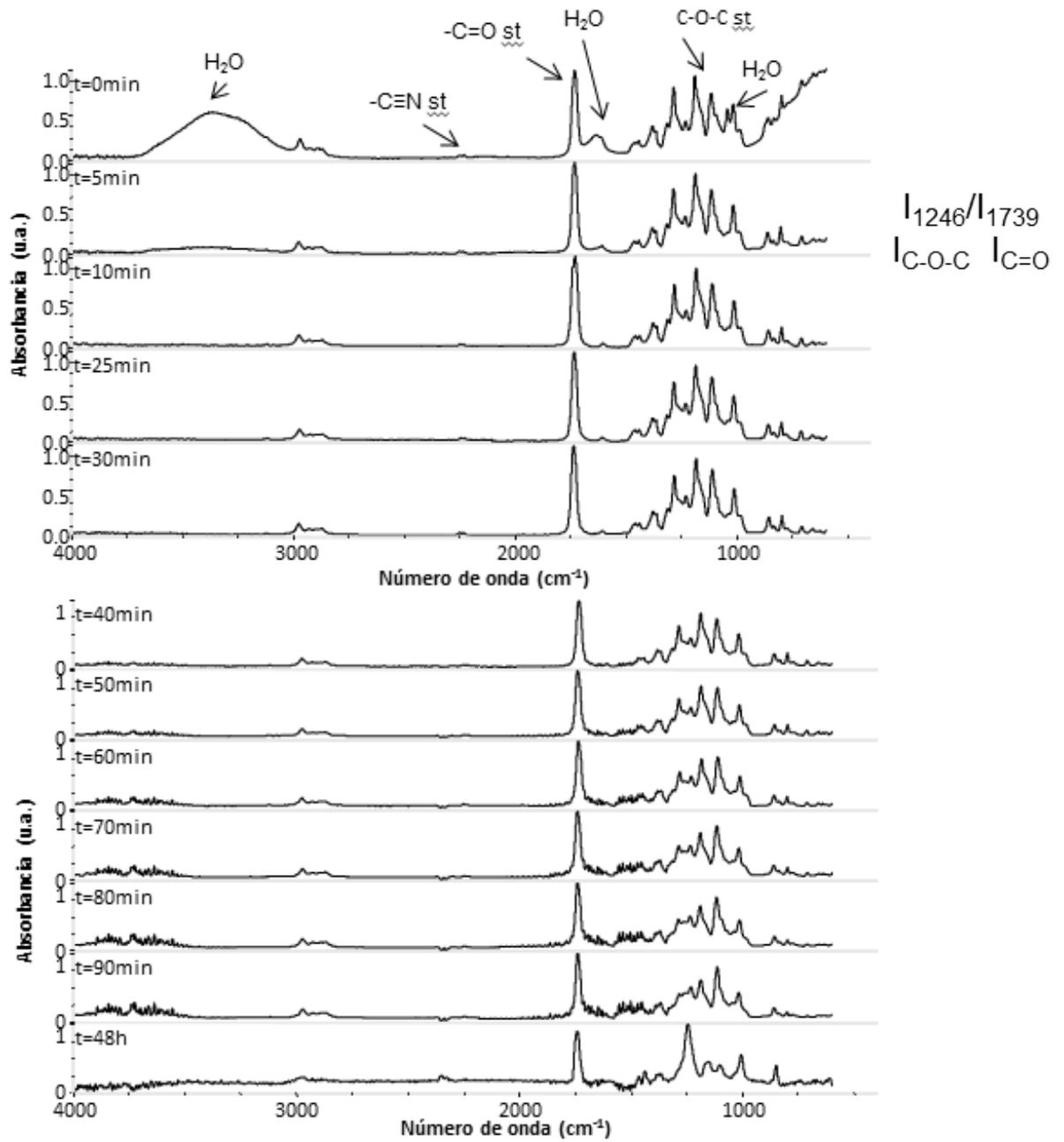


FIG. 5

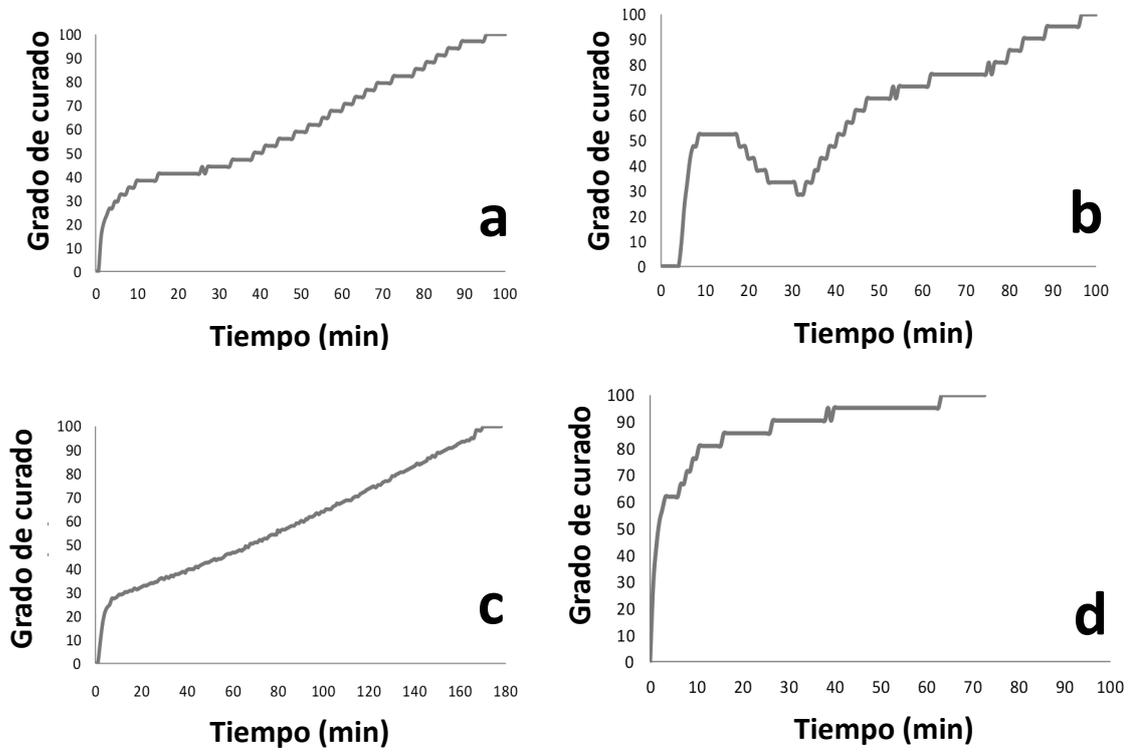


FIG. 6

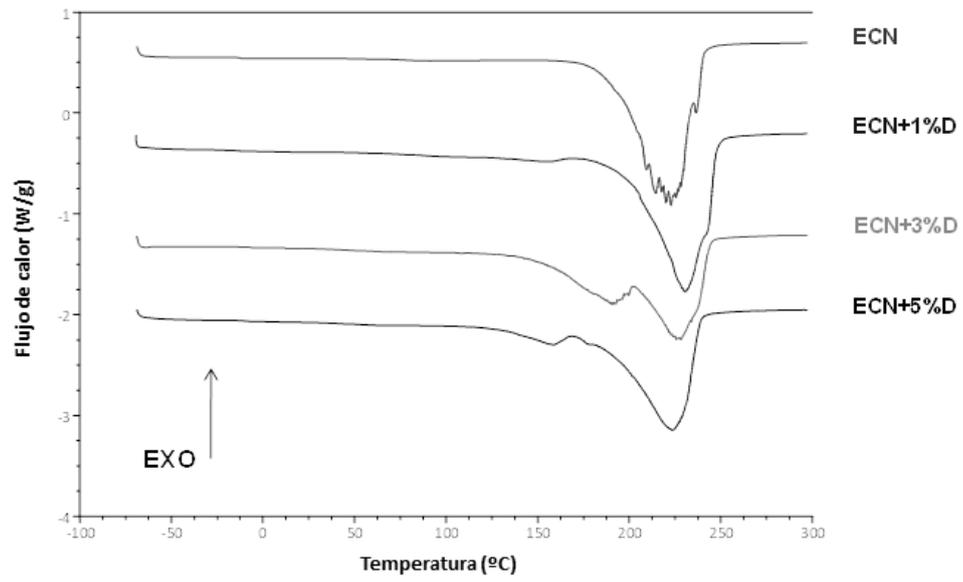


FIG. 7

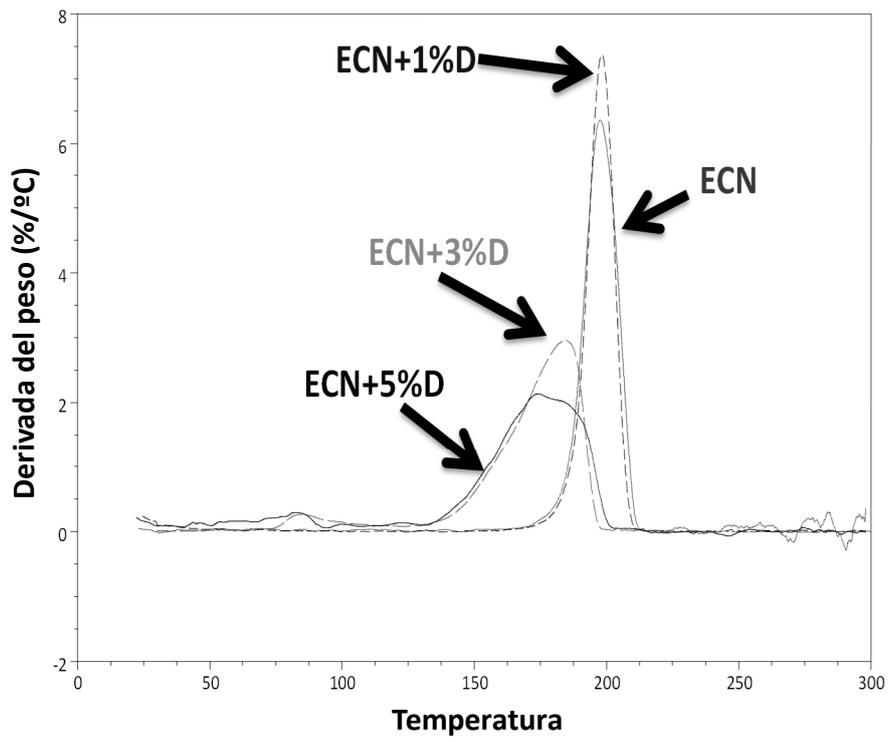


FIG. 8