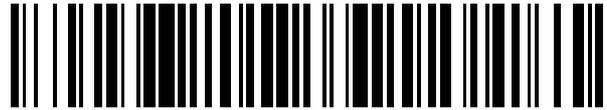


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 406**

51 Int. Cl.:

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/04 (2006.01)

A61L 24/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12718802 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2696906**

54 Título: **Materiales adhesivos biocompatibles y métodos**

30 Prioridad:

13.04.2011 US 201161474984 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2015

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**ARTZI, NATALIE;
EDELMAN, ELAZER R.;
JORGE, NURIA OLIVA y
SOLANES, MARIA CARCOLE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 548 406 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

Materiales adhesivos biocompatibles y métodos

5 **Campo de la invención**

Esta divulgación se refiere a materiales adhesivos biocompatibles, tal como para su uso con tejidos biológicos y/o implantes médicos, así como a métodos y kits para preparar y usar los materiales adhesivos biocompatibles.

10 **Antecedentes**

Se ha usado un número de adhesivos de tejido en diversos procedimientos y aplicaciones médicas, incluyendo cierre de heridas tópicas, complementación o sustitución de las suturas o grapas quirúrgicas, adhesión de materiales sintéticos a tejidos biológicos y suministro de fármaco. Sin embargo, un número de adhesivos de tejido conocidos, son inadecuados para muchas aplicaciones, por ejemplo, debido a productos de degradación tóxicos, curado lento, pobre resistencia mecánica y otros inconvenientes.

Se han desarrollado diversas variedades de adhesivos de hidrogel, que no son tóxicos y tienen propiedades mejoradas. Estos hidrogeles generalmente se forman haciendo reaccionar un componente que tenga grupos nucleófilos con un componente que tenga grupos electrófilos que reaccionan para formar una red reticulada. Sin embargo, estos hidrogeles normalmente se disuelven demasiado rápidamente, carecen de adhesión suficiente o tienen una resistencia mecánica insuficiente.

El documento US2006/079599 desvela composiciones adhesivas y de suministro de fármaco que comprenden una solución de un polisacárido oxidado que contiene grupos aldehído y una segunda solución que comprende un compuesto de poliamida.

Por lo tanto, sería deseable proporcionar formulaciones adhesivas mejoradas que superen una o más de las desventajas descritas anteriormente.

30 **Sumario**

En un aspecto, se proporcionan composiciones y métodos para adherir, sellar o tratar uno o más tejidos biológicos. El método puede incluir combinar un componente de polímero y un componente de dendrímero para formar una formulación adhesiva, y poner en contacto uno o más tejidos biológicos con la formulación adhesiva. En las realizaciones, el componente de polímero comprende un polímero que tiene uno o más grupos aldehído. En las realizaciones, el componente de dendrímero comprende un dendrímero que tiene al menos 2 brazos o ramas con uno o más grupos superficiales. En ciertas realizaciones, menos del 75 % de los grupos superficiales comprenden al menos una amina primaria o secundaria. En algunas realizaciones, las formulaciones adhesivas se usan en un método para tratar, adherir o sellar un tejido biológico, comprendiendo el método (1) proporcionar una primera solución que comprende un componente de polímero, en el que el componente de polímero comprende un polímero que tiene uno o más grupos aldehído, (2) proporcionar una segunda solución que comprende un componente de dendrímero, en el que el componente de dendrímero comprende un dendrímero que tiene al menos 2 ramas con uno o más grupos superficiales, en el que menos del 75 % de los grupos superficiales comprenden al menos una amina primaria o secundaria, (3) combinar la primera y segunda soluciones entre sí para producir una formulación adhesiva y poner en contacto uno o más tejidos biológicos con la formulación adhesiva y (4) permitir que la formulación adhesiva se cure.

En otro aspecto se proporcionan kits para preparar y suministrar una composición adhesiva. El kit puede incluir una primera parte que comprende un componente de polímero y una segunda parte que comprende un componente de dendrímero. El componente de polímero puede comprender un polímero que tiene uno o más grupos aldehído. El componente de dendrímero puede comprender un dendrímero que tiene al menos 2 brazos o ramas con uno o más grupos superficiales. En ciertas realizaciones, menos del 75 % de los grupos superficiales comprenden al menos una amina primaria o secundaria. El kit puede incluir medios para mezclar la primera y segunda partes entre sí.

55 **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** representa la fluorescencia normalizada e imágenes de microesferas fluorescentes recubiertas con aldehído (f-MS) sobre las superficies de tejidos a partir de tres regiones del intestino delgado.
 La **Figura 2** representa las fluorescencias interfacial e imágenes de una formulación dendrímero:dextrano marcada aplicada a las superficies de tejidos a partir de tres regiones del intestino delgado.
 La **Figura 3** representa la correlación de la fluorescencia normalizada de f-MS y formulaciones dendrímero:dextrano marcadas cuando se aplican a superficies de tejidos a partir de tres regiones del intestino delgado.
 La **Figura 4** representa la carga máxima de tres formulaciones adhesivas que contienen soluciones de dextrano de diferentes concentraciones.

La **Figura 5** representa la carga máxima a fallo para diferentes formulaciones adhesivas que contienen soluciones de dextrano de diferentes concentraciones.

La **Figura 6** representa la fluorescencia en la interfaz entre diversas formulaciones adhesivas y tejidos del yeyuno.

5 La **Figura 7** representada la correlación entre fluorescencia (sucedáneo para contenido de amina del tejido) y carga máxima de formulaciones adhesivas aplicadas al yeyuno.

La **Figura 8** representa la biocompatibilidad de varias formulaciones adhesivas usando fibroblastos 3T3.

Las **Figuras 9 y 10** representan hallazgos histopatológicos pertinentes para diversas formulaciones adhesivas.

10 La **Figura 11** representa una comparación de tiempos de gelificación para las formulaciones adhesivas descritas en este documento y varios adhesivos que contienen poli(etilenglicol) aminado.

La **Figura 12** representa la carga máxima de diversas formulaciones adhesivas que contienen dendrímero o PEG amina.

La **Figura 13** representa los tiempos de gelificación de adhesivos de PEG amina de diversos pesos moleculares y formulaciones adhesivas que contienen dendrímero.

15 La **Figura 14** representa los resultados del ensayo de tracción para adhesivos de PEG amina con PEG aminas de diferentes pesos moleculares.

La **Figura 15** representa la distribución de la intensidad de las microesferas en modelos sanos y enfermos.

La **Figura 16** representa la intensidad promedio de las microesferas aplicadas a tejidos sanos y enfermos.

20 Las **Figuras 17 y 18** representan la cobertura de la superficie del tejido de microesferas fluorescentes en tejido de colon sano y enfermo.

La **Figura 19** representa la intensidad de las microesferas fluorescentes en colon de conejo sano, colon de conejo enfermo, colon de rata sano y colon de rata enfermo.

Las **Figuras 20 y 21** representan la puntuación histológica para tejidos sanos y enfermos con y sin incisiones y con y sin la aplicación de una formulación adhesiva.

25 La **Figura 22** representa una realización de un kit que contiene los componentes de una formulación adhesiva.

Descripción detallada

Se han desarrollado composiciones y métodos mejorados para adherir, sellar o tratar uno o más tejidos biológicos.

30 En general, estas formulaciones adhesivas comprenden un componente de dendrímero y un componente de polímero. En algunas realizaciones, las formulaciones adhesivas se usan como adhesivos de tejidos, sellantes de tejido, tratamientos de tejido, materiales de matriz, cargas, recubrimientos o una combinación de los mismos.

35 Las formulaciones adhesivas descritas en este documento consiguen una mejor adhesión, sellado y/o tratamiento que los adhesivos conocidos anteriormente porque el componente de dendrímero tiene aminas en menos del 75 % de sus grupos superficiales.

40 Como se usa en este documento, la expresión "que se adhiere" generalmente se refiere a que se fijan, permanente o temporalmente, dos o más tejidos biológicos, o dos o más regiones de un tejido biológico. Como se usa en este documento, la expresión "que se sella" generalmente se refiere a cubrir, al menos parcialmente, o llenar, al menos parcialmente uno o más sitios en uno o más tejidos biológicos, tal como una herida. Como se usa en este documento, la expresión "que se trata" generalmente se refiere a mejorar la respuesta de al menos un tejido biológico al que se aplica una o más formulaciones adhesivas. En algunas realizaciones, la "respuesta" que se mejora o potencia incluye inflamación, curación o ambas.

45 En general, pueden usarse formulaciones adhesivas en cualquier tejido biológico interno o externo. Los tejidos biológicos pueden ser humanos u otro tejido de mamífero. Los tejidos biológicos se pueden generar de forma natural o artificial. Los tejidos biológicos pueden ser piel, hueso, ocular, muscular, vascular o de un órgano interno, tal como pulmón, intestino, corazón, hígado, etc.

50 La formulación adhesiva puede aplicarse a un sitio de tejido en un ser humano u otro paciente animal como por ejemplo durante un procedimiento quirúrgico u otro procedimiento médico. En una realización, la formulación adhesiva se usa para crear una anastomosis. En algunas realizaciones, la formulación adhesiva se usa para adherir, sellar y/o tratar una herida, lesión o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la formulación adhesiva puede aplicarse a heridas de curado lento o problemáticas, tal como las que sufren los diabéticos.

En una realización, la formulación adhesiva puede usarse para asegurar o ayudar a asegurar un implante médico, tal como un implante ortopédico, dentro de un paciente humano u otro paciente animal.

60 Componente de dendrímero

En una realización, el componente de dendrímero comprende un dendrímero que tiene aminas en menos del 75 % de sus grupos superficiales, que se denominan comúnmente "grupos terminales" o "grupos finales". Como se usa en este documento, la expresión "dendrímero" se refiere a cualquier compuesto con un núcleo polivalente unido covalentemente a dos o más ramas dendríticas. En una realización, las aminas son aminas primarias. En otra realización, las aminas son aminas secundarias. En otra realización más, uno o más grupos superficiales tienen al

menos una amina primaria y al menos una amina secundaria.

5 En una realización, el dendrímero se extiende a través de al menos 2 generaciones. En otra realización, el dendrímero se extiende a través de 3 generaciones. En otra realización más, el dendrímero se extiende a través de al menos 4 generaciones. En otra realización más, el dendrímero se extiende a través de al menos 5 generaciones. En una realización adicional, el dendrímero se extiende a través de al menos 6 generaciones. En otra realización adicional más, el dendrímero se extiende a través de al menos 7 generaciones.

10 En una realización, el dendrímero puede tener un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000 Dalton. En una realización adicional, el dendrímero puede tener un peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 120.000 Dalton. En otra realización, el dendrímero puede tener un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 Dalton. En otra realización, el dendrímero puede tener un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Dalton.

15 En general, el dendrímero puede prepararse usando cualquier método conocido. En una realización, el dendrímero se prepara oxidando un dendrímero de partida que tiene grupos superficiales que comprenden al menos un grupo hidroxilo, de manera que al menos una porción de los grupos superficiales comprende al menos una amina. En otra realización, el dendrímero se prepara oxidando un dendrímero de partida de generación 5 (G5) que tiene grupos superficiales que comprenden al menos un grupo hidroxilo, de manera que al menos una porción de los grupos superficiales comprende al menos una amina. En otra realización más, el dendrímero se prepara oxidando un dendrímero G5 de partida que tiene grupos superficiales que comprenden al menos un grupo hidroxilo de manera que aproximadamente el 25 % de los grupos superficiales comprende al menos una amina. En una realización particular, el dendrímero es un dendrímero G5 que tiene aminas primarias en aproximadamente el 25 % de los grupos superficiales del dendrímero.

25 En una realización, el dendrímero es un dendrímero derivado de poli(amidoamina) (PAMAM). En otra realización, el dendrímero es un dendrímero derivado de PAMAM G5. En otra realización más, el dendrímero es un dendrímero derivado de PAMAM G5 que tiene aminas primarias en aproximadamente el 25 % de los grupos superficiales del dendrímero.

30 En una realización, el dendrímero es un dendrímero derivado de poli(propilenimina).

35 En ciertas realizaciones, el componente de dendrímero se combina con un líquido para formar una solución del componente de dendrímero. En una realización, la solución del componente de dendrímero es una solución acuosa. En una realización, la solución comprende agua, solución salina tamponada con fosfato (PBS), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la concentración del componente de dendrímero en la solución del componente de dendrímero es de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 25 % en peso. En otra realización, la concentración del componente de dendrímero en la solución del componente de dendrímero es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 % en peso. En una realización adicional, la concentración del componente de dendrímero en la solución del componente de dendrímero es de aproximadamente el 11 % a aproximadamente el 15 % en peso.

45 En algunos casos, el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero pueden comprender adicionalmente un aditivo. En general, la cantidad de aditivo puede variar dependiendo de la aplicación, tipo de tejido, concentración de la solución del componente de dendrímero, el tipo de componente de dendrímero, concentración de las soluciones de componente de polímero y/o tipo de componente de polímero. El ejemplo de aditivos adecuados incluye, aunque sin limitación, modificadores del pH, espesantes, agentes microbianos, colorantes, tensioactivos y compuestos radioopacos. Se describen ejemplos específicos de estos tipos de aditivos en este documento. En una realización, la solución del componente de dendrímero comprende un aditivo de espumación.

50 En realizaciones particulares, el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero comprenden al menos un fármaco. En tales realizaciones, la formulación adhesiva puede servir como material de matriz para liberación controlada del fármaco. El fármaco puede ser esencialmente cualquier fármaco adecuado para administración local, regional o sistémica a partir de una cantidad de la formulación adhesiva que se haya aplicado a uno o más sitios de tejido en un paciente. En una realización, el fármaco comprende un agente trombogénico. Los ejemplos no limitantes de agentes trombogénicos incluyen trombina, fibrinógeno, homocisteína, estramustina y combinaciones de los mismos. En otra realización, el fármaco comprende un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen indometacina, acetato de ácido salicílico, ibuprofeno, sulindac, piroxicam, naproxeno y combinaciones de los mismos. En otra realización más, el fármaco comprende un agente antineoplásico. En otras realizaciones más, el fármaco es uno para terapia génica. Por ejemplo, el fármaco puede comprender moléculas ARNsi para combatir el cáncer. Se prevén otros fármacos.

65 En otras realizaciones particulares, el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero comprenden una o más células. Por ejemplo, la formulación adhesiva puede servir como un material de matriz para suministrar células a un sitio de tejido en el que se haya aplicado la formulación adhesiva. En las realizaciones, las

células pueden comprender células endoteliales (EC), células progenitoras endoteliales (EPC), células madre hematopoyéticas u otras células madre. En una realización, las células son capaces de liberar factores para tratar la enfermedad cardiovascular y/o reducir la restenosis. Se prevén otros tipos de células.

5 Componente de polímero

En general, el componente de polímero comprende un polímero con uno o más grupos funcionales capaces de reaccionar con uno o más grupos funcionales sobre un tejido biológico y/o uno o más grupos funcionales en el componente de dendrímero.

10 En ciertas realizaciones, el polímero es al menos un polisacárido. En estas realizaciones, el al menos un polisacárido puede ser lineal, ramificado o tener secciones tanto lineales como ramificadas dentro de su estructura. En general, el al menos un polisacárido puede ser natural, sintético o modificado, por ejemplo reticulando o alterando los sustituyentes del polisacárido o ambos. En una realización, el al menos un polisacárido está basado en plantas. En
15 otra realización, el al menos un polisacárido está basado en animales. En otra realización más, el al menos un polisacárido es una combinación de polisacáridos basados en plantas y basados en animales. Los ejemplos no limitantes de polisacáridos incluyen, aunque sin limitación, dextrano, quitina, almidón, agar, celulosa, ácido hialurónico o una combinación de los mismos.

20 En ciertas realizaciones, el al menos un polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000 Dalton. En una realización, el al menos un polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 15.000 Dalton. A menos que se especifique de otra manera, el "peso molecular" del polímero se refiere al peso molecular promedio en número.

25 En algunas realizaciones, el polímero se funcionaliza de manera que su estructura incluya uno o más grupos funcionales que reaccionarán con uno o más grupos funcionales en un tejido biológico y/o uno o más grupos funcionales en el componente de dendrímero. En una realización, el uno o más grupos funcionales incorporados en la estructura del polímero es un aldehído.

30 En ciertas realizaciones, el grado de funcionalización del polímero es ajustable. El "grado funcionalización" generalmente se refiere al número o porcentaje de grupos reactivos en el polímero que se reemplazan o convierten en el uno o más grupos funcionales deseados. En una realización, el grado de funcionalización se ajusta basándose en el tipo de tejido al que se aplica el adhesivo, la concentración o concentraciones de los componentes y/o el tipo de polímero o dendrímero usado en el adhesivo. En una realización, el grado de funcionalización, es de
35 aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 75 %. En otra realización, el grado de funcionalización es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %. En otra realización más, el grado de funcionalización es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %.

40 En una realización, el polímero es dextrano con un peso molecular de aproximadamente 10 kDa. En otra realización, el polímero es dextrano que tiene aproximadamente un 50 % de sus grupos hidroxilos convertidos en aldehídos. En una realización adicional, el polímero es dextrano con un peso molecular de aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 50 % de sus grupos hidroxilos convertidos en aldehídos.

45 En algunas realizaciones, un polisacárido se oxida para incluir un porcentaje deseado del uno o más grupos funcionales aldehído. En general, esta oxidación puede realizarse usando cualquier medio conocido. Por ejemplo, los agentes oxidantes adecuados incluyen, aunque sin limitación peryodatos, hipocloritos, ozono, peróxidos, hidroperóxidos, persulfatos y percarbonatos. En una realización, la oxidación se realiza usando peryodato sódico. Normalmente, pueden usarse diferentes cantidades de agentes oxidantes para alterar el grado de funcionalización.

50 En ciertas realizaciones, el componente de polímero se combina con un líquido para formar una solución del componente de polímero. En una realización, la solución del componente de polímero es una solución acuosa. En una realización, la solución comprende agua, PBX, DMEM, o cualquier combinación de los mismos.

55 En general, la solución del componente de polímero puede tener cualquier concentración adecuada de componente de polímero. En una realización, la concentración del componente de polímero en la solución del componente de polímero es de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 % en peso. En otra realización, la concentración del componente de polímero en la solución del componente de polímero es de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 30 % en peso. En otra realización más, la concentración del componente de polímero en la solución del componente de polímero es de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 25 % en peso.
60 Normalmente, la concentración puede adaptarse y/o ajustarse basándose en la aplicación particular, tipo de tejido y/o tipo de concentración del componente de dendrímero usado.

65 El componente de polímero o la solución del componente de polímero pueden comprender también uno o más aditivos. En una realización, el aditivo es compatible con el componente de polímero. En otra realización, el aditivo no contiene aminas primarias o secundarias. En general, la cantidad de aditivo varía dependiendo de la aplicación, tipo de tejido, concentración de la solución del componente de polímero, tipo de componente de polímero y/o

componente de dendrímero. Los ejemplos de aditivos adecuados, incluyen, aunque sin limitación, modificadores del pH, espesantes, agentes antimicrobianos, colorantes, tensioactivos y compuestos radioopacos. En otras realizaciones, la solución del componente de polímero comprende un agente de espumación.

5 En ciertas realizaciones, el modificador del pH es un compuesto ácido. Los ejemplos de modificadores del pH ácidos incluyen, aunque sin limitación, ácidos carboxílicos, ácidos inorgánicos y ácidos sulfónicos. En otras realizaciones, el modificador del pH es un compuesto básico. Los ejemplos de modificadores del pH básicos incluyen, aunque sin limitación, hidróxidos, alcóxidos, compuestos que contienen nitrógeno distintos de aminas primarias y secundarias, carbonatos básicos y fosfatos básicos.

10 En general, el espesante puede seleccionarse de cualquier modificador de la viscosidad conocido incluyendo, aunque sin limitación, polisacáridos y derivados de los mismos tal como almidón o hidroxietil celulosa.

15 En general, el tensioactivo puede ser cualquier compuesto que reduzca la tensión superficial del agua. En una realización, el tensioactivo es un tensioactivo iónico por ejemplo el lauril sulfato sódico. En otra realización, el tensioactivo es un tensioactivo neutro. Los ejemplos de tensioactivos neutros incluyen, aunque sin limitación, éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno y polioxoetilensorbitanos.

20 En una realización, el compuesto radioopaco es sulfato de bario, partículas de oro o una combinación de los mismos.

25 En realizaciones particulares, el componente de polímero o la solución del componente de polímero comprenden al menos un fármaco. En tales realizaciones la formulación adhesiva puede servir como material de matriz para liberación controlada del fármaco. El fármaco puede ser esencialmente cualquier fármaco adecuado para administración local, regional o sistémica a partir de una cantidad de la formulación adhesiva que se haya aplicado a uno o más sitios de tejido en un paciente. En una realización, el fármaco comprende un agente trombogénico. Los ejemplos no limitantes de agentes trombogénicos incluyen trombina, fibrinógeno, homocisteína, estramustina y combinaciones de los mismos. En otra realización, el fármaco comprende un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen indometacina, acetato de ácido salicílico, ibuprofeno, sulindac, piroxicam, naproxeno y combinaciones de los mismos. En otra realización más, el fármaco comprende un agente antineoplásico. En otras realizaciones más, el fármaco es uno para terapia génica o celular. Por ejemplo, el fármaco puede comprender moléculas de ARNsi para combatir el cáncer. Se prevén otros fármacos.

35 En otras realizaciones particulares, el componente de polímero o la solución del componente de polímero comprenden una o más células. Por ejemplo, la formulación adhesiva puede servir como un material de matriz para suministrar células a un sitio de tejido en el que se haya aplicado la formulación adhesiva. En las realizaciones, las células pueden comprender células endoteliales (EC) células progenitoras endoteliales (EPC), células madre hematopoyéticas u otras células madre. En una realización, las células son capaces de liberar factores para tratar de la enfermedad cardiovascular y/o reducir la restenosis. Se prevén otros tipos de células.

40

Formulación adhesiva

45 En general, las formulaciones adhesivas descritas en este documento pueden formarse combinando el componente de polímero o la solución del componente de polímero y el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero. El componente de polímero o la solución del componente de polímero y el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero se combinan antes de poner en contacto un tejido biológico con la formulación adhesiva. El componente de polímero o la solución del componente de polímero y el componente de dendrímero y la solución del componente de dendrímero se combinan, en cualquier orden, sobre un tejido biológico. El componente de polímero o la solución del componente de polímero pueden aplicarse a un primer tejido biológico, el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero a un segundo tejido biológico, y el primer y segundo tejidos biológicos se ponen en contacto. El componente de polímero o la solución del componente de polímero pueden aplicarse a una primera región de un tejido biológico, el componente de dendrímero o la solución del componente de dendrímero a una segunda región de un tejido biológico y la primera y segunda regiones se ponen en contacto.

55

60 En general, la formulación adhesiva puede aplicarse a uno o más tejidos biológicos como un adhesivo, sellante y/o tratamiento. El uno o más tejidos biológicos pueden ser enfermos o sanos. En una realización, la formulación adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un adhesivo. En otra realización, la fórmula adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un sellante. En una realización adicional, la formulación adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un tratamiento. En una realización adicional, la formulación adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un adhesivo y sellante. En otra realización más, la formulación adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un adhesivo y tratamiento. En otra realización más, la formulación adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un sellante y tratamiento. En otra realización adicional, la formulación adhesiva se aplica a uno o más tejidos biológicos como un adhesivo, sellante y tratamiento

65

Como se usa en este documento, la formulación adhesiva es un "tratamiento" cuando mejora la respuesta de al menos un tejido biológico al que se aplica. En algunas realizaciones, la respuesta mejorada es reducir la inflamación global, mejorar la respuesta específica en el sitio de la herida/interfaz del tejido y la formulación adhesiva, potenciar la curación o una combinación de las mismas. Como se usa en este documento, la expresión "reducir la inflamación global" se refiere a una mejora de la puntuación histológica que refleja la gravedad de la inflamación. Como se usa en este documento la expresión "mejorar la respuesta específica en el sitio de la herida/interfaz del tejido y la formulación adhesiva" se refiere a una mejora de las puntuaciones histológicas que reflejan la gravedad de los neutrófilos séricos. Como se usa en este documento la expresión "potenciar la curación" se refiere a una mejora de las puntuaciones histológicas que reflejan la gravedad de la fibrosis serosa.

Después de poner en contacto uno o más tejidos biológicos, pueden permitirse un tiempo adecuado para curar o gelificar las formulaciones adhesivas. Cuando la formulación adhesiva "se cura" o "gelifica", como estos términos se usan en este documento, significa que los grupos reactivos en el componente de polímero, el componente de dendrímero y uno o más tejidos biológicos han experimentado una o más reacciones. Sin querer quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que las formulaciones adhesivas descritas en este documento son eficaces porque el componente de polímero reacciona tanto con el componente de dendrímero como con la superficie de los tejidos biológicos. En ciertas realizaciones, los grupos funcionales aldehído reactivos del componente de polímero reaccionan con las aminas en el componente de dendrímero y los tejidos biológicos para formar enlaces imina. En estas realizaciones, se cree que las aminas o el componente de dendrímero reaccionan con un alto porcentaje de los aldehídos en el componente de polímero, reduciendo de esta manera la toxicidad y aumentando la biocompatibilidad de las formulaciones adhesivas. Normalmente, el tiempo necesario para curar o gelificar las formulaciones adhesivas variará basándose en un número de factores incluyendo, aunque sin limitación, las características del componente de polímero y/o componente de dendrímero, las concentraciones de la solución del componente de polímero y/o la solución del componente de dendrímero y las características del uno o más tejidos biológicos. En las realizaciones, la formulación adhesiva se curará suficientemente para proporcionar una unión deseada o sellado poco después de que los componentes se combinen. El tiempo de gelificación o curado posibilitará que una mezcla de los componentes pueda suministrarse de forma fluida a un área diana antes de hacerse demasiado viscoso o solidificar y después una vez aplicado al área diana fragua rápidamente en ella. En una realización el tiempo de gelificación o curado es menor de 120 segundos. En otra realización, el tiempo de gelificación o curado es entre 3 y 60 segundos. En una realización particular, el tiempo de gelificación o curado es entre 5 y 30 segundos.

En ciertas realizaciones, se añaden uno o más agentes de espumación a la solución del componente de polímero y/o la solución del componente de dendrímero antes de que las soluciones se combinen. En una realización, los agentes de espumación comprenden un sistema líquido de dos partes que comprende Parte 1 y Parte 2, en el que la Parte 1 comprende un bicarbonato y la Parte 2 una solución acuosa de di- o polialdehído y un valorante. Existe un amplio intervalo de di- o polialdehídos, y su utilidad está restringida en gran medida por la disponibilidad y por su solubilidad en agua. Por ejemplo, el glioxal acuoso (etanodial) es útil, así como también lo es el glutaraldehído acuoso (pentadial). Las mezclas solubles en agua de di- y polialdehídos preparadas por escisión oxidativa de los carbohidratos apropiados con peryodato, ozono o similares pueden ser útiles también.

Se emplea un valorante más preferentemente en la solución líquida de la Parte 2. Más específicamente, el valorante es un ácido orgánico o inorgánico, tampón, sal o solución salina que sea capaz de reaccionar con el componente bicarbonato de la Parte 1 para generar dióxido de carbono y agua como subproductos de reacción. El dióxido de carbono gaseoso que se genera crea una estructura similar a espuma de la formulación adhesiva y también provoca que el volumen de la formulación adhesiva se expanda.

Más preferentemente, el valorante es un ácido inorgánico u orgánico que está presente en una cantidad para conferir un pH ácido a la mezcla resultante de los componentes de la Parte 1 y de la Parte 2. Los ácidos preferidos que pueden emplearse en la práctica de la presente invención incluyen ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido acético y ácido cítrico.

Formulaciones específicas de tejido

En general, el componente de polímero y el componente de dendrímero que se combinan para formar la formulación adhesiva pueden adaptarse a tejidos biológicos específicos. Por ejemplo, el tipo de componentes o las cantidades de uno o ambos de los componentes pueden ajustarse. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que realizar un análisis para determinar la densidad de los grupos amina en la superficie de un tejido biológico puede guiar en la determinación de cómo alterar las formulaciones adhesivas. En una realización, se aplican microesferas fluorescentes recubiertas con aldehído (f-MS) a diversos tejidos para ayudar en el análisis.

En general, las formulaciones adhesivas pueden ajustarse de cualquier manera para compensar las diferencias entre los tejidos. En una realización, la cantidad de componente de polímero se aumenta o disminuye mientras la cantidad de componente de dendrímero no cambia. En otra realización, la cantidad de componente de dendrímero se aumenta o disminuye mientras la cantidad de componente de polímero no cambia. En otra realización la concentración de la solución del componente de polímero se aumenta o disminuye mientras el componente de

dendrímico o la solución del componente de dendrímico no cambia, en otra realización más, la concentración de la solución de componente del dendrímico se aumenta o disminuye mientras el componente de polímero o la solución del componente de polímero no cambia. En una realización adicional, se cambian las concentraciones tanto de la solución del componente de polímero como de la solución del componente de dendrímico.

5 Cuando la densidad de amina sobre la superficie de un tejido biológico particular es desconocida debido a enfermedad, lesión u otras causas, puede añadirse un exceso de componente de polímero o de solución del componente de polímero, en algunas realizaciones, cuando se aplica por primera vez la formulación adhesiva, entonces la cantidad de componente de polímero o solución del componente de polímero puede reducirse, por ejemplo de forma gradual o drástica, hasta que esta consigue el efecto deseado. El "efecto deseado", en esta realización puede ser un tiempo de curación, adhesión, sellado apropiado o adecuado o una combinación de los mismos. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que un exceso del componente de polímero o la solución del componente de polímero puede requerirse, en algunos casos, para obtener el efecto deseado cuando la densidad de amina en un tejido biológico es baja. Por lo tanto, añadir un exceso ayudará al usuario, en esta realización, a conseguir un sellado o adhesión adecuados en menos tiempo. Esto es particularmente deseable en situaciones de emergencia.

En otras realizaciones, sin embargo, una menor cantidad de componente de polímero o solución del componente de polímero puede añadirse cuando la formulación adhesiva se aplica en primer lugar, entonces la cantidad del componente de polímero o la solución del componente de polímero puede aumentarse, por ejemplo de forma gradual o drástica, hasta que se consigue el efecto deseado, que puede ser un tiempo de curado, adhesión, sellado adecuado o una combinación de los mismos.

Kits de formulación adhesiva

25 En otro aspecto, se proporciona un kit que comprende una primera parte que incluye un componente de polímero o una solución del componente de polímero, y una segunda parte que incluye un componente de dendrímico o una solución del componente de dendrímico. El kit puede incluir además un aplicador u otros medios de dispositivo, tal como una jeringa multicompartimento para almacenar, combinar y suministrar las dos partes y/o la formulación adhesiva resultante a un sitio de tejido.

En una realización, el kit comprende depósitos separados para la solución del componente de polímero y la solución del componente de dendrímico. En ciertas realizaciones, el kit comprende depósitos para las soluciones del componente de polímero de diferentes concentraciones. En las realizaciones, el kit comprende depósitos para las soluciones del componente de dendrímico de diferentes concentraciones.

En una realización, el kit comprende instrucciones para seleccionar una concentración o cantidad apropiada de al menos uno del componente de polímero, la solución del componente de polímero, el componente de dendrímico o la solución del componente de dendrímico para compensar o tener en cuenta al menos una característica de uno o más tejidos biológicos. En una realización, la formulación adhesiva se selecciona basándose en una o más características del tejido predeterminadas. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos previos, tales como los descritos en este documento para determinar el número de densidad de los grupos de unión sobre un tejido biológico en estados tanto sano como enfermo. Como alternativa, puede realizarse un ensayo rápido de tejido para evaluar el número o densidad de los grupos de unión. La cuantificación de los grupos de unión a tejido puede realizarse poniendo en contacto un tejido con uno o más materiales que (1) tienen al menos un grupo funcional que interactúa específicamente con los grupos de unión, y (2) puede evaluarse mediante fluorescencia o la fuerza de separación requerida para separar los grupos de unión y el material. En otra realización, cuando la densidad de los grupos de unión sobre un tejido biológico es desconocida, un exceso del componente de polímero, tal como uno que contiene aldehídos, puede añadirse inicialmente como se describe en este documento para calibrar la densidad de los grupos de unión sobre la superficie del tejido biológico.

En ciertas realizaciones, el kit comprende al menos una jeringa. En una realización, la jeringa comprende depósitos separados para la solución del componente de polímero y la solución del componente de dendrímico. La jeringa puede comprender también una punta de mezclado que combina las dos soluciones cuando se presiona el émbolo. La punta de mezclado puede asegurarse de forma liberable a la jeringa (para posibilitar el intercambio de puntas de mezclado), la punta de mezclado puede comprender una mezcladora estática. En algunas realizaciones, los depósitos en la jeringa pueden tener diferentes tamaños o adaptarse a diferentes volúmenes de solución. En otras realizaciones, los depósitos en la jeringa pueden ser del mismo tamaño o adaptarse a los mismos volúmenes de solución. En una realización adicional, un depósito puede comprender la Parte 1 de la composición de espumación descrita anteriormente en este documento y un segundo depósito puede comprender la Parte 2 de la composición de espumación.

La **Figura 22** representa una realización de una jeringa **220**. La jeringa **220** incluye un cuerpo **221** con dos depósitos (**223, 224**). Una solución del componente de dendrímico se dispone en el primer depósito **223**, y una solución del componente de polímero se dispone en el segundo depósito **224**. Los dos depósitos (**223, 224**) se vacían apretando el émbolo **222**, que empuja los contenidos de los dos depósitos (**223, 224**) a la punta de mezclado **225** y fuera de la

jeringa **220**.

En una realización adicional, uno o más de los depósitos de la jeringa puede ser removible. En esta realización, el depósito removible puede reemplazarse con un depósito que contenga una solución del componente de polímero o una solución del componente de dendrímero de una concentración deseada.

En una realización preferida, el kit es estéril. Por ejemplo, los componentes del kit pueden envasarse juntos, por ejemplo una bandeja, bolsita y/o bolsa. El kit envasado puede esterilizarse usando técnicas conocidas tales como irradiación con haz de electrones, irradiación gamma, esterilización con óxido de etileno u otras técnicas adecuadas.

Ejemplos

Ejemplo 1 - *Ensayo preliminar de diversos tejidos*

La conjugación de microesferas fluorescentes recubiertas con aldehído (f-MS) se usó como sonda para la química superficial del tejido y proporcionar una base mecánica para la variabilidad en la mecánica del adhesivo. Esta técnica se describe en Artzi, N., et al. ADV. MATER. 21, 2009, 1-5.

La técnica se usa porque la tensión interfacial tejido-tejido se regula en su naturaleza con variaciones en la química de la superficie. Examinar estos cambios ayudó a explicar las interacciones tejido-formulación adhesiva y ayudó al desarrollo de las formulaciones adhesivas específicas para tejido.

En este ejemplo, se ensayaron tejidos de tres regiones del intestino delgado: yeyuno, duodeno e íleo. Estos tejidos se seleccionaron debido a las diferencias químicas derivadas de la fisiología del tracto gastrointestinal (GI). El espectro de contractilidad y peristalsia, pH, y química superficial a través del lecho de GI permiten una modulación profunda de la nutrición, inflamación, infección, etc. Se prepararon biopsias de cada tejido con la misma área superficial (20 mm²) y se sumergieron en 0,5 ml de soluciones de f-MS al 0,5 % durante 20 minutos en un balancín a 37 °C. Las muestras de tejido después se enjuagaron minuciosamente con 10 ml de PBS tres veces. Después del enjuagado, se midió la intensidad fluorescente en las superficies de las muestras de tejido. Se obtuvieron imágenes con un microscopio de fluorescencia para confirmar la presencia de f-MS. Se usó un filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC) para fluoresceína y de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) para yoduro de propidio (tinción de tejido)

En la **Figura 1** se muestra la fluorescencia normalizada de las f-MS sobre la superficie de cada muestra de tejido. Los tejidos de las tres regiones del intestino delgado tenían superficies con diferentes números de grupos amina, como se demuestra por la intensidad fluorescente variable de las f-MS conjugadas. En esta figura, un valor $p < 0,05$ se consideró que denotaba significación estadística.

Ejemplo 2 - *Fluorescencia interfacial de un adhesivo biocompatible*

La información relacionada con la química de la superficie del GI natural en el Ejemplo 1 se usó para crear formulaciones adhesivas que interactuaban diferenciadamente con tejidos específicos para crear formulaciones adhesivas que son sellantes de la pared del GI más eficaces. Las fugas del contenido intestinal es una complicación quirúrgica frecuente que puede dar como resultado infección local y sepsis sistémica, peritonitis y a menudo necesita reoperación. Se crearon formulaciones adhesivas haciendo coincidir la formulación adhesiva y las propiedades del tejido. Este ejemplo determinó que las diferencias en las superficies del tejido- en este caso, densidad de amina en el duodeno, yeyuno e íleon - afecta en las interacciones con las formulaciones adhesivas de contenido y densidades de aldehído variadas.

Para caracterizar la morfología de las formulaciones adhesivas en la interfaz tejido-adhesivo, el componente de dendrímero se marcó con fluoresceína. Esta técnica se describe en Artzi, N., et al. ADV. MATER. 21, 2009, 1-5. El dendrímero usado en este Ejemplo fue un dendrímero G5 con un 25 % de sus grupos superficiales que tienen aminas primarias en lugar de grupos hidroxilo. El dendrímero tenía un peso molecular de aproximadamente 30 kDalton.

El dendrímero se disolvió en 6 ml de dimetilsulfóxido, seguido de la adición de 0,030 g de ácido 6-(fluoresceína-5-carboxiamido)hexanoico (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008) y 12 µl de trietilamina. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. El sólido resultante después de la evaporación del disolvente se disolvió en 100 ml de agua, se dializó y se liofilizó. El dendrímero marcado con fluoresceína después se añadió a agua para crear una solución que tenía un 1 % del contenido de sólidos totales (12,5 %) en peso del dendrímero marcado con fluoresceína (GS-25-12.5).

Se creó una solución acuosa separada de dextrano. El dextrano, en este ejemplo tenía un peso molecular de aproximadamente 10 kDalton, y un 50 % de sus grupos hidroxilos se habían convertido en aldehídos. La solución acuosa contenía un 11,25 % en peso del dextrano (D10-50-11.25).

Las dos soluciones G5-25-12.5 y D10-50-11.25 se combinaron y se aplicaron a muestras separadas de tres tejidos de regiones diferentes del intestino delgado: yeyuno, duodeno e íleon. La combinación de soluciones se dejó curar durante 5 min.

5 Las muestras de tejido después se crioseccionaron (secciones de 20 μm) y se tiñeron con yoduro de propidio. La morfología del adhesivo en la interfaz tejido: adhesivo se cuantificó usando técnicas de análisis de imágenes (Leica Microsystems, MetaMorph[®]) para caracterizar el material transitorio entre la superficie del tejido y el grueso del material. La Figura 2 representa la fluorescencia interfacial del dendrímero marcado. Las diferencias en la fluorescencia normalizada demostraron que el dendrímero: dextrano (formulación G5-25-12.5:D10-50-11.25) tenía diferente reactividad con las tres superficies de tejido debido a las diferentes densidades de amina presentes en estos tejidos. En esta Figura, un valor $p < 0,05$ se consideró que denotaba significación estadística.

15 Para demostrar que el análisis f-MS predice con precisión la interacción de un tejido particular con el dendrímero: dextrano marcado (formulación G5-25-12.5:D10-50-11.25), la fluorescencia normalizada de la f-MS y la fluorescencia normalizada del dendrímero marcado se han representado y comparado como se muestra en la Figura 3. En esta figura, existe una correlación lineal entre la fluorescencia normalizada del dendrímero marcado (eje X) y la f-MS. Como resultado, la f-MS se usó como una herramienta para calibrar con precisión el comportamiento de diversas composiciones adhesivas cuando se aplicaron a diferentes tipos de tejido. La información obtenida de la f-MS puede usarse para determinar cómo deberían ajustarse el componente de dendrímero, el componente de polímero y/o las concentraciones de solución para compensar las características de variación de los diferentes tipos de tejido. Estos datos soportaron la notación que los grupos funcionales en los tejidos y en las formulaciones adhesivas influían en las interacciones del adhesivo mediadas por aldehído, proporcionando una base funcional para el diseño de adhesivo específico para el tejido. En este ejemplo, el ensayo con microesferas se correlacionó con una cuantificación mecánica de la resistencia a la adhesión medida en los ensayos de resistencia a la tracción descritos en este documento.

Ejemplo 3 - Efecto de la concentración de la solución del componente de polímero sobre la resistencia de adhesión

30 Se midió la resistencia de adhesión después de la aplicación de un adhesivo biocompatible a diversos tejidos con un ensayo de tracción uniaxial monotónico (Bose[®] Biodynamic Test Instrument, Minnetonka, MN, EE.UU.). En este ejemplo, se aplicaron tres formulaciones adhesivas a tres tejidos del intestino delgado. Las tres formulaciones adhesivas contenían la misma solución del componente de dendrímero: la solución G5-25-12.5 descrita en el Ejemplo 2. Cada solución del componente de polímero contenía diversas concentraciones de un dextrano (D10-50) con un peso molecular de 10 kDalton, y un 50 % de subgrupos hidroxilo convertidos en aldehídos. La primera solución del componente de polímero tenía una concentración de dextrano del 25 % en peso (D10-50-25), la segunda solución del componente de polímero tenía una concentración de dextrano del 15 % en peso (D10-50-15), y la tercera solución del componente de polímero tenía una concentración de dextrano del 11,25 % en peso (D10-50-11.25).

40 Cada solución de dextrano individual se combinó con un volumen igual de la solución de dendrímero para crear tres formulaciones: (1) D10-50-25:G5-25-12.5, (2) D10-50-15:G5-25-12.5, y (3) D10-50-11.25:G5-25-12.5. Se crearon elementos de ensayo de adhesivo distribuyendo uniformemente 200 μl de estas formulaciones adhesivas entre dos biopsias de tejido de tamaño uniforme (discos de 8 mm de diámetro, espesor del elemento de ensayo total de 1 mm). Las tres formulaciones se ensayaron en tres tejidos de regiones diversas del intestino delgado: íleon, yeyuno y duodeno. Las superficies del tejido se secaron suavemente antes de la aplicación de la formulación adhesiva.

50 Después de aplicar cada formulación entre las superficies de tejido y dejar 5 minutos para el curado, los elementos del ensayo de adhesivo se desplazaron a una velocidad constante de 0,05 mm/s, y la respuesta de carga se registró continuamente (200 mediciones/s). Las cargas registradas se normalizaron para tener en cuenta el área de la sección transversal del elemento de ensayo de adhesivo. En la Figura 4 se muestra la carga máxima (N) de cada formulación en cada tipo de tejido. En estos tres tejidos, aumentando la concentración de la solución de dextrano aumentaba la carga máxima. Por lo tanto, alterar la concentración de la solución del componente de polímero- en este ejemplo, una solución que contiene dextrano- puede compensar las diferentes estructuras y constitución química de los diversos tipos de tejidos. En esta figura, un valor $p < 0,05$ se consideró que denotaba una significación estadística.

60 También se ensayó la carga máxima (N) de tres formulaciones adicionales y su adhesión al yeyuno. Al igual que las formulaciones descritas anteriormente, cada una contenía una solución del componente de dendrímero de la misma concentración- en este caso, G5-25,12.5. Sin embargo, se usaron diferentes concentraciones del componente de polímero para preparar cada formulación: 7,5 % en peso, 9,375 % en peso, y 20 % en peso. Por lo tanto, las tres formulaciones adicionales fueron (4) D10-50-7.5:G5-25-12.5, (5) D10-50-9.375:G5-25-12.5, y (6) D10-50-20:G5-25-12.5.

65 En la **Figura 5** se muestran las cargas máximas (N) de estas tres formulaciones adicionales y las formulaciones descritas anteriormente. A medida que aumentaba la concentración de la solución del componente de polímero, la carga máxima (N) aumentaba. Este resultado ilustra adicionalmente cómo ajustar la concentración del componente

de polímero que puede usarse para compensar las diferencias entre los tejidos. En esta figura un valor $p < 0,05$ se consideró que denotaba una significación estadística. Se obtuvieron imágenes de las formulaciones adhesivas ensayadas en la **Figura 5** después de aplicarlas a tejidos del yeyuno. Las imágenes se obtuvieron marcando un 1 % del dendrímero con ácido 6-(fluoresceín-5-carboxiamido)hexanoico antes de aplicar la formulación al yeyuno. El yeyuno después se congeló con nitrógeno líquido y se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una noche. El tejido después se crioseccionó (secciones de $20\text{ }\mu\text{m}$) y se tiñó con yoduro de propidio. Se tomaron imágenes de microscopia de fluorescencia usando filtros de FITC (material, fluoresceína) y TRITC (tejido, yoduro de propidio). Las imágenes revelaron la interfaz entre los tejidos y las formulaciones adhesivas.

También se midió la fluorescencia en la interfaz entre el yeyuno y las formulaciones adhesivas de la **Figura 5**. Como se muestra en la **Figura 6**, la fluorescencia normalizada aumentaba a medida que la concentración de solución del componente de polímero- en este caso una solución de dextrano- aumentaba. Además de correlacionarse con la concentración de la solución del componente de polímero, la fluorescencia normalizada también se correlacionaba con la carga máxima de las formulaciones adhesivas aplicadas al yeyuno. Esta relación se ilustra en la **Figura 7**. Estas relaciones mostraron cómo pueden usarse las técnicas analíticas descritas en este documento para predecir y estimar los cambios que deberían hacerse a las formulaciones adhesivas para compensar un número de variables, incluyendo las características de los diferentes tipos de tejido. Estos ensayos también permiten determinar cómo el estado de una enfermedad y su gravedad pueden alterar el número y la funcionalidad de los grupos químicos en las superficies del tejido.

Ejemplo 4 - Biocompatibilidad de diversas formulaciones adhesivas

La biocompatibilidad de tres de las formulaciones adhesivas descritas en el Ejemplo 3 se ensayó usando fibroblastos 3T3. Las tres formulaciones adhesivas fueron (a) D10-50-7.5:G5-25-12.5, (b) D10-50-15:G5-25-12.5, y (c) D10-50-25:G5-25-12.5. Se midió la supervivencia celular después de 1 día, 1 semana y 1 mes.

Los discos adhesivos de 5 mm de diámetro se mantuvieron en 5 ml de medio a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 día, 1 semana y 1 mes. A cada intervalo, se incubaron 100k fibroblastos 3T3 durante 24 horas en 1 ml de medio que contenía los productos de degradación de los discos. Después de 24 horas, se midió la muerte celular usando un ensayo de integridad de membrana CytotoxONE (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.), y el número de células muertas se normalizó al número total de células tanto vivas como muertas. El número de células vivas se determinó tripsinizando y contando las células. Como se muestra en la **Figura 8**, el ensayo de biocompatibilidad mostró una supervivencia celular muy alta. Las imágenes de las formulaciones adhesivas implantadas en el tejido de ratones también mostraron buena biocompatibilidad.

Análogamente, las **Figuras 9 y 10** representan hallazgos histopatológicos pertinentes de diversas formulaciones adhesivas. En este ensayo, se tiñeron secciones de tejido de $15\text{ }\mu\text{m}$ con Hematoxilina y Eosina para puntuación semicuantitativa (es decir, 1 = mínimo, 2 = moderado, 3 = grave) de los parámetros pertinentes (por ejemplo inflamación, fibrosis, células gigantes, etc.) para cada grupo de dosis por punto temporal.

Ejemplo 5 - Comparación de los tiempos de gelificación para diversas formulaciones adhesivas

Los tiempos de gelificación para diversas formulaciones adhesivas descritas en este documento se compararon entre sí y con los adhesivos preparados usando polietilenglicol (PEG) amina y dextrano. El tiempo de gelificación en este ejemplo es el tiempo requerido por los dos componentes para formar un hidrogel adhesivo que es indicativo de la densidad de reticulación y la rigidez.

Para este ensayo se produjeron seis formulaciones adhesivas diferentes, como se describen en este documento. Cada formulación adhesiva consistía en una combinación de G5-25-20 (que es una solución acuosa al 20 % en peso de un dendrímero G5 con 25 % de sus grupos superficiales que tienen aminas primarias en lugar de grupos hidroxilo) y diversas concentraciones de una solución acuosa de D10-50, que es un dextrano de 10 kDalton con 50 % de sus grupos hidroxilo reemplazados con aldehídos. Las concentraciones, en porcentaje en peso de las soluciones de D10-50 fueron 4, 5, 7,5, 10, 15 y 25. Como se muestra en la **Figura 11**, los tiempos de gelificación para las composiciones adhesivas con solución del componente de polímero con concentraciones de 10, 15 y 25 % eran muy similares y mucho más cortos que los tiempos de gelificación para las composiciones adhesivas con concentraciones de solución del componente de polímero de 4, 5 y 7,5 % en peso.

La **Figura 11** incluye también los tiempos de gelificación de diversos adhesivos que contienen PEG amina y dextrano (D10-50). La PEG amina en este ejemplo era un polímero de ocho brazos con aminas primarias en el extremo de cada brazo, y un peso molecular de 10 kDalton. Una solución acuosa al 6,67 % en peso de PEG amina - denominada en este ejemplo como P8-10-6.67- se combinó con soluciones de dextrano de las siguientes concentraciones: 4, 5, 10, 15 y 25 % en peso. Los tiempos de gelificación de estos seis adhesivos de PEG se representan en la **Figura 11**. Para fines de comparación todas las formulaciones adhesivas comparadas en la **Figura 11** se formularon de manera que cada una tenía el mismo número de moléculas de PEG amina o moléculas de dendrímero.

Como se muestra en la **Figura 11**, los tiempos de gelificación de las formulaciones adhesivas que contienen dendrímero eran más rápidos que aquellos de los adhesivos de PEG amina a una concentración elevada de dextrano. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, esta discrepancia puede estar provocada por los bajos impedimentos estéricos del componente de dendrímero de las formulaciones adhesivas descritas en este documento; por lo tanto, es más probable que ocurra la reacción entre el componente de dendrímero y el dextrano que la reacción entre la PEG amina y el dextrano.

La carga máxima de los adhesivos de la **Figura 11** se representa en la **Figura 12**. Con la excepción de las formulaciones adhesivas que contienen una solución de dextrano al 5 % en peso, las formulaciones adhesivas que contienen dendrímero tenían una mayor carga máxima.

Ejemplo 6 - Comparación de formulaciones adhesivas que contienen dendrímeros con aquellas que contienen PEG amina de diferentes pesos moleculares

En el Ejemplo 5, el componente de dendrímero era un dendrímero con aminas primarias sobre el 25 % de sus grupos superficiales en lugar de grupos hidroxilo, y un peso molecular de 30 kDalton. En contraste, la PEG amina usada en las otras formulaciones adhesivas del Ejemplo 5 tenía un peso molecular de 10 kDalton. Para ensayar los efectos del peso molecular de la PEG amina, se produjeron una serie de PEG aminas que contenían adhesivo con diferentes pesos moleculares. Aunque los pesos moleculares diferían, cada adhesivo contenía el mismo número de moléculas de PEG amina.

Específicamente, se usaron tres componentes de PEG amina diferentes para formular quince adhesivos combinando tres componentes de PEG amina con soluciones de dextrano que tenían concentraciones de 5, 7,5, 10, 15 y 25 % en peso. Los tres componentes de PEG amina diferentes tenía cada uno ocho brazos (P8) y consistía en una solución al 6,67 % en peso de una PEG amina de 10 kDalton, una solución al 13,34 % en peso de una PEG amina de 20 kDalton y una solución al 26,68 % en peso de una PEG amina de 40 kDalton.

La **Figura 13** representa los tiempos de gelificación de estos quince adhesivos junto con los tiempos de gelificación para formulaciones adhesivas preparadas combinando cada solución de dextrano con una solución al 20 % de un dendrímero G5 de 30 kDalton que tiene aminas primarias sobre un 25 % de sus grupos superficiales en lugar de grupos hidroxilo. A medida que aumenta el peso molecular del PEG en el adhesivo de PEG amina, el tiempo de gelificación del adhesivo de PEG amina se hace más similar al de las formulaciones adhesivas que contienen dendrímero descritas en este documento. Los adhesivos de PEG amina de 20 kDalton y 40 kDalton tenían aproximadamente los mismos tiempos de gelificación, que eran muchos menores que el tiempo de gelificación para la PEG amina de 10 kDalton. Sin desear queda ligado a teoría particular alguna, se cree que esta diferencia está causada por las diferencias en los impedimentos estéricos: las PEG aminas con mayores pesos moleculares tienen menores impedimentos estéricos y, como resultado, es más probable que reaccionen con los otros componentes.

Aunque los adhesivos de PEG amina de 20 kDalton y 40 kDalton tenían tiempos de gelificación más rápidos que el adhesivo de PEG amina de 10 kDalton, la carga máxima manipulada por el adhesivo de PEG amina de 10 kDalton era mucho mayor que las cargas máximas de los adhesivos de PEG amina de 20 kDalton y 40 kDalton. Sin desear queda ligado a teoría particular alguna, esto puede relacionarse con la competición en la reacción entre los aldehídos en el dextrano con las aminas en el tejido y las aminas en la PEG amina. La **Figura 14** representa estos resultados.

Ejemplo 7 - Modelo de enfermedad - Inducción de colitis

Se diseñó un modelo de enfermedad basado en colitis. Para desarrollar el modelo, se estudiaron las diferencias en la densidad de amina de colon sano y enfermo. Los experimentos indicaron si la superficie del tejido se modificó por inducción de la inflamación o en qué extensión esta afectaba a la resistencia de adhesión y cohesión de la formulación adhesiva que contiene dendrímero.

Para el modelo enfermo, se instiló ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNBS) a una concentración de 80 mg/ml. Después de 24 horas, los conejos se sacrificaron por eutanasia y el colon se recogió, se limpió y se incubó durante 20 minutos en una solución de microesferas recubiertas con aldehído al 0,5 %. Los tejidos se congelaron, se crioseccionaron y se tiñeron con yoduro de propidio. La intensidad de la microesferas se cuantificó por microscopía de fluorescencia.

Las imágenes del microscopio de fluorescencia mostraron que el modelo sano tenía una mayor densidad de amina y una mayor distribución a lo largo de la superficie. Las tinciones con hematoxilina y eosina (H y E) de los tejidos crioseccionados sanos y enfermos demostraron una alteración en la morfología de la superficie luminal, evidenciada por la hiperplasia y engrosamiento del colon con infiltrados celulares. La química de la capa serosa también se vio afectada, como evidencia la alteración de la intensidad de f-MS y continuidad a lo largo del colon en el estado enfermo, es decir, había menos grupos amina presentes en la superficie. La **Figura 15** muestra la distribución de la intensidad de las microesferas en los modelos sano y enfermo. La **Figura 16** muestra la intensidad promedio de las microesferas aplicadas a tejidos sanos y enfermos (colitis). Este gráfico muestra que la intensidad de fluorescencia

promedio de las microesferas y, por tanto, la adhesión de las formulaciones adhesivas que contienen dendrímero al tejido, cayó drásticamente (más del 60 %) cuando el tejido estaba inflamado.

5 En este modelo, la reducción en la densidad de amina afectó a la interacción entre el tejido y la formulación adhesiva, y la resistencia de adhesión. Más específicamente, en este ejemplo particular, la colitis dio como resultado una conjugación de f-MS menor a los tejidos, como se pone de manifiesto por la intensidad de fluorescencia inferior en la superficie del tejido y la menor cobertura de superficie, como se muestra en la **Figura 17**. La menor cobertura de superficie, en este ejemplo, ocurrió en áreas aisladas y alteró la cobertura de superficie continua observada en el estado sano. Por lo tanto, las concentraciones de las soluciones de componente o las cantidades de los componentes administrados pueden ajustarse para compensar esta característica del tejido enfermo. Pueden diseñarse formulaciones de material específicas para abordar la alteración inducida por enfermedad de la química de la superficie del tejido. Específicamente, en ciertas realizaciones, una formulación que contiene una alta cantidad de concentración del componente de polímero puede administrarse para compensar el menor número de aminas sobre la superficie de tejido enfermo, mejorando de esta manera el rendimiento de reacción, mejorando la adhesión o ambos.

Ejemplo 8 - Modelo de enfermedad - Cáncer

20 Los análisis en el Ejemplo 7 también se realizaron sobre tejido canceroso a partir de colon de ratas. En el modelo de cáncer, el tejido enfermo tenía una cobertura de superficie de tejido f-MS mayor que el tejido sano, como se muestra en la **Figura 18**. Los resultados opuestos producidos por el modelo de colitis (Ejemplo 7) y el modelo de cáncer indicaron la importancia de afinar la formulación adhesiva como se describe en este documento para compensar la alteración de tejido inducida por la enfermedad. En la **Figura 19** se muestra una comparación más minuciosa de las diferencias en intensidad f-MS en el modelo de colitis (Ejemplo 7) y el modelo de cáncer. La **Figura 19** muestra que el tejido de colon inflamado a partir del modelo de colitis (Ejemplo 7) tenía una cobertura de la superficie de tejido inferior de f-MS en comparación con el tejido canceroso en el modelo de cáncer.

Ejemplo 9 - Respuesta del tejido a la formulación adhesiva - Modelo de colitis

30 La respuesta global del tejido a una formulación adhesiva se determinó recogiendo una serie de puntuaciones histológicas que indicaron la gravedad de la inflamación, heterófilos séricos (en la interfaz con el material indicando la respuesta del material), y la fibrosis serosa (que indica curación). La formulación adhesiva usada en este ejemplo incluía D10-50-15 y G5-25-20. Se recogieron las puntuaciones histológicas para los 6 grupos de tejidos de colon mostrados en la **Tabla 1**. En cada uno de los grupos que contenían incisiones, las incisiones se suturaron. Se recogieron también fotomicrografías de las secciones teñidas H y E y se explican en la **Tabla 1**. Las muestras de tejidos se recogieron de una manera similar al proceso del Ejemplo 7.

Tabla 1 - Grupos de Tejido de Colon

Grupo Nº	Descripción	Fotomicrografía
I	Grupo de control sano - sin incisión, sin formulación adhesiva	El colon parecía normal.
II	Grupo de control de colitis, sin incisión, sin formulación adhesiva	La mucosa colónica era difusamente necrótica con una respuesta inflamatoria heterofílica intensa.
III	Colon sano - con incisión, sin formulación adhesiva	Aumento moderado en el número de células inflamatorias en la mucosa; respuesta inflamatoria heterofílica moderada, predominantemente en asociación con el material sutura; se ven inflamación moderada y fibrosis a lo largo de la superficie serosa en asociación con el sitio de incisión/material de sutura.
IV	Colon con colitis - con incisión, sin formulación adhesiva	La mucosa colónica era difusamente necrótica con una respuesta inflamatoria heterofílica intensa que se extendía desde la superficie de la mucosa, rodeaba el material de sutura y se infiltraba en profundidad en la superficie serosa, donde había fibrosis asociada.
V	Colon sano - con incisión, con formulación adhesiva	Inflamación moderada y fibrosis en la interfaz entre el material sérico y el adhesivo.
VI	Colon con colitis - con incisión, con formulación adhesiva	Era visible una pequeña porción de mucosa relativamente normal; el resto de la pared colónica era necrótica, con una respuesta inflamatoria heterofílica intensa que se extendía desde la superficie de la mucosa, rodeaba el material de sutura y se infiltraba en profundidad en la superficie serosa, rodeando el material adhesivo.

La **Figura 20** muestra las puntuaciones histológicas recogidas de los tejidos de los Grupos I-VI. En los tejidos sanos (Grupos I, III y V), la inflamación en el Grupo V era menor que la inflamación en el Grupo III. Por lo tanto, en este ensayo, la inflamación de tejidos sanos con una incisión se redujo tras la aplicación del adhesivo. En los tejidos sanos, las respuestas de curación fueron similares se hubiera aplicado o no formulación adhesiva, y no hubo evidencia de ninguna respuesta adversa a la formulación adhesiva.

En los tejidos enfermos (Grupos II, IV y V), la inflamación global fue mayor que en los tejidos sanos. Sin embargo, se observó que la aplicación de la formulación adhesiva aumentaba la respuesta inflamatoria en la interfaz entre el tejido y la formulación adhesiva. Además, en este ensayo particular, la aplicación de la formulación adhesiva a los tejidos enfermos aumentó la fibrosis serosa- es decir, potenció la curación de los tejidos.

Tanto los heterófilos séricos como la fibrosis serosa se vieron afectados por el estado del tejido (enfermo o sano), lo que demuestra adicionalmente la importancia en ciertos casos de afinar la formulaciones adhesivas en vista de las condiciones microambientales específicas.

Ejemplo 10 - Respuesta del tejido a la formulación adhesiva - Modelo de cáncer

Los análisis en el Ejemplo 9 se realizaron también sobre tejidos cancerosos. Como en el Ejemplo 9, la formulación adhesiva usada en este ejemplo incluía D10-50-15 y G5-25-20. La respuesta global del tejido a la formulación adhesiva se determinó recogiendo una serie de puntuaciones histológicas que indicaban la gravedad de la inflamación, heterófilos séricos (en la interfaz con el material indicando la respuesta del material) y fibrosis serosa (que indica curación). Las puntuaciones histológicas se recogieron para los 6 grupos de tejidos mostrados en la **Tabla 2**. En cada uno de los grupos que contenían incisiones, las incisiones se suturaron. Se recogieron también fotomicrografías de secciones teñidas con H y E y se explican en la **Tabla 2**. Las muestras de tejido se recogieron de una manera similar al proceso del Ejemplo 8.

Tabla 2 - Grupo de Tejidos con Cáncer

Grupo Nº	Descripción	Fotomicrografía
VII.	Grupo de control sano - sin incisión, sin formulación adhesiva	El colon parecía normal
VIII.	Grupo de control con cáncer - sin incisión, sin formulación adhesiva	Epitelio displásico, caracterizado por aglomeración nuclear e hiper cromatismo, indicando el sitio del tumor.
IX.	Colon sano - con incisión, sin formulación adhesiva	Aumento moderado en el número de células inflamatorias en la mucosa; se observaron inflamación moderada y fibrosis a lo largo de la superficie serosa en asociación con el sitio de incisión/material de sutura.
X.	Colon con cáncer - con incisión, sin formulación adhesiva	La mucosa colónica mostró respuesta inflamatoria heterofílica rodeando el material de sutura, y se infiltra a la superficie serosa, donde había fibrosis asociada.
XI.	Colon sano - con incisión, con formulación adhesiva	Se observó inflamación de la mucosa coalescente y fibrosis en la interfaz entre el material seroso y adhesivo, especialmente cerca del material de sutura.
XII.	Colon con cáncer - con incisión, con formulación adhesiva	Era visible una pequeña porción de mucosa relativamente normal, la aglomeración nuclear mostró formación de tumor; el resto de la pared colónica mostró una mezcla de respuesta inflamatoria neutrófila y tejido fibroso.

La **Figura 21** muestra las puntuaciones histológicas recogidas de los tejidos de los Grupos VII-XII. La inflamación global y la inflamación en superficie fueron similares en los estados sano (Grupos VII, IX y XI) y enfermo (Grupos VIII, X y XII). De forma similar al modelo de colitis (Ejemplo 8), la adición de formulación adhesiva confirió curación a los tejidos cancerosos según se demuestra por la elevación de los heterófilos en superficie.

REIVINDICACIONES

1. Un kit para preparar un adhesivo, que comprende:
 - 5 una primera parte que incluye una primera solución que comprende un componente de polímero, en la que el componente de polímero comprende un polímero que tiene uno o más grupos aldehído; una segunda parte que incluye una segunda solución que comprende un componente de dendrímero, en la que el componente de dendrímero comprende un dendrímero que tiene al menos dos ramas con uno más grupos superficiales, en donde menos del 75 % de los grupos superficiales comprende al menos una amina primaria o
 - 10 secundaria.
 2. El kit de la reivindicación 1, que comprende además una jeringa, en el que la primera y segunda soluciones se almacenan en la jeringa.
 - 15 3. El kit de la reivindicación 2, en el que la jeringa comprende depósitos separados para la primera solución y la segunda solución.
 4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la jeringa comprende una punta de mezclado.
 - 20 5. El kit de la reivindicación 1, que comprende además instrucciones para seleccionar una concentración apropiada de al menos una de la primera solución o de la segunda solución para compensar las características de uno o más tejidos biológicos.
 6. El kit de la reivindicación 1, en el que el componente de dendrímero, el componente de polímero o ambos
 - 25 componentes, comprenden un fármaco.
 7. El kit de la reivindicación 1, en el que el componente de dendrímero, el componente de polímero o ambos componentes comprenden células madre u otras células.
 - 30 8. Un método para preparar un adhesivo, comprendiendo el método:
 - proporcionar una primera solución que comprende un componente de polímero, en el que el componente de polímero comprende un polímero que tiene uno o más grupos aldehído;
 - 35 proporcionar una segunda solución que comprende un componente de dendrímero, en el que el componente de dendrímero comprende un dendrímero que tiene al menos dos ramas con uno o más grupos superficiales, en el que al menos el 75 % de los grupos superficiales comprenden al menos una amina primaria o secundaria;
 - y
 - combinar la primera y segunda soluciones entre sí en una punta de mezclado para producir un adhesivo.
 - 40 9. El método de la reivindicación 8, en el que el polímero es un dextrano.
 10. El método de la reivindicación 9, en el que aproximadamente el 50 % de los grupos hidroxilo del dextrano son aldehídos.
 - 45 11. El método de la reivindicación 8, en el que el dendrímero tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000 Da.
 12. El método de la reivindicación 8, en el que el dendrímero es un dendrímero de generación 5 que tiene aminas primarias sobre aproximadamente el 25 % de los grupos superficiales del dendrímero.
 - 50 13. El método de la reivindicación 8, en el que el componente de dendrímero, el componente de polímero o ambos comprenden adicionalmente un aditivo seleccionado del grupo que consiste en agentes de espumación, modificadores del pH, espesantes, agentes antimicrobianos, colorantes, tensioactivos y agentes radioopacos.
 - 55 14. Una composición de administración de fármaco que comprende:
 - un componente de polímero, en el que el componente de polímero comprende un polímero que tiene uno o más grupos aldehído;
 - un componente de dendrímero, en el que el componente de dendrímero comprende un dendrímero que tiene al
 - 60 menos dos ramas con uno o más grupos superficiales, en el que menos del 75 % de los grupos superficiales comprende al menos una amina primaria o secundaria;
 - al menos un fármaco combinado con al menos uno del componente de polímero y el componente de dendrímero.
 - 65 15. La composición de la reivindicación 14, en la que los componentes de polímero y dendrímero están en una combinación eficaz para que la composición se adhiera a un tejido biológico.

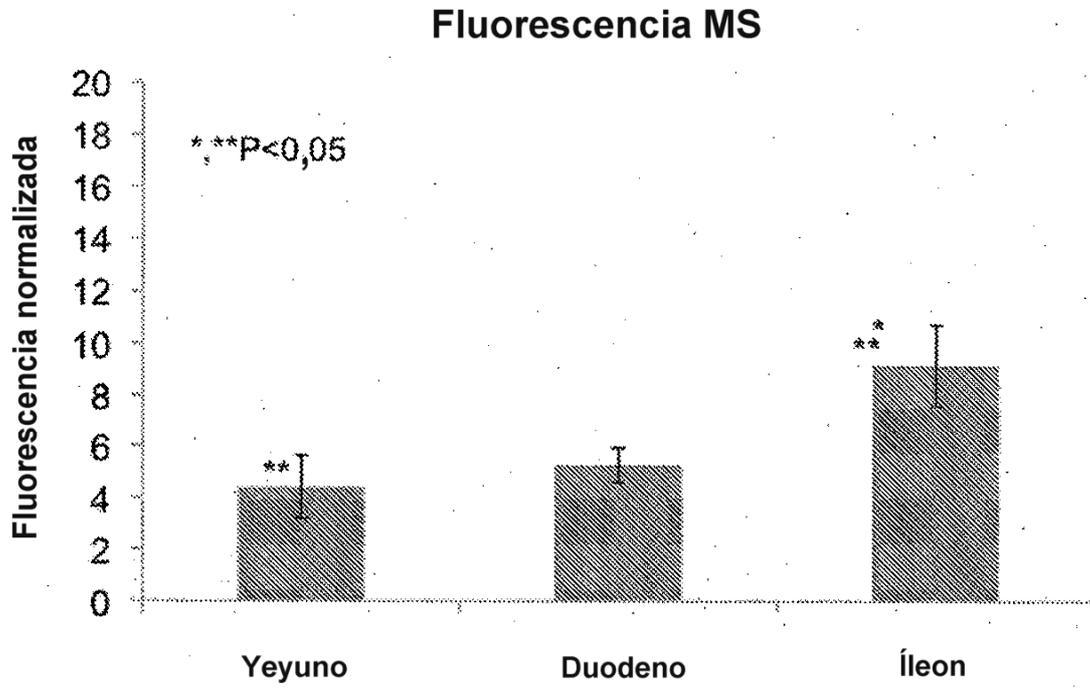


Fig. 1

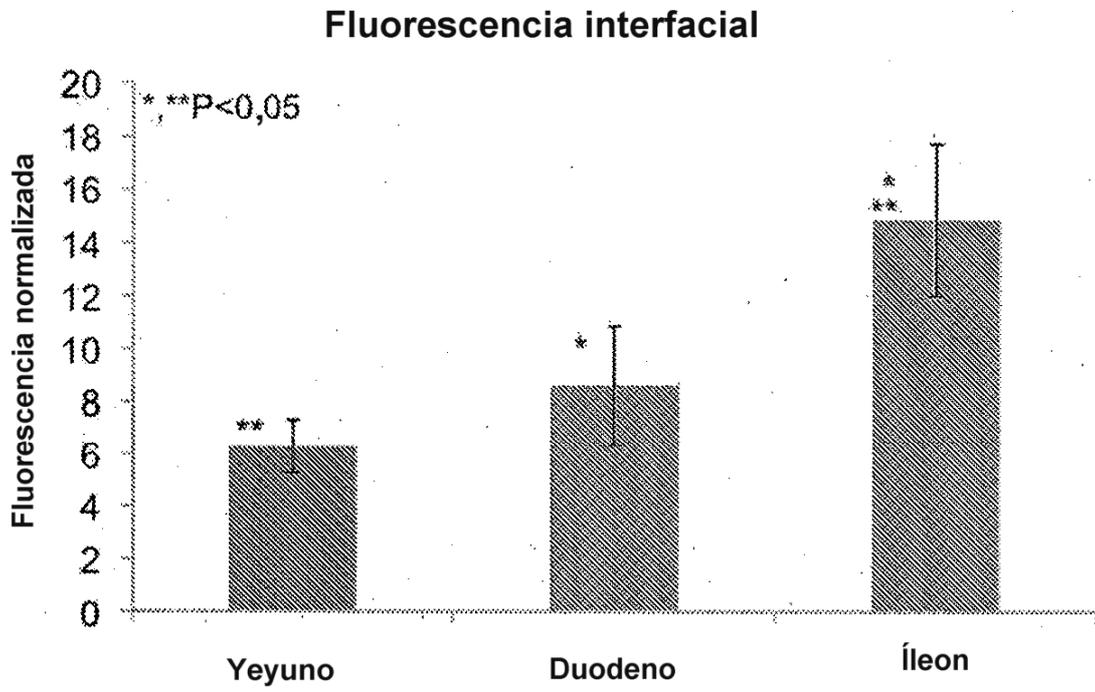


Fig. 2

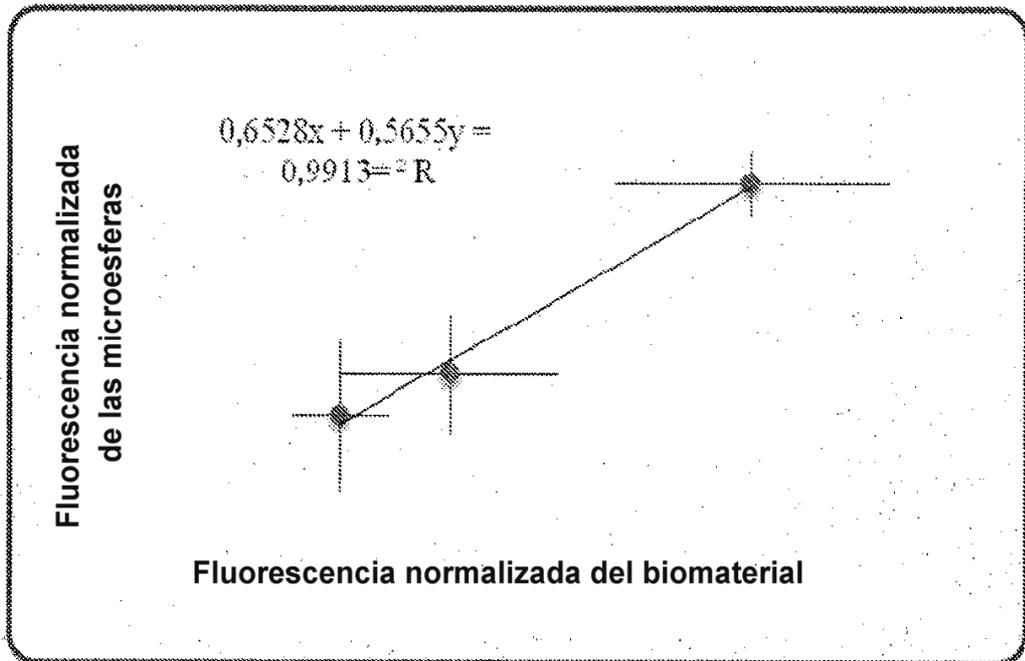


Fig. 3

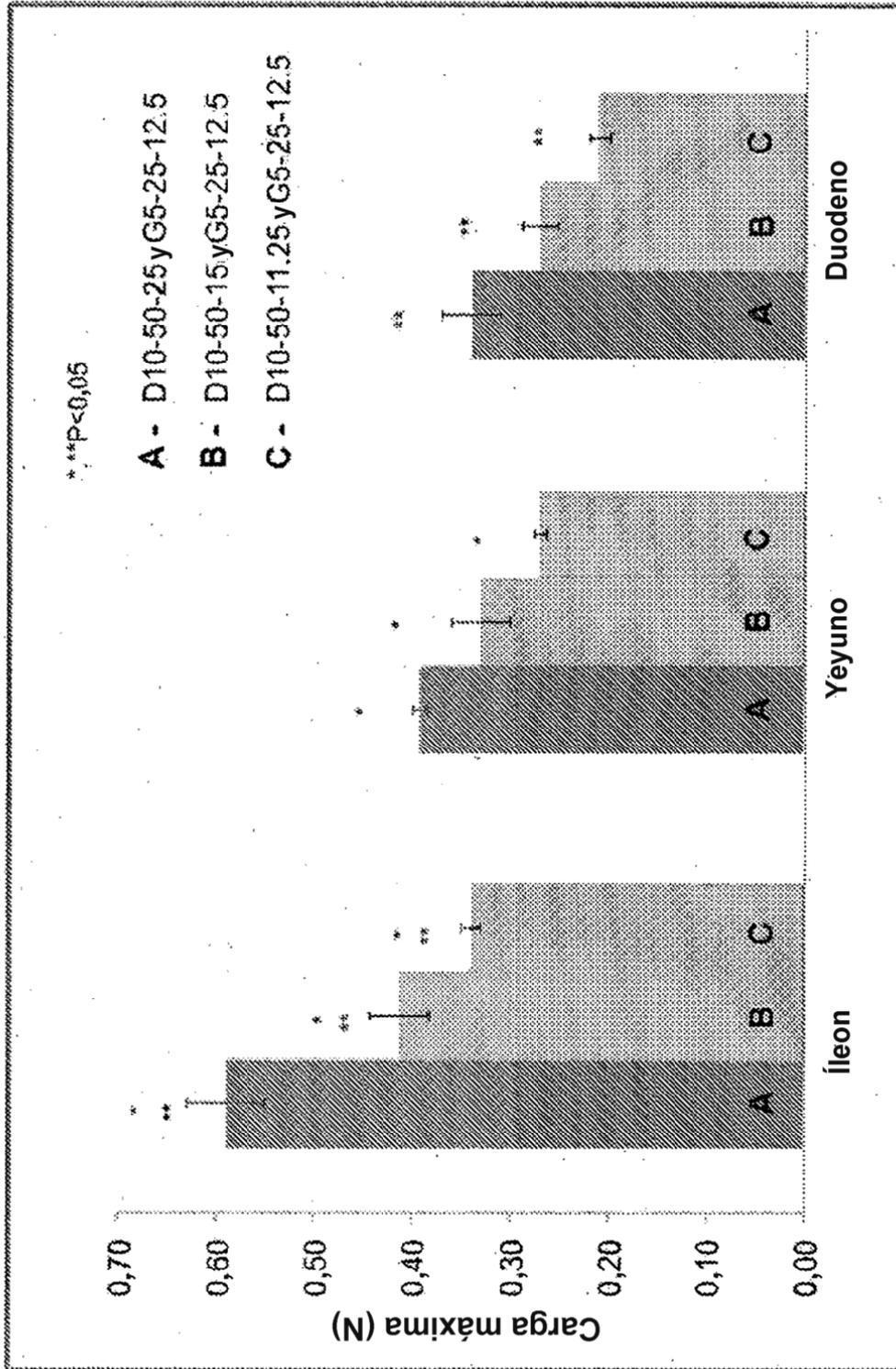


Fig. 4

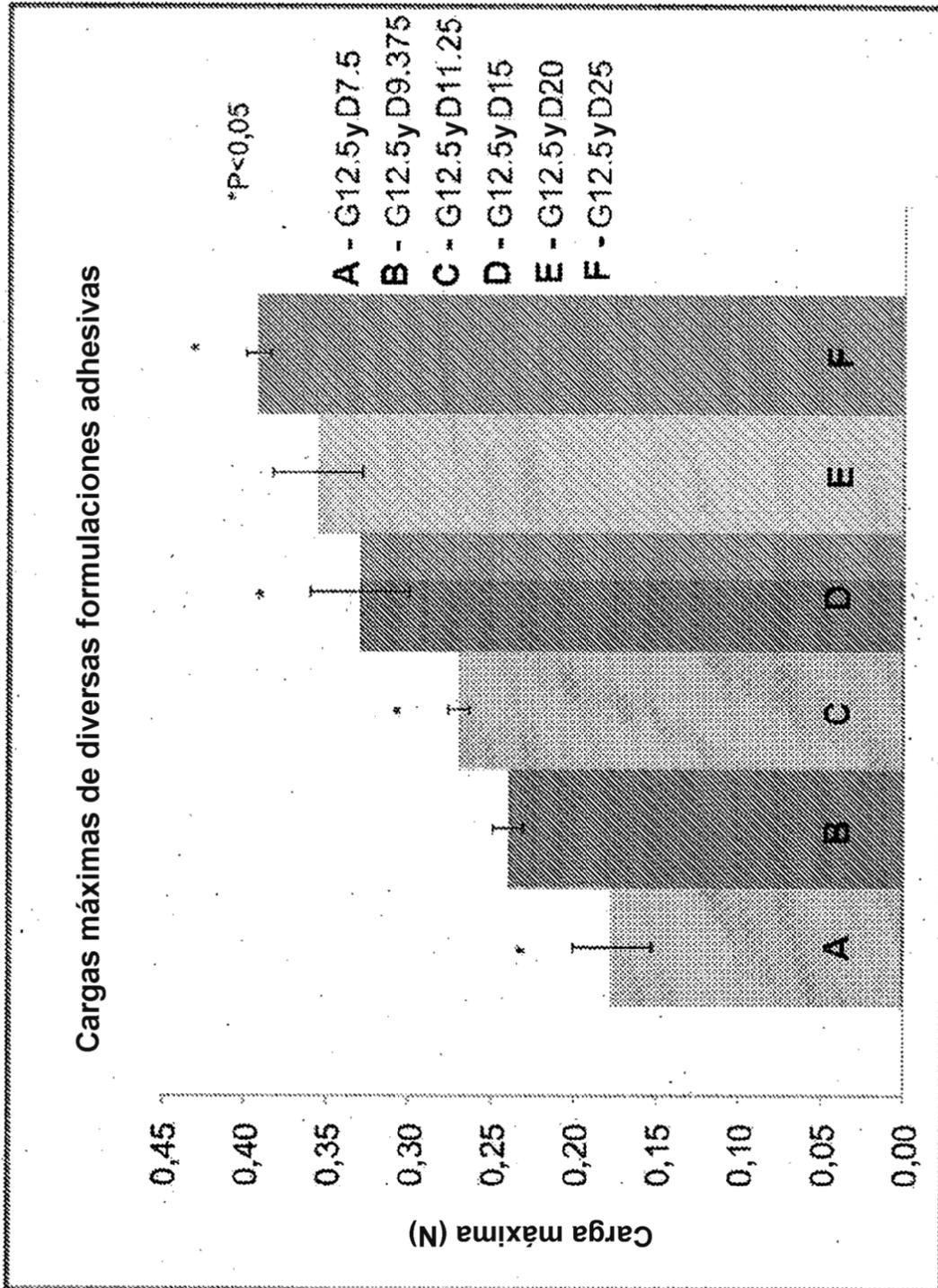


Fig. 5

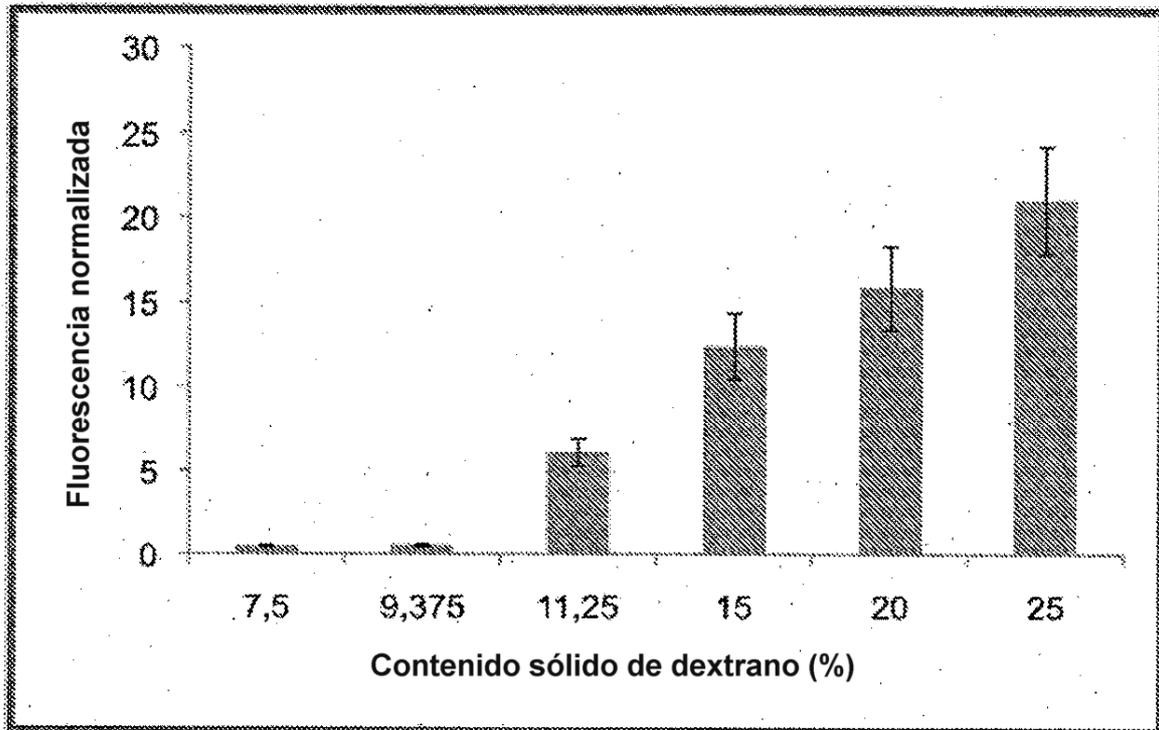


Fig. 6

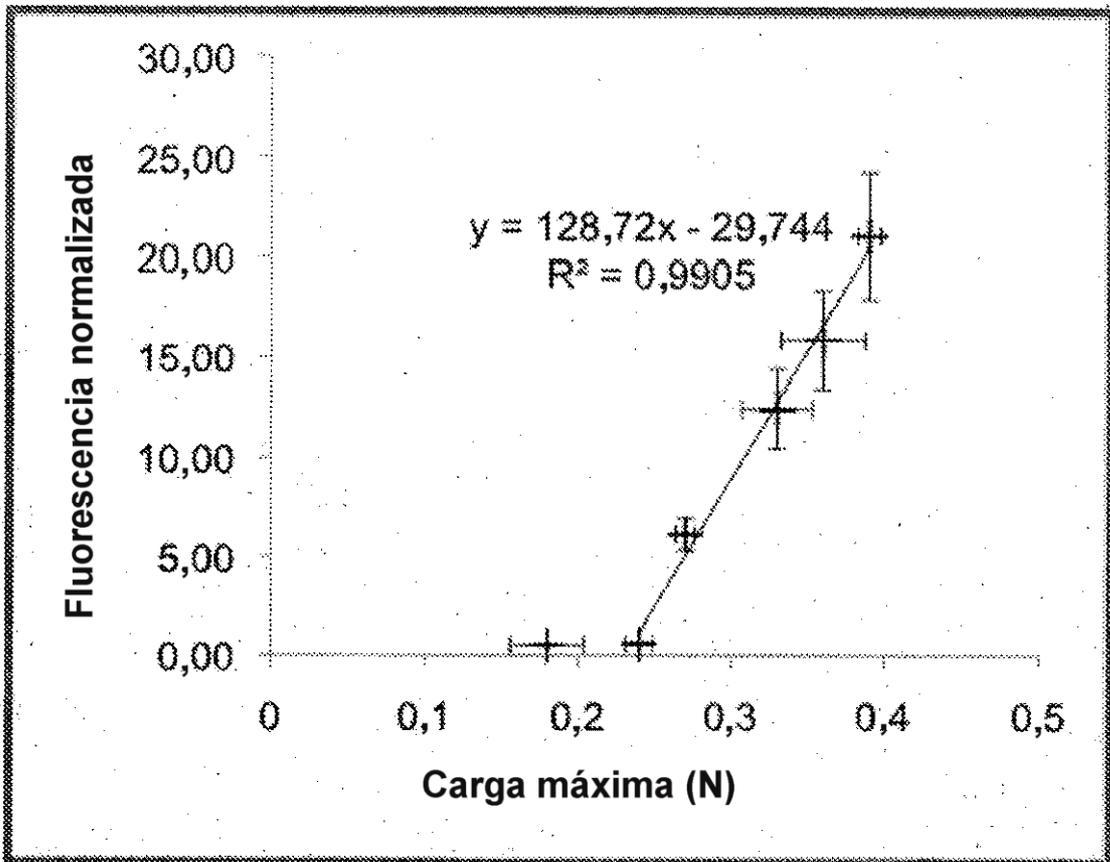


Fig. 7

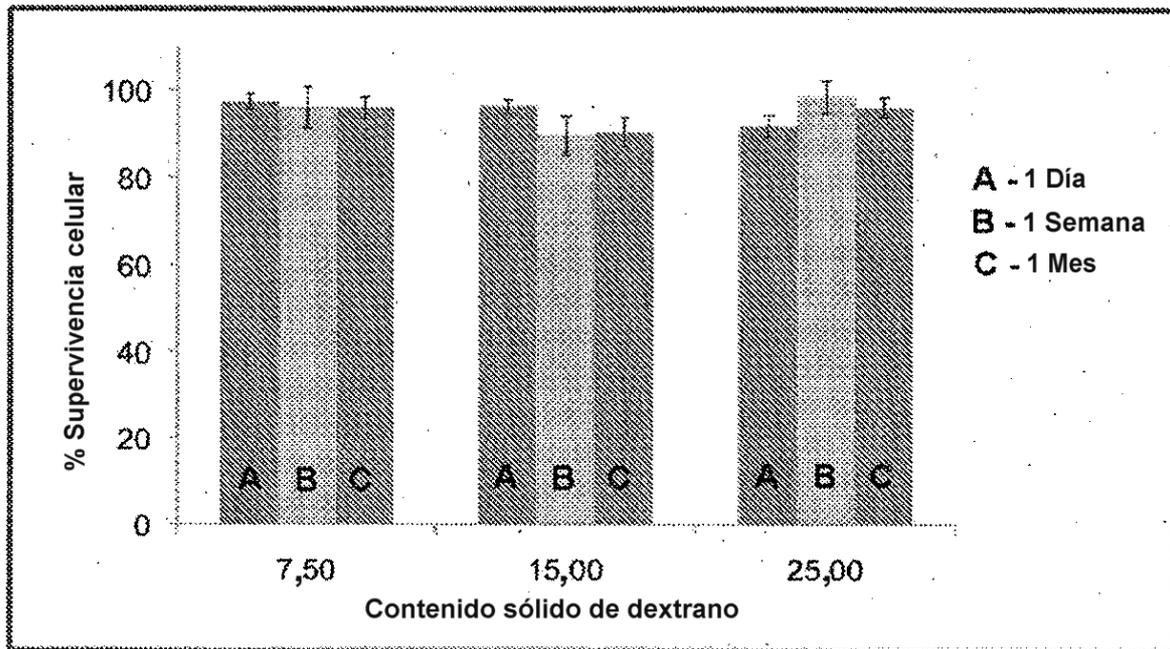


Fig. 8

Hallazgos histopatológicos pertinentes

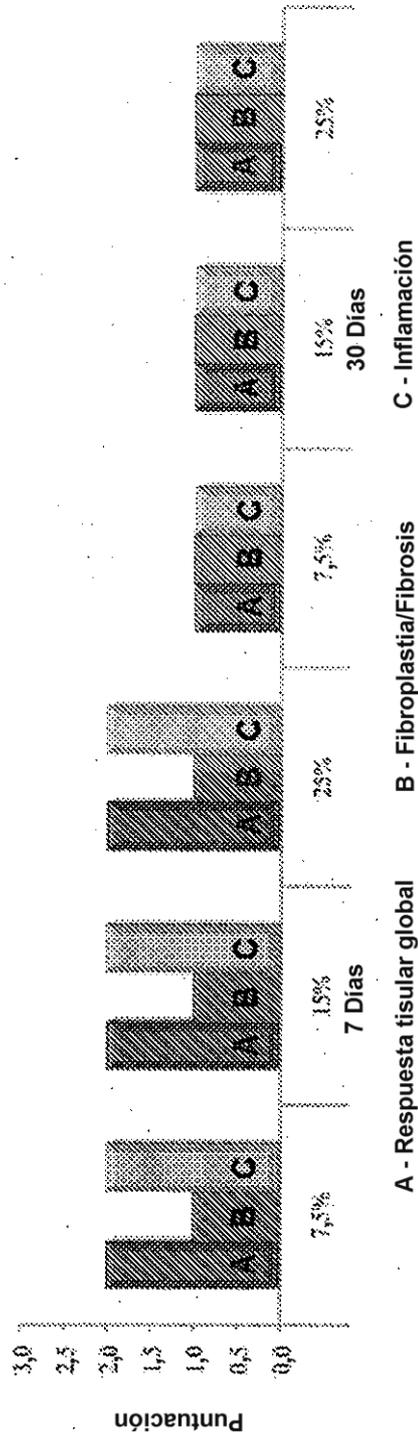


Fig. 9

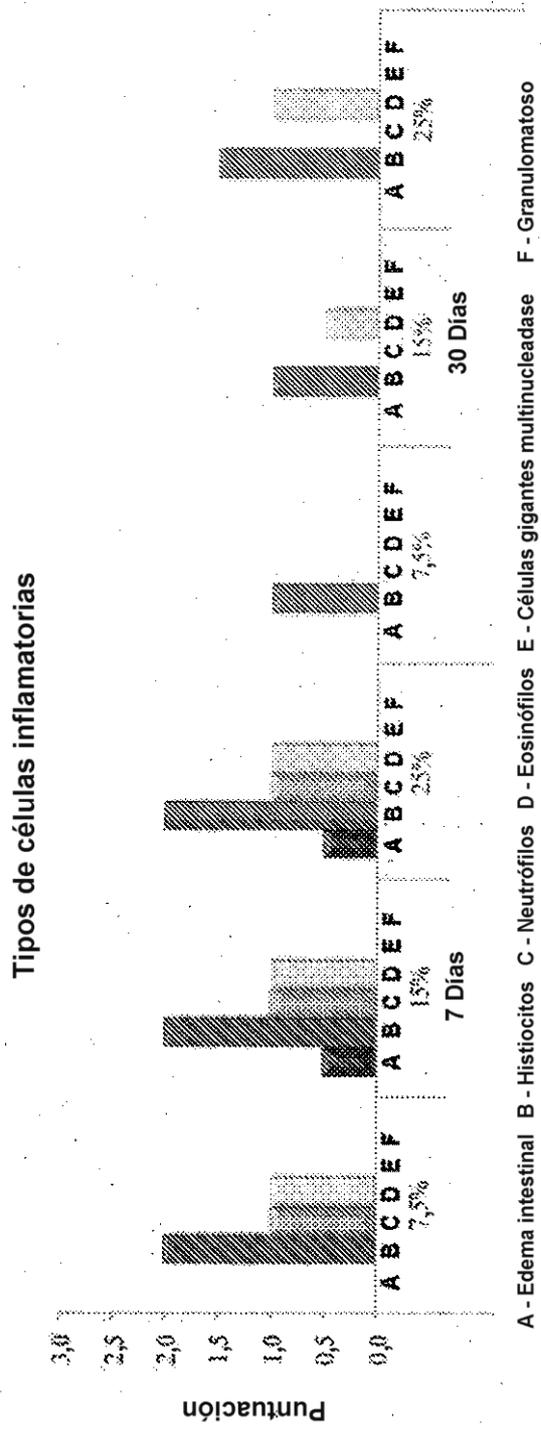


Fig. 10

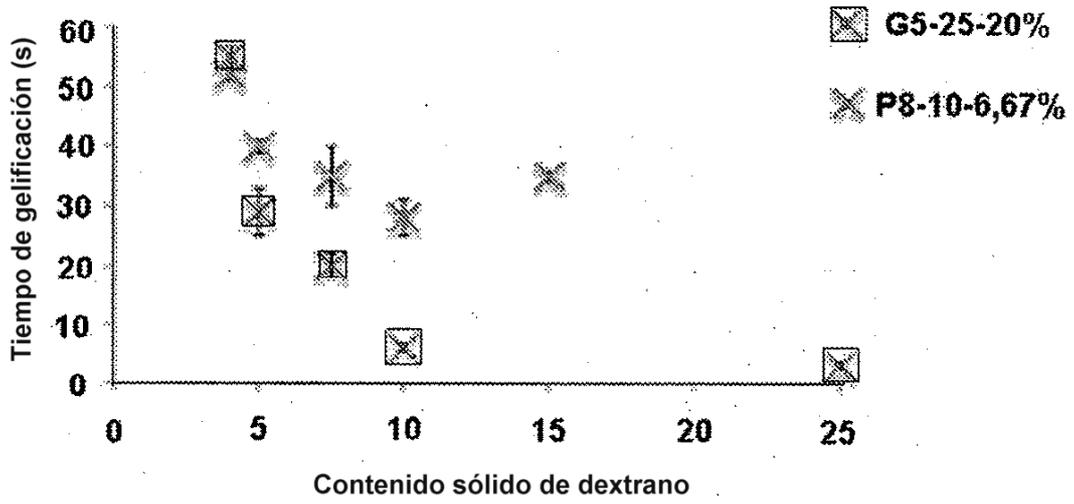


Fig. 11

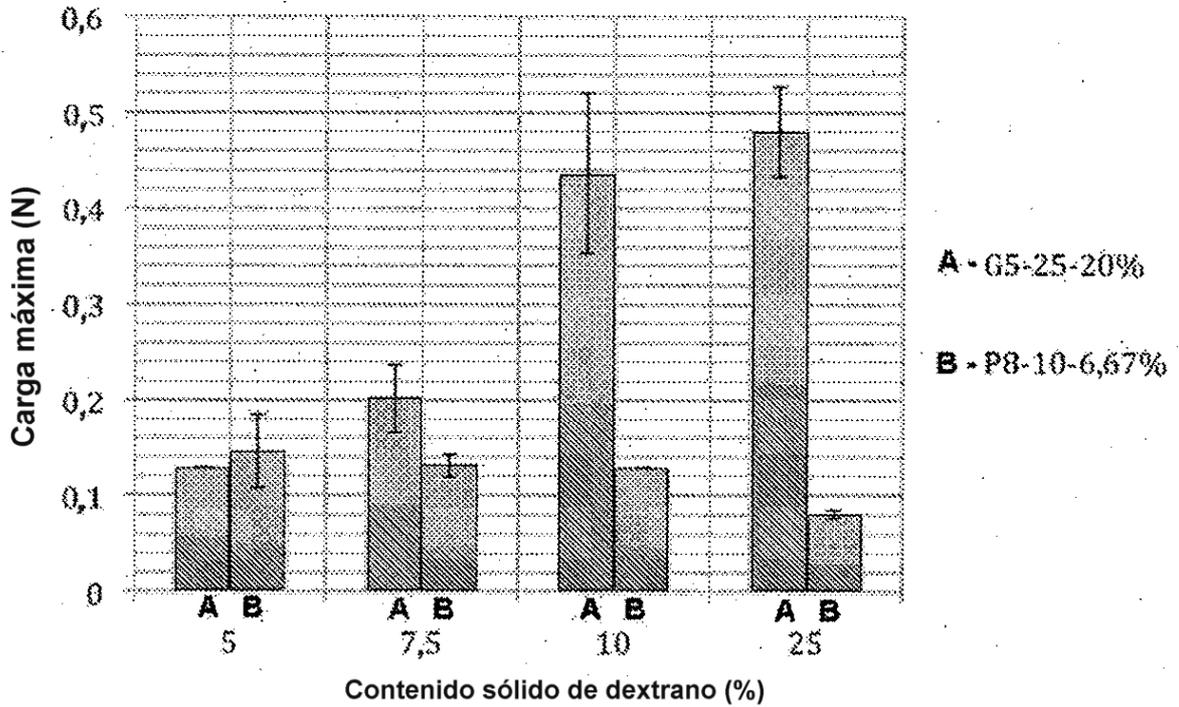


Fig. 12

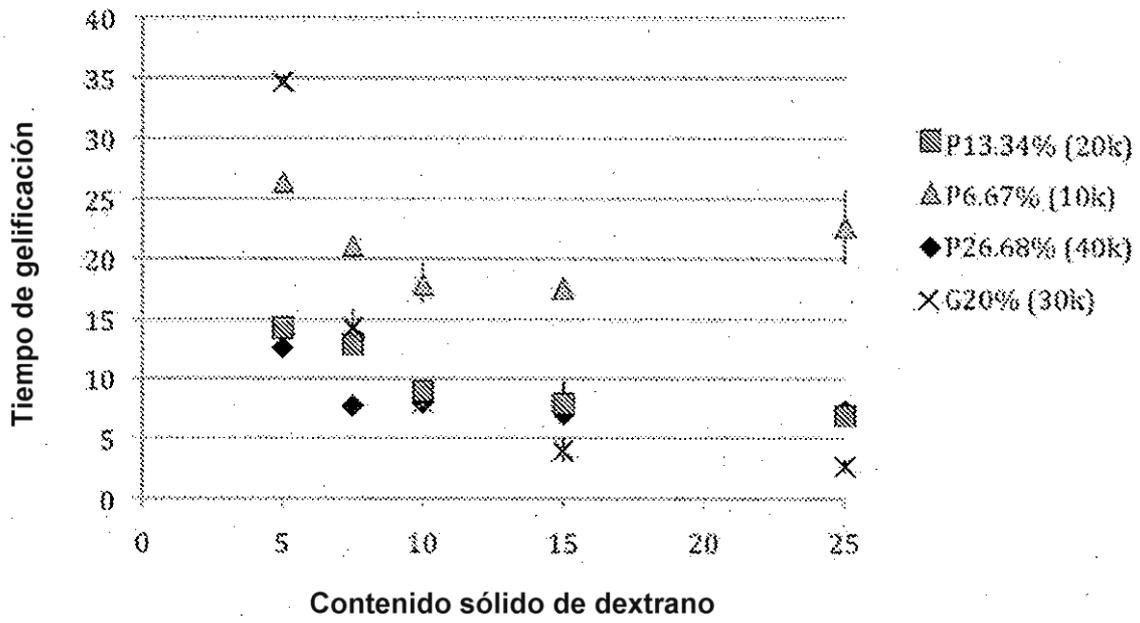


Fig. 13

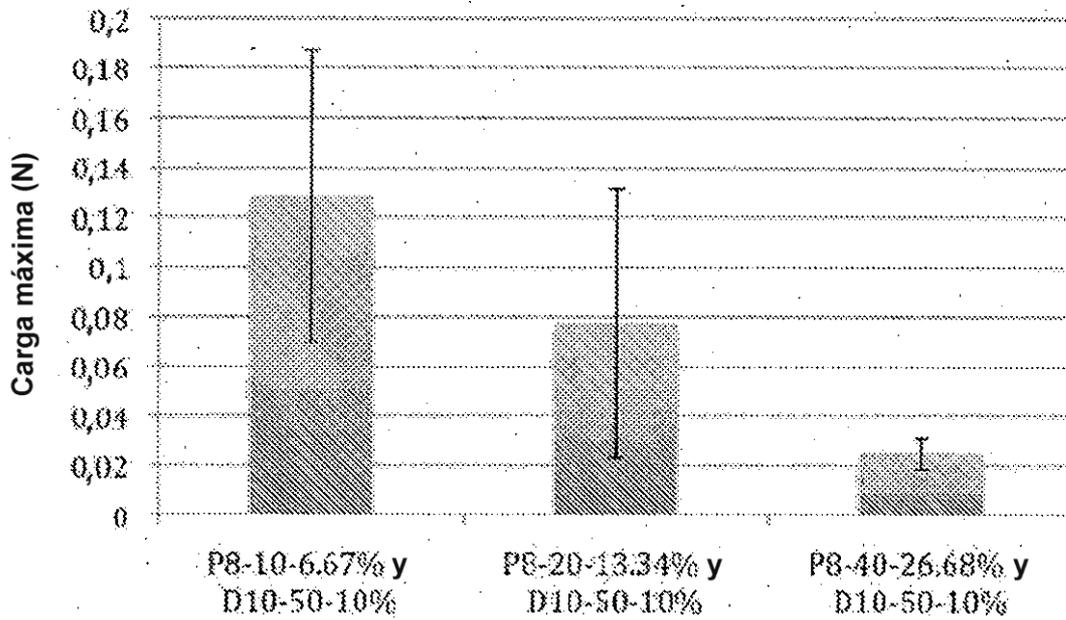


Fig. 14

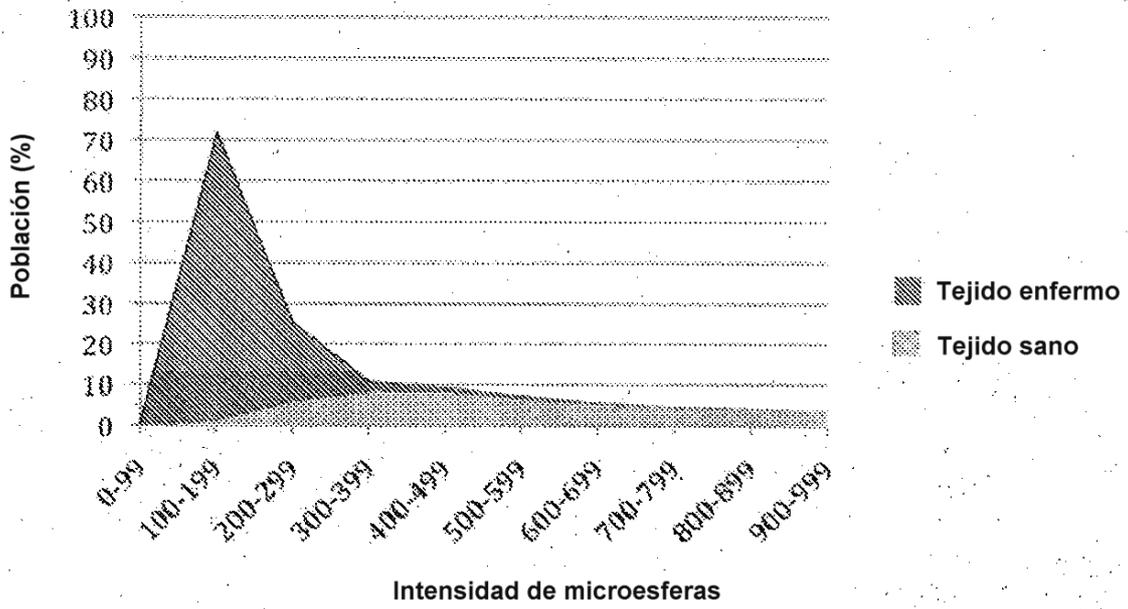


Fig. 15

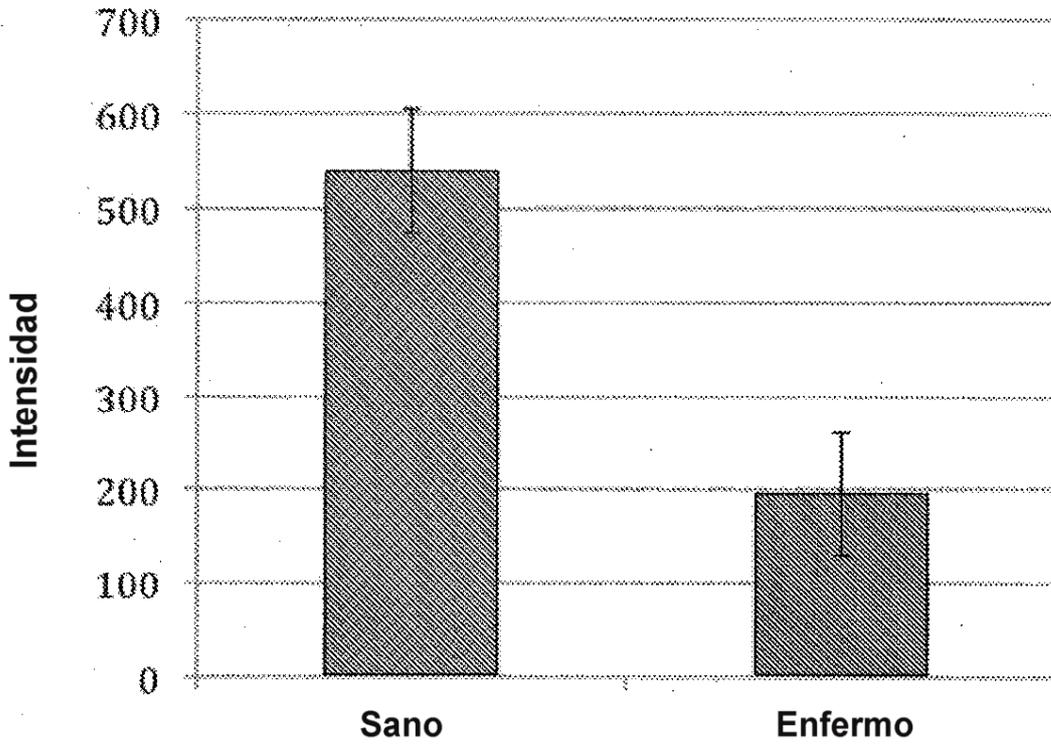


Fig. 16

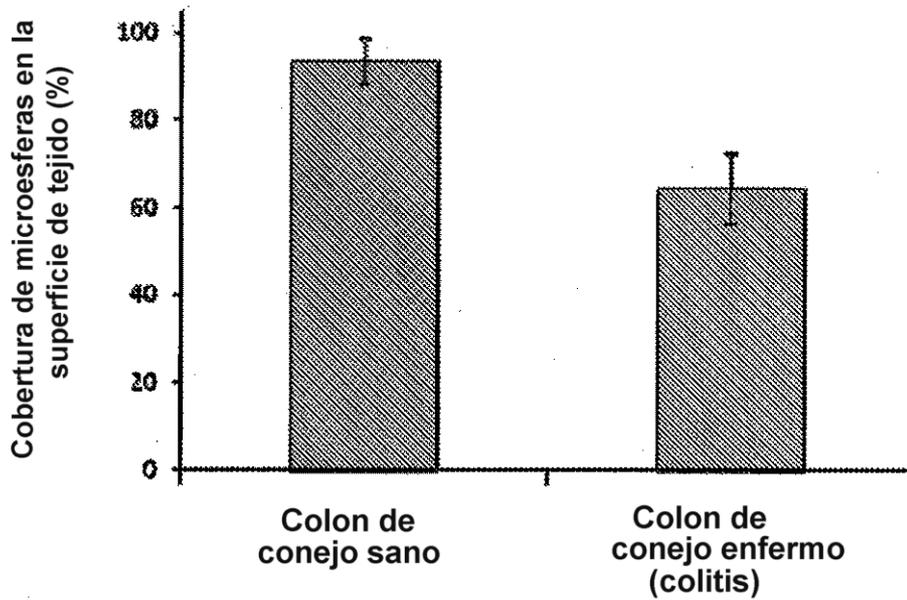


Fig. 17

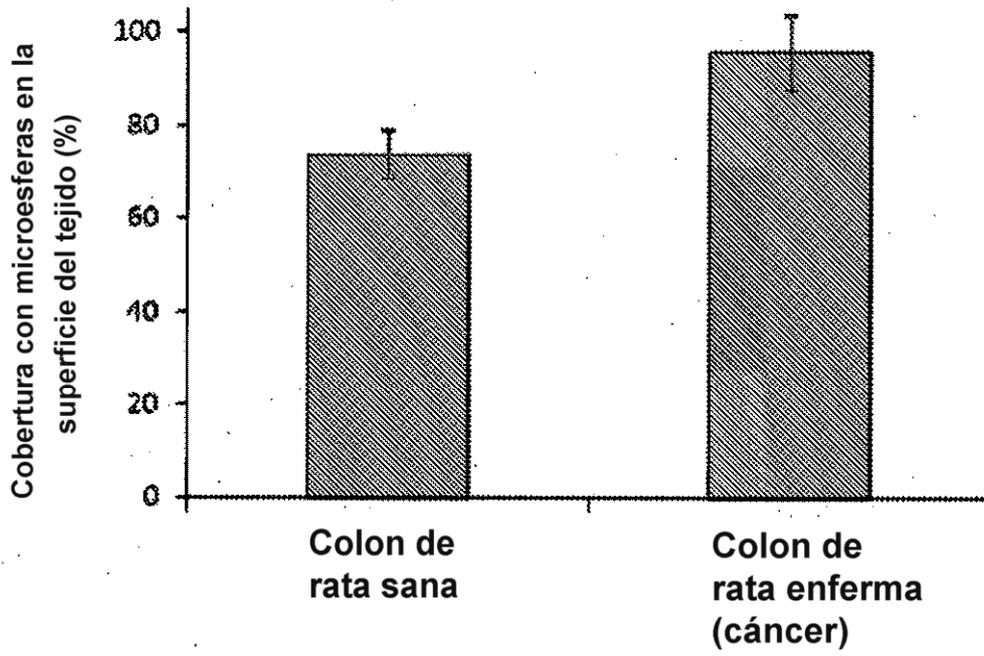


Fig. 18

Intensidad de microesferas



Fig. 19

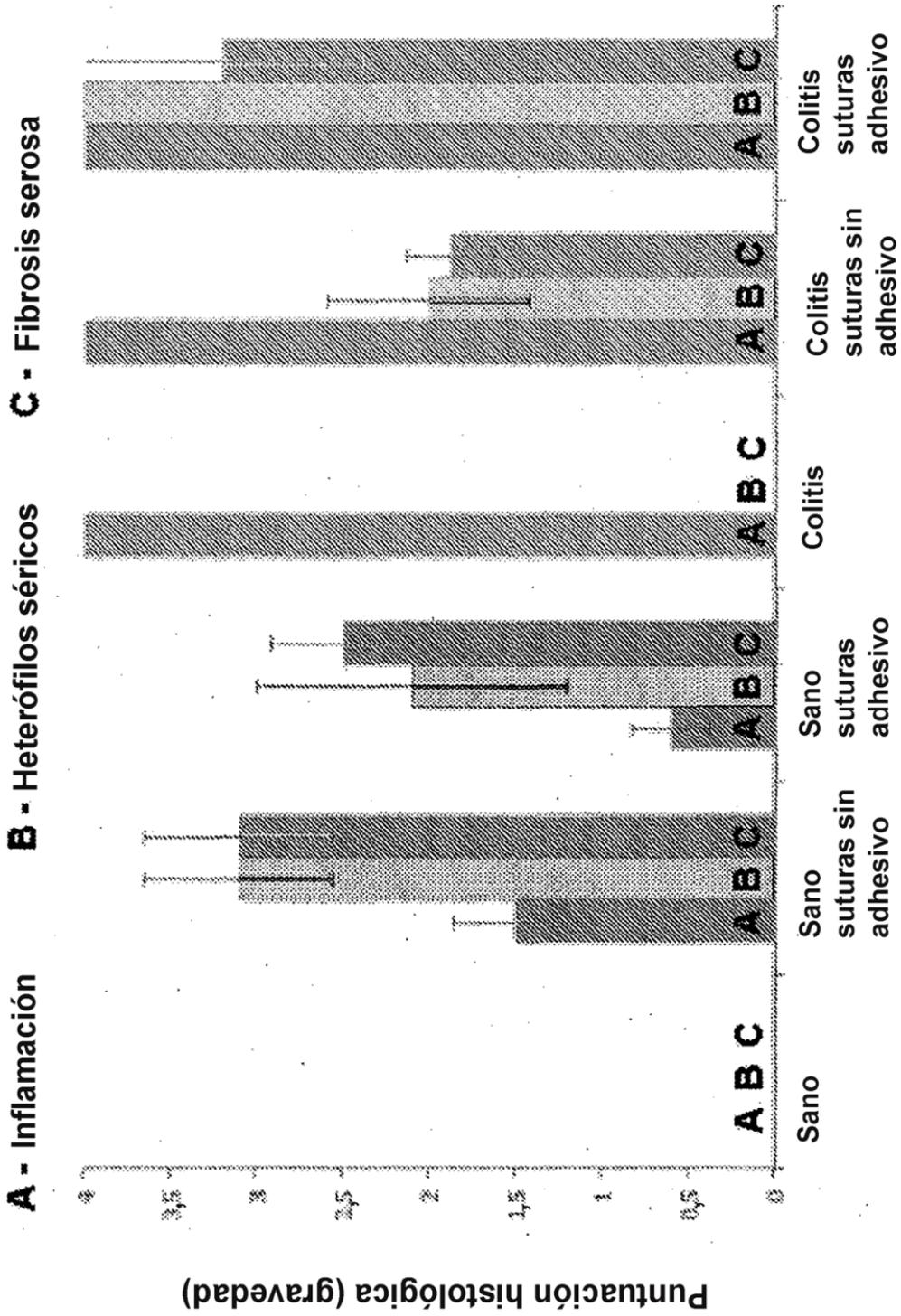


Fig. 20

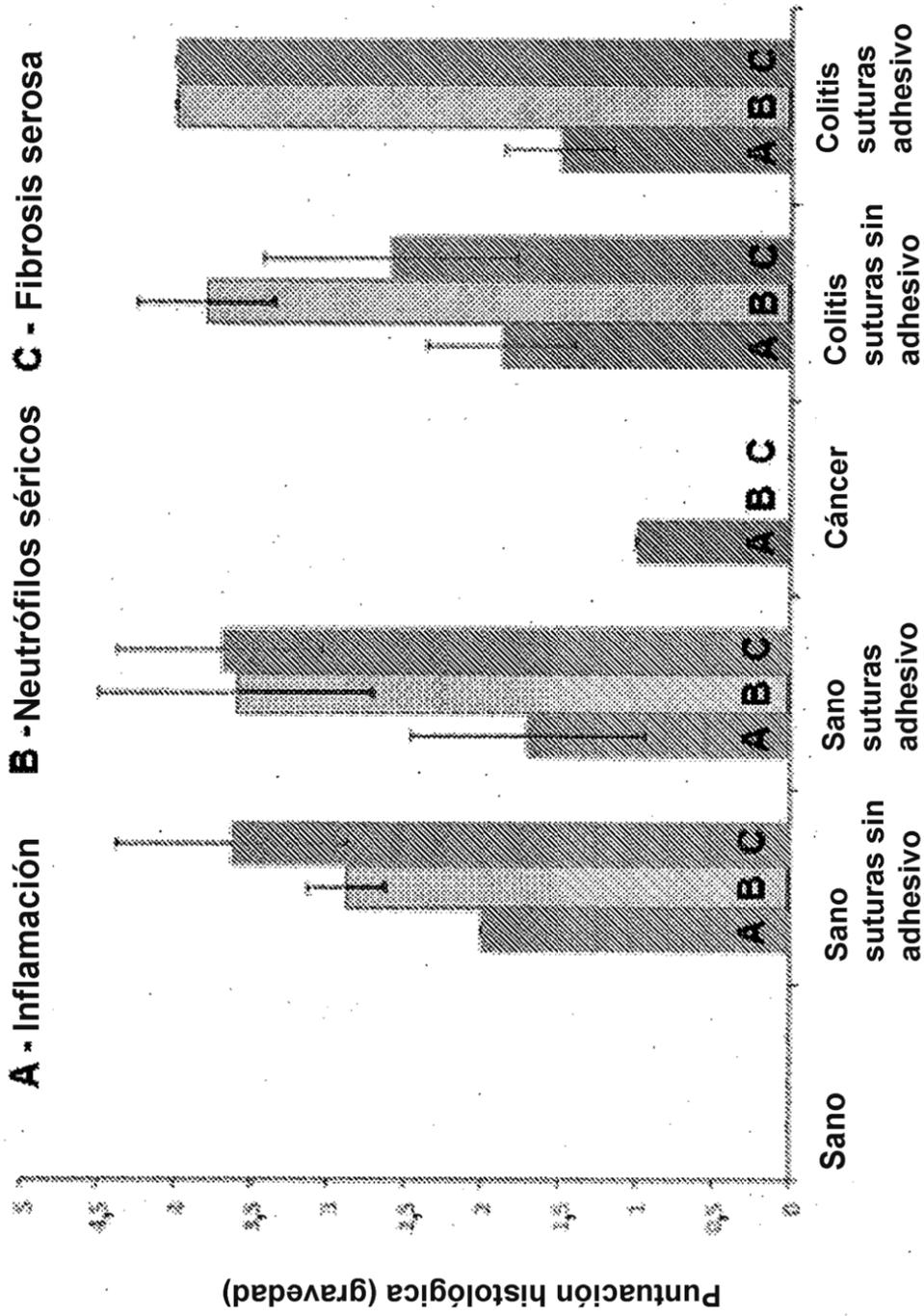


Fig. 21

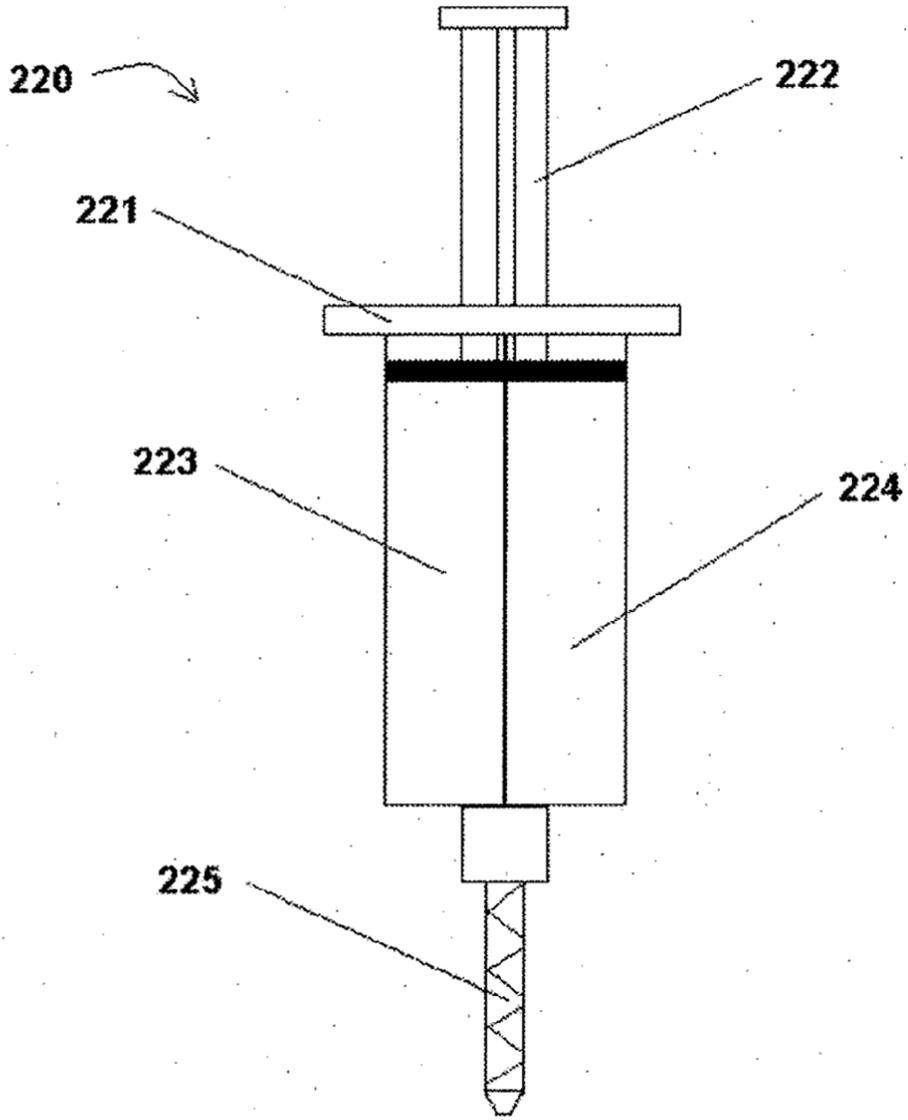


Fig. 22