

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 473**

51 Int. Cl.:

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 17/00 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 31/00 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05812166 .6**

96 Fecha de presentación: **06.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1796746**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **ADHESIVO TISULAR POLIMÉRICO BASADO EN POLISACÁRIDO PARA USO MÉDICO.**

30 Prioridad:
07.10.2004 US 616899 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
Actamax Surgical Materials LLC
2810 7th Street
Berkeley, CA 94710, US

72 Inventor/es:
KODOKIAN, George, K. y
ARTHUR, Samuel, David

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 473 T3

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

DESCRIPCIÓN

Adhesivo tisular polimérico basado en polisacárido para uso médico.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere al campo de los adhesivos médicos. Más específicamente, la invención se refiere a un adhesivo tisular polimérico formado haciendo reaccionar un polisacárido oxidado con una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los adhesivos tisulares tienen muchas aplicaciones médicas potenciales, que incluyen el cierre de heridas tópicas, la complementación o la sustitución de suturas o grapas en procedimientos quirúrgicos internos, la adhesión de capas superficiales o internas sintéticas a la córnea, dispositivos de administración de fármacos, y como barreras anti-adhesión para impedir las adhesiones post-quirúrgicas. Los adhesivos tisulares convencionales no son adecuados en general para una amplia diversidad de aplicaciones adhesivas. Por ejemplo, se han usado los adhesivos basados en cianoacrilato para el cierre de heridas tópicas, pero la liberación de productos de degradación tóxicos limita su uso para las aplicaciones internas. Los adhesivos basados en fibrina son de endurecimiento lento, tienen escasa fuerza mecánica, y plantean el riesgo de infección viral. Además, los adhesivos basados en fibrina no se unen de manera covalente al tejido subyacente.

15 Se han desarrollado varios tipos de adhesivos tisulares de hidrogel, que tienen propiedades adhesivas y cohesivas mejoradas y son atóxicos. Estos hidrogeles se forman en general haciendo reaccionar un componente que tiene grupos nucleófilos con un componente que tiene grupos electrófilos, que son capaces de reaccionar con los grupos nucleófilos del primer componente, para formar una red reticulada a través de la formación de uniones covalentes. Sin embargo, estos hidrogeles generalmente se hinchan o se disuelven demasiado rápido, o carecen de una adhesión o fuerza mecánica suficiente, por lo que disminuye su eficacia como adhesivos quirúrgicos.

20 Sehl et al. describe ejemplos de adhesivos tisulares de hidrogel en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0119985. Los adhesivos se forman haciendo reaccionar un polímero hidrófilo, tal como colágeno, con un componente reticulable que tiene grupos nucleófilos y un componente reticulable que tiene grupos electrófilos. Los componentes reticulables incluyen diversas formas activadas de polietileno glicol. Goldmann et al. en el documento WO 03/035122 describe un adhesivo tisular de hidrogel formado haciendo reaccionar quitosano o un poli(alcohol vinílico) modificado que alberga grupos amino con un polisacárido oxidado, tal como dextrano oxidado. Ninguna de estas descripciones describe un adhesivo polimérico formado haciendo reaccionar un polisacárido oxidado con una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua.

25 Otros materiales relevantes se describen en los documentos US-A-5275838 y WO 01/49268.

Por lo tanto, el problema a resolver es proporcionar un material adhesivo tisular con características mejoradas para el uso en procedimientos quirúrgicos, así como en otras aplicaciones médicas.

35 Los solicitantes han abordado el problema indicado mediante el descubrimiento de un adhesivo tisular polimérico formado haciendo reaccionar un polisacárido oxidado con una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua, en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario. El adhesivo resultante tiene propiedades de adhesión y cohesión mejoradas, se reticula fácilmente a la temperatura corporal, mantiene inicialmente la estabilidad dimensional, no se degrada rápidamente, es atóxico para las células y no es inflamatorio para el tejido.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

40 La invención proporciona un equipo que comprende:

a) una primera disolución acuosa que comprende un polisacárido oxidado que contiene grupos aldehído, que tiene un peso molecular de 1.000 a 1.000.000 Daltons, y dicho polisacárido oxidado tiene un peso equivalente por grupo aldehído de 90 a 1500 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 40% en peso del polisacárido oxidado; y

45 b) una segunda disolución acuosa que comprende una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario, en la que la amina de poliéter de múltiples brazos tiene un peso molecular de 450 a 200.000 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 70% en peso de la amina de poliéter de múltiples brazos.

50 En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende el producto de reacción de: a) una primera disolución acuosa que comprende un polisacárido oxidado que contiene grupos aldehído, que tiene un peso molecular de 1.000 a 1.000.000 Daltons, y dicho polisacárido oxidado tiene un peso equivalente por grupo aldehído de 90 a 1500 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 40% en peso del polisacárido oxidado; y

b) una segunda disolución acuosa que comprende una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario, en la que la amina de poliéter de múltiples brazos tiene un peso molecular de 450 a 200.000 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 70% en peso de la amina de poliéter de múltiples brazos.

- 5 También se proporcionan métodos para el uso del adhesivo tisular polimérico de la invención para el cierre de heridas tópicas, anastomosis intestinales y vasculares, aplicación de sellos en incisiones corneales, prevención de adhesiones, administración de fármacos, y tratamiento de la incontinencia urinaria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La invención se refiere a un adhesivo polimérico formado haciendo reaccionar un polisacárido oxidado con una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua, en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario. El adhesivo polimérico de la invención es útil como adhesivo para aplicaciones médicas y veterinarias que incluyen, pero sin limitación, el cierre de heridas tópicas y procedimientos quirúrgicos, tales como anastomosis intestinal, anastomosis vascular, reparación tisular, y procedimientos oftálmicos. Además, el adhesivo polimérico puede tener utilidad en la administración de fármacos, aplicaciones anti-adhesivas, y como agente de relleno para tratar la incontinencia urinaria.

15 Se usan las siguientes definiciones en la presente memoria, y se debería hacer referencia a ellas para la interpretación de las reivindicaciones y de la memoria descriptiva.

La expresión "polisacárido oxidado" se refiere a un polisacárido que se ha hecho reaccionar con un agente oxidante para introducir grupos aldehído en la molécula.

20 La expresión "peso equivalente por grupo aldehído" se refiere al peso molecular del polisacárido oxidado dividido por el número de grupos aldehído introducidos en la molécula.

25 La expresión "amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua" se refiere a un poliéter ramificado, en el que al menos tres de las ramas ("brazos") terminan en un grupo amino primario, que es soluble en agua o que es capaz de dispersarse en agua para formar una suspensión coloidal capaz de reaccionar con un segundo reactivo en disolución acuosa.

La expresión "poliéter dendrítico" se refiere a un poliéter muy ramificado que tiene una estructura arborescente.

La expresión "poliéter en forma de peine" se refiere a un poliéter que tiene una cadena principal con múltiples puntos de ramificación trifuncionales a partir de los cuales surge un brazo lineal.

30 La expresión "poliéter en forma de estrella" se refiere a un poliéter que tiene un único punto de ramificación a partir del cual surgen brazos lineales.

La expresión "peso molecular", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al peso molecular medio en peso.

La expresión "% en peso", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al porcentaje de peso respecto del peso total de la disolución, a menos que se especifique de otra manera.

35 La expresión "localización anatómica" se refiere a cualquier parte externa o interna del organismo de seres humanos o animales.

El término "tejido" se refiere a cualquier tejido, tanto vivo como muerto, en seres humanos o animales.

El término "hidrogel" se refiere a una matriz polimérica hinchable en agua, que consiste en una red tridimensional de macromoléculas mantenidas unidas mediante reticulación covalente o no covalente, que puede absorber una cantidad sustancial de agua para formar un gel elástico.

40 La invención proporciona un adhesivo tisular formado haciendo reaccionar un polisacárido oxidado con una amina de poliéter de múltiples brazos, en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario. La reacción forma un hidrogel, que tiene muchas características deseables como adhesivo tisular, que incluyen, pero sin limitación, propiedades de adhesión y cohesión mejoradas, se reticula fácilmente a temperatura corporal, mantiene la estabilidad dimensional inicialmente, no se degrada rápidamente, es atóxico para las células y no es inflamatorio para el tejido.

Polisacáridos Oxidados:

50 Los polisacáridos útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, dextrano, quitina, almidón, agar, celulosa, y ácido hialurónico. Estos polisacáridos están disponibles comercialmente de fuentes tales como Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). En una realización, el polisacárido es dextrano. Los polisacáridos adecuados tienen un peso molecular de alrededor de 1.000 a alrededor de 1.000.000 Daltons, y además de alrededor de 3.000 a alrededor de 250.000 Daltons.

El polisacárido se oxida para introducir grupos aldehído mediante el uso de cualquier agente oxidante adecuado, que incluye, pero sin limitación, peryodatos, hipocloritos, ozono, peróxidos, hidroperóxidos, persulfatos, y percarbonatos. En una realización, el polisacárido se oxida mediante reacción con peryodato sódico, por ejemplo como describió Mo et al. (*J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 11:341-351, 2000). El polisacárido se hace reaccionar con diferentes cantidades de peryodato para proporcionar los polisacáridos con diferentes grados de oxidación y, por lo tanto, diferentes cantidades de grupos aldehído, como se describe con detalle más adelante en la Sección de Métodos Generales de los Ejemplos. El contenido de aldehído del polisacárido oxidado se puede determinar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el contenido de aldehído del polisacárido oxidado se puede determinar mediante el uso del método descrito por Hofreiter et al. (*Anal Chem.* 27:1930-1931, 1955), como se describe con detalle más adelante en la Sección de Métodos Generales de los Ejemplos. En ese método, se determina la cantidad de álcali consumido por mol de aldehído en el polisacárido oxidado, en condiciones de reacción específicas, mediante una volumetría ácido-base. En una realización, el peso equivalente por grupo aldehído del polisacárido oxidado es de 90 a 1500 Daltons.

En la invención, el polisacárido oxidado se usa en forma de una disolución acuosa. El polisacárido oxidado se añade a agua para proporcionar una concentración de un 6% a un 40% en peso, y además de un 15% a un 30% en peso respecto del peso total de la disolución. La concentración óptima a usar depende de la aplicación y de la concentración de la amina de poliéter de múltiples brazos usada, como se describe más adelante, y un experto en la técnica puede determinarla fácilmente mediante el uso de experimentación rutinaria.

Para el uso en tejido vivo, se prefiere que la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado esté esterilizada para prevenir infecciones. Se puede usar cualquier método de esterilización adecuado conocido en la técnica que no degrade el polisacárido, lo que incluye la irradiación con haz de electrones, irradiación gamma, esterilización con óxido de etileno, o ultrafiltración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,2 µm.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado puede comprender además diversos aditivos dependiendo de la aplicación deseada. Preferiblemente, el aditivo es compatible con el polisacárido oxidado. De manera específica, el aditivo no contiene grupos amino primarios o secundarios que podrían interferir con la gelificación eficaz del hidrogel. La cantidad usada de aditivo depende de la aplicación particular, y un experto en la técnica puede determinarla fácilmente mediante el uso de experimentación rutinaria. Por ejemplo, la disolución puede incluir opcionalmente al menos un modificador del pH para ajustar el pH de la disolución. Se conocen bien en la técnica los modificadores del pH adecuados. El modificador del pH puede ser un compuesto ácido o básico. Los ejemplos de modificadores del pH ácidos incluyen, pero sin limitación, los ácidos carboxílicos, ácidos inorgánicos, y ácidos sulfónicos. Los ejemplos de modificadores del pH básicos incluyen los hidróxidos, alcóxidos, compuestos que contienen nitrógeno distintos de las aminas primarias y secundarias, y carbonatos y fosfatos básicos.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado puede incluir opcionalmente al menos un espesante. El espesante se puede seleccionar de los modificadores de la viscosidad conocidos que incluyen, pero sin limitación, polisacáridos y derivados de los mismos, tales como almidón o hidroxietil celulosa.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado puede incluir opcionalmente al menos un agente antimicrobiano. Los conservantes antimicrobianos adecuados son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos de agentes antimicrobianos adecuados incluyen alquil parabenos, tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, y butilparabeno; triclosán; clorhexidina; cresol; clorocresol; hidroquinona; benzoato sódico; y benzoato potásico. En una realización, el agente antimicrobiano es triclosán.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado puede incluir opcionalmente además al menos un colorante para mejorar la visibilidad de la disolución. Los colorantes adecuados incluyen tintes, pigmentos, y agentes colorantes naturales. Los ejemplos de colorantes adecuados incluyen los colorantes FD&C y D&C, tales como FD&C Violeta nº 2, D&C Verde nº 6, D&C Verde nº 5, D&C Violeta nº 2, FD&C Amarillo nº 6, FD&C Rojo nº 3; y colorantes naturales, tales como rojo remolacha, cantaxantina, clorofila, eosina, azafrán, y carmín. En una realización, el colorante es FD&C Violeta nº 2, D&C Verde nº 6, D&C Verde nº 5, o D&C Violeta nº 2.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado puede incluir opcionalmente al menos un tensoactivo. Tensoactivo, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que disminuye la tensión superficial del agua. El tensoactivo puede ser un tensoactivo iónico, tal como lauril sulfato sódico, o un tensoactivo neutro, tal como éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, y polioxietilén sorbitán.

Además, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado puede incluir opcionalmente agentes anti-inflamatorios, tales como indometacina, acetato de ácido salicílico, ibuprofeno, sulindaco, piroxicam, y naproxeno; agentes trombogénicos, tales como trombina, fibrinógeno, homocisteína, y estramustina; y compuestos radio-opacos, tales como sulfato de bario y partículas de oro.

Aminas de Poliéter de Múltiples Brazos:

Las aminas de poliéter de múltiples brazos son poliéteres dispersables en agua que tienen la unidad repetitiva [-O-R]-, en la que R es un grupo hidrocarbilo que tiene de 2 a 5 átomos de carbono. La expresión "grupo hidrocarbilo" se refiere a un grupo divalente formado mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno, procedente cada

uno de dos átomos de carbono diferentes, de un hidrocarburo. Las aminas de poliéter de múltiples brazos de la invención incluyen poliéteres dendríticos, en forma de peine, y en forma de estrella en los que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario. Las aminas de poliéter de múltiples brazos tienen un peso molecular de alrededor de 450 a alrededor de 200.000 Daltons, y además de 2.000 a 40.000 Daltons. Los ejemplos adecuados de aminas de poliéter de múltiples brazos dispersables en agua incluyen poli(óxidos de etileno) en forma de estrella, dendríticos, o en forma de peine terminados en amina; poli(óxidos de propileno) en forma de estrella, dendríticos, o en forma de peine terminados en amina; copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) en forma de estrella, dendríticos, o en forma de peine terminados en amina; poliamidoaminas dendríticas terminadas en amina, vendidas con el nombre comercial Starburst® Dendrimers (disponibles de Sigma-Aldrich, St Louis, MO); y triaminas de polioxialquileño, vendidas con el nombre comercial de triaminas Jeffamine®, de Huntsman LLC (Houston, TX). Los ejemplos de aminas de poli(óxido de etileno) en forma de estrella incluyen, pero sin limitación, diversas aminas de polietilén glicol de múltiples brazos disponibles de Nektar Transforming Therapeutics (Huntsville, AL), y polietilén glicoles en forma de estrella que tienen 3, 4, o 8 brazos terminados en aminas primarias (denominados en la presente memoria aminas de PEG en forma de estrella de 3, 4 ó 8 brazos, respectivamente). La amina de PEG en forma de estrella de 8 brazos está disponible de Nektar Transforming Therapeutics. Los ejemplos de triaminas Jeffamine® adecuadas incluyen Jeffamine® T-403 (n° CAS 39423-51-3), Jeffamine® T-3000 (n° CAS 64852-22-8), y Jeffamine® T-5000 (n° CAS 64852-22-8). En una realización, la amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua es un polietilén glicol de ocho brazos que tiene ocho brazos terminados en un grupo amino primario y que tiene un peso molecular de 10.000 Daltons (disponible de Nektar Transforming Therapeutics).

Estas aminas de poliéter de múltiples brazos están disponibles comercialmente, como se indicó anteriormente, o se pueden preparar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polietilén glicoles de múltiples brazos, en los que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario, se pueden preparar colocando extremos amino en los polietilén glicoles de múltiples brazos (p.ej., polietilén glicoles de 3, 4 y 8 brazos, disponibles de Nektar Transforming Therapeutics) mediante el uso del método descrito por Buckmann et al. (*Makromol. Chem.* 182:1379-1384, 1981). En ese método, el polietilén glicol de múltiples brazos se hace reaccionar con bromuro de tionilo para convertir los grupos hidroxilo en bromos, que después se convierten en aminas mediante reacción con amoníaco a 100 °C. El método es aplicable en general a la preparación de otras aminas de poliéter de múltiples brazos. Merrill et al. describe otros métodos que se pueden usar para preparar aminas de poliéter de múltiples brazos en la patente de EE.UU. n° 5.830.986, al igual que Chang et al. en el documento WO 97/30103.

Se debería reconocer que las aminas de poliéter de múltiples brazos son en general una mezcla heterogénea que tiene una distribución de especies con diferentes números de brazos. No obstante, existirá una especie predominante que tiene un número específico de brazos. Por ejemplo, la amina de PEG en forma de estrella de 8 brazos comprende una mezcla de aminas de PEG en forma de estrella de múltiples brazos, y algunas tienen menos de 8 brazos, y algunas tienen más de 8 brazos, pero la especie predominante es la amina de PEG en forma de estrella de 8 brazos.

Un factor a considerar cuando se selecciona la amina de poliéter de múltiples brazos óptima a usar para una aplicación dada es la velocidad de degradación deseada para el hidrogel resultante. Se descubrió que la velocidad de degradación del hidrogel depende del número de brazos de la amina de poliéter de múltiples brazos usada para preparar el hidrogel. De manera específica, la velocidad de degradación del hidrogel disminuye a medida que se incrementa el número de brazos de la amina de poliéter de múltiples brazos. Por lo tanto, para las aplicaciones en las que se desea una velocidad de degradación rápida, se debería elegir una amina de poliéter de múltiples brazos que tenga 3 ó 4 brazos, mientras en las aplicaciones que requieren una velocidad de degradación lenta, se debería elegir una amina de poliéter de múltiples brazos que tenga 6, 8 o más brazos.

En la invención, se usa la amina de poliéter de múltiples brazos en forma de una disolución acuosa. La amina de poliéter de múltiples brazos se añade a agua para proporcionar una concentración de un 5% a un 70% en peso, además de un 20% a un 50% en peso respecto del peso total de la disolución. La concentración óptima a usar depende de la aplicación y de la concentración usada del polisacárido oxidado. En una realización, las concentraciones del polisacárido oxidado y de la amina de poliéter de múltiples brazos se ajustan de manera que los grupos aldehído del polisacárido oxidado están en un exceso estequiométrico respecto de los grupos amino de la amina de poliéter de múltiples brazos. En una realización, en la que se usa una amina de PEG en forma de estrella de 8 brazos como la amina de poliéter de múltiples brazos, la cantidad de grupos aldehído es de 1,1 veces a 50 veces la cantidad de grupos amino, además de 3 veces a 15 veces la cantidad de grupos amino. En otra realización en la que se usa una triamina Jeffamine® como la amina de poliéter de múltiples brazos, la cantidad de grupos aldehído es de 0,5 veces a 3 veces la cantidad de grupos amino.

Para el uso en tejido vivo, se prefiere que la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos esté esterilizada para prevenir infecciones. Se puede usar cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la esterilización de la disolución de polisacárido oxidado.

La disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos puede comprender además diversos aditivos. Se puede usar cualquiera de los aditivos descritos anteriormente para la disolución de polisacárido oxidado. Además, la disolución puede comprender un promotor de la cicatrización, tal como quitosano.

Además, la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos puede comprender opcionalmente al menos otra amina multi-funcional que tiene uno o más grupos amino primarios para proporcionar otras propiedades beneficiosas, tales como hidrofobicidad. La amina multi-funcional puede ser una segunda amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua, tal como las descritas anteriormente, u otro tipo de amina multi-funcional, lo que incluye, pero sin limitación, las diaminas lineales y ramificadas, tales como diaminoalcanos, poliaminoalcanos, y espermina; poliaminas ramificadas, tales como polietilenimina; diaminas cíclicas, tales como N, N'-bis(3-aminopropil)piperazina, 5-amino-1,3,3-trimetilciclohexanometilamina, 1,3-bis(aminometil)ciclohexano, 1,4-diaminociclohexano, y p-xililendiamina; aminoalquiltrialcoxisilanos, tales como 3-aminopropiltrimetoxisilano y 3-aminopropiltriethoxisilano; aminoalquildialcoxialquilsilanos, tales como 3-aminopropildietoximetilsilano, dihidrazidas, tales como dihidrazida de ácido adípico; diaminas poliméricas lineales, tales como polietilenimina lineal, poliéteres α,ω -amino-terminados, α,ω -bis(3-aminopropil)polibutanodiol, poliéteres β,ω -1-amino-terminados (Jeffamines[®] lineales); poliaminas en forma de peine, tales como quitosano, polialilamina, y polilisisina, y di- y polihidrazidas, tales como bis(carboxihidrazido)poliéteres y poli(carboxihidrazido)poliéteres en forma de estrella. Muchos de estos compuestos están disponibles comercialmente de empresas tales como Sigma-Aldrich y Huntsman LLC. En general, si está presente, la amina multi-funcional se usa a una concentración de alrededor de un 5% en peso a alrededor de un 1000 % en peso respecto del peso de la amina de poliéter de múltiples brazos de la disolución acuosa.

En otra realización, la amina multi-funcional se proporciona en una disolución distinta a una concentración de un 5% en peso a un 100% en peso respecto del peso total de la disolución. Si la amina multi-funcional no se usa pura (es decir, al 100% en peso), se usa en forma de una disolución acuosa. Para el uso en el tejido vivo, se prefiere que la disolución que comprende la amina multi-funcional esté esterilizada. Se puede usar cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la esterilización de las disoluciones de polisacárido oxidado. La disolución acuosa que comprende la amina multi-funcional puede comprender además diversos aditivos. Se puede usar cualquiera de los aditivos descritos anteriormente para la disolución de polisacárido oxidado o la disolución de amina de poliéter de múltiples brazos.

En una realización, la invención proporciona un equipo que comprende una disolución acuosa que comprende un polisacárido oxidado y una disolución acuosa que comprende una amina de poliéter de múltiples brazos. Cada una de las disoluciones acuosas puede estar contenida en un recipiente adecuado, tal como un vial o un cilindro de jeringa.

En otra realización, la invención proporciona un equipo que comprende una disolución acuosa que comprende un polisacárido oxidado, una disolución acuosa que comprende una amina de poliéter de múltiples brazos, y una tercera disolución que comprende una amina multi-funcional, tal como se describió anteriormente. Cada una de las disoluciones puede estar contenida en un recipiente adecuado, tal como un vial o un cilindro de jeringa.

Método de Aplicación:

La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se pueden aplicar en una localización anatómica en el tejido de un organismo vivo de varias maneras. Una vez que ambas disoluciones se aplican en una localización, se reticulan para formar un hidrogel, un proceso denominado endurecimiento en la presente memoria, generalmente en 2 segundos a 2 minutos. Debido a que los grupos aldehído del polisacárido oxidado también se pueden unir de manera covalente a los grupos amino del tejido, el adhesivo tisular de la invención es capaz de unirse de manera covalente al tejido, por lo que se incrementa su fuerza adhesiva.

En una realización, las dos disoluciones acuosas se aplican en la localización de manera secuencial mediante el uso de cualquier medio adecuado que incluye, pero sin limitación, la pulverización, la aplicación con una torunda de algodón o pincel, o la extrusión mediante el uso de una pipeta, o una jeringa. Las disoluciones se pueden aplicar en cualquier orden. Después, las disoluciones se mezclan en la localización mediante el uso de un dispositivo adecuado, tal como una torunda de algodón, una espátula, o una punta de piqueta o jeringa.

En otra realización, las dos disoluciones acuosas se mezclan manualmente antes de la aplicación en la localización. La mezcla resultante se aplica después en la localización antes de que se endurezca completamente mediante el uso de un aplicador adecuado, como se describió anteriormente.

En otra realización, las dos disoluciones acuosas están contenidas en una jeringa de doble cilindro. De esta manera, las dos disoluciones se aplican de manera simultánea en la localización con la jeringa. Se conocen en la técnica aplicadores de jeringa de doble cilindro adecuados. Por ejemplo, RedI describe varios aplicadores adecuados para el uso en la invención en la patente de EE.UU. n° 6.620.125, (en particular las Figuras 1, 5, y 6, que se describen en la Columna 4, línea 10 a la columna 6, línea 47). Además, la jeringa de doble cilindro puede contener un mezclador inmóvil, tal como el disponible de ConProtec, Inc. (Salem, NH), en la punta para llevar a cabo la mezcla de las dos disoluciones acuosas antes de la aplicación.

En otra realización en la que se usa la tercera disolución opcional que comprende una amina multi-funcional, las tres disoluciones se aplican en la localización anatómica en cualquier orden mediante el uso de cualquiera de los méto-

dos descritos anteriormente. En esta realización, la jeringa de doble cilindro se puede modificar para que tenga tres cilindros, uno para cada una de las disoluciones.

En otra realización, el adhesivo tisular de la invención se usa para unir al menos dos localizaciones anatómicas. En esta realización, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado se aplica al menos en una localización anatómica, y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se aplica al menos en una de la misma localización o de otra localización. Las dos o más localizaciones se ponen en contacto y se mantienen unidas manualmente o mediante el uso de otros medios, tales como una pinza quirúrgica, durante un tiempo suficiente para que la mezcla se endurezca, generalmente de 2 segundos a 2 minutos. De manera alternativa, se aplica una mezcla de las dos disoluciones acuosas premezcladas manualmente o mediante el uso de un aplicador de jeringa de doble cilindro, al menos en una de las localizaciones anatómicas a unir. Las dos o más localizaciones se ponen en contacto y se mantienen unidas manualmente o mediante el uso de otros medios, tales como una pinza quirúrgica, durante un tiempo suficiente para que la mezcla se endurezca.

En otra realización en la que se usa la tercera disolución opcional que comprende una amina multi-funcional junto con la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos para unir al menos dos localizaciones anatómicas, cada una de las tres disoluciones se aplica al menos en una localización anatómica en cualquier orden. Las disoluciones se pueden aplicar en la misma localización o en localizaciones diferentes. De manera alternativa, las tres disoluciones se premezclan mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos anteriormente, y la mezcla resultante se aplica al menos en una de las localizaciones anatómicas a unir antes de que la mezcla se endurezca completamente. Las dos o más localizaciones se ponen en contacto después y se mantienen unidas manualmente o mediante el uso de otros medios, tales como una pinza quirúrgica, durante un tiempo suficiente para que la mezcla se endurezca.

Aplicaciones Médicas y Veterinarias:

El adhesivo tisular de la invención tiene muchas aplicaciones médicas y veterinarias potenciales, que incluyen el cierre de heridas tópicas, procedimientos quirúrgicos, tales como anastomosis intestinal, anastomosis vascular, y procedimientos oftálmicos; administración de fármacos, aplicaciones anti-adhesivas, y como agente de relleno para tratar la incontinencia urinaria. Para estos usos, se describen más adelante procedimientos que implican la aplicación de dos disoluciones acuosas, una que comprende el polisacárido oxidado y la otra que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos. También se puede usar para este fin la aplicación de tres disoluciones, en la que la tercera disolución comprende una amina multi-funcional adicional, mediante el uso de los procedimientos descritos anteriormente.

El adhesivo tisular de la invención se puede usar para el tratamiento de heridas tópicas, cortes leves, arañazos, irritaciones, abrasiones, laceraciones, quemaduras, llagas, y heridas quirúrgicas. Para el cierre de heridas tópicas, se aplica la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos en la herida mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, y la mezcla se deja endurecer.

El adhesivo tisular de la invención se puede usar también en procedimientos quirúrgicos, anastomosis intestinal, anastomosis vascular, y procedimientos oftálmicos, tales como la aplicación de sellos en incisiones corneales por cataratas.

La anastomosis intestinal es un procedimiento quirúrgico muy conocido para los cirujanos expertos. El procedimiento, que implica unir dos segmentos del intestino después de una resección, fue descrito por Sweeney et al. (*Surgery* 131:185-189, 2002). Los dos segmentos del intestino se unen mediante el uso de suturas o grapas. Un problema que se presenta con este procedimiento son las fugas alrededor de las suturas o de las grapas. Se ha informado de tasas de fuga del 5-8% (Bruce et al. *Br. J. Surg.* 88:1157-1168, 2001). Se puede usar el adhesivo tisular de la invención para complementar las suturas o las grapas usadas en las anastomosis intestinales, por lo que se proporciona un sello mejor que reduce las fugas. En esta aplicación, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se aplican en el intestino alrededor de las suturas o de las grapas, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, y la mezcla se deja endurecer.

Además, el adhesivo tisular de la invención se puede usar en procedimientos de anastomosis vascular. Este procedimiento es similar a la anastomosis intestinal, descrita anteriormente, y se usa para los injertos vasculares. Los dos segmentos del vaso sanguíneo se unen mediante el uso de suturas o grapas. El adhesivo tisular de la invención se puede usar para complementar las suturas o las grapas, por lo que se proporciona un sello mejor que reduce las fugas. En esta aplicación, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se aplican al vaso sanguíneo alrededor de las suturas o de las grapas, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, y la mezcla se deja endurecer.

Las incisiones en la córnea clara temporal y las incisiones del túnel escleral se usan durante la cirugía de cataratas. Estos procedimientos son bien conocidos para el cirujano experto en cataratas. Aunque estas incisiones se pueden sellar con suturas, muchos cirujanos prefieren las incisiones sin suturas, que se auto-sellan. Sin embargo, surgen

problemas por las fugas a través de las incisiones sin suturas, que provocan endoftalmitis (Sarayba et al. *Amer. J. Ophthalmol.* 138:206-210, 2004, y Kim et al. *J. Cataract Refract. Surg.* 21:320-325, 1995). El adhesivo tisular de la invención se puede usar para sellar tanto las incisiones de la córnea clara como las incisiones del túnel escleral para impedir las fugas. En esta aplicación, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se aplican en la localización de la incisión en el ojo, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, y la mezcla se deja endurecer. Además, las dos disoluciones acuosas se pueden revestir a los lados de la hoja del bisturí usado para realizar la incisión, una disolución a cada lado de la hoja, para aplicarlas en la localización cuando la localización está lista para el cierre.

El adhesivo tisular de la invención se puede usar también para impedir las adhesiones entre localizaciones anatómicas adyacentes tras cirugía o lesión de órganos internos. La disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se aplican en una localización anatómica mediante el uso de los métodos descritos anteriormente. Se impide que la primera localización entre en contacto con cualquier localización adyacente manualmente o mediante el uso de otros medios, tales como una pinza quirúrgica, hasta que la mezcla se endurezca, generalmente de alrededor de 2 segundos a alrededor de 2 minutos. Después del endurecimiento, el hidrogel ya no es adhesivo, y sirve como barrera que impide las adhesiones de las localizaciones adyacentes.

El adhesivo tisular de la invención se puede usar también para la administración de fármacos en una localización anatómica seleccionada. En esta aplicación, al menos una de las disoluciones acuosas comprende además un fármaco o un agente terapéutico. Los fármacos y los agentes terapéuticos adecuados se conocen bien en la técnica. Kabonov et al. proporciona una lista exhaustiva en la patente de EE.UU. n° 6.696.089, (en particular, columnas 16 a 18). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos, agentes anti-cáncer, vacunas, radiomarcadores, anti-inflamatorios, agentes anti-glaucoma, anestésicos locales, agentes anti-neoplásicos, anticuerpos, hormonas, y similares. En esta aplicación, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos, al menos una de las cuales comprende además el fármaco o el agente terapéutico de interés, se aplican en la localización anatómica deseada mediante el uso de los métodos descritos anteriormente. Tras endurecerse el hidrogel, el fármaco o el agente terapéutico se libera en la localización anatómica deseada. La velocidad de liberación depende de la densidad de reticulación del hidrogel, que se puede controlar mediante el grado de reticulación, que a su vez está determinado por las concentraciones del polisacárido oxidado y del poliéter polifuncional usado, así como los niveles relativos de grupos funcionales presentes en estos reactivos respectivos. La concentración de los reactivos necesarios para obtener la velocidad adecuada de liberación del fármaco para cualquier aplicación particular puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica mediante el uso de experimentación rutinaria.

El adhesivo tisular de la invención se puede usar también como agente de relleno para tratar la incontinencia urinaria, en particular, la incontinencia urinaria femenina de esfuerzo. La incontinencia urinaria de esfuerzo es la pérdida de orina desde la vejiga provocada por la presión que se da durante el ejercicio, la tos, el estornudo, etc. Una causa de este problema es el debilitamiento del esfínter uretral, un músculo en forma de anillo en la base de la vejiga que controla el flujo de orina. Un remedio para esta afección es usar un agente de relleno para proporcionar soporte físico al esfínter uretral. En esta aplicación, la disolución acuosa que comprende el polisacárido oxidado y la disolución acuosa que comprende la amina de poliéter de múltiples brazos se aplican en el tejido que rodea el esfínter, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, y preferiblemente se inyecta una mezcla de las dos disoluciones acuosas mediante el uso de un citoscopio estándar. La mezcla se endurece hasta un hidrogel firme pero flexible. El volumen incrementado en la localización de la inyección proporciona a los músculos del esfínter una capacidad adicional para controlar el flujo de orina.

Además, el adhesivo tisular de la invención puede ser útil para otras aplicaciones médicas. Estas aplicaciones incluyen un adhesivo para mantener un implante en su lugar, un adhesivo usado sobre el tejido para bloquear el aire, la humedad, el fluido o la migración microbiana, y un adhesivo para sustituir o complementar las suturas o las grapas en otros procedimientos quirúrgicos, tales como colecistectomía, conexión de ostomía, apendicectomía, bariatría, cirugía de desprendimiento de retina, cierre de cesárea, histerectomía abdominal, y el cierre de punciones traumáticas, y de roturas de membranas.

EJEMPLOS

La presente invención se define, adicionalmente, en los siguientes Ejemplos. Se debería entender que estos Ejemplos, aunque indican las realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración únicamente. A partir de la discusión anterior y de estos Ejemplos, el experto en la técnica puede adivinar las características esenciales de esta invención, y puede introducir diversos cambios y modificaciones con el fin de adaptarlo a diferentes usos y condiciones.

El significado de las abreviaturas usadas es el siguiente: "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "seg" significa segundo(s), "d" significa día(s), "mL" significa mililitro(s), "L" significa litro(s), "µL" significa microlitro(s), "cm" significa centímetro(s), "mm" significa milímetro(s), "µm" significa micrometro(s), "mol" significa mol(es), "mmol" significa milimol(es), "g" significa gramo(s), "mg" significa miligramo(s), "meq" significa miliequivalente(s), "p. eq." significa peso equivalente, "PM" significa peso molecular, "M" significa concentración molar, "%p" significa porcentaje en peso,

"PEG" significa polietilén glicol, "Dex" significa dextrano oxidado, "Vol" significa volumen, "na" significa no aplicable, "nd" significa no determinado, "Ox" significa oxidación, "rpm" significa revoluciones por minuto, y "kGy" significa kilogray.

Métodos Generales:

5 **Reactivos:**

Se adquirió dextrano (PM = 10.000) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). La amina de PEG de 8 brazos (PM = 10.000) que tenía ocho brazos terminados en un grupo amino primario se adquirió de Nektar Transforming Therapeutic (Huntsville, AL). Jeffamine T3000 y Jeffamine T403 se obtuvieron de Huntsman LLC. (Houston, TX). Se adquirió peryodato sódico (pureza del 99%, n° CAS 7790-28-5) de Acros Organics (Morris Plains, NJ). Los demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, a menos que se indique de otra manera.

Preparación de Dextrano Oxidado:

Se usó el siguiente procedimiento para preparar un dextrano oxidado con una conversión del contenido de aldehídos de aproximadamente un 48% a partir de dextrano que tenía un peso molecular de 10.000 Daltons. Se usaron procedimientos similares para dextranos que tenían pesos moleculares de 40.000, 60.000, y 250.000 Daltons. Se obtuvieron otras conversiones de aldehídos variando la concentración de la disolución de peryodato utilizada, como se indica más adelante.

Se añadió dextrano (18,9 g) a 170,1 g de agua destilada (para proporcionar una disolución acuosa al 10 %p) en un matraz de fondo redondo de 500 mL. La disolución se agitó durante 15 a 30 min. Después, se añadieron 17,6 g de NaIO₄ en 158,4 g de agua destilada (disolución acuosa al 10 %p) a la disolución de dextrano. La concentración de la disolución de peryodato se puede variar dependiendo de la conversión de aldehídos deseada. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Después de este tiempo, la disolución se eliminó del matraz de fondo redondo, se dividió en cuatro volúmenes iguales y se dispersó en 4 tubos con membrana de diálisis (tubos de diálisis MEMBRA-CEL™, umbral de peso molecular de 3500 Daltons, obtenido de Viskase Companies, Inc., Willowbrook, IL). Para el dextrano que tenía un peso molecular de 40.000, 60.000, y 250.000 Daltons, se usó un tubo de membrana de diálisis de 14.000 Daltons (Viskase Companies, Inc.). Los tubos de diálisis se insertaron en un matraz de 5 L que contenía 4,5 L de agua destilada y se dializaron durante hasta 4 días. Durante esta diálisis, el agua destilada se cambió después de 2 días. Las muestras se extrajeron de los tubos de membrana de diálisis y se colocaron en un recipiente de liofilizador. Las muestras se congelaron mediante el uso de nitrógeno líquido y se colocaron en un liofilizador durante 24 a 48 h o hasta que todo el agua se evaporó.

Se determinó el contenido de dialdehído en el dextrano oxidado resultante mediante el siguiente procedimiento. Se añadió el dextrano oxidado (0,1250 g) a 10 mL de NaOH 0,25 M en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. La mezcla se agitó lentamente y después se colocó en un baño sonicador de temperatura controlada a 40°C durante 5 min hasta que se disolvió todo el material, lo que proporcionó una disolución de color amarillo oscuro. La muestra se eliminó del baño y se enfrió inmediatamente con agua fría de grifo durante 5 min. Después, se añadieron 15,00 mL de HCl 0,25 M a la disolución, seguido de la adición de 50 mL de agua destilada y 1 mL de una disolución de fenoltaleína al 0,2%. Esta disolución se tituló con NaOH 0,25 M mediante el uso de una bureta de 50 mL y se determinó el punto final mediante el cambio de color de amarillo a púrpura/violeta.

El contenido de dialdehído, también denominado conversión de oxidación en la presente memoria, en la muestra de dextrano oxidado se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de dialdehído} = \frac{(V_b - V_a)_s}{W_s/M} - \frac{(V_b - V_a)_p}{W_p/M} \times 100(\%)$$

40

V_b = meq totales de base

V_a = meq totales de ácido

W = peso de la muestra seca (mg)

M = peso molecular de la unidad repetitiva = 162

45 S = la muestra oxidada

P = la muestra original

Ejemplos 1-16Ensayo de Ruptura In Vitro de una Incisión de Bisturí Sellada

El propósito de estos Ejemplos fue demostrar la fuerza de ruptura de un sello hecho con diversos adhesivos tisulares de una incisión hecha en el intestino delgado de un cerdo.

- 5 En estos Ejemplos, se usó un sistema de bomba de jeringa para medir la fuerza de ruptura de un sello de una incisión hecha en una sección de intestino delgado de un cerdo. La bomba de jeringa (modelo n° 22, Harvard Apparatus, Holliston, MA) se modificó para equiparla con dos jeringas de 30 mL, que se conectaron entre sí por medio de una unión de tipo "Y". Se bombeó agua a través de un único trozo de tubo Tygon® R-36 (0,6 cm de diámetro) y a través de un manómetro (Modelo PDG 5000L, Omega Engineering, Stamford, CT).
- 10 Una sección de aproximadamente 12,5 cm de intestino de cerdo limpio, obtenido de un matadero local, se ajustó en un extremo con un tapón metálico con un tubo de alimentación que se ajustaba a la alimentación de agua de la bomba de jeringa, y en el otro extremo con un tapón metálico con un orificio roscado que se podía sellar con un tornillo mecánico. Los tapones se mantuvieron en su lugar con lazos de nailon alrededor del exterior del intestino. Se realizó una incisión a través de la pared del intestino hacia el interior perforando con un mango 5 de hoja quirúrgica Bard Parker™ (obtenido de BD Surgical Products, Franklin Lakes, NJ), equipado con una hoja quirúrgica n° 15. La incisión en el exterior del intestino fue mayor que la hoja de bisturí (en general 4-5 mm), mientras el orificio a través de la pared interna fue de alrededor de 3 mm (aproximadamente igual a la hoja). Este tamaño de incisión imita la distancia entre las suturas discontinuas si se fuera a cortar un intestino y a suturarlo más tarde. El intestino se rellena con agua que contenía un tinte púrpura por medio de la bomba de jeringa hasta que el agua comenzó a filtrarse por el agujero abierto en el tapón del extremo, y también por la punción del bisturí en la pared del intestino. Después se apagó la bomba y el tapón del extremo se selló con el tornillo mecánico. La localización de la incisión del bisturí se secó mediante el uso de una toalla de papel.

- 25 Se prepararon las disoluciones de dextrano oxidado y las disoluciones de amina de poliéter de múltiples brazos en agua. Las dos disoluciones se aplicaron en la incisión mediante el uso de uno de dos métodos. En un método, se aplicaron las disoluciones en la localización mediante el uso de una micropipeta (Eppendorf®, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY), y las disoluciones se mezclaron en la superficie mediante el uso de una espátula. Tras la aplicación, se dejó endurecer el adhesivo a temperatura ambiente durante no más de 2 min. En el segundo método de aplicación, dos jeringas de 1 mL se equiparon con un conector de tipo "Y" (obtenido de Micromedics, Inc., St. Paul, MN). Se insertó un mezclador inmóvil de tipo Kenics (obtenido de ConProTec, Inc., Salem, NH) en el extremo del conector de tipo "Y". El diámetro interno del mezclador fue de alrededor de 3 mm, y la longitud fue de 48 mm con 17 etapas de mezcla. Los botones de final de los émbolos de las dos jeringas se hicieron coincidir por medio de una placa de fijación, lo que permitía pulsarlos de manera simultánea, por lo que se depositaba la cantidad deseada del adhesivo con la proporción correcta de las dos disoluciones en la localización de la incisión.

- 35 En estos ejemplos, se usaron dextranos que tenían diferentes pesos moleculares, diferentes conversiones de oxidación, y diferentes concentraciones, tal como se muestra en la Tabla 1. Las aminas de poliéter de múltiples brazos usadas fueron amina de PEG de 8 brazos, Jeffamine T3000, y Jeffamine T403. La amina de PEG de 8 brazos se usó a diferentes concentraciones, y se varió la proporción del volumen de la disolución de dextrano respecto de la disolución de amina, tal como se muestra en la Tabla 1.

- 40 Como comparación, se usó un adhesivo de fibrina comercial (obtenido de Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) para sellar la incisión en el intestino de cerdo, y se midió la presión de ruptura. El adhesivo de fibrina se preparó y se usó según las instrucciones del fabricante.

- 45 El ensayo de la presión de ruptura, también denominado en la presente memoria ensayo de presión de fuga, se llevó a cabo presurizando con agua el intestino sellado desde la bomba de jeringa a un caudal de 11 mL/min hasta que el sello bioadhesivo comenzó a tener fugas, en cuyo momento se registró la presión. Se atribuyó una rotura adhesiva cuando el agua se filtró bajo el sello entre el hidrogel y la superficie del tejido. Se atribuyó una rotura cohesiva cuando el agua penetró y se filtró a través del propio hidrogel. También se llevó a cabo el ensayo de la presión de ruptura en el intestino sin sellar, y la presión de fuga fue < 10 mm de mercurio (Hg). Los resultados del ensayo de ruptura se resumen en la Tabla 1.

- 50 Los resultados de estos Ejemplos indican que a medida que se incrementa la conversión de oxidación del polisacárido, se incrementa la presión de ruptura, y, por lo tanto, se proporciona un sello más fuerte. Sin embargo, con conversiones de oxidación relativamente elevadas (es decir, mayores de alrededor del 60%), el adhesivo se reticula muy rápidamente y no tiene tiempo suficiente para extenderse y reaccionar con el tejido. En general, las presiones de fuga se incrementaron con la concentración creciente del dextrano oxidado entre un 10% y un 30% en peso. Además, se obtuvieron presiones de fuga elevadas mediante el uso de concentraciones de amina de PEG de 8 brazos de un 10 a un 70% en peso. En casi todos estos Ejemplos, la presión de fuga obtenida con los adhesivos tisulares de la invención fue significativamente mayor que la obtenida con el adhesivo de fibrina. Para las presiones de fuga por debajo de 100 mm de mercurio, la rotura fue cohesiva, mientras que para las presiones de fuga por encima de 100 mm de mercurio, las roturas fueron interfaciales (es decir, rotura adhesiva).

Tabla 1**Resultados del Ensayo de Ruptura In Vitro de una Incisión Sellada en Intestino de Cerdo**

| Ejemplo | Dex PM | Dex Ox (%) | Dex P Eq | Dex %p | Amina | Amina %p | Dex Vol (µL) | Amina Vol (µL) | Fuga mm Hg |
|-------------------------|---------|------------|----------|--------|-----------------|----------|--------------|----------------|------------|
| 1 | 10.000 | 20 | 389 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 135 |
| 2 | 10.000 | 46 | 160 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 150 |
| 3 | 10.000 | 46 | 160 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 64 | 8 | 150 |
| 4 | 10.000 | 46 | 160 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 40 | 20 | 135 |
| 5 | 10.000 | 46 | 160 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 20 | 40 | 85 |
| 6 | 10.000 | 46 | 160 | 10 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 85 |
| 7 | 10.000 | 46 | 160 | 20 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 100 |
| 8 | 40.000 | 15 | 525 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 15 |
| 9 | 40.000 | 74 | 95 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 60 |
| 10 | 60.000 | 19 | 410 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 110 |
| 11 | 250.000 | 6 | 1335 | -30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 175 |
| 12 | 10.000 | 46 | 160 | 25 | PEG de 8 brazos | 10 | 30 | 30 | 50 |
| 13 | 10.000 | 46 | 160 | 25 | PEG de 8 brazos | 70 | 30 | 30 | 140 |
| 14 | 10.000 | 46 | 160 | 30 | Jeffamine T3000 | pura | 30 | 30 | 60 |
| 15 | 10.000 | 46 | 160 | 30 | Jeffamine T403 | pura | 40 | 20 | 30 |
| 16 Comparativo, Fibrina | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 15 mm |

Ejemplo 17**Ensayo de Ruptura In Vitro de una Incisión de Bisturí Sellada Mediante el Uso de un Sistema de Dos Aminas**

5 El propósito de este Ejemplo fue demostrar la fuerza de ruptura de un sello, hecho con un adhesivo tisular basado en dos aminas, de una incisión realizada en el intestino delgado de un cerdo.

10 Los procedimientos usados en este Ejemplo son los mismos que los descritos en los Ejemplos 1-16, a excepción de que se usaron dos aminas diferentes para reaccionar con el dextrano oxidado. El dextrano tuvo un peso molecular de 10.000, y la conversión de oxidación fue del 46% (p. eq. de 160). La disolución de dextrano tuvo una concentración del 30 %p. La primera disolución de amina contuvo la amina de PEG de 8 brazos a una concentración del 50 %p, y la segunda disolución de amina fue Jeffamine T403 líquida pura (es decir, del 100 %p). Las disoluciones se

5 aplicaron en la localización mediante el uso de una micropipeta (Eppendorf®) para administrar 40 µL de la disolución de dextrano oxidado, 20 µL de la disolución de amina de PEG de 8 brazos, y 12 µL de la Jeffamine. Las disoluciones se mezclaron en la localización mediante el uso de una espátula. La fuerza de ruptura se determinó como se describió en los Ejemplos 1-16. Se obtuvo una presión de fuga de 125 mm de mercurio. Este resultado demuestra que se formó un adhesivo tisular eficaz haciendo reaccionar el dextrano oxidado con dos aminas de poliéter de múltiples brazos.

Ejemplos 18-23

Ensayo de Ruptura In Vitro de una Incisión de Enterotomía Suturada Sellada en un Intestino de Cerdo

10 El propósito de estos Ejemplos fue demostrar la fuerza de ruptura de una incisión de enterotomía suturada en el intestino delgado de un cerdo que se selló con diversos adhesivos tisulares.

15 Se realizó una incisión con bisturí alrededor de un medio de la circunferencia de una sección de aproximadamente 12,5 cm de intestino delgado reciente y limpio de un cerdo. Esta incisión se cerró después con 2-3 suturas discontinuas mediante el uso de hilo de sutura Vicryl 5-0 (Ethicon Inc., Summerville, NJ). Se usó la técnica de sutura evertida, en la que solamente se unió la capa externa de tejido. El intestino suturado se equipó en un extremo con una boquilla metálica con un tubo de alimentación para el agua de una bomba de jeringa, y se sujetó en el otro extremo con un hemostato. La boquilla se mantuvo en su lugar con un lazo de nailon. La línea de la sutura se secó con una toalla de papel y después se aplicó el adhesivo sobre las suturas mediante el uso de los métodos descritos en los Ejemplos 1-16.

20 Los componentes de los adhesivos tisulares usados en estos Ejemplos fueron una disolución acuosa de dextrano oxidado (PM de 10.000), conversión de oxidación del 46% al 48%, que tenía una concentración del 25 o del 30 %p y una disolución acuosa de amina de PEG de 8 brazos, que tenía una concentración del 20 al 50 %p. Se varió la proporción de los volúmenes de las dos disoluciones usadas, tal como se muestra en la Tabla 2. Se usó el adhesivo de fibrina descrito en los Ejemplos 1-16 como comparación.

25 Se llevaron a cabo los ensayos de presión de ruptura como se describió en los Ejemplos 1-16. También se ensayó el intestino suturado antes de la aplicación del sello, y la presión de fuga fue de 10 mm de mercurio. Los resultados de los ensayos de presión de ruptura se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2

Resultados de los Ensayos de Ruptura In Vitro de una Incisión de Enterotomía Suturada en un Intestino de Cerdo

| Ejemplo | Dex PM | Dex Ox (%) | Dex P Eq | Dex %p | Amina de PEG de 8 brazos %p | Dex Vol (µL) | Amina Vol (µL) | Fuga mm Hg |
|-------------------------|--------|------------|----------|--------|-----------------------------|--------------|----------------|------------|
| 18 | 10,000 | 46 | 160 | 30 | 50 | 40 | 10 | 120 |
| 19 | 10,000 | 46 | 160 | 30 | 50 | 30 | 30 | 110 |
| 20 | 10,000 | 46 | 160 | 30 | 50 | 20 | 40 | 85 |
| 21 | 10,000 | 48 | 167 | 25 | 20 | 50 | 50 | 275 |
| 22 | 10,000 | 48 | 167 | 25 | 25 | 50 | 50 | 200 |
| 23 Comparativo, Fibrina | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 25 |

30 Estos resultados demuestran que se obtuvo un sello eficaz de una incisión de enterotomía suturada en un intestino de cerdo mediante el uso de los adhesivos tisulares de la invención. En general, a medida que se incrementó la proporción de la amina de PEG de 8 brazos respecto del dextrano, el adhesivo resultante se hizo más blando y tuvo peores propiedades mecánicas. En todos estos Ejemplos, la presión de fuga obtenida con los adhesivos tisulares de la invención fue significativamente mayor que la obtenida con el adhesivo de fibrina. Para las presiones de fuga por debajo de los 100 mm de mercurio, la rotura fue cohesiva, mientras que para las presiones de fuga por encima de los 100 mm de mercurio, las roturas fueron interfaciales (es decir, rotura adhesiva).

35

Ejemplos 24-27**Ensayo de Ruptura In Vitro de una Incisión Suturada Sellada en un Intestino de Cerdo**

El propósito de estos Ejemplos fue demostrar la fuerza de ruptura de una incisión suturada en el intestino delgado de un cerdo que se selló con diversos adhesivos tisulares.

5 Se realizó una incisión con bisturí alrededor de la circunferencia completa de una sección de aproximadamente 12,5 cm de intestino delgado limpio de cerdo. Esta incisión se cerró después con suturas discontinuas mediante el uso de hilo de sutura Vicryl 5-0. Se usó la técnica de sutura invertida, en la que solamente se unió la capa interna del músculo. Esta es la técnica preferida usada en los procedimientos de anastomosis intestinal en seres humanos. El intestino suturado se equipó en un extremo con una boquilla metálica con un tubo de alimentación para el agua de una bomba de jeringa, y se sujetó en el otro extremo con un hemostato. La boquilla se mantuvo en su lugar con un lazo de nailon. La línea de la sutura se secó con una toalla de papel y después se aplicó el adhesivo sobre las suturas, como se describió en los Ejemplos 1-16.

15 Los componentes de los adhesivos tisulares usados en estos Ejemplos fueron una disolución acuosa de dextrano oxidado (PM de 10.000), conversión de oxidación del 46%, que tenía concentraciones variables, y una disolución acuosa de amina de PEG de 8 brazos, que tenía concentraciones variables, tal como se muestra en la Tabla 3. Se usó el adhesivo de fibrina descrito en los Ejemplos 1-16 para la comparación.

Se llevaron a cabo los ensayos de presión de ruptura como se describió en los Ejemplos 1-16. También se ensayó el intestino suturado antes de la aplicación del sello, y la presión de fuga fue de 10 mm de mercurio. Los resultados de los ensayos de presión de ruptura se proporcionan en la Tabla 3.

20

Tabla 3**Resultados de los Ensayos de Ruptura In Vitro de una Incisión Suturada en un Intestino de Cerdo**

| Ejemplo | Dex PM | Dex Ox (%) | Dex P Eq | Dex %p | Amina de PEG de 8 brazos %p | Dex Vol (µL) | Amina Vol (µL) | Fuga mm Hg |
|--------------------------|--------|------------|----------|--------|-----------------------------|--------------|----------------|------------|
| 24 | 10,000 | 46 | 160 | 20 | 20 | 250 | 250 | 105 |
| 25 | 10,000 | 46 | 160 | 10 | 50 | 250 | 250 | 105 |
| 26 | 10,000 | 46 | 160 | 30 | 50 | 250 | 250 | 125 |
| 27, Comparativo, Fibrina | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 25 |

Estos resultados demuestran que se obtuvo un sello eficaz de una incisión suturada en un intestino de cerdo mediante el uso de los adhesivos tisulares de la invención. En todos estos Ejemplos, la presión de fuga obtenida para los adhesivos tisulares de la invención fue significativamente mayor que la obtenida con el adhesivo de fibrina. Para las presiones de fuga por debajo de los 100 mm de mercurio, la rotura fue cohesiva, mientras que para las presiones de fuga por encima de los 100 mm de mercurio, las roturas fueron interfaciales (es decir, rotura adhesiva).

25

Ejemplos 28-29**Ensayo de Ruptura In Vitro de una Incisión Sellada en el Ojo**

El propósito de estos Ejemplos fue demostrar la fuerza de ruptura de una incisión sellada en el ojo de un conejo New Zealand.

30 Se realizó una incisión en la córnea clara temporal de 2-3 mm en el ojo de un conejo New Zealand (obtenido de Covance Research Products, Denver, PA) para imitar la incisión realizada para la cirugía de cataratas. Se usó un mango 5 de hoja quirúrgica Bard Parker™ (obtenido de BD Surgical Products, Franklin Lakes, NJ), equipado con una hoja quirúrgica nº 15 para hacer la incisión. La incisión se selló aplicando los componentes del adhesivo tisular en la localización, tal como se describió en los Ejemplos 1-16.

35 Los componentes de los adhesivos tisulares usados en estos Ejemplos fueron una disolución acuosa de dextrano oxidado (PM de 10.000), conversión de oxidación del 46%, que tenía concentraciones variables, y una disolución acuosa de amina de PEG de 8 brazos, que tenía concentraciones variables, tal como se muestra en la Tabla 4.

El ojo se presurizó con agua de una bomba de jeringa a un caudal de 11 mL/min hasta que se detectaron fugas, en cuyo momento se registró la presión. Se atribuyó una rotura adhesiva cuando el agua se filtró bajo el sello entre el

hidrogel y la superficie del tejido. Se atribuyó una rotura cohesiva cuando el agua penetró y se filtró a través del propio hidrogel. Se ensayó el ojo antes de sellar la incisión, y la presión de fuga fue < 15 mm de mercurio. Los resultados de los ensayos de presión de ruptura se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Resultados de los Ensayos de Ruptura In Vitro de una Incisión Sellada en el Ojo

| Ejemplo | Dex PM | Dex Ox (%) | Dex P Eq | Dex %p | Amina de PEG de 8 brazos %p | Dex Vol (µL) | Amina Vol (µL) | Fuga mm Hg |
|---------|--------|------------|----------|--------|-----------------------------|--------------|----------------|------------|
| 28 | 10.000 | 46 | 160 | 25 | 50 | 10 | 10 | 235 |
| 29 | 10.000 | 46 | 160 | 27 | 50 | 5 | 5 | 250 |

- 5 Estos resultados demuestran que se obtuvo un sello eficaz de una incisión en la córnea clara temporal en el ojo mediante el uso de los adhesivos tisulares de la invención. En ambos Ejemplos, la fuga fue a través del adhesivo (es decir, rotura cohesiva).

Ejemplos 30-37

Degradación In Vitro de los Adhesivos Tisulares

- 10 El propósito de estos Ejemplos fue demostrar la estabilidad mecánica de los adhesivos tisulares de la invención in vitro.

Se prepararon muestras de adhesivos tisulares mezclando disoluciones acuosas del dextrano oxidado y de la amina de poliéter de múltiples brazos. Se usó dextrano que tenía un peso molecular de 10.000 en estos Ejemplos. Las concentraciones y los volúmenes de las dos disoluciones acuosas usadas se proporcionan en la Tabla 5.

- 15 Después de endurecerse los adhesivos, las muestras se colocaron en frascos que contenían una disolución tampón fosfato de pH 7,4. Los frascos se colocaron dentro de un equipo agitador con temperatura controlada a 80 rpm y 37°C. Las muestras se monitorizaron en cuanto a la degradación (es decir, la desaparición del material) mediante inspección visual, las propiedades mecánicas, determinadas mediante el uso de un ensayo de plegamiento a 45 grados, y el aumento de peso (medido después de 24 h). El ensayo de plegamiento de 45 grados implicó plegar el adhesivo hasta un ángulo de aproximadamente 45 grados y observar la formación de fisuras. Si no se observó la formación de fisuras, se consideró que el material había superado el ensayo. Los resultados se resumen en la Tabla 5.
- 20

Tabla 5

Resultados de la Degradación In Vitro de los Adhesivos Tisulares

| Ej. | Dex Ox (%) | Dex P Eq | Dex %p | Amina | Amina %p | Dex Vol (µL) | Amina Vol (µL) | Degradación | Plegamiento de 45 grados | Incremento de peso (%) |
|-----|------------|----------|--------|-----------------|----------|--------------|----------------|-------------|--------------------------|------------------------|
| 30 | 20 | 390 | 40 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 24 h | Sí | nd |
| 31 | 46 | 160 | 20 | PEG de 8 brazos | 50 | 10 | 50 | 3 h | Sí | nd |
| 32 | 46 | 160 | 20 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 15 d | Sí | 250 |
| 33 | 46 | 160 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 30 | 30 | 15 d | Sí | 250 |
| 34 | 46 | 160 | 30 | PEG de 8 brazos | 50 | 40 | 20 | 30 d | Sí | 175 |
| 35 | 46 | 167 | 25 | PEG de 8 brazos | 20 | 50 | 50 | > 10 d | Sí | 115 |
| 36 | 46 | 167 | 25 | PEG de 8 brazos | 25 | 50 | 50 | > 10 d | Sí | 115 |
| 37 | 46 | 160 | 30 | Jeffamine T3000 | pura | 30 | 30 | > 30 d | Sí | 2 |

Estos resultados demuestran que los adhesivos tisulares de la invención tienen buenas propiedades mecánicas. La velocidad de degradación se puede controlar variando el grado de oxidación del dextrano, las concentraciones del polisacárido y de la amina de poliéter de múltiples brazos, la proporción de volúmenes de las dos disoluciones acuosas, y la amina de poliéter de múltiples brazos utilizada. Los datos también indican que para reducir el hinchamiento o incrementar las propiedades mecánicas a largo plazo del adhesivo tisular, puede ser beneficiosa una concentración más baja de la amina de PEG de 8 brazos, en especial de un 20 a un 25 %p.

Ejemplos 38-39

Degradación In Vitro de Adhesivos Tisulares Preparados Mediante el Uso de Dos Aminas

El propósito de estos Ejemplos fue demostrar la estabilidad mecánica de los adhesivos tisulares preparados mediante el uso de dos aminas de poliéter de múltiples brazos diferentes in vitro.

Los procedimientos usados en estos Ejemplos fueron los mismos que los descritos en los Ejemplos 30-37. Se usó un dextrano que tenía un peso molecular de 10.000, y una conversión de oxidación del 46% (p. eq. de 160) en estos Ejemplos. La concentración de la disolución acuosa de dextrano fue del 30 %p. La primera disolución de amina contuvo la amina de PEG de 8 brazos a una concentración del 50 %p. La segunda amina fue Jeffamine T3000 o Jeffamine T403, que se usaron puras, como se indica en la Tabla 6. Los volúmenes de las tres disoluciones y los resultados también se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6

Resultados de la Degradación In Vitro de los Adhesivos Tisulares Preparados Mediante el Uso de Dos Aminas

| Ejemplo | Dex Vol (µL) | Amina 1 Vol (µL) | Amina 2 | Amina 2 Vol (µL) | Degradación | Plegamiento de 45 grados | Incremento de peso (%) |
|---------|--------------|------------------|-----------------|------------------|-------------|--------------------------|------------------------|
| 38 | 40 | 20 | Jeffamine T3000 | 4 | 25 d | Sí | 180 |
| 39 | 40 | 12 | Jeffamine T403 | 10 | 12 d | No | 150 |

Estos resultados demuestran que los adhesivos tisulares de la invención preparados mediante el uso de dos aminas de múltiples brazos diferentes tienen buenas propiedades mecánicas.

Ejemplo 40

Esterilización de los Componentes de los Adhesivos Tisulares y de los Dispositivos de Administración

El propósito de este Ejemplo fue demostrar la esterilización de la disolución acuosa que comprende dextrano oxidado, la disolución acuosa que comprende la amina de PEG de 8 brazos, y los componentes de un dispositivo de administración.

Se esterilizaron disoluciones acuosas (20-30 %p) de dextrano oxidado y disoluciones acuosas (20-50 %p) de amina de PEG de 8 brazos mediante irradiación gamma con un flujo de 25 kGy ($2,5 \times 10^6$ rad). Las disoluciones estaban contenidas en viales de vidrio durante la irradiación. Las disoluciones pueden estar contenidas también en jeringas desechables selladas durante la irradiación.

Los conectores de tipo "Y" del dispositivo de administración (descritos en los Ejemplos 1-16), usados para conectar las dos jeringas de 1 mL, se esterilizaron también mediante irradiación gamma con un flujo de 25 kGy ($2,5 \times 10^6$ rad).

Las puntas de mezcla inmóviles del dispositivo de administración se irradiaron con un flujo de 25 kGy ($2,5 \times 10^6$ rad). No obstante, las puntas se volvieron de color "amarillento" y se rompieron debido a la falta de plasticidad, incluso bajo una fuerza mínima. Las puntas de mezcla se esterilizaron mediante autoclave a 120°C durante 15 min sin ningún efecto perjudicial.

Se ensayó la gelificación de las disoluciones acuosas esterilizadas, y se ensayó la degradación mecánica y la presión de fuga en los geles resultantes, mediante el uso de los métodos descritos en los Ejemplos previos. Se descubrió que las disoluciones esterilizadas eran muy similares a las disoluciones sin esterilizar. Estos resultados demuestran la facilidad de esterilización de las disoluciones acuosas y del dispositivo de administración.

Ejemplo 41Ensayo de Biocompatibilidad In Vitro

El propósito de este Ejemplo fue demostrar la seguridad de las disoluciones acuosas que comprenden el dextrano oxidado y la amina de PEG de 8 brazos, y el hidrogel de dextrano-PEG que resulta de su reacción en un ensayo in vitro.

El ensayo se llevó a cabo mediante el uso de cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO-K1) según ISO10993-5:1999. Las células de ovario de hámster chino (CHO-K1) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, y se cultivaron en medio F12-K complementado con un 10% de suero bovino fetal.

El cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO-K1) se expuso a disoluciones acuosas (al 5, 10, 15, 20, 25, 27 y 30 %p) de dextrano oxidado (PM = 10.000, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160). Las células CHO-K1 se sembraron en una placa de cultivo a 55.000 células por pocillo y se incubaron con 1 mL de medio de cultivo durante 24 h. Después, se añadieron 100 µL de una disolución de dextrano oxidado.

De manera similar, se expuso a un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO-K1) a disoluciones acuosas (al 10, 20, 30,40, 50, 60 y 70 %p) de una amina de PEG de 8 brazos (PM = 10.000, p. eq. = 1250). Las células CHO-K1 se sembraron en una placa de cultivo a 55.000 células por pocillo y se incubaron con 1 mL de medio de cultivo durante 24 h. Después, se añadieron 100 µL de la disolución de amina de PEG de 8 brazos.

Además, se expuso a los cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO-K1) a extractos acuosos de hidrogeles hechos combinando disoluciones acuosas (al 10, 15, 20, 25, 27 y 30 %p) de dextrano oxidado (PM = 10.000, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160) con una disolución acuosa de amina de PEG de 8 brazos (PM = 10.000, 50 %p, p. eq. = 1250). Los extractos líquidos de los hidrogeles se obtuvieron incubando el hidrogel con medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) a 37 °C durante 24 h. Los extractos se esterilizaron mediante ultrafiltración y después se diluyeron en serie con DMEM. Las células CHO-K1 se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos a 55.000 células por pocillo y se incubaron con medio de cultivo durante 24 h. Después, se extrajo el DMEM, y se añadieron 100 µL de extracto de hidrogel a cada pocillo. La citotoxicidad se determinó mediante el uso del ensayo colorimétrico basado en tetrazolio (MTT), tal como se describe más adelante, después de 24 h de la exposición del extracto.

La citotoxicidad se determinó mediante el uso del ensayo colorimétrico basado en tetrazolio (MTT), tal como escribió Sgouras et al. (*Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1:61-68, 1990) y un ensayo de bioluminiscencia de ATP (Toxilight), tal como describió Crouch et al. (*Journal of Immunological Methods*)

Ejemplo 42Ensayo de Biocompatibilidad In Vitro

El propósito de este Ejemplo fue demostrar la seguridad del hidrogel de dextrano-PEG en un ensayo in vitro mediante el uso de cultivos celulares de fibroblastos humanos NIH3T3. -

El ensayo se realizó mediante el uso de cultivos celulares de fibroblastos humanos NIH3T3 según ISO10993-5:1999. Los fibroblastos humanos NIH3T3 se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con un 10% de suero bovino fetal.

Se expuso a un cultivo celular de fibroblastos humanos NIH3T3 a hidrogeles hechos combinando disoluciones acuosas (al 10, 15, 20, 25, 27 y 30 %p) de dextrano oxidado (PM = 10.000, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160) con una disolución acuosa de la amina de PEG de 8 brazos (PM = 10.000, 50 %p, p. eq. = 1250). El hidrogel se revistió en el fondo de un pocillo de una placa de cultivo de poliestireno de forma que se cubrió alrededor de ¼ del fondo del pocillo. Después se esterilizó el pocillo bajo luz UV y se sembraron 50.000-100.000 células NIH3T3. Las células crecieron normalmente de manera confluyente y revistieron el fondo del pocillo, creciendo hasta los bordes del hidrogel; no obstante, no crecieron hasta rebasar el hidrogel. Este resultado demuestra la ausencia de citotoxicidad del hidrogel, así como la ausencia de adhesión de los cultivos celulares al hidrogel.

Ejemplo 43Ensayo de Biocompatibilidad In Vitro

El propósito de este Ejemplo fue demostrar la respuesta no inflamatoria producida por el hidrogel de dextrano-PEG en un ensayo in vitro mediante el uso de macrófagos J774.

El ensayo se realizó mediante el uso de cultivos de macrófagos J774 según ISO10993-5:1999. Los macrófagos J774 se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal.

Se expuso a un cultivo de macrófagos peritoneales J774 de ratón a un hidrogel hecho combinando disoluciones acuosas (al 10, 15, 20, 25, 27 y 30 %p) de dextrano oxidado (PM = 10.000, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160) con una disolución acuosa de la amina de PEG de 8 brazos (PM = 10.000, 50 %p, p. eq. = 1250). El hidrogel se revistió en el fondo de un pocillo de una placa de cultivo de poliestireno de forma que se cubrió alrededor de ¼ del fondo del pocillo. El pocillo se esterilizó después bajo luz UV y se sembraron las células J774. Después se analizó en el cultivo celular el TNF- α , un indicador de la respuesta inflamatoria, mediante el uso de un ensayo ELISA, como describió Lara et al. (*Journal of Dental Research* 82(6):460-465, 2003). El título de TNF- α fue similar al del control negativo (un pocillo con blanco), lo que indica la naturaleza no inflamatoria de los hidrogeles.

Ejemplo 44

Ensayo de Biocompatibilidad In Vivo

Se demostró adicionalmente la seguridad de los hidrogeles de dextrano-PEG "pintando" un parche de hidrogel sobre el intestino delgado de conejos vivos. Los animales se cerraron y se alimentaron normalmente y se sacrificaron 3 días más tarde. Se examinaron los tejidos intestinales y los tejidos adyacentes debajo y alrededor del parche de adhesivo de hidrogel en busca de edema, eritema, toxicidad, inflamación, degradación del hidrogel, adhesión a la pared intestinal y ausencia de crecimiento del tejido adherido.

Cinco conejos New Zealand blancos (1 año de edad, aproximadamente 4 kg de peso) se sometieron a ayuno durante la noche. Antes de la cirugía, se trató a los animales con buprenorfina, y después se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina. Se llevó a cabo un procedimiento de laparotomía estándar para aislar una sección de duodeno del intestino delgado. Se colocó el único punto de sutura "marcador" de material de sutura de polipropileno teñido de azul (Prolene[®], Ethicon) en el duodeno en la capa externa de tejido intestinal a una distancia de alrededor de 10 cm en posición distal respecto del estómago. Esto se realizó para ayudar a localizar el parche de hidrogel en la necropsia. Se aplicó un parche de hidrogel de alrededor de 1 cm x 2 cm en el duodeno a una distancia de alrededor de 12 cm en posición distal respecto del estómago de la siguiente manera. Mediante el uso de una micropipeta (Eppendorf[®]) se pintaron alrededor de 100 μ L de una disolución de dextrano oxidado (30 %p, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160) sobre el duodeno, seguido por la aplicación de 100 μ L de una disolución de amina de PEG de 8 brazos (50 %p, p. eq. = 1250). La mezcla se agitó energicamente en la localización con una espátula fina durante 2-5 seg o hasta que la mezcla comenzó a adquirir una viscosidad perceptible. En 15 seg el parche ya no era pegajoso. El parche se dejó endurecer durante 2 min y después se cerró el peritoneo y el abdomen por capas mediante el uso de un procedimiento quirúrgico habitual. La superficie del intestino se cubrió aproximadamente en un 90% a su alrededor, dejando el mesenterio sin cubrir.

En la necropsia 3 días más tarde, se examinó la localización de la aplicación del adhesivo en busca de respuestas tisulares observables y de la presencia del adhesivo. Se determinó la gravedad del eritema y del edema mediante el uso de un sistema de puntuación que es coherente con el ensayo de reactividad intracutánea ISO (ISO 10993-12). El examen reveló una buena adhesión del adhesivo de hidrogel en todos los casos y no reveló una inflamación observable. No hubo adhesiones fibrosas o unión al tejido adyacente. Hubo un hinchamiento del hidrogel, pero no un deterioro del revestimiento polimérico. En todos los casos, el peristaltismo intestinal se pudo mover fácilmente más allá de la localización del adhesivo. Tras el examen macroscópico, se extirpó el tejido y se fijó en formalina al 4% para el análisis histopatológico. Las muestras de tejido se incrustaron, se cortaron y se tiñeron mediante el uso de métodos habituales. El análisis histopatológico reveló la biocompatibilidad del hidrogel.

Ejemplo 45

Ejemplo Comparativo de un Ensayo de Biocompatibilidad In Vivo de un Adhesivo de Fibrina

El propósito de este Ejemplo fue comparar el comportamiento del adhesivo de fibrina en el ensayo de biocompatibilidad in vivo con el del adhesivo de dextrano-PEG, tal como se describió en el Ejemplo 44.

Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 44, a excepción de que se pintó sobre el duodeno el adhesivo de fibrina (200 μ L) preparado según las instrucciones del fabricante y aplicado con su dispositivo de administración. El parche se dejó endurecer durante 2 min y después se cerró el peritoneo y el abdomen por capas mediante el uso de un procedimiento quirúrgico habitual. La superficie del intestino se cubrió aproximadamente en un 90% a su alrededor, dejando el mesenterio sin cubrir.

En la necropsia 3 días más tarde, se examinó la localización de la aplicación del adhesivo en busca de respuestas tisulares observables y de la presencia del adhesivo. Se determinó la gravedad del eritema y del edema mediante el uso de un sistema de puntuación que es coherente con el ensayo de reactividad intracutánea ISO (ISO 10993-12). El examen reveló una adhesión escasa. Los parches de adhesivo se desprendieron de la localización debido a la escasa adhesión, y no hubo una inflamación observable. No hubo adhesiones fibrosas o unión al tejido adyacente. En todos los casos, el peristaltismo intestinal se pudo mover fácilmente más allá de la localización del adhesivo. El análisis histopatológico de la localización reveló una respuesta inflamatoria de muy poca importancia.

Este resultado demuestra la adhesión in vivo superior del adhesivo de dextrano-PEG, descrito en el Ejemplo 44, en comparación con el adhesivo de fibrina.

Ejemplo 46Aplicación de un Sello en una Enterotomía en Ratón In Vivo

El propósito de este Ejemplo fue demostrar la seguridad y la eficacia del adhesivo de dextrano-PEG en la aplicación de un sello alrededor de una línea de sutura de una incisión de enterotomía en el intestino delgado de un conejo vivo. Tras la aplicación del adhesivo alrededor de la sutura y la incisión, se dejó endurecer. Los animales se cerraron y se alimentaron normalmente y se sacrificaron 3 días más tarde. Se examinaron los tejidos intestinales y los tejidos adyacentes debajo y alrededor del parche de adhesivo de hidrogel en busca de edema, eritema, toxicidad, inflamación, degradación del hidrogel, adhesión a la pared intestinal y ausencia de crecimiento del tejido adherido.

Cinco conejos New Zealand blancos (1 año de edad, aproximadamente 4 kg de peso) se sometieron a ayuno durante la noche. Antes de la cirugía, se trató a los animales con buprenorfina, y después se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina. Se llevó a cabo un procedimiento de laparotomía estándar para aislar una sección de duodeno del intestino delgado. Se colocó un único punto de sutura "marcador" de material de sutura de polipropileno teñido de azul (Prolene®, Ethicon) en el duodeno en la capa externa de tejido intestinal a una distancia de alrededor de 10 cm en posición distal respecto del estómago. Esto se realizó para ayudar a localizar el parche de hidrogel en la necropsia. Se realizó una incisión de 5 mm a alrededor de 12 cm en posición distal respecto del estómago y la incisión se cerró con dos suturas de Vicryl 5-0. Se aplicó un parche de hidrogel en el intestino delgado sobre los puntos de sutura de la siguiente manera. Mediante el uso del dispositivo de administración descrito en los Ejemplos 1-16 con un mezclador inmóvil que tenía 8 etapas de mezcla, se administraron 100 µL de una disolución de dextrano oxidado (30 %p, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160) mezclada con 100 µL de una disolución de amina de PEG de 8 brazos (50 %p; p. eq. = 1250) en la localización de enterotomía. El adhesivo coaguló el sangrado perceptible en la localización y fue capaz de reticularse y dejó de ser pegajoso en 15 seg. El parche se dejó endurecer durante 2 min y después se cerró el peritoneo y el abdomen por capas mediante el uso de un procedimiento quirúrgico habitual. La superficie del intestino se cubrió aproximadamente en un 90% a su alrededor, dejando el mesenterio sin cubrir.

En la necropsia 3 días más tarde, se examinó la localización de la aplicación del adhesivo en busca de respuestas tisulares observables y de la presencia del adhesivo. Se determinó la gravedad del eritema y del edema mediante el uso de un sistema de puntuación que es coherente con el ensayo de reactividad intracutánea ISO (ISO 10993-12). El examen reveló una buena adhesión del adhesivo de hidrogel en todos los casos y no reveló una inflamación observable. No hubo adhesiones fibrosas o unión al tejido adyacente. Hubo un hinchamiento del hidrogel, pero no un deterioro del revestimiento polimérico. Tras el examen macroscópico, se extirpó el tejido y se fijó en formalina al 4% para el análisis histopatológico. Las muestras de tejido se incrustaron, se cortaron y se tiñeron mediante el uso de métodos habituales. El análisis histopatológico reveló la biocompatibilidad del hidrogel.

Se extirparon secciones de alrededor de 12,5 cm del intestino de los conejos y se determinó la presión de fuga, tal como se describió en los Ejemplos 1-16. En todos los casos, la presión de fuga fue de al menos 30 mm de mercurio, lo que indica un buen sellado de la incisión.

Como comparación, se cerraron conejos sin la aplicación de un adhesivo. La necropsia 3 días más tarde reveló adhesiones observables en la localización debido a las fugas. La evaluación histopatológica reveló una respuesta inflamatoria debida a las fugas en la localización.

Ejemplo 47Ejemplo Comparativo de Aplicación de un Sello en una Enterotomía en Conejo In Vivo Mediante el Uso de un Adhesivo de Fibrina

El propósito de este Ejemplo fue comparar el comportamiento del adhesivo de fibrina en la aplicación de un sello alrededor de una línea de sutura de una incisión de enterotomía en el intestino delgado de un conejo vivo con el del adhesivo de dextrano-PEG, tal como se describió en el Ejemplo 46.

El procedimiento usado fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 46, a excepción de que se aplicó un adhesivo de fibrina (250 µL) en las localizaciones de sutura de enterotomía. El parche se dejó endurecer durante 2 min. En tres de cinco casos, el adhesivo se tuvo que volver a aplicar, debido a que el adhesivo fue arrastrado de la localización debido al sangrado. Se cerró el peritoneo y el abdomen por capas mediante el uso de un procedimiento quirúrgico habitual. La superficie del intestino se cubrió aproximadamente en un 100% a su alrededor, dejando el mesenterio sin cubrir.

En la necropsia 3 días más tarde, se examinó la localización de la aplicación del adhesivo en busca de respuestas tisulares observables y de la presencia del adhesivo. Se determinó la gravedad del eritema y del edema mediante el uso de un sistema de puntuación que es coherente con el ensayo de reactividad intracutánea ISO (ISO 10993-12). El examen reveló adhesiones observables en la localización debido a supuestas fugas. Además, el adhesivo se había despegado de la superficie intestinal y se había unido mecánicamente a los extremos de la sutura. El análisis histopatológico reveló una respuesta inflamatoria debida a las fugas. Este resultado demuestra la adhesión in vivo

superior y la capacidad de sellado del adhesivo de dextrano-PEG, descrito en el Ejemplo 46, en comparación con el adhesivo de fibrina.

Ejemplo 48

Aplicación de un Sello en una Resección en Conejo In Vivo

5 La seguridad y la eficacia del hidrogel se demostraron adicionalmente sellando alrededor de la línea de sutura de una resección en el intestino delgado de un conejo vivo. Después de la aplicación del adhesivo alrededor de las suturas y de la incisión, se dejó endurecer. Los animales se cerraron y se alimentaron normalmente y se sacrificaron 3 días más tarde. Se examinaron los tejidos intestinales y los tejidos adyacentes debajo y alrededor del parche de adhesivo de hidrogel en busca de edema, eritema, toxicidad, inflamación, degradación del hidrogel, adhesión a la pared intestinal y ausencia de crecimiento del tejido adherido.

10 Cinco conejos New Zealand blancos (1 año de edad, aproximadamente 4 kg de peso) se sometieron a ayuno durante la noche. Antes de la cirugía, se trató a los animales con buprenorfina, y después se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina. Se llevó a cabo un procedimiento de laparotomía estándar para aislar una sección de duodeno del intestino delgado. Se colocó un único punto de sutura "marcador" de material de sutura de polipropileno teñido de azul (Prolene[®], Ethicon) en el duodeno en la capa externa de tejido intestinal a una distancia de alrededor de 10 cm en posición distal respecto del estómago. Esto se realizó para ayudar a localizar el parche de hidrogel en la necropsia. Se realizó una incisión completa en el intestino delgado a alrededor de 12 cm en posición distal respecto del estómago. Los dos extremos del intestino se volvieron a unir mediante el uso de 9 puntos de sutura con suturas Vicryl 5-0. Se aplicó un parche de hidrogel en el intestino delgado sobre los puntos de sutura de la siguiente manera. Mediante el uso del dispositivo de administración descrito en los Ejemplos 1-16 con un mezclador inmóvil que tenía 8 etapas de mezcla, se administraron 100 µL de una disolución de dextrano oxidado (30 %p, conversión de oxidación del 46%, p. eq. = 160) mezclada con 100 µL de una disolución de amina de PEG de 8 brazos (50 %p; p. eq = 1250) en las localizaciones de la resección. El adhesivo coaguló el sangrado perceptible en la localización y fue capaz de reticularse y dejó de ser pegajoso en 15 seg. El parche se dejó endurecer durante 2 min y después se cerró el peritoneo y el abdomen por capas mediante el uso de un procedimiento quirúrgico habitual. La superficie del intestino se cubrió aproximadamente en un 100% a su alrededor, dejando el mesenterio sin cubrir.

15 En la necropsia 3 días más tarde, se examinó la localización de la aplicación del adhesivo en busca de respuestas tisulares observables y de la presencia del adhesivo. Se determinó la gravedad del eritema y del edema mediante el uso de un sistema de puntuación que es coherente con el ensayo de reactividad intracutánea ISO (ISO 10993-12). El examen reveló una buena adhesión del adhesivo de hidrogel en todos los casos y no reveló una inflamación observable. No hubo adhesiones fibrosas o unión al tejido adyacente. Hubo un hinchamiento del hidrogel, pero no un deterioro del revestimiento polimérico. Se extirparon secciones de alrededor de 12,5 cm del intestino de los conejos y se determinó la presión de fuga, tal como se describió en los Ejemplos 1-18. En todos los casos, la presión de fuga estuvo entre 25 y 65 mm de mercurio. El análisis histopatológico reveló la biocompatibilidad del hidrogel.

20 Como comparación, se cerraron conejos sin la aplicación de un adhesivo. La necropsia 3 días más tarde reveló adhesiones observables en la localización debido a las supuestas fugas. Se extirparon secciones de alrededor de 12,5 cm de intestino de los conejos y se determinó la presión de fuga. En cuatro de los casos, se dieron fugas a una presión manométrica de prácticamente cero. La quinta muestra alcanzó una presión de alrededor de 90 mm de mercurio. No obstante, hubo adhesiones considerables en la localización de anastomosis. El análisis histopatológico reveló una respuesta inflamatoria debida a las fugas en la localización.

Ejemplo 49

Ejemplo Comparativo de la Aplicación de un Sello en una Resección en Conejo In Vivo Mediante el Uso de un Adhesivo de Fibrina

45 El propósito de este Ejemplo fue comparar el comportamiento del adhesivo de fibrina en la aplicación de un sello alrededor de una línea de sutura de una resección en el intestino delgado de un conejo vivo con el del adhesivo de dextrano-PEG, tal como se describió en el Ejemplo 48.

50 El procedimiento usado fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 48, a excepción de que se aplicó un adhesivo de fibrina (300 µL) en las localizaciones de resección. El parche se dejó endurecer durante 2 min. En dos de cinco casos, el adhesivo se tuvo que volver a aplicar, debido a que el adhesivo fue arrastrado de la localización debido al sangrado. El parche se dejó endurecer durante 2 min y después se cerró el peritoneo y el abdomen por capas mediante el uso de un procedimiento quirúrgico habitual. La superficie del intestino se cubrió aproximadamente en un 100% a su alrededor, dejando el mesenterio sin cubrir.

55 En la necropsia 3 días más tarde, se examinó la localización de la aplicación del adhesivo en busca de respuestas tisulares observables y de la presencia del adhesivo. Se determinó la gravedad del eritema y del edema mediante el uso de un sistema de puntuación que es coherente con el ensayo de reactividad intracutánea ISO (ISO 10993-12). El examen reveló adhesiones observables en la localización debido a la supuesta fuga de materia fecal. Además, el adhesivo se había despegado de la superficie intestinal y se había unido mecánicamente a los extremos de la su-

5 tura. Se extirparon secciones de alrededor de 12,5 cm de intestino de los conejos y se determinó la presión de fuga. En todos los casos excepto en uno, la fuga se dio a una presión manométrica de prácticamente cero. Un caso tuvo una presión de fuga de alrededor de 25 mm de mercurio. El análisis histopatológico reveló una respuesta inflamatoria debida a las fugas. Este resultado demuestra la adhesión in vivo superior y la capacidad de sellado del adhesivo de dextrano-PEG, descrito en el Ejemplo 48, en comparación con el adhesivo de fibrina.

REIVINDICACIONES

1. Un equipo que comprende:
 - a) una primera disolución acuosa que comprende un polisacárido oxidado que contiene grupos aldehído, que tiene un peso molecular de 1.000 a 1.000.000 Daltons, y dicho polisacárido oxidado tiene un peso equivalente por grupo aldehído de 90 a 1500 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 40% en peso del polisacárido oxidado; y
 - b) una segunda disolución acuosa que comprende una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario, en la que la amina de poliéter de múltiples brazos tiene un peso molecular de 450 a 200.000 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 70% en peso de la amina de poliéter de múltiples brazos.
2. El equipo según la reivindicación 1 en el que el peso molecular del polisacárido oxidado es de 3.000 a 250.000 Daltons.
3. El equipo según la reivindicación 1 en el que el peso molecular de la amina de poliéter de múltiples brazos es de 2.000 a 40.000 Daltons.
4. El equipo según la reivindicación 1 en el que el polisacárido oxidado se selecciona del grupo que consiste en dextrano, quitina, almidón, agar, celulosa, y ácido hialurónico.
5. El equipo según la reivindicación 1 en el que los grupos aldehído del polisacárido oxidado de la primera disolución acuosa están en un exceso estequiométrico respecto de los grupos amino de la amina de poliéter de múltiples brazos de la segunda disolución acuosa.
6. El equipo según la reivindicación 1 en el que la primera y segunda disoluciones acuosas están esterilizadas.
7. El equipo según la reivindicación 1 en el que la primera o segunda disolución acuosa comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en modificadores del pH, modificadores de la viscosidad, antimicrobianos, colorantes, promotores de la cicatrización, tensoactivos, agentes anti-inflamatorios, agentes trombogénicos, y compuestos radio-opacos.
8. El equipo según la reivindicación 7 en el que dichos colorantes se seleccionan del grupo que consiste en FD&C Violeta nº 2, D&C Verde nº 6, D&C Verde nº 5, y D&C Violeta nº 2.
9. El equipo según la reivindicación 7 en el que dicho antimicrobiano es triclosán.
10. El equipo según la reivindicación 1 en el que la primera o segunda disolución acuosa comprende además un fármaco o agente terapéutico.
11. El equipo según la reivindicación 1 en el que la concentración del polisacárido oxidado en la primera disolución acuosa es del 15% al 30% en peso.
12. El equipo según la reivindicación 1 en el que la amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua se selecciona del grupo que consiste en poli(óxidos de etileno) en forma de estrella terminados en amino, poli(óxidos de etileno) dendríticos terminados en amino, poli(óxidos de etileno) en forma de peine terminados en amino, poli(óxidos de propileno) en forma de estrella terminados en amino, poli(óxidos de propileno) dendríticos terminados en amino, poli(óxidos de propileno) en forma de peine terminados en amino, copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) en forma de estrella terminados en amino, copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) en forma de peine terminados en amino, poliamidoaminas dendríticas terminadas en amino, y triaminas de polioxialquilenos.
13. El equipo según la reivindicación 1 en el que la amina de poliéter de múltiples brazos es un polietileno glicol en forma de estrella que comprende ocho brazos terminados en un grupo amino primario y que tiene un peso molecular de 10.000 Daltons.
14. El equipo según la reivindicación 1 en el que la concentración de la amina de poliéter de múltiples brazos de la segunda disolución acuosa es del 20% al 50% en peso.
15. El equipo según la reivindicación 1 en el que la segunda disolución acuosa comprende además al menos otra amina multi-funcional que tiene uno o más grupos amino primarios, y dicha amina multi-funcional está presente a una concentración del 5% al 1000% en peso respecto de la cantidad de la amina de poliéter de múltiples brazos de la disolución.
16. El equipo según la reivindicación 15 en el que la amina multi-funcional se selecciona del grupo que consiste en aminas de poliéter de múltiples brazos dispersables en agua, diaminas lineales y ramificadas, poliaminas ramifi-

cadras, diaminas cíclicas, aminoalquiltrialcoxisilanos, aminoalquildialcoxialquilsilanos, dihidrazidas, diaminas poliméricas lineales, poliaminas en forma de peine, dihidrazidas y polihidrazidas.

- 5 17. El equipo según la reivindicación 1 que comprende además una tercera disolución que comprende al menos otra amina multi-funcional que tiene uno o más grupos amino primarios, y dicha disolución contiene del 5% al 100% en peso de la amina multi-funcional respecto del peso total de la disolución.
18. El equipo según la reivindicación 17 en el que la amina multi-funcional se selecciona del grupo que consiste en aminas de poliéter de múltiples brazos dispersables en agua, diaminas lineales, diaminas ramificadas, poliaminas ramificadas, diaminas cíclicas, aminoalquiltrialcoxisilanos, dihidrazidas, diaminas poliméricas lineales, poliaminas en forma de peine, dihidrazidas y polihidrazidas.
- 10 19. El equipo según la reivindicación 17 en el que la tercera disolución está esterilizada.
20. Una composición médica o veterinaria que comprende el producto de reacción de:
- 15 a) una primera disolución acuosa que comprende un polisacárido oxidado que contiene grupos aldehído, que tiene un peso molecular de 1.000 a 1.000.000 Daltons, y dicho polisacárido oxidado tiene un peso equivalente por grupo aldehído de 90 a 1500 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 40% en peso del polisacárido oxidado; y
- b) una segunda disolución acuosa que comprende una amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua en la que al menos tres de los brazos terminan en un grupo amino primario, en la que la amina de poliéter de múltiples brazos tiene un peso molecular de 450 a 200.000 Daltons, y dicha disolución contiene de un 5% a un 70% en peso de la amina de poliéter de múltiples brazos.
- 20 21. La composición de la reivindicación 20 en la que el peso molecular del polisacárido oxidado es de 3.000 a 250.000 Daltons.
22. La composición de la reivindicación 20 en la que el peso molecular de la amina de poliéter de múltiples brazos es de 2.000 a 40.000 Daltons.
- 25 23. La composición de la reivindicación 20 en la que el polisacárido oxidado se selecciona del grupo que consiste en dextrano, quitina, almidón, agar, celulosa, y ácido hialurónico.
24. La composición de la reivindicación 20 en la que los grupos aldehído del polisacárido oxidado de la primera disolución acuosa están en un exceso estequiométrico respecto de los grupos amino de la segunda disolución acuosa.
- 30 25. La composición de la reivindicación 20 en la que la primera y segunda disoluciones acuosas están esterilizadas.
26. La composición de la reivindicación 20 en la que la primera o segunda disolución acuosa comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en modificadores del pH, modificadores de la viscosidad, antimicrobianos, colorantes, promotores de la cicatrización, tensoactivos, agentes anti-inflamatorios, agentes trombogénicos, y compuestos radio-opacos.
- 35 27. La composición de la reivindicación 26 en la que dichos colorantes se seleccionan del grupo que consiste en FD&C Violeta nº 2, D&C Verde nº 6, D&C Verde nº 5, y D&C Violeta nº 2.
28. La composición de la reivindicación 26 en la que dicho antimicrobiano es triclosán.
29. La composición de la reivindicación 20 en la que la primera o segunda disolución acuosa comprende además un fármaco o agente terapéutico.
- 40 30. La composición de la reivindicación 20 en la que la concentración del polisacárido oxidado en la primera disolución acuosa es del 15% al 30% en peso.
31. La composición de la reivindicación 20 en la que la amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua se selecciona del grupo que consiste en poli(óxidos de etileno) en forma de estrella terminados en amino, poli(óxidos de etileno) dendríticos terminados en amino, poli(óxidos de etileno) en forma de peine terminados en amino, poli(óxidos de propileno) en forma de estrella terminados en amino, poli(óxidos de propileno) dendríticos terminados en amino, poli(óxidos de propileno) en forma de peine terminados en amino, copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) en forma de estrella terminados en amino, copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) dendríticos terminados en amino, copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) en forma de peine terminados en amino, poliamidoaminas dendríticas terminadas en amino, y triaminas de polioxialquilenos.
- 45
- 50

- 32 La composición de la reivindicación 20 en la que la amina de poliéter de múltiples brazos dispersable en agua es un polietilen glicol en forma de estrella que comprende ocho brazos terminados en un grupo amino primario y que tiene un peso molecular de 10.000 Daltons.
- 5 33. La composición de la reivindicación 20 en la que la concentración de la amina de poliéter de múltiples brazos de la segunda disolución acuosa es del 20% al 50% en peso.
34. La composición de la reivindicación 20 en la que la segunda disolución acuosa comprende además al menos otra amina multi-funcional que tiene uno o más grupos amino primarios, y dicha amina multi-funcional está presente a una concentración del 5% al 1000% en peso respecto de la cantidad de la amina de poliéter de múltiples brazos de la disolución.
- 10 35. La composición de la reivindicación 34 en la que la amina multi-funcional se selecciona del grupo que consiste en aminas de poliéter de múltiples brazos dispersables en agua, diaminas lineales, diaminas ramificadas, poli-aminas ramificadas, diaminas cíclicas, aminoalquiltrialcoxisilanos, dihidrazidas, diaminas poliméricas lineales, poli-aminas en forma de peine, dihidrazidas y polihidrazidas.
- 15 36. La composición de la reivindicación 20 que comprende además c) una tercera disolución que comprende una amina multi-funcional que tiene uno o más grupos amino primarios, y dicha disolución contiene del 5% al 100% en peso de la amina multi-funcional respecto del peso total de la disolución.
- 20 37. La composición de la reivindicación 36 en la que la amina multi-funcional se selecciona del grupo que consiste en aminas de poliéter de múltiples brazos dispersables en agua, diaminas lineales, diaminas ramificadas, poli-aminas ramificadas, diaminas cíclicas, aminoalquiltrialcoxisilanos, dihidrazidas, diaminas poliméricas lineales, poli-aminas en forma de peine, dihidrazidas y polihidrazidas.