

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 238**

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: **30.06.2010 E 10730327 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2448604**

54 Título: **Adhesivo tisular de hidrogel para uso médico**

30 Prioridad:

02.07.2009 US 222713 P

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

16.06.2016

73 Titular/es:

**ACTAMAX SURGICAL MATERIALS LLC (100.0%)
2810 7th Street
Berkeley, CA 94710, US**

72 Inventor/es:

**LU, HELEN, S.M. y
SHUEY, STEVEN, W.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 574 238 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 de hidrogel para uso médico

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con el campo de los adhesivos médicos. Más específicamente, la invención se relaciona con un adhesivo tisular de hidrogel formado mediante la reacción de un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído colgantes con una amina de múltiples brazos dispersable en agua.

Antecedentes de la invención

10 Los adhesivos tisulares tienen muchas potenciales aplicaciones médicas, inclusive cerrar heridas, complementar o reubicar suturas o grapas en procedimientos quirúrgicos internos, prevenir la pérdida de fluidos tales como sangre, bilis, líquido gastrointestinal y líquido cefalorraquídeo, la adherencia de incrustaciones o recubrimientos sintéticos a la córnea, como dispositivos de administración de fármacos y como barreras antiadherentes para impedir adhesiones posquirúrgicas. Los adhesivos tisulares convencionales por lo general no son adecuados para una amplia gama de aplicaciones adhesivas. Por ejemplo, los adhesivos a base de cianoacrilato se han utilizado para el cierre de heridas tópicas, pero la liberación de productos de degradación tóxicos limita su uso para las aplicaciones internas. Los
15 adhesivos a base de fibrina tienen curación lenta, poca resistencia mecánica y constituyen un riesgo de infección viral. Adicionalmente, los adhesivos a base de fibrina no se unen de forma covalente al tejido subyacente.

20 Se han desarrollado varios tipos de adhesivos tisulares de hidrogel, los cuales han mejorado las propiedades adhesivas o cohesivas y no son tóxicos (ver, por ejemplo, Sehl et al., publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0119985 y Goldmann, publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0002893). Estos hidrogeles generalmente se forman mediante la reacción de un componente que tiene grupos nucleofílicos con un componente que tiene grupos electrofílicos, que son capaces de reaccionar con los grupos nucleofílicos del primer componente para formar una red reticulada mediante enlace covalente. Sin embargo, estos hidrogeles normalmente se hinchan, se disuelven muy rápidamente o carecen de adherencia o resistencia mecánica suficiente, lo que de este modo disminuye su eficacia como adhesivos quirúrgicos.

25 Kodokian et al. (publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0078536 en tramitación con la presente y de titularidad compartida) describe adhesivos tisulares de hidrogel a base de un polisacárido que se forman mediante la reacción de un polisacárido oxidado con una poliéteramina de múltiples brazos, dispersable en agua. Estos adhesivos proporcionan propiedades mejoradas de adherencia y cohesión, se reticulan fácilmente a temperatura corporal, mantienen la estabilidad dimensional inicial, no se degradan rápidamente y no son tóxicas para las células ni son
30 inflamatorias para los tejidos. Sin embargo, para determinadas aplicaciones, tal como la prevención de adherencias no deseadas de tejido con tejido que resultan de traumatismos o cirugías, se necesita un adhesivo tisular de hidrogel que se degrade más rápidamente. Por ejemplo, una composición que prevenga la adherencia no debería persistir en el sitio una vez que haya comenzado el proceso de curación, normalmente no más que 1 a 3 semanas.

35 Por lo tanto, existe la necesidad de obtener un adhesivo tisular de hidrogel que tenga las propiedades deseadas de los adhesivos tisulares a base de polisacáridos oxidados descritos por Kodokian et al., *supra*, pero que posea un tiempo de degradación más corto.

Compendio de la invención

40 La presente invención trata la necesidad antemencionada al proporcionar un adhesivo tisular de hidrogel que tiene buenas propiedades de adherencia y cohesión, se reticula fácilmente a temperatura corporal, mantiene la estabilidad dimensional inicialmente, no es tóxica para las células ni es inflamatoria para los tejidos y se degrada más rápidamente que los adhesivos tisulares de hidrogel a base de polisacáridos oxidados.

45 Por consiguiente, la invención proporciona un kit que comprende: a) al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído individuales o dialdehídos unidos al polisacárido mediante un grupo de enlace que comprende átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero no contiene un átomo de nitrógeno, mediante un enlace éter a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido o, de forma alternativa, en el caso de dialdehídos mediante un enlace éster a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido, donde dicho polisacárido funcionalizado con aldehído tiene un peso molecular promedio en peso de 1.000 a 1.000.000 Daltons y un grado de
50 sustitución de aldehído de 10% a 200%; y b) al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario, dicha amina de múltiples brazos tiene un peso molecular numérico promedio de 450 a 200.000 Daltons.

Adicionalmente, la invención proporciona una composición de hidrogel reticulada que comprende:

55 a) al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído individuales o dialdehídos unidos al polisacárido mediante un grupo de enlace que comprende átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero no contiene un átomo de nitrógeno, mediante un enlace éter a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido o, de forma alternativa, en el caso de dialdehídos mediante un enlace éster a uno de los grupos hidroxilo de anillo del

polisacárido, donde dicho polisacárido funcionalizado con aldehído tiene un peso molecular promedio en peso de 1.000 a 1.000.000 Daltons y tiene un grado de sustitución de aldehído de 10% a 200%; y

- 5 b) al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario, dicha amina de múltiples brazos tiene un peso molecular numérico promedio de 450 a 200.000 Daltons;

en donde al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído y al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua se reticularan mediante enlaces covalentes formados entre los grupos aldehído colgantes del polisacárido y los grupos amina primarios de la amina de múltiples brazos dispersable en agua.

La composición de hidrogel reticulada puede encontrarse en forma de un hidrogel seco.

- 10 Por último, la invención proporciona el uso del kit mencionado anteriormente en la elaboración de un medicamento para forma un recubrimiento en un punto anatómico en el tejido de un organismo vivo.

Descripción detallada

Tal como se utilizó anteriormente y a lo largo de la descripción de la invención, a menos que se indique lo contrario, los siguientes términos se definirán como se muestra a continuación:

- 15 La expresión "polisacárido funcionalizado con aldehído", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un polisacárido que se modificó de forma química para introducir grupos aldehído colgantes en la molécula. Los grupos aldehído colgantes pueden ser grupos aldehído individuales o dialdehídos. Tal como se define en la presente memoria, los polisacáridos funcionalizados con aldehído no incluyen polisacáridos que se oxiden por escisión de los anillos de polisacárido para introducir grupos aldehído. La oxidación de los anillos de polisacáridos tiene como resultado dialdehídos formados mediante la apertura de los anillos del polisacárido.

- 20 La expresión "grupo aldehído colgante" hace referencia a un grupo aldehído que se une al carbohidrato del polisacárido mediante uno de los grupos hidroxilo de anillo.

- 25 La expresión "grado de sustitución de aldehído" hace referencia al porcentaje en moles de grupos aldehído colgantes por mol de unidades de repetición de carbohidratos, es decir, (moles de grupos de aldehído colgantes/moles de unidades de repetición de carbohidrato) x 100.

- 30 La expresión "amina de múltiples brazos dispersable en agua" hace referencia a un polímero que tiene tres o más cadenas de polímeros ("brazos"), que pueden ser lineales o ramificadas, que surgen de una estructura central, que puede ser un átomo individual, una molécula de núcleo o una estructura principal de polímero, en donde al menos tres de las ramificaciones ("brazos") terminan en al menos un grupo amina primario. La amina de múltiples brazos dispersable en agua es soluble en agua o es capaz de dispersarse en agua para formar una suspensión coloidal capaz de reaccionar con un segundo reactivo en una dispersión o solución acuosa.

El término "dispersión", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una suspensión coloidal capaz de reaccionar con un segundo reactivo en un medio acuoso.

- 35 La expresión "poliéteramina de múltiples brazos dispersable en agua" hace referencia a una amina de múltiples brazos dispersable en agua donde el polímero es un poliéter.

El término "poliéter" hace referencia a un polímero que tiene una unidad de repetición [-OR]-, donde R es un grupo hidrocarbilo que tiene de 2 a 5 átomos de carbono. El poliéter también puede ser un copolímero aleatorio o en bloque que comprende diferentes unidades de repetición que contienen diferentes grupos R.

- 40 La expresión "grupo hidrocarbilo" hace referencia a un grupo divalente formado por la eliminación de dos átomos de hidrógeno, uno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes, de un hidrocarburo.

La expresión "poliéter ramificado" hace referencia a un poliéter que tiene uno o más puntos de ramificación ("brazos"), que incluye poliéteres en forma de estrella, dendríticos, en estructura de panal, altamente ramificados e hiperramificados. Las ramificaciones surgen de uno o más puntos de ramificación trifuncionales o más funcionales.

- 45 La expresión "poliéter dendrítico" hace referencia a un poliéter altamente ramificado que tiene una estructura ramificada que se repite de forma regular con cada generación sucesiva de monómeros que surgen de una molécula nuclear.

La expresión "poliéter en estructura de panal" hace referencia a un poliéter ramificado en el cual las cadenas laterales lineales surgen de puntos de ramificación trifuncionales en una estructura principal de polímeros lineales.

- 50 La expresión "poliéter en forma de estrella" hace referencia a un poliéter ramificado en el cual las cadenas laterales lineales surgen de un átomo individual o una molécula nuclear que tiene un punto de simetría.

- La expresión "poliéter hiperramificado" hace referencia a un poliéter altamente ramificado que es más ramificado que el "altamente ramificado", con un orden que se aproxima al de un dendrímero imperfecto.
- La expresión "poliéter altamente ramificado" hace referencia a un poliéter ramificado que tiene muchos puntos de ramificación, de modo que la distancia entre los puntos de ramificación es pequeña respecto a la longitud total de brazos.
- La expresión "amino primario" hace referencia a un grupo amino neutro que tiene dos hidrógenos libres. El grupo amino puede unirse a un carbono primario, secundario o terciario.
- La expresión "amina multifuncional" hace referencia a un compuesto químico que comprende al menos dos grupos funcionales, al menos uno de los cuales es un grupo amina primario.
- El término "reticulación" hace referencia a un enlace o cadena de átomos unida entre dos cadenas de polímeros diferentes y uniéndolas.
- La expresión "densidad de reticulación" se define en la presente memoria como el recíproco de la cantidad promedio de átomos en cadena entre sitios de conexión de reticulación.
- La expresión "% en peso", a la que también se hace referencia en la presente memoria como "% en p." hace referencia al porcentaje en peso respecto al peso total de la solución o dispersión, a menos que se especifique de otro modo.
- La expresión "punto anatómico" hace referencia a cualquier parte externa o interna del cuerpo de seres humanos o animales.
- El término "tisular" hace referencia a cualquier tejido biológico, tanto vivo como muerto, en seres humanos o animales.
- El término "hidrogel" hace referencia a una matriz polimérica hinchable en agua, que consta de una red tridimensional de macromoléculas que se mantienen unidas mediante reticulación covalente que puede absorber una cantidad considerable de agua para formar un gel elástico.
- La expresión "hidrogel seco" hace referencia a un hidrogel que se trató para eliminar al menos una parte del solvente contenido allí. Preferiblemente, casi todo el solvente se elimina del hidrogel.
- El término "PEG", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un poli(etilenglicol).
- El término " M_w ", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al peso molecular promedio en peso.
- El término " M_n ", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al peso molecular numérico promedio.
- El término " M_z ", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al peso molecular z promedio.
- La expresión "aplicación médica" hace referencia a las aplicaciones médicas en cuanto se relacionan con seres humanos y animales.
- Los significados de las abreviaciones utilizadas son los siguientes: "min" significa minuto/s, "h" significa horas/s, "seg" significa segundo/s, "d" significa día/s, "mL" significa mililitro/s, "L" significa litro/s, "µL" significa microlitro/s, "cm" significa centímetros, "mm" significa milímetro/s, "µm" significa micrómetro/s, "mol" significa mol/es, "mmol" significa milimol/es, "g" significa gramo/s, "mg" significa miligramo/s, "% mol" significa porcentaje en moles, "Vol" significa volumen, "p/p" significa peso por peso, "Da" significa Daltons, "kDa" significa kiloDaltons, la designación "10K" significa que una molécula de polímero posee un peso molecular numérico promedio de 10 kiloDaltons, "M" significa molaridad, "kPa" significa kiloPascuales, "psi" significa libras por pulgada cuadrada, "rpm" significa revoluciones por minuto, " ^1H NMR" significa espectroscopía de resonancia magnética nuclear por protones, " $^{13}\text{-C}$ NMR" significa espectroscopía de resonancia magnética nuclear por carbono 13, "ppm" significa partes por millón, "cP" significa centipoise, "PBS" significa solución salina tamponada con fosfato, "MWCO" significa corte de peso molecular.
- Una referencia a "Aldrich" o una referencia a "Sigma" significa que dicho químico o ingrediente se obtuvo de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- En la presente memoria se describe un adhesivo tisular de hidrogel formado mediante la reacción de un polisacárido funcionalizado con aldehído, que contiene grupos aldehído colgantes, con una amina de múltiples brazos dispersable en agua. El hidrogel puede ser útil como adhesivo tisular o sellante para aplicaciones médicas que requieren degradación más rápida, inclusive, pero no se limitan a, la prevención de adherencias no deseadas de tejido con tejido que resultan de traumatismos o cirugías.
- Polisacáridos funcionalizados con aldehídos
- Los polisacáridos funcionalizados con aldehído adecuados para uso en la presente memoria son polisacáridos que se modificaron de forma química para introducir grupos aldehído colgantes dentro de la molécula. Los grupos aldehído colgantes pueden ser grupos aldehído individuales o dialdehídos. Los grupos aldehído colgantes de los polisacáridos

funcionalizados con aldehído descritos en la presente memoria se unen al polisacárido mediante grupos de enlace. En una realización, los grupos de enlace comprenden átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero no contienen átomos de nitrógeno, y se unen al polisacárido mediante enlaces éter. Tal como se demuestra en los Ejemplos más adelante en la presente memoria, los polisacáridos funcionalizados con aldehído que tienen estos tipos de grupos de enlace son más estables en soluciones acuosas que los polisacáridos oxidados o los polisacáridos funcionalizados con aldehído que tienen otros tipos de grupos de enlace, tal como aquellos que contienen un átomo de nitrógeno o se unen al polisacárido mediante otros enlaces químicos (por ejemplo, amida o uretano). En una realización, el grupo de enlace contiene un grupo alcoxi alfa respecto al grupo aldehído colgante (es decir, en un átomo de carbono contiguo). En otra realización, el grupo de enlace no contiene un grupo alcoxi beta respecto al grupo aldehído colgante (es decir, en el segundo átomo de carbono del grupo aldehído).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los polisacáridos funcionalizados con aldehído no incluyen polisacáridos que se oxiden con la escisión de los anillos de polisacárido para introducir grupos aldehído. La oxidación de los anillos de polisacárido tiene como resultado dialdehídos formados por la apertura de los anillos del polisacárido. Por tanto, los grupos dialdehído formados por la oxidación de anillos de polisacárido no son grupos aldehído colgantes tal como se definen en la presente memoria.

Los polisacáridos funcionalizados con aldehído pueden prepararse mediante la modificación química de un polisacárido para introducir grupos aldehído colgantes. Los polisacáridos funcionalizados con aldehído útiles incluyen, pero no se limitan a, derivados funcionalizados con aldehído de: dextrano, carboximetildextrano, almidón, agar, celulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, pululano, inulina, levana y ácido hialurónico. Los polisacáridos de inicio se encuentran disponibles en el mercado en fuentes tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Normalmente, los polisacáridos son una mezcla heterogénea que tiene una distribución de diferentes pesos moleculares y se caracterizan por un peso molecular promedio, por ejemplo, el peso molecular promedio en peso (M_w) o el peso molecular numérico promedio (M_n), tal como se conoce en la técnica. Por lo tanto, los polisacáridos funcionalizados con aldehído preparados a partir de estos polisacáridos también son una mezcla heterogénea que tiene una distribución de diferentes pesos moleculares. Los polisacáridos funcionalizados con aldehído adecuados tienen un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.000.000 Daltons, de forma más particular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 250.000 Daltons, de forma más particular de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 60.000 Daltons y de forma más particular de aproximadamente 7.000 a aproximadamente 20.000 Daltons. En una realización, el polisacárido funcionalizado con aldehído es dextrano funcionalizado con aldehído. En otra realización, el polisacárido funcionalizado con aldehído es inulina funcionalizada con aldehído.

Los polisacáridos funcionalizados con aldehído pueden prepararse utilizando los métodos conocidos en la técnica. Los polisacáridos funcionalizados con aldehído pueden prepararse utilizando cualquiera de los métodos descritos en Mehta et al. (WO 99/07744). Por ejemplo, puede hacerse reaccionar el dextrano con alilglicidiléter en un medio acuoso ácido para formar aliloxidextrano, que luego se oxida por ozonólisis para escindir el enlace doble e introducir un grupo aldehído terminal, tal como se describe detalladamente en los Ejemplos más adelante en la presente memoria. Adicionalmente, el glicidol puede hacerse reaccionar con un polisacárido, tal como dextrano, en un medio acuoso básico para proporcionar un polisacárido alquilado, tal como se describe en Chen (Biotechnology Techniques 3:131-134, 1989). La oxidación con periodato del polisacárido alquilado proporciona un polisacárido funcionalizado con aldehído que tiene grupos aldehído colgantes. Los polisacáridos funcionalizados con aldehído también pueden prepararse mediante el método descrito por Solarek et al. (patente de EE.UU. n.º 4.703.116) en donde un polisacárido se hace reaccionar con un reactivo acetal de derivación en presencia de una base y luego se hidroliza el acetal al ajustar el pH a menos de 7,0.

Los polisacáridos funcionalizados por aldehído que tienen grupos funcionales dialdehído pueden prepararse primero mediante la unión de un grupo colgante que contiene o un dieno terminal o mediante la unión de una olefina disustituida cíclica al anillo del polisacárido. La unión de los grupos colgantes puede lograrse utilizando una cantidad de métodos, inclusive la reacción del polisacárido con glicidiléteres que contienen olefinas cíclicas o dienos terminales, o la reacción con ácidos carboxílicos o sus derivados que también contienen olefinas cíclicas o dienos terminales. La oxidación de los polisacáridos derivados con olefinas cíclicas o dienos terminales utilizando los métodos conocidos en la técnica, tales como ozonólisis, proporciona polisacáridos derivados con dialdehídos colgantes.

El grado de sustitución de aldehído puede determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el grado de sustitución de aldehído puede determinarse mediante la titulación del polisacárido funcionalizado con aldehído con clorhidrato de hidroxilamina de acuerdo con el método de Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991). Los polisacáridos funcionalizados con aldehído tienen un grado de sustitución de aldehído de aproximadamente 10% a aproximadamente 200%, de forma más particular de aproximadamente 30% a aproximadamente 200%, de forma más particular de aproximadamente 35% a aproximadamente 120% y más particularmente de aproximadamente 40% a aproximadamente 120%.

Aminas de múltiples brazos dispersables en agua:

Las aminas de múltiples brazos dispersables en agua incluyen, pero no se limitan a, poliéteraminas de múltiples brazos dispersables en agua, poliamidoaminas dendríticas con terminación amino y aminas de extremos ramificados

de múltiples brazos. Normalmente, las aminas de múltiples brazos adecuadas para uso en la presente memoria tienen un peso molecular numérico promedio de aproximadamente 450 a aproximadamente 200.000 Daltons, de forma más particular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

5 En una realización, la amina de múltiples brazos dispersable en agua es una poliéteramina de múltiples brazos, que es un poliéter dispersable en agua que tiene la unidad de repetición [-O-R]-, en donde R es un grupo hidrocarbilo que tiene de 2 a 5 átomos de carbono. Las poliéteraminas de múltiples brazos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, óxidos de polietileno en forma de estrella terminados en amino, óxidos de polietileno dendríticos terminados en amino, óxidos de polietileno en estructura de panal terminados en amino, óxidos de polipropileno en forma de estrella terminados en amino, óxidos de polipropileno dendríticos terminados en amino, óxidos de polipropileno en estructura de panal terminados en amino, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de polietileno en forma de estrella terminados en amino, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de polietileno dendríticos terminados en amino, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de polietileno en estructura panal terminados en amino y polioxialquiltriaminas, que se venden con el nombre comercial triaminas Jeffamine® de Huntsman LLC. (Houston, TX). Los ejemplos de aminas de óxido de polietileno en forma de estrella incluyen, pero no se limitan a, varias aminas de polietilenglicol de múltiples brazos y polietilenglicoles en forma de estrella que tienen 3, 4, 6 u 8 brazos que terminan en aminas primarias (a las que se hace referencia en la presente memoria como aminas PEG en forma de estrella con 3, 4, 6 o 8 brazos, respectivamente). Los ejemplos de triaminas Jeffamine® adecuadas incluyen, pero no se limitan a, Jeffamine® T-403 (CAS No. 39423-51-3), Jeffamine® T-3000 (CAS n.º 64852-22-8) y Jeffamine® T-5000 (CAS n.º 64852-22-8). En una realización, la poliéteramina de múltiples brazos dispersable en agua es un polietilenglicol de 20 ocho brazos que tiene ocho brazos que terminan en un grupo amina primario y que tiene un peso molecular numérico promedio de aproximadamente 10.000 Daltons.

Las poliéteraminas de múltiples brazos se encuentran disponibles en el mercado, tal como se observó anteriormente, o pueden prepararse utilizando los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, polietilenglicoles de múltiples 25 brazos, donde al menos tres de los brazos terminan en un grupo amina primario, pueden prepararse al poner extremos amina en los polietilenglicoles de múltiples brazos (por ejemplo, polietilenglicoles en forma de estrella con 3, 4, 6 y 8 brazos, disponibles mediante empresas tales como Nektar Transforming Therapeutics; SunBio, Inc., Anyang, Corea del Sur; NOF Corp., Tokio, Japón; o JenKem Technology USA, Allen, TX) utilizando el método descrito por Buckmann et al. (Makromol. Chem. 182:1379-1384, 1981). En tal método, el polietilenglicol de múltiples brazos reacciona con bromuro de tionilo para convertir los grupos hidroxilo en bromos, que luego se convierten en aminas al reaccionar con amoníaco a 100°C. El método es ampliamente aplicable a la preparación de otras poliéteraminas de múltiples brazos. Adicionalmente, las poliéteraminas de múltiples brazos pueden prepararse a partir de polioles de múltiples brazos utilizando el método descrito en Chenault (publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0249870 en tramitación con la presente memoria y de titularidad compartida). En tal método, el poliéter de múltiples brazos reacciona con cloruro de tionilo para convertir los grupos hidroxilo en grupos de cloro, que luego se convierten en 35 aminas mediante la reacción con amoníaco anhidro o acuoso. Otros métodos que pueden utilizarse para la preparación de poliéteraminas de múltiples brazos se describen en Merrill et al. en la patente de EE.UU. n.º 5.830.986 y en Chang et al. en WO 97/30103.

Las aminas de múltiples brazos dispersables en agua adecuadas para uso en la presente memoria pueden también ser poliamidoaminas dendríticas con terminación amino, que se venden con el nombre comercial Dendrímeros Starburst® (disponible en Sigma-Aldrich, St Louis, MO). 40

En una realización, la amina de múltiples brazos dispersable en agua es una amina de extremo ramificado de múltiples brazos, tal como se describe en Arthur (publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2008/066787 en tramitación con la presente y de titularidad compartida). Las aminas de extremo ramificado de múltiples brazos son polímeros ramificados que tienen dos o tres grupos amina primarios en el extremo de cada uno de los brazos del 45 polímero. Los múltiples grupos funcionales aumentan la probabilidad estadística de reacción en un extremo de cadena dado y permiten una incorporación más eficiente de las moléculas ramificadas en una red de polímeros. Los materiales iniciales utilizados para preparar las aminas de extremo ramificado pueden ser polímeros ramificados tal como poliéterpolioles de múltiples brazos que incluyen, pero no se limitan a, poliéterpolioles en forma de estrella y en estructura de panal. Las aminas de extremo ramificado pueden prepararse mediante la unión de múltiples grupos amina a los extremos del polímero al reaccionar con los grupos hidroxilo utilizando los métodos conocidos en la 50 técnica. Por ejemplo, una amina de extremo ramificado que tiene dos grupos funcionales amina en cada extremo de los brazos del polímero puede prepararse al hacer reaccionar el material inicial, tal como se mencionó anteriormente, con cloruro de tionilo en un solvente adecuado, tal como tolueno, para proporcionar el derivado de cloruro, que posteriormente se hace reaccionar con tris(2-aminoetil)amina para proporcionar el reactivo de extremo ramificado que tiene dos grupos amina primarios en el extremo de los brazos del polímero. 55

En una realización, la amina de múltiples brazos dispersable en agua es una polietilenglicolamina de extremo ramificado de ocho brazos que tiene dos grupos amino primarios en el extremo de los brazos del polímero y que tiene un peso molecular numérico promedio de aproximadamente 10.000 Daltons.

En otra realización, la amina de múltiples brazos dispersable en agua es una mezcla de una polietilenglicolamina de extremo ramificado de ocho brazos que tiene dos grupos amino primarios en el extremo de los brazos del polímero y 60 tiene un peso molecular numérico promedio de aproximadamente 10.000 Daltons, y una polietilenglicolamina de ocho

brazos que tiene ocho brazos que terminan en un grupo amina primario y que tiene un peso molecular numérico promedio de aproximadamente 10.000 Daltons.

Debe reconocerse que las aminas de múltiples brazos dispersables en agua son, por lo general, una mezcla algo heterogénea que tiene una distribución de longitudes de brazos y, en algunos casos, una distribución de especies con diferentes cantidades de brazos. Cuando una amina de múltiples brazos tiene una distribución de especies que tiene diferente cantidad de brazos, se puede denominar según la cantidad promedio de brazos en la distribución. Por ejemplo, en una realización, la amina de múltiples brazos es una amina PEG en forma de estrella de 8 brazos, que comprende una mezcla de aminas PEG en forma de estrella con múltiples brazos, algunas tienen menos y otras tienen más que 8 brazos; sin embargo, las aminas PEG en forma de estrella de múltiples brazos en la mezcla tienen un promedio de 8 brazos. Por tanto, las expresiones "de 8 brazos", "de 6 brazos", "de 4 brazos" y "de 3 brazos", tal como se utilizan en la presente para hacer referencia a las aminas con múltiples brazos, deben interpretarse como que denominan una mezcla heterogénea que tiene una distribución de longitudes de brazos y, en algunos casos, una distribución de especies con diferente cantidad de brazos, en cuyo caso la cantidad de brazos citada hace referencia a la cantidad promedio de brazos en la mezcla.

Métodos de para usar los adhesivos tisulares de hidrogel

Los adhesivos tisulares de hidrogel descritos en la presente memoria pueden utilizarse en varias formas. En una realización, el polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído colgantes y la amina de múltiples brazos dispersable en agua se utilizan como componentes de dispersiones o soluciones acuosas. Para preparar una dispersión o solución acuosa que comprende un polisacárido funcionalizado con aldehído (al que se hace referencia en la presente memoria como "primera dispersión o solución acuosa"), se agrega al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído a agua para proporcionar una concentración de aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, de forma más particular de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, y de forma más particular de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% en peso respecto al peso total de la solución o dispersión. Adicionalmente, puede utilizarse una mezcla de al menos dos polisacáridos funcionalizados con aldehído diferentes que tienen pesos moleculares promedio en peso diferentes, grados diferentes de sustitución de aldehído o tanto pesos moleculares promedio en peso como grados de sustitución de aldehído diferentes. Cuando se utiliza una mezcla de polisacáridos funcionalizados con aldehído, la concentración total de polisacáridos funcionalizados con aldehído es de aproximadamente 5% a aproximadamente 40% en peso, de forma más particular de aproximadamente 5% a aproximadamente 30% y de forma más particular de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% en peso respecto al peso total de la solución o dispersión.

De manera similar, para preparar una dispersión o solución acuosa que comprende una amina de múltiples brazos dispersable en agua (a la que se hace referencia en la presente memoria como la "segunda dispersión o solución acuosa"), se agrega al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua a agua para proporcionar una concentración de aproximadamente 5% a aproximadamente 70% en peso, de forma más particular de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en peso respecto al peso total de la solución o dispersión. La concentración óptima a utilizarse depende de la aplicación pretendida y de la concentración del polisacárido funcionalizado con aldehído utilizado en la primera solución o dispersión acuosa. Adicionalmente, puede utilizarse una mezcla de diferentes aminas de múltiples brazos dispersables en agua que tengan diferentes pesos moleculares numéricos promedio, diferentes cantidades de brazos o tanto diferentes pesos moleculares numéricos promedio como diferentes cantidades de brazos. Cuando se utiliza una mezcla de aminas de múltiples brazos dispersables en agua, la concentración total de aminas de múltiples brazos es de aproximadamente 5% a aproximadamente 70% en peso, de forma más particular de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en peso respecto al peso total de la solución o dispersión.

Para usos en tejido vivo, se prefiere que la primera solución o dispersión acuosa y la segunda solución o dispersión acuosa se esterilice para prevenir infecciones. Puede utilizarse cualquier método de esterilización adecuado conocido en la técnica que no perjudique la capacidad de los componentes de reaccionar para formar un hidrogel eficaz, inclusive, pero no se limitan a, radiación por haz de electrones, radiación gamma, esterilización con óxido de etileno o filtración mediante una membrana con poros de 0,2 μm .

La primera solución o dispersión acuosa y la segunda solución o dispersión acuosa pueden comprender además varios aditivos según la aplicación pretendida. Preferiblemente, el aditivo no interfiere con la gelificación eficaz para formar un hidrogel. La cantidad de aditivo utilizado depende de la aplicación particular y un experto en la técnica puede determinarlo fácilmente utilizando experimentación de rutina. Por ejemplo, la primera solución o dispersión acuosa y/o la segunda solución o dispersión acuosa puede comprender al menos un aditivo seleccionado de modificadores de pH, antibióticos, colorantes, tensioactivos, fármacos y agentes terapéuticos.

La primera solución o dispersión acuosa y/o la segunda solución o dispersión acuosa pueden incluir opcionalmente al menos un modificador de pH para ajustar el pH de las soluciones o dispersiones. Los modificadores de pH adecuados son conocidos en la técnica. El modificador de pH puede ser un compuesto ácido o básico. Los ejemplos de modificadores de pH ácidos incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos, ácidos inorgánicos y ácidos sulfónicos. Los ejemplos de modificadores de pH básicos incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos, alcóxidos, compuestos que contienen nitrógeno que no sean aminas primarias y secundarias y carbonatos y fosfatos básicos.

La primera solución o dispersión acuosa y/o la segunda solución o dispersión acuosa puede incluir opcionalmente al menos un agente antibiótico. Los conservantes antibióticos adecuados son conocidos en la técnica. Los ejemplos de antibióticos adecuados incluyen, de mono no taxativo, alquilparabenos, tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno; triclosán; clorhexidina; cresol; clorocresol; hidroquinona; benzoato de sodio y benzoato de potasio.

La primera solución o dispersión acuosa y/o la segunda solución o dispersión acuosa pueden incluir opcionalmente al menos un colorante para mejorar la visibilidad de las soluciones o dispersiones. Los colorantes adecuados incluyen tintes, pigmentos y agentes colorantes natural. Los ejemplos de colorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, los colorantes FD&C y D&C, tales como FD&C violeta n.º 2, FD&C azul n.º 1, D&C verde n.º 6, D&C verde n.º 5, D&C violeta n.º 2; y colorantes naturales tales como rojo de remolacha, cantaxantina, clorofila, eosina, azafrán y carmín.

La primera solución o dispersión acuosa y/o la segunda solución o dispersión acuosa puede incluir opcionalmente al menos un tensioactivo. Tensioactivo, tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un compuesto que disminuye la tensión superficial del agua. El tensioactivo puede ser un tensioactivo iónico, tal como laurilsulfato de sodio, o un tensioactivo neutro, tal como éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno y sorbitán polioxietileno.

Adicionalmente, la primera solución o dispersión acuosa y/o la segunda solución o dispersión acuosa pueden incluir opcionalmente al menos un fármaco o agente terapéutico. Los fármacos y agentes terapéuticos adecuados son conocidos en la técnica (por ejemplo, ver la Farmacopea de Estados Unidos (USP, por su sigla en inglés), Physician's Desk Reference (Thomson Publishing), The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 18va. edición, Mark H. Beers and Robert Berkow (eds.), Merck Publishing Group, 2006; o, en el caso de animales, The Merck Veterinary Manual, 9na. edición, Kahn, C.A. (ed.), Merck Publishing Group, 2005). Los ejemplos no taxativos incluyen agentes antiinflamatorios, por ejemplo, glucocorticoides tales como prednisona, dexametasona, budesónida; agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como indometacina, acetato de ácido salicílico, ibuprofeno, sulindac, piroxicam y naproxeno; agentes fibrinolíticos tales como activador tisular de plasminógeno y estreptocinasa; anticoagulantes tales como heparina, hirudina, ancrod, dicumarol, sincumar, iloprost, L-arginina, dipiramidol y otros inhibidores de la función plaquetaria; anticuerpos; ácidos nucleicos; péptidos; hormonas; factores de crecimiento; citocinas; quimiocinas; factores de coagulación; inhibidores endógenos de coagulación; agentes antibacterianos; agentes antivirales; agentes antifúngicos; agentes anticancerígenos; inhibidores de la adhesión celular; promotores de curación; vacunas; agentes trombogénicos, tales como trombina, fibrinógeno, homocisteína y estramustina; compuestos radioopacos, tales como sulfato de bario y partículas de oro y radioetiquetas.

Adicionalmente, la segunda solución o dispersión acuosa que comprende la amina con múltiples brazos puede comprender opcionalmente al menos otra amina multifuncional que tiene uno o más grupos de amina primarios para proporcionar otras propiedades beneficiosas, tales como la hidrofobicidad o la densidad de reticulación modificada. La amina multifuncional es capaz de inducir la gelificación cuando se mezcla con un polisacárido oxidado en una solución o dispersión acuosa. La amina multifuncional puede ser una segunda amina de múltiples brazos dispersable en agua, tal como las que se describieron anteriormente, u otro tipo de amina multifuncional, inclusive, pero no se limitan a, diaminas lineales y ramificadas, tales como diaminoalcanos, poliaminoalcanos y espermina; poliaminas ramificadas, tales como polietilenimina; diaminas cíclicas, tales como N,N'-bis(3-aminopropil)piperacina, 5-amino-1,3,3-trimetilciclohexanometilamina, 1,3-bis(aminometil)ciclohexano, 1, 4-diaminociclohexano y p-xililendi-amina; aminoalquiltrialcoxisilanos, tales como 3-aminopropiltrimetoxisilano y 3-aminopropiltriethoxisilano; aminoalquildialcoxialquilsilanos, tales como 3-aminopropildietoximetilsilano, dihidrazidas, tales como dihidrazida adípica; diaminas poliméricas lineales, tales como polietilenimina lineal, poliéteres con terminación α,ω -amino, α,ω -bis(3-aminopropil)polibutanodiol, poliéteres con terminación β,ω -1-amino (Jeffamines® lineales); poliaminas en estructura de panal, tales como quitosano, polialilamina y polilisina y di- y polihidrazidas, tales como bis(carboxihidrazido)poliéteres y poli(carboxihidrazido)poliéteres en forma de estrella. Muchos de estos compuestos se encuentran disponibles en el mercado por empresas tales como Sigma-Aldrich y Huntsman LLC. Normalmente, si se encuentra presente, la amina multifuncional se utiliza a una concentración de aproximadamente 5% en peso a aproximadamente 1000% en peso respecto al peso de la amina de múltiples brazos en la solución o dispersión acuosa.

Cuando la primera solución o dispersión acuosa y la segunda solución o dispersión acuosa se mezclan, reaccionan para formar una composición de hidrogel reticulada que comprende al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído colgantes; y al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario, y en donde al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído y al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua se reticulan mediante enlaces covalentes formados entre los grupos aldehído colgantes del polisacárido funcionalizado con aldehído y los grupos amina primarios de la amina de múltiples brazos dispersable en agua. Los enlaces covalentes pueden ser enlaces de imina, aminales o hemiaminales. El tiempo de degradación del hidrogel puede ajustarse para las necesidades de la aplicación pretendida al utilizar diferentes cantidades del polisacárido funcionalizado con aldehído en la primera solución o dispersión acuosa y la amina de múltiples brazos dispersable en agua en la segunda solución o dispersión acuosa en cuanto a porcentaje en peso y/o al alterar la cantidad de funcionalización ya sea de la amina en la amina de múltiples brazos dispersable en agua o del aldehído en el polisacárido funcionalizado con aldehído, tal como se muestra más adelante en la presente memoria en los Ejemplos.

La primera solución o dispersión acuosa y la segunda solución o dispersión acuosa pueden utilizarse para aplicar un recubrimiento a un punto anatómico en el tejido de un organismo vivo. Las dos soluciones o dispersiones acuosas pueden aplicarse en el punto anatómico en cualquier cantidad de formas. Una vez que ambas soluciones o dispersiones se combinaron en el punto, se reticular para formar un hidrogel que proporciona un recubrimiento en el punto.

En una realización, las dos soluciones o dispersiones acuosas se aplican al punto de forma secuencial utilizando cualquier medio adecuado, inclusive, pero no se limitan a, rociado, barrido con un hisopo o cepillo o extrusión utilizando una pipeta o jeringa. Las soluciones o dispersiones pueden aplicarse en cualquier orden. Luego, se mezclan las soluciones o dispersiones en el punto utilizando cualquier dispositivo adecuado, tal como un hisopo, una espátula o la punta de la pipeta o jeringa.

En otra realización, las dos soluciones o dispersiones acuosas se mezclan de forma manual antes de la aplicación al punto. La mezcla resultante se aplica luego al punto antes de que se cure completamente utilizando un aplicador adecuado, tal como se describió anteriormente.

En otra realización, la primera solución o dispersión acuosa y la segunda solución o dispersión acuosa se aplican al punto de forma simultánea donde se mezclan para formar un hidrogel. Por ejemplo, las dos soluciones o dispersiones acuosas pueden contenerse en cilindros separados de una jeringa con doble cilindro. De esta forma las dos soluciones o dispersiones acuosas se aplican de forma simultánea al punto con la jeringa. Los aplicadores de jeringa con doble cilindro adecuados son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Redl describe varios aplicadores adecuados para uso en la invención en la patente de EE.UU. n.º 6.620.125, (especialmente en las Figuras 1, 5 y 6, que se describen de la columna 4, línea 10 a la columna 6, línea 47). Las dos soluciones o dispersiones acuosas pueden aplicarse también al punto utilizando un catéter de doble luz, tal como los que se encuentran disponibles en Bistech, Inc. (Woburn, MA). Adicionalmente, los dispositivos de inyección para la introducción de dos componentes líquidos de forma endoscópica en el cuerpo de manera simultánea se conocen en la técnica y pueden adaptarse para la administración de las dos soluciones o dispersiones acuosas descritas en la presente memoria (ver por ejemplo, Linder et al., patente de EE.UU. n.º 5.322.510).

En otra realización, la primera solución o dispersión acuosa y la segunda solución o dispersión acuosa puede premezclarse y administrarse al punto utilizando una jeringa de doble cilindro que contiene un mezclador inmóvil, tal como el que se consigue en ConProtec, Inc. (Salem, NH) o Mixpac Systems AG (Rotkreuz, Suiza). De forma alternativa, la punta mezcladora puede equiparse con una cabeza rociadora, tal como se describe en Cruise et al. en la patente de EE.UU. n.º 6.458.147. De forma adicional, la mezcla de las dos soluciones o dispersiones acuosas desde la jeringa de cilindro doble puede aplicarse al punto utilizando un catéter o endoscopio. Los dispositivos para la mezcla de un adhesivo tisular de dos componentes líquidos y la administración de la mezcla resultante de forma endoscópica se conocen en la técnica y pueden adaptarse para la mezcla y administración de las dos soluciones o dispersiones acuosas descritas en la presente memoria (ver, por ejemplo, Nielson, patente de EE.UU. n.º 6.723.067; y Redl et al., patente de EE.UU. n.º 4.631.055).

En otra realización, las dos soluciones o dispersiones acuosas pueden aplicarse al punto utilizando un dispositivo de rociado, tal como aquellos descritos por Fukunaga et al. (patente de EE.UU. n.º 5.582.596), Delmotte et al. (patente de EE.UU. n.º 5.989.215) o Sawhney (patente de EE.UU. n.º 6.179.862).

En otra realización, las dos soluciones o dispersiones acuosas pueden aplicarse al punto utilizando un aplicador quirúrgico mínimamente invasivo, tales como aquellos descritos en Sawhney (patente de EE.UU. n.º 7.347.850).

En otra realización, el adhesivo tisular de hidrogel de la invención se utiliza para unir al menos dos puntos anatómicos. En esta realización, la primera solución o dispersión acuosa se aplica a al menos un punto anatómico y la segunda solución o dispersión acuosa se aplica a al menos uno o del mismo punto o de otro punto utilizando los métodos descritos anteriormente. Los dos puntos o más se ponen en contacto y se sostienen juntos de forma manual o utilizando otros medios, tales como pinzas quirúrgicas, durante un tiempo suficiente para que la mezcla cure. De forma alternativa, una mezcla de las dos soluciones o dispersiones acuosas se aplica a al menos uno de los puntos anatómicos a enlazar utilizando los métodos descritos anteriormente. Los dos puntos o más se ponen en contacto y se sostienen juntos de forma manual o utilizando otros medios, tales como pinzas quirúrgicas, durante un tiempo suficiente para que la mezcla cure.

En otra realización, el polisacárido funcionalizado con aldehído y la amina de múltiples brazos dispersable en agua pueden utilizarse en forma de polvos muy finos. Los polvos pueden prepararse utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, cada una de las soluciones o dispersiones acuosas descritas anteriormente puede secarse utilizando calor, vacío, una combinación de calor y vacío o mediante liofilización para formar los polvos. Opcionalmente, los polvos pueden triturarse para tener partículas más finas utilizando los métodos conocidos en la técnica, inclusive, pero no se limitan a, molienda, trituración o machacamiento con un mortero y mano de mortero. Los polvos finos pueden esterilizarse utilizando los métodos descritos anteriormente. Los polvos finos pueden aplicarse a un punto anatómico en el tejido de un organismo vivo en una diversidad de formas. Por ejemplo, los polvos pueden aplicarse de forma individual al punto en cualquier orden por aspersión o rociado. Adicionalmente, los polvos pueden premezclarse y la mezcla resultante puede aplicarse al punto mediante aspersión o rociado. Los polvos pueden hidratarse en el punto

mediante la adición de una solución acuosa tal como agua o una solución tamponada adecuada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) o mediante los fluidos fisiológicos que se encuentren presentes en el punto. Los polvos finos también pueden utilizarse para unir dos puntos anatómicos tal como se describió anteriormente para las soluciones o dispersiones acuosas. De forma alternativa, los polvos pueden hidratarse con agua o una solución acuosa adecuada antes de utilizar para formar la primera y la segunda solución o dispersión acuosa, tal como se describió anteriormente.

En otra realización, el adhesivo tisular de hidrogel descrito en la presente memoria puede utilizarse en forma de un hidrogel seco. En esta realización, se prepara un hidrogel seco al combinar en un solvente al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído con al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua para formar un hidrogel y tratar el hidrogel para eliminar al menos una parte del solvente para formar el hidrogel seco. Los solventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, etanol, isopropanol, tetrahidrofurano, hexanos, polietilenglicol y sus mezclas. Si se utilizan dos solventes diferentes, los dos solventes son miscibles uno en el otro. En una realización el solvente es agua. El polisacárido funcionalizado con aldehído y la amina de múltiples brazos dispersable en agua pueden combinarse de varias formas. Por ejemplo, la primera solución o dispersión acuosa que comprende el polisacárido funcionalizado con aldehído y la segunda solución o dispersión acuosa que comprende la amina de múltiples brazos dispersable en agua pueden separarse y mezclarse tal como se describió anteriormente para formar el hidrogel. Las soluciones o dispersiones utilizadas para preparar el hidrogel pueden comprender además varios aditivos según la aplicación pretendida. Puede utilizarse cualquiera de los aditivos descritos anteriormente. Luego se trata el hidrogel para eliminar al menos una parte del solvente que este contiene para formar el hidrogel seco. Preferiblemente, se elimina casi todo el solvente del hidrogel. El solvente puede eliminarse del hidrogel utilizando los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando calor, vacío, una combinación de calor y vacío o haciendo fluir una corriente de aire seco o un gas inerte seco, tal como nitrógeno, sobre el hidrogel. El hidrogel seco puede esterilizarse utilizando los métodos descritos anteriormente. El hidrogel seco puede aplicarse a un punto anatómico en una cantidad de formas, tal como se describe más adelante. El hidrogel seco puede hidratarse en el punto mediante la adición de una solución acuosa adecuada tal como agua o una solución tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) o mediante los fluidos fisiológicos que se encuentren presentes en el punto.

En una realización, el hidrogel seco puede utilizarse en forma de una película. La película de hidrogel seco puede formarse al crear una mezcla de las soluciones o dispersiones, tal como se describió anteriormente, en un sustrato adecuado y tratar el hidrogel resultante para formar una película de hidrogel seco. La película de hidrogel seco puede aplicarse directamente a un punto anatómico. Adicionalmente, la película de hidrogel seco puede utilizarse para unir dos puntos anatómicos.

En otra realización, el hidrogel seco puede utilizarse en forma de partículas finas. Las partículas de hidrogel seco pueden formarse por trituración del hidrogel seco utilizando métodos conocidos en la técnica, inclusive, pero no se limitan a, molienda, trituración o machacamiento con un mortero y mano de mortero. Las partículas de hidrogel seco pueden aplicarse al punto anatómico en una diversidad de formas, tal como mediante aspersion o rociado, y también pueden utilizarse para unir dos puntos anatómicos.

Kits

En una realización, la invención proporciona un kit que comprende al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído colgantes y al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario.

En otra realización, el kit comprende una primera solución o dispersión acuosa que comprende al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído colgantes y una segunda solución o dispersión acuosa que comprende al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario. Cada una de las soluciones o dispersiones acuosas puede estar contenida en cualquier recipiente, tal como un vial o un cilindro de jeringa.

En otra realización, el kit comprende al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído colgantes y al menos una amina con múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario en forma de polvos finos, tal como se describió anteriormente. Los polvos pueden estar contenidos en recipientes separados o pueden premezclarse y estar contenidos en un único contenedor. El kit también comprende una solución acuosa para hidratar los polvos.

En otra realización, el kit comprende un hidrogel seco tal como se describió anteriormente. El hidrogel seco puede encontrarse en forma de película, partículas finas u otras formas secas. El kit puede comprender adicionalmente una solución acuosa para hidratar el hidrogel seco. Las partículas de hidrogel seco pueden estar contenidas en cualquier contenedor adecuado.

55 Aplicaciones médicas:

El hidrogel descrito en la presente memoria puede ser útil como adhesivo tisular o sellante para aplicaciones médicas que requieren un tiempo de degradación más rápido, inclusive, pero no se limitan a, la prevención de adherencias no deseadas de tejido con tejido que resultan de traumatismos o cirugías. En estas aplicaciones, el polisacárido

funcionalizado con aldehído y la amina de múltiples brazos dispersable en agua o el hidrogel seco pueden aplicarse al punto anatómico deseado utilizando los métodos descritos anteriormente.

Ejemplos

5 La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Se debería comprender que estos Ejemplos, en tanto indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan únicamente a modo ilustrativo. A partir de la descripción anterior y de estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de la presente invención y, sin apartarse del espíritu y alcance de esta, pueden realizarse varios cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a varios usos y condiciones.

Preparación de reactivos

10 Preparación de dextrano con grupos aldehído colgantes (AFD-15-90):

Se preparó dextrano con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 15 kDa y un grado de sustitución de aldehído de aproximadamente 90% utilizando un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 9 a 15 aproximadamente 11 kDa con alilglicidiléter para formar una olefina intermedia, que luego se hizo reaccionar con ozono para formar el dextrano que contiene grupos aldehído colgantes.

En la primera etapa, se agregaron 30 g de dextrano (peso molecular promedio de 9-11 kDa, Sigma) y 30 mL de agua en un matraz de 3 cuellos. Se enfrió la solución a 10°C y luego se agregaron 39 mL de una solución de NaOH al 20% en peso. La solución resultante se agitó durante 25 min, proporcionando una solución de color amarillo pálido y luego se agregó 84,58 g (4 equiv.) de alilglicidiléter (Aldrich). La mezcla resultante se calentó a 65°C durante 5,5 horas y luego se permitió enfriar a temperatura ambiente, luego de lo cual se ajustó el pH a 7,0 con HCl 1 N. Se diluyó la mezcla con 200 mL de agua adicionales y se purificó utilizando un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore (Millipore Corp., Billerica, MA), al filtrar mediante filtros de corte de 1 kDa con remplazo continuo de filtrado con agua pura hasta que se recolectó 5x el volumen de solución inicial como filtrado. Se tomó una pequeña muestra y se liofilizó con fines analíticos. El resto del filtrado se utilizó directamente en la etapa posterior de ozonólisis. El grado de sustitución se determinó que fue 1,33 mediante RMN de protones a partir de la relación de integración entre los picos de olefina y los picos anoméricos en 4,8-5,0.

En la segunda etapa, se agregaron 460 mL del filtrado resultante de la etapa 1 a un matraz de 2 L de 3 cuellos equipado con una barra agitadora magnética y una entrada de tubo de aspersión. La solución se enfrió en un baño helado a 0-5°C y luego se administró ozono por aspersión a partir de un generador de ozono (ClearWater Tech, LLC., San Luis Obispo, CA; Modelo CD10) al 100% de la energía que genera 7% de ozono. Se dio una formación de espuma, que se controló mediante la adición de unas pocas gotas de 1-heptanol. Se tomaron muestras a las 6,25 y 7,75 horas y se analizaron utilizando 13-C NMR. La desaparición de resonancias a 118 y 134 ppm indicó que la olefina se consumió antes de las 7,75 horas. Luego, se agregó una solución de sulfito de sodio (23,3 g en 138 mL de agua) gota a gota con agitación. Se observó un proceso exotérmico y se permitió que la mezcla de reacción se agitara durante la noche en nitrógeno. Se transfirió la mezcla a un frasco de vidrio de 1 L y se filtró mediante el sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore con filtros de corte de 1 kDa. Se agregó agua continuamente para remplazar el filtrado recolectado y lo retenido se recicló de vuelta al frasco de vidrio. Este proceso se continuó hasta que se recolectó más de 5x el volumen de reacción inicial en el filtrado. La solución purificada se congeló luego y se liofilizó para proporcionar 53,9 g de un sólido blanco blando. El grado de sustitución de aldehído del producto sólido resultante se determinó que fue 89% utilizando el método de Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991). El peso molecular promedio en peso del dextrano funcionalizado con aldehído se determinó que fue a aproximadamente 15 kDa utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por su sigla en inglés). Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-15-90.

Se elaboró una segunda preparación de este dextrano funcionalizado con aldehído utilizando el mismo procedimiento. Se determinó que el grado de sustitución de aldehído del producto resultante fue de 92% utilizando el método de Zhao y Heindel y el peso molecular promedio en peso fue de 16 kDa utilizando SEC. Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-16-92.

Preparación de inulina con grupos aldehído colgantes (AFI-12-49):

50 Se preparó inulina con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 12 kDa y un grado de sustitución de aldehído de aproximadamente 49% utilizando el procedimiento de dos etapas descrito anteriormente.

En la primera etapa, se suspendieron 20 g de inulina (peso molecular promedio de aproximadamente 4 kDa, Sigma) en 200 mL de agua, se calentó a 70°C durante 1 hora para disolverse y luego se enfrió a 65°C. A esta solución se agregaron 23 mL de solución de hidróxido de sodio (20% en peso en agua), seguido por la adición lenta de alilglicidiléter (50,7 g) mediante una bomba de jeringa a una velocidad de 3 mL/min. Luego de la adición, se calentó la mezcla a 65°C durante 6 horas. Luego de dicho tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temp. ambiente y se neutralizó a pH 7 con HCl al 50%. La mezcla de reacción se purificó mediante ultrafiltración en una membrana de 1000

MWCO (se recolectó 10X el volumen de desecho).

^1H NMR (D_2O): d 5,95ppm (m, integral 1,0, $\text{OCH}_2\text{C}(\text{H})=\text{CH}_2$), 5,31 (dd, integral 2,1, $\text{OCH}_2(\text{CH})=\text{CH}_2$), 4,37 (br. s, integral 0,40), 4,25 (br. s, integral 0,76), 4,0-3,55 (br. m, integral 12,9).

5 En la segunda etapa, se enfrió el filtrado a aproximadamente 5°C utilizando un baño de hielo/agua. Se administró ozono por aspersión dentro de la solución agitada durante 6 horas. Se agregó 1-heptanol (unas pocas gotas) para controlar la formación de espuma. Al final de la reacción, se agregó una solución de sulfito de sodio (16 g en 100 mL de agua) a la solución enfriada (enfriada en un baño de hielo/agua). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante la noche. Se purificó el producto mediante ultrafiltración (MWCO 1000, se recolectó 12X el volumen de desecho). Se liofilizó el filtrado para proporcionar un sólido blanco.

10 El análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) del producto proporcionó lo siguiente: $M_w = 1,2 \times 10^4$, $M_n = 7,3 \times 10^3$, $M_z = 1,5 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1,6$.

El grado de sustitución de aldehído se determinó que fue aproximadamente 49% mediante titulación del aducto de hidroxilamina del aldehído de inulina utilizando el método descrito en Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991). Esta inulina funcionalizada con aldehído se denomina en la presente memoria AFI-12-49.

15 Preparación de dextrano con grupos aldehído colgantes (AFD-7-86):

20 Se preparó dextrano con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 5 a 11 kDa y un grado de sustitución de aldehído de 86% utilizando un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 kDa con glicidol para formar un dextrano alquilado. En la segunda etapa, el dextrano alquilado se oxidó con periodato de sodio para oxidar los grupos de extremo diol agregados en la primera etapa para proporcionar dextrano con grupos aldehído colgantes.

25 En la primera etapa, se suspendieron 20 g de dextrano (peso molecular promedio de 5-11 kDa, Sigma) en 20 mL de agua y se calentó a 55°C . A esta solución se agregaron 25 mL de solución de hidróxido de sodio (20% en peso e agua), seguido por la adición lenta de glicidol (36 g, Aldrich) utilizando una bomba de jeringa a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min a 55°C . Luego, se calentó la mezcla a 55°C durante 6 horas, luego de lo cual se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se lavó el producto dos veces con 20 mL de éter para eliminar el exceso de reactivo. La mezcla resultante amarilla y homogénea se neutralizó con HCl al 50% sobre hielo (pH final de 7,3). Se precipitó la muestra en aproximadamente 5x el volumen del isopropanol frío ($\sim 0^\circ\text{C}$). Se decantó la capa de isopropanol, se lavó el producto sólido con isopropanol frío y se repitió el proceso de disolución seguido por la precipitación dos veces más. Se secó el producto sólido al vacío durante 48 horas.

35 En la segunda etapa, se disolvieron 15 g del producto sólido de la primera etapa en 150 mL de agua en un matraz de fondo redondo y luego se enfrió la solución resultante a 4°C . Se agregó una solución de periodato de sodio (8,25 g en 85 mL de agua) al matraz de fondo redondo gota a gota durante 30 min. Se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 2 horas y luego se agregaron 10,4 g (9,3 mL) de etilenglicol a la mezcla de reacción, que se agitó luego durante 10 min. Se purificó el producto utilizando un sistema TFF (Millipore Corp., Billerica, MA) con una membrana de corte de peso molecular de 1000 y se liofilizó para proporcionar 10 g de polvo blanco. El grado de sustitución de aldehído del producto se determinó que fue 86% mediante titulación del aducto de hidroxilamina utilizando el método descrito por Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991).

40 El análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) del producto proporcionó lo siguiente: $M_w = 7,4 \times 10^3$, $M_n = 4,8 \times 10^3$, $M_z = 1,1 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1,5$. Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-7-86.

Preparación de dextrano que tiene grupos aldehído colgantes (AFD-9-120):

45 Se preparó dextrano con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 9 kDa y un grado de sustitución de aldehído de 120% utilizando un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 kDa con glicidol para formar dextrano alquilado. En la segunda etapa, el dextrano alquilado se oxidó con periodato de sodio para oxidar los grupos de extremo diol agregados en la primera etapa para proporcionar dextrano con grupos aldehído colgantes.

50 En la primera etapa, se hicieron reaccionar tres lotes de dextrano con glicidol para formar el dextrano alquilado. En dos de los lotes, se hicieron reaccionar 20 g de dextrano (peso molecular promedio de 5-11 kDa, Sigma) con glicidol (36 g, Aldrich) de la misma forma que se describió anteriormente, para la primera etapa de la preparación de AFD-7-86. En el tercer lote, la relación molar del glicidol respecto al dextrano varió. Se disolvió dextrano (10 g) en una solución formada por la combinación de 10 mL de agua y 12,5 mL de solución de hidróxido de sodio (20% en peso). Se agregó glicidol (44g, Aldrich) a la solución de dextrano utilizando una bomba de jeringa a una velocidad de 0,7 mL/min. Se calentó la mezcla a 55°C y se agregaron 20 mL de agua. La mezcla de reacción se calentó a 55°C durante 6 horas. Se aisló el producto tal como se describió anteriormente para AFD-7-86. Se combinaron los tres lotes para elaborar un lote

maestro de materiales para la segunda etapa.

5 En la segunda etapa, se disolvieron 25 g del producto sólido del lote maestro descrito anteriormente en 250 mL de agua en un matraz de fondo redondo y luego se enfrió la solución resultante a 4°C. Se agregó una solución de periodato de sodio (20,8 g en 125 mL de agua) al matraz de fondo redondo gota a gota durante 1 hora. Se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 2 horas y luego se agregaron 66 g de etilenglicol a la mezcla de reacción, que luego se agitó durante 30 min. Luego de tal tiempo, se filtró la mezcla de reacción. Se purificó el filtrado utilizando un sistema TFF (Millipore Corp., Billerica, MA) con una membrana de corte de peso molecular de 1000 y se liofilizó para proporcionar 17 g de polvo blanco. El grado de sustitución de aldehído del producto se determinó que fue 120% mediante titulación del aducto de hidroxilamina utilizando el método descrito por Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991).

10 El análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) del producto proporcionó lo siguiente: $M_w = 8,9 \times 10^3$, $M_n = 6,8 \times 10^3$, $M_z = 1,2 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1,3$. Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-9-120.

Preparación de dextrano con grupos aldehído colgantes (AFD-13-64):

15 Se preparó dextrano con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 13 kDa y un grado de sustitución de aldehído de 64% utilizando un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 kDa con glicidol para formar dextrano alquilado. En la segunda etapa, el dextrano alquilado se oxidó con periodato de sodio para oxidar los grupos de extremo diol agregados en la primera etapa para proporcionar dextrano con grupos aldehído colgantes.

20 La primera etapa se lleva a cabo tal como se describió anteriormente para AFD-9-120. En la segunda etapa, se disolvieron 25 g del producto sólido del lote maestro del dextrano alquilado descrito anteriormente para AFD-9-120 en 250 mL de agua en un matraz de fondo redondo y luego se enfrió la solución resultante a 4°C. Se agregó una solución de periodato de sodio (10,4 g en 60 mL de agua) al matraz de fondo redondo gota a gota durante 1 hora. Se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 2 horas y luego se agregaron 6 g de etilenglicol a la mezcla de reacción, que luego se agitó durante 30 min. Luego se filtró la mezcla de reacción. Se purificó el filtrado utilizando un sistema TFF (Millipore Corp., Billerica, MA) con una membrana de corte de peso molecular de 1000 y se liofilizó para proporcionar 17 g de polvo blanco. El grado de sustitución de aldehído del producto se determinó que fue 64% mediante titulación del aducto de hidroxilamina utilizando el método descrito por Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991).

30 El análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) del producto proporcionó lo siguiente: $M_w = 1,3 \times 10^4$, $M_n = 9,8 \times 10^3$, $M_z = 1,8 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1,3$. Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-13-64.

Preparación de dextrano con grupos aldehído colgantes (AFD-13-46):

35 Se preparó dextrano con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 13 kDa y un grado de sustitución de aldehído de 46% utilizando un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 kDa con alilglicidiléter para formar una olefina intermedia, que luego se hizo reaccionar con ozono para formar el dextrano que contiene grupos aldehído colgantes.

40 En la primera etapa, se agregaron 30 g de dextrano (peso molecular promedio de 9-11 kDa, Sigma) y 30 mL de agua en un matraz de 3 cuellos. Se enfrió la solución a 10°C y luego se agregaron 39 mL de una solución de NaOH al 20% en peso. La solución resultante se agitó durante 25 min, proporcionando una solución de color amarillo pálido y luego se agregó 42,27 g (2 equiv.) de alilglicidiléter (Aldrich). La mezcla resultante se calentó a 65°C durante 5,5 horas y luego se permitió enfriar a temperatura ambiente, luego de lo cual se ajustó el pH a 7,0 con HCl 1 N. Se diluyó la mezcla con 200 mL de agua adicionales y se purificó con un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore (Millipore Corp., Billerica, MA), utilizando filtros de corte de 1 kDa con remplazo continuo de filtrado con agua pura hasta que se recolectó 5x el volumen de solución inicial como filtrado. Se tomó una pequeña muestra del filtrado y se liofilizó con fines analíticos. El resto del filtrado se utilizó directamente en la etapa posterior de ozonólisis. Se encontró que el grado de sustitución fue 0,84 mediante RMN, integrando los picos olefinicos respecto a las resonancias anoméricas.

45 En la segunda etapa, se agregaron 475 mL del filtrado resultante de la etapa 1 a un matraz de 2 L de 3 cuellos equipado con una barra agitadora magnética y una entrada de tubo de aspersión. La solución se enfrió en un baño helado a 0-5°C y luego se administró ozono por aspersión a partir de un generador de ozono (ClearWater Tech, LLC., San Luis Obispo, CA; Modelo CD10) al 100% de la energía que genera 7% de ozono. Se dio una formación de espuma, que se controló mediante la adición de unas pocas gotas de 1-heptanol. Se tomaron muestras a las 2 y 4 horas y se analizaron utilizando 13-C NMR. La desaparición de resonancias a 118 y 134 ppm indicó que la olefina se consumió antes de las 4 horas. Luego, se agregó una solución de sulfito de sodio (19,6 g en 117 mL de agua) gota a gota con agitación. Se observó un proceso exotérmico y se permitió que la mezcla de reacción se agitara durante la noche en nitrógeno. Se transfirió la mezcla a un frasco de vidrio de 1 L y se filtró mediante el sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore con filtros de corte de 1 kDa. Se agregó agua continuamente para reemplazar el filtrado

recolectado y lo retenido se recicló de vuelta al frasco de vidrio. Este procedimiento se continuó hasta que se recolectó más de 5x el volumen de reacción inicial en el filtrado. La solución purificada se congeló luego y se liofilizó para proporcionar 28,6 g de un sólido blanco blando. El grado de sustitución de aldehído del producto sólido resultante se determinó que fue 46% utilizando el método de Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research, 1991, 8:400). El peso molecular promedio en peso del dextrano funcionalizado con aldehído se determinó que fue a aproximadamente 13 kDa utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por su sigla en inglés). Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-13-46.

Preparación de dextrano con grupos aldehído colgantes (AFD-19-64):

Se preparó dextrano con grupos aldehído colgantes y un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 19 kDa y un grado de sustitución de aldehído de 60% utilizando el procedimiento de dos etapas descrito anteriormente.

En la primera etapa, se agregaron 30 g de dextrano (peso molecular promedio de 9-11 kDa, Sigma) y 30 mL de agua en un matraz de 3 cuellos. Se enfrió la solución a 10°C y luego se agregaron 39 mL de una solución de NaOH al 20% en peso. La solución resultante se agitó durante 25 min, proporcionando una solución de color amarillo pálido y luego se agregó 63,41 g (3 equiv.) de alilglicidiléter (Aldrich). La mezcla resultante se calentó a 65°C durante 5,5 horas y luego se permitió enfriar a temperatura ambiente, luego de lo cual se ajustó el pH a 7,0 con HCl 1 N. Se diluyó la mezcla con 200 mL de agua adicionales y se purificó utilizando un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore, al filtrar mediante filtros de corte de 1 kDa con remplazo continuo de filtrado con agua pura hasta que se recolectó 5x el volumen de solución inicial como filtrado. Se tomó una pequeña muestra y se liofilizó con fines analíticos. El resto del filtrado se utilizó directamente en la etapa posterior de ozonólisis. El grado de sustitución se determinó que fue 0,99 mediante RMN a partir de la relación de integración entre los picos de olefina y los picos anoméricos en 4,8-5,0.

En la segunda etapa, se agregaron 475 mL del filtrado resultante de la etapa 1 a un matraz de 2 L de 3 cuellos equipado con una barra agitadora magnética y una entrada de tubo de aspersion. La solución se enfrió en un baño helado a 0-5°C y luego se administró ozono por aspersion a partir de un generador de ozono (ClearWater Tech, LLC., San Luis Obispo, CA; Modelo CD10) al 100% de la energía que genera 7% de ozono. Se dio una formación de espuma, que se controló mediante la adición de unas pocas gotas de 1-heptanol. Se tomaron muestras a las 4 y 5,75 horas y se analizaron utilizando 13-C NMR. La desaparición de resonancias a 118 y 134 ppm indicó que la olefina se consumió antes de las 5,75 horas. Luego, se agregó una solución de sulfito de sodio (23,3 g en 139 mL de agua) gota a gota con agitación. Se observó un proceso exotérmico y se permitió que la mezcla de reacción se agitara durante la noche en nitrógeno. Se transfirió la mezcla a un frasco de vidrio de 1 L y se filtró mediante el sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore con filtros de corte de 1 kDa. Se agregó agua continuamente para remplazar el filtrado recolectado y lo retenido se recicló de vuelta al frasco de vidrio. Este proceso se continuó hasta que se recolectó más de 5x el volumen de reacción inicial en el filtrado. La solución purificada se congeló luego y se liofilizó para proporcionar 39,1 g de un sólido blanco blando. El grado de sustitución de aldehído del producto sólido resultante se determinó que fue 60% utilizando el método de Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 1991, 8:400). El peso molecular promedio en peso del dextrano funcionalizado con aldehído se determinó que fue a aproximadamente 19 kDa utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por su sigla en inglés). Este dextrano funcionalizado con aldehído se denomina en la presente memoria AFD-19-64.

Preparación de dextrano con grupos aldehído colgantes (DAFD-10-16):

Se preparó dextrano funcionalizado con dialdehído en el cual los grupos dialdehído colgantes se unen a la estructura principal del dextrano mediante un enlace éter utilizando un procedimiento de tres etapas.

Etapas 1:

A un matraz de dos cuellos de 300 mL equipado con una barra de agitación magnética y una entrada de nitrógeno se agregaron 74,3 mL de una solución de hidróxido de sodio al 40% en peso y 0,94 g (2,91 mmol) de bromuro de tetrabutilamonio. Se enfrió la solución a 5-10°C y se trató con 5,0 g (59,44 mmol) de 3-ciclopenteno-1-ol seguido por la adición gota a gota de 22,0 g de epiclorohidrina (237,76 mmol) durante un período de 20 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se vertió la mezcla de reacción en aproximadamente 50 mL de hielo/agua y se agitó para proporcionar una solución, que se extrajo tres veces con porciones de 50 mL de dietiléter. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución de salmuera hasta que se volvieron neutras en el tornasol y se secaron sobre MgSO₄. Se eliminó el solvente en un evaporador giratorio para proporcionar un líquido marrón. Se purificó el producto bruto mediante destilación. Se recolectó el producto a 118°C y 25 mm Hg (3,3 kPa). ¹H NMR en CDCl₃ δ ppm (2,42,m, 2H; 2,5,m 1 H; 2,6,m,2H, 2,78,m,1H; 3,15,m,1H;3,4,m,1H; 3,65-3,68,m, 1H; 4,26,m,1H; 5,68s,2H)

Etapas 2:

En un matraz de 2 cuellos de 10 mL equipado con una barra de agitación magnética y condensador de reflujo con entrada de nitrógeno se colocaron 0,58 mL de agua seguidos por 0,5778 g (3,567 mmol) de dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 kDa. Se agitó la solución para formar una suspensión. Se agregaron al matraz 0,75 mL de solución de NaOH al 20% en peso. Luego de agitar durante 30 min, se agregó 1,0 g (7,134 mmol) de glicidil 3-ciclopenteniléter. Se calentó la solución en un baño de aceite a 65°C durante

5,5 horas. Luego, se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7,0 con HCl 0,5 M. Se diluyó la solución resultante a aproximadamente 400 mL con agua, luego se purificó utilizando el sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore con un cassette de corte de peso molecular de 1000. Se liofilizó una pequeña alícuota para análisis. Se obtuvo ^1H NMR en D_2O . δ ppm (2,2,d; 2,4,d; 3,31-3,7,m; 4,1,s; 4,77,s; 4,9,s(b); 5,55, s).

- 5 Se trató el resto de la solución con ozono para elaborar dextrano funcionalizado. A partir de la RMN, se determinó el grado de sustitución mediante la integración de los picos anoméricos a 5,0-5,2 ppm en func. de los picos olefinicos. Se encontró que el grado de sustitución fue 0,52.

Etapa 3:

- 10 A un matraz de 3 cuellos de 1 L que contenía 400 mL de la solución acuosa de dextrano funcionalizado (de la etapa anterior) a aproximadamente 8°C se le administró por aspersion ozono durante 5,5 horas. Se detuvo el flujo de ozono y se agregó una solución de 0,45 g de sulfito de sodio en 3 mL de agua al matraz a 8°C . Se agitó la solución durante la noche y se purificó mediante ultrafiltración en el sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore utilizando un cassette de 1000 MWCO. Se congeló la solución final y se liofilizó para proporcionar 0,68 g de un sólido tipo espuma.

^1H NMR se obtuvo en D_2O . δ ppm (1,318,m; 1,523,m; 1,8,m; 2,1,m; 2,3-2,48,m; 3,3-3,9,m; 4,9,s; 5,1, s(b); 5,5,s)

- 15 El grado de sustitución de aldehído se determinó que fue aproximadamente 16% mediante titulación del aducto de hidroxilamina del dextrano funcionalizado con dialdehído utilizando el método descrito en Zhao y Heindel (Pharmaceutical Research 8:400, 1991). Este dextrano funcionalizado con dialdehído se denomina en la presente memoria DAFD-10-16.

Preparación de dextrano con grupos dialdehído colgantes (DAFD unido por ésteres):

- 20 Se preparó dextrano funcionalizado con dialdehído en el cual los grupos dialdehído colgantes se unen a la estructura principal del dextrano mediante un enlace éster utilizando un procedimiento de dos etapas.

Etapa 1:

- 25 En un matraz de 3 cuellos de 50 mL, equipado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se colocaron 22 mL de dimetilacetamida (DMAC) seguidos por 1,817 g (11,217 mmol) de dextrano con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 kDa y 1,09 g (25,71 mmol) de cloruro de litio. Se formó una suspensión, que se calentó a 90°C durante una hora hasta que resultó una solución clara. Se enfrió la solución a temperatura ambiente y se agregaron 0,91 mL (11,217 mmol) de piridina seguidos por la adición gota a gota de 2,18 g (11,217 mmol) de cloruro de 3-ciclopentenocarbonilo. Se agregó 4-Dimetilaminopiridina (DMAP, Aldrich) (30 mg) y se calentó la mezcla a 60°C durante la noche, es decir, aproximadamente 20 horas). Luego de enfriarse, se agregó la solución marrón resultante gota a gota a 200 mL de agua fría con agitación para proporcionar una solución amarilla. Se ajustó el pH de 2,15 a 6,0 utilizando una solución de NaOH 0,25 N. Se purificó el producto bruto en un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore utilizando un cassette de corte de peso molecular de 1000. Se congeló una pequeña alícuota y se liofilizó para obtener una muestra analítica.

- 35 ^1H NMR. δ ppm (2,59-2,66,m); (2,85,s); (3,0,s); (3,24(b),s); (3,46-3,51,m); (3,52-3,71,m); (3,84,d); (3,93,d); (4,91, s); (4,97,s); (5,12,t); (5,68,s)

Etapa 2:

- 40 A un matraz de 3 cuellos de 1 L, equipado con una barra de agitación magnética y que contenía 350 mL de la solución que resulta de la etapa anterior a aproximadamente 8°C se le administró una corriente de ozono por aspersion durante 5 horas. Luego de discontinuar la aspersion de ozono, se agregó una solución de 1,41 g de sulfito de sodio en 8,4 mL de agua. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche, luego se purificó en un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore utilizando un filtro de cassette de corte de peso molecular de 1000. Se congeló la solución y se liofilizó para proporcionar 1,92 g de un sólido blanco.

^1H NMR se presentó en D_2O . δ ppm (3,49-3,79,m); (3,89-3,97,m); (4,97 d, (amplio)); 5,16(s, (b))

Este dextrano funcionalizado con dialdehído se denomina en la presente memoria DAFD unido con ésteres.

- 45 Preparación de dextrano oxidado (D10-50)

- 50 El aldehído de dextrano se elabora al oxidar dextrano en una solución acuosa con metaperiodato de sodio. Un dextrano oxidado que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10.000 Da y una conversión de óxido de aproximadamente 50% (es decir, aproximadamente la mitad de los anillos de glucosa en el polímero de dextrano se oxidan con dialdehídos) se prepara a partir de dextrano que tiene un peso molecular promedio en peso de 8.500 a 11.500 Daltons (Sigma) mediante el método descrito por Cohen et al. (publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2008/133847 en tramitación con la presente memoria y de titularidad compartida). Aquí se describe un procedimiento típico.

Se carga un reactor de 20 L equipado con agitador mecánico, embudo de adición, sonda de temperatura interna y purga de nitrógeno con 1000 g del dextrano y 9,00 L de agua desionizada. La mezcla se agita a temperatura ambiente para disolver el dextrano y luego se enfría de 10 a 15°C. A la solución de dextrano enfriada se le agrega durante un período de una hora, mientras se mantiene la temperatura de la reacción por debajo de 25°C, una solución de 1000 g de periodato de sodio disuelta en 9,00 L de agua desionizada. Una vez que se agregó toda la solución de periodato de sodio, se agita la mezcla de 20 a 25°C durante 4 horas más. Luego se enfría la mezcla de reacción a 0°C y se filtra para clarificar. Se agrega cloruro de calcio (500 g) al filtrado y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min y luego se filtra. Se agrega yoduro de potasio (400 g) al filtrado y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se agrega una parte de 3 L de la solución roja resultante a 9,0 L de acetona durante un período de 10 a 15 min. con agitación enérgica mediante un agitador mecánico durante la adición. Luego de unos pocos minutos más, el producto aglomerado se separa del líquido sobrenadante. El resto de la solución roja obtenida por la adición de yoduro de potasio al segundo filtrado se trata de la misma forma que se mencionó anteriormente. El producto aglomerado combinado se parte en pedazos, se combina con 2 L de metanol en una mezcladora de acero inoxidable grande y se mezcla hasta que el sólido se vuelve granulado. Se recupera el sólido granulado mediante filtración y se seca al vacío con purga de nitrógeno. Luego se muele con martillos el sólido granulado hasta quedar un polvo fino. Se carga un reactor de 20 L con 10,8 L de agua desionizada y 7,2 L de metanol y se enfría la mezcla a 0°C. El sólido granulado formado por la etapa anterior se agrega al reactor y se agita enérgicamente la suspensión durante una hora. Se discontinúa la agitación y se permite que el sólido repose en el fondo del reactor. Se decanta el líquido sobrenadante al vacío, se agregan 15 L de metanol al reactor y se agita la suspensión durante 30 a 45 min. mientras se enfría a 0°C. Se filtra la suspensión en partes y se lavan los sólidos recuperados con metanol, se combinan y se secan al vacío con una purga de nitrógeno para proporcionar aproximadamente 600 g del dextrano oxidado, al que se denomina en la presente memoria D10-50.

El grado de oxidación del producto se determina mediante RMN de protones que es aproximadamente 50% (peso equivalente por grupo aldehído = 146). En el método de RMN, se determinan los integrales para dos intervalos de picos, específicamente, $-O_2CHx-$ a aproximadamente 6,2 partes por millón (ppm) a aproximadamente 4,15 ppm (menos el pico HOD) y $-OCHx-$ a aproximadamente 4,15 ppm a aproximadamente 2,8 ppm (menos cualquier pico de metanol, si estuviera presente). El cálculo del nivel de óxido se basa en la relación (R) para estas áreas, específicamente $R = (OCH)/(O_2CH)$.

Preparación de octaamina PEG 10K de ocho brazos (P8-10-1):

La octaamina PEG 10K de ocho brazos ($M_n=10$ kDa) se sintetiza utilizando el procedimiento de dos etapas descrito por Chenault en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2007/0249870, en tramitación con la presente y de titularidad compartida. En la primera etapa, el cloruro de PEG 10K de 8 brazos se elabora mediante la reacción de cloruro de tionilo con el octaalcohol PEG 10K de 8 brazos. En la segunda etapa, el cloruro de PEG 10K de 8 brazos se hace reaccionar con amoníaco acuoso para proporcionar la octaamina PEG 10K de 8 brazos. Aquí se describe un procedimiento típico.

El octaalcohol PEG 10K de 8 brazos ($M_n=10000$; NOF SunBright HGEO-10000), (100 g en un matraz de fondo redondo de 500 mL) se secó mediante calor con agitación a 85°C al vacío (0,06 mm de mercurio (8,0 Pa)) durante 4 horas o mediante destilación azeotrópica con 50 g de tolueno a presión reducida (2 kPa) con una temperatura de depósito de 60°C. Se permite enfriar el octaalcohol PEG 10K de 8 brazos a temperatura ambiente y se agrega cloruro de tionilo (35 mL, 0,48 moles) al matraz, que se equipa con un condensador de reflujo y se calienta la mezcla a 85°C con agitación bajo una capa de nitrógeno durante 24 horas. El exceso de cloruro de tionilo se elimina mediante evaporación giratoria (temp. de baño 40°C). Se agregan dos partes sucesivas de 50 mL de tolueno y se evaporan a presión reducida (2 kPa, temperatura de baño 60°C) para completar la eliminación de cloruro de tionilo. Los resultados de la RMN por protones de una síntesis son:

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,71-3,69 (m, 16H), 3,67-3,65 (m, 16H), 3,50 (s, ~800H).

El octacloruro PEG 10K de 8 brazos (100 g) se disuelve en 640 mL de amoníaco acuoso concentrado (28% en peso) y se calienta en un recipiente de presión a 60°C durante 48 horas. La solución se administra por aspersión durante 1-2 horas con nitrógeno seco para quitar de 50 a 70 g de amoníaco. Luego se pasa la solución a través de una columna (500 mL de volumen de lecho) de resina con un fuerte intercambio aniónico básico (Purolite® A-860, The Purolite Co., Bala-Cynwyd, PA) en forma de hidróxido. Se recolectó el eluyente y se pasaron tres porciones de 250 mL de agua desionizada a través de la columna y se recolectaron. Las soluciones acuosas se combinan, se concentran a presión reducida (2 kPa, temperatura de baño 60°C) a aproximadamente 200 g, se congelan en porciones y se liofilizan para proporcionar la octaamina PEG 10K de 8 brazos, a la que se hace referencia en la presente memoria como P8-10-1, como un sólido ceroso incoloro.

Preparación de hexadecaamina PEG 10K de 8 brazos (P8-10-2):

Se preparó una hexadecaamina PEG 10K de 8 brazos, a la que se hace referencia en la presente memoria como "P8-10-2", que tiene dos grupos amino primarios en el extremo de los brazos, utilizando un procedimiento de dos etapas, tal como describe Arthur en WO 2008/066787, en la cual PEG 10K de 8 brazos reaccionó con cloruro de metanosulfonilo en diclorometano en presencia de trietilamina para producir mesilato PEG 10K de 8 brazos, que

posteriormente reaccionó con tris(2-aminoetil)amina para proporcionar la hexadecaamina PEG 10K de 8 brazos. Aquí se describe una síntesis típica.

A una solución de 10 g de PEG 10K de 8 brazos ($M_n=10.000$; NOF, Tokio, Japón) en 50 mL de diclorometano agitada en nitrógeno y enfriada a 0°C se agregaron 2,2 mL de trietilamina, seguidos por 1,2 mL de cloruro de metanosulfonilo.

5 Se permite que la mezcla se caliente a temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla de reacción se transfiere a un embudo separador y se lava con cuidado tres veces con porciones de 15 mL de dihidrógenofosfato de potasio 1 M, seguido por 15 mL de carbonato de potasio 1 M y luego 15 mL de agua. La capa de diclorometano se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra mediante evaporación giratoria para proporcionar 11,17 g de mesilato PEG 10K de 8 brazos.

10 Se agita una mezcla de 10 g de mesilato PEG 10K de 8 brazos y 45 mL de tris(2-aminoetil)amina disuelta en 45 mL de agua a temperatura ambiente durante 24 horas. Se diluye la mezcla de reacción con 45 mL de bicarbonato de sodio acuoso al 5% (p/p) y se extrajo con un total de 500 mL de diclorometano dividido en 3 porciones. Se seca la solución de diclorometano sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación giratoria de 20 a 25 g. Se agrega éter (100 mL) a la solución de diclorometano concentrada con agitación enérgica y se enfría la mezcla a 0°C, lo que provoca que un sólido ceroso se separe de la solución. Se decantó el solvente del sólido ceroso y el sólido ceroso se secó al vacío para proporcionar la hexadecaamina PEG 10K de 8 brazos (P8-10-2).

Ejemplos 1-15

Prueba de rotura in vitro de una incisión de bisturí sellada en cuerno uterino porcino

20 El objeto de estos Ejemplos fue demostrar la resistencia a la rotura de un sello elaborado con varios hidrogeles de una incisión realizada en un cuerno uterino porcino.

Se utilizó un sistema de bomba de jeringa para medir la resistencia a la rotura de un sello de una incisión realizada en una parte del cuerno uterino porcino. La bomba de jeringa (modelo n.º 22, Harvard Apparatus, Holliston, MA) se modificó para equiparse con dos jeringas de 30 mL, que se conectaron mediante una unión en "Y". Se bombeó agua a través de una pieza individual de tubo Tygon® R-36 (0,6 cm de diámetro) y a través de un calibrador de presión (modelo PDG 5000L, Omega Engineering, Stamford, CT). Se colocó un corte de aproximadamente 12,5 cm de cuerno uterino porcino puro, obtenido de un matadero local, en un extremo con un tapón de metal con un adaptador de línea de alimentación para el suministro de agua desde la bomba de la jeringa y en el otro extremo con un tapón de metal con un agujero roscado que puede sellarse con un tornillo mecánico. Se mantuvieron los tapones en su lugar con cuerdas de nylon alrededor de la parte externa del intestino. Se realizó una incisión a través de la pared del cuerno uterino hasta el interior al perforar con una cuchilla quirúrgica 5 de Bard Parker™ (obtenida de BD Surgical Products, Franklin Lakes, NJ) equipada con una cuchilla quirúrgica #15. La incisión en el exterior del cuerno uterino fue más amplia que la de la cuchilla de bisturí (normalmente 4-5 mm) mientras que el agujero a través de la pared interna fue de aproximadamente 3 mm (aproximadamente equivalente a la cuchilla). El tamaño de la incisión reproduce la distancia entre las suturas interrumpidas si un intestino fuera a cortarse y suturarse luego. Se llenó el cuerno uterino con agua con un tinte púrpura mediante la bomba de la jeringa hasta que el agua comenzó a salir del agujero abierto en el tapón de extremo y también de la perforación del bisturí en la pared del cuerno uterino. Luego se apagó la bomba y se selló el tapón de extremo con el tornillo mecánico. El punto de incisión del bisturí se secó utilizando una toalla de papel.

Se prepararon las soluciones de polisacárido funcionalizado con aldehído y amina PEG de múltiples brazos, tal como se muestra en la Tabla 1, en agua con agitación durante la noche a 37°C y 175 rpm. Se aplicaron las dos soluciones a la incisión utilizando una jeringa de doble cilindro (Mixpac Systems AG (Rotkreuz, Suiza) equipada con un mezclador estático de 16 o 12 etapas (Mixpac Systems AG). Luego de la aplicación, se permitió que el adhesivo curara a temperatura ambiente durante no más que 2 min. La prueba presión de rotura, a la que también se hace referencia en la presente memoria como prueba de presión de fuga, se realizó al presurizar el intestino sellado con agua de la bomba de jeringa a una tasa de flujo de 11 mL/min hasta que el sello bioadhesivo comenzó a tener pérdidas, en cuyo momento se registró la presión. La falla del adhesivo se atribuyó cuando el agua se escapó debajo del sello entre el hidrogel y la superficie del tejido. La falla cohesiva se atribuyó cuando el agua penetró y se escapó a través del propio hidrogel. Los resultados de la prueba de rotura se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Prueba de presión de rotura			
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Presión de rotura prom. (psi)
1	AFD-15-90 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 20% en p	1,2 (8,3 kPa)

Prueba de presión de rotura			
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Presión de rotura prom. (psi)
2	AFD-15-90 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 30% en p	2,4 (16 kPa)
3	AFD-15-90 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 20% en p	2,8 (19 kPa)
4	AFD-15-90 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 10% en p	1,3 (9,0 kPa)
5	AFD-7-86 30% en p	P8-10-1 50% en p	4,2 (29 kPa)
6	AFD-7-86 30% en p	P8-10-2 20% en p	1,1 (7,6 kPa)
7	AFD-7-86 30% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	2,7 (19 kPa)
8	AFD-9-120 25% en p	P8-10-1 30% en p	3,0 (21 kPa)
9	AFD-9-120 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 25% en p	2,5 (18 kPa)
10	AFD-13-64 25% en p	P8-10-1 30% en p	2,5 (18kPa)
11	AFD-13-64 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 25% en p	4,2 (30 kPa)
12	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	2,6 (18 kPa)
13	AFI-12-49 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	2,8 (19 kPa)
14	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:1 p/p) 30% en p	4,7 (32 kPa)
15	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 30% en p	4,2 (29 kPa)

Los resultados que se muestran en la Tabla 1 demuestran que los hidrogeles formados por la reacción de un polisacárido funcionalizado con aldehído, que contiene grupos aldehído colgantes individuales, con una mezcla de polietilenglicolamina de extremo ramificado de ocho brazos, que tiene dos grupos amina primarios en el extremo de los brazos del polímero (es decir, P8-10-2) y una polietilenglicolamina de ocho brazos (P8-10-1) que tiene un grupo amina primario en el extremo de los brazos del polímero, se adhieren bien y sellan bien los tejidos biológicos.

Ejemplos 16-26

Prueba de biocompatibilidad in vitro - Citotoxicidad

El objeto de estos Ejemplos fue demostrar la seguridad de los hidrogeles que resultan de la reacción de un polisacárido funcionalizado con aldehído con una amina PEG de múltiples brazos en una prueba in vitro.

5 La prueba se realizó utilizando cultivos de fibroblastos humanos NIH3T3 de acuerdo con ISO10993-5:1999. Los fibroblastos humanos NIH3T3 se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA) y se cultivaron en medio esencial modificado Dulbecco (DMEM), complementado con suero fetal bovino al 10%.

10 Se expuso a los cultivos de fibroblastos humanos NIH3T3 a los hidrogeles realizados mediante la combinación volúmenes equivalentes de una solución acuosa de un polisacárido funcionalizado con aldehído y una solución acuosa de amina PEG de múltiples brazos, tal como se muestra en la Tabla 2. Se prepararon y mezclaron las soluciones acuosas para formar hidrogeles tal como se describió en los Ejemplos 1-15. Cada hidrogel se ubicó en el fondo de un pocillo en una placa de cultivo de poliestireno de modo que aproximadamente 1/4 de los fondos de pocillos estuvieran cubiertos. Los pocillos se esterizaron luego bajo luz UV y se sembraron con 50.000-100.000 células NIH3T3.

15 Las células se cultivaron normalmente confluentes y recubrieron el fondo del pocillo, llegando hasta los bordes de los hidrogeles; sin embargo, no se desarrollaron sobrepasando los hidrogeles. Estos resultados, que se resumen en la Tabla 2, demuestran la carencia de citotoxicidad de los hidrogeles, así como una carencia de adherencia de los cultivos celulares a los hidrogeles.

Tabla 2

Resultados de citotoxicidad			
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Citotoxicidad
16	AFI-12-49 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	no tóxico
17	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:1 p/p) 30% en p	no tóxico
18	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 25% en p	no tóxico
19	AFD-9-120 25% en p	P8-10-1 30% en p	no tóxico
20	AFD-9-120 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 25% en p	no tóxico
21	AFD-13-64 25% en p	P8-10-1 30% en p	no tóxico
22	AFD-13-64 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 25% en p	no tóxico
23	AFD-15-90 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 20% en p	no tóxico
25	AFD-15-90 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 20% en p	no tóxico

Resultados de citotoxicidad			
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Citotoxicidad
26	AFD-15-90 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 30% en p	no tóxico

Ejemplos 27-37

Degradación in vitro de hidrogeles

El objeto de estos Ejemplos fue demostrar que los hidrogeles formados por la reacción de un polisacárido funcionalizado con aldehído con una amina PEG de múltiples brazos se hidrolizan fácilmente en una prueba in vitro.

- 5 Se prepararon las muestras de hidrogeles al mezclar volúmenes equivalentes de una solución acuosa de un polisacárido funcionalizado con aldehído y una solución acuosa de una amina PEG de múltiples brazos, tal como se muestra en la Tabla 3. Se prepararon y mezclaron las soluciones acuosas para formar hidrogeles tal como se describió en los Ejemplos 1-15. Luego de que se curaron los hidrogeles, se pesaron las muestras y se colocaron dentro de frascos que contienen PBS (solución salina tamponada con fosfato) a pH 7,4. Los frascos se colocaron dentro de un
- 10 agitador controlado por temperatura configurado a 80 rpm y 37°C. Se quitaron las muestras de los frascos en varios momentos, se secaron para eliminar el exceso de solución y se pesaron. Luego, se devolvieron las muestras a los frascos.

Los resultados se resumen en la Tabla 3. El porcentaje de hinchazón que se informa en la tabla en el peso del hidrogel medido durante el transcurso del estudio dividido por el peso inicial del hidrogel, multiplicado por 100.

15

Tabla 3

Degradación in vitro de hidrogeles				
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Tiempo (horas)	% hinchazón
27	AFD-15-90 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 30% en p	0	100
			6	332
			24	285
			54	259
			96	243
			192	218
			216	207
			264	203
			384	191
			456	184
528	176			
28	AFD-15-90 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 20% en p	0	100
			6	150
			24	102
			54	87
			96	74
			192	64
			216	59
			264	58
			384	46

Degradación in vitro de hidrogeles				
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Tiempo (horas)	% hinchazón
			456	51
			528	49
29	AFD-15-90 25% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 20% en p	0	100
			6	214
			24	176
			54	152
			96	129
			192	125
			216	125
			264	112
			384	109
			456	107
			528	107
30	AFD-7-86 40% en p	P8-10-1 50% en p	6	79
			24	0
31	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	6	0
			75	0
32	AFD-13-64 20% en p	P8-10-1 30% en p	3	20
			6	0
33	AFD-13-64 30% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	3	58
			6	0
34	AFD-13-64 30% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:1 p/p) 30% en p	6	366
			48	223
			312	59
35	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (9:1 p/p) 30% en p	6	0
36	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:1 p/p) 30% en p	6	0
			75	0
37	AFI-12-49 40% en p	P8-10-1/P8-10-2 (1:2 p/p) 25% en p	6	116
			75	20

Los resultados en la Tabla 3 demuestran que los hidrogeles formados por la reacción de un polisacárido funcionalizado con aldehído con una amina PEG de múltiples brazos se hidrolizan fácilmente en una prueba in vitro. Al utilizar diferentes cantidades de componentes en cuanto al % en p y/o al alterar la cantidad de funcionalización ya sea de la amina en las aminas PEG o del aldehído en el polisacárido funcionalizado con aldehído, el tiempo de degradación puede ajustarse de unas pocas horas a muchos días. Los resultados de la hidrólisis indican que los hidrogeles descritos en la presente memoria deberían degradarse fácilmente in vivo.

5

Ejemplos 38 y 39

Degradación in vitro de hidrogeles formados utilizando dextranos funcionalizados con dialdehído

El objeto de estos Ejemplos fue examinar la degradación in vitro de los hidrogeles formados por la reacción de dextranos funcionalizados por dialdehído con una amina PEG de múltiples brazos.

- 5 Se mezcló una solución acuosa que contenía dextrano funcionalizado con dialdehído DAFD-10-16 (Ejemplo 38) o DAFD-10 unido con ésteres (Ejemplo 39) a una concentración de 20% en p con una solución acuosa que contenía la amina PEG de múltiples brazos P8-10-1 (25% en p) para formar un hidrogel, tal como se describe en los Ejemplos 1-15. La degradación de los hidrogeles se determinó utilizando el método descrito en los Ejemplos 27-37. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

10 Tabla 4

Degradación in vitro de hidrogeles				
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Tiempo (horas)	% hinchazón
38	DAFD-10-16 20% en p	P8-10-1 25% en p	0	100
			1	249
			2	258
			4	245
			6	244
			8	243
			22	244
			26	247
39	DAFD unido por ésteres 20% en p	P8-10-1 25% en p	0	100
			1	236
			2	45,3
			4	3,6

- 15 Estos resultados demuestran que los dextranos funcionalizados con dialdehído forman geles hidrogeles con la amina PEG de múltiples brazos P-8-10-1 y que pueden obtenerse hidrogeles con una amplia gama de tasas de degradación en un entorno acuoso. Específicamente, los hidrogeles con vida útil prolongada pueden formarse utilizando el dextrano funcionalizado con aldehído que tiene grupos dialdehído colgantes donde el enlace a la estructura principal del dextrano es estable desde el punto de vista químico como en el dextrano funcionalizado con dialdehído unido por éter (Ejemplo 38). También pueden prepararse hidrogeles con degradación mucho más rápida al utilizar dextrano funcionalizado con aldehído con grupos dialdehído colgantes donde el enlace de los grupos dialdehído colgantes es potencialmente inestable desde el punto de vista hidrolítico, tal como un enlace éster (Ejemplo 39).

Ejemplos 40-44

- 20 Estabilidad de dextranos funcionalizados con aldehído en solución acuosa - Mediciones de viscosidad

El objeto de estos Ejemplos fue demostrar la estabilidad más alta de los dextranos funcionalizados con aldehído en una solución acuosa en comparación con el dextrano oxidado D10-50 utilizando mediciones de viscosidad.

- 25 Se calentaron soluciones acuosas de dextrano oxidado (25% en p) y varios dextranos funcionalizados con aldehído (25% en p), tal como se muestra en la Tabla 5, a 45°C durante 12 días. La viscosidad de las soluciones acuosas se midió a 30°C en varios momentos. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

Viscosidad de las soluciones acuosas de dextrano oxidado y dextrano funcionalizado con aldehído					
Ejemplo	Dextrano	Viscosidad (cP) Día 0	Viscosidad (cP) Día 6	Viscosidad (cP) Día 12	Disminución de viscosidad después de 12 días
40	AFD-13-64	17,37	17,35	17,94	0%

Viscosidad de las soluciones acuosas de dextrano oxidado y dextrano funcionalizado con aldehído					
Ejemplo	Dextrano	Viscosidad (cP) Día 0	Viscosidad (cP) Día 6	Viscosidad (cP) Día 12	Disminución de viscosidad después de 12 días
41	AFD-13-46	12,6	13,0	11,0	11%
42	AFD-19-64	15,7	17,6	15,1	4%
43	AFD-15-90	14,3	14,3	12,7	11%
44, Comparativo	D10-50	20	18	15,6	22%

Los resultados en la Tabla 5 muestran que las soluciones acuosas que contienen los dextranos funcionalizados con aldehído con grupos colgantes tuvieron una disminución en viscosidad luego de 12 días que varió de 0% a 11%, mientras que la viscosidad de la solución acuosa que contiene el dextrano oxidado disminuyó 22% durante el mismo período de tiempo. Estos resultados indican que los dextranos funcionalizados con aldehído con grupos aldehído colgantes son más estables en una solución acuosa que el dextrano oxidado.

Ejemplos 45-48

Estabilidad de dextranos funcionalizados con aldehído en una solución acuosa - Mediciones de reometría

El objeto de estos Ejemplos fue demostrar la estabilidad de dextranos funcionalizados con aldehído en una solución acuosa. La reometría de disco oscilante de los hidrogeles que resultan de la reacción de los dextranos funcionalizados con aldehído con las poliéteraminas de múltiples brazos se utilizó como medida de la estabilidad de las soluciones de dextrano funcionalizado con aldehído.

Se prepararon por duplicado jeringas de cilindro doble que contenían una solución acuosa de varios polisacáridos funcionalizados con aldehído en un cilindro y una solución acuosa de una amina PEG de múltiples brazos en el otro cilindro, tal como se muestra en la Tabla 6. Se llenaron otras dos jeringas de doble cilindro con una solución acuosa de dextrano oxidado D10-50 en un cilindro y una solución acuosa de P8-10-1 (20% en p) en el otro cilindro. Las soluciones acuosas contenidas en las jeringas de doble cilindro se expresaron mediante una punta de mezcla estática en la plataforma de muestra de un reómetro modelo APA2000 (Alpha Technologies, Akron, OH), y el módulo de almacenamiento (G') de la mezcla se midió y se tomó como el valor en el Día cero. El valor de G' a los 60 segundos se tomó como una medición de la velocidad de gelificación.

Un grupo de las jeringas se almacenó a 25°C durante varios períodos de tiempo y el segundo grupo de jeringas se calentó a 40°C durante varios períodos de tiempo (tal como se muestra en la Tabla 6) para proporcionar soluciones acuosas deterioradas de forma térmica de polisacáridos funcionalizados con aldehído. El módulo de almacenamiento de las soluciones mezcladas se midió tal como se describió anteriormente en varios momentos. Los resultados se muestran en la Tabla 6, expresados como el porcentaje de G' del Día cero.

Tabla 6

Resultados de reometría de la formación de hidrogeles				
Ejemplo	Solución de polisacárido funcionalizado con aldehído	Solución de amina PEG de múltiples brazos	Porcentaje de G' del Día 0 (60 seg) 25°C	Porcentaje de G' del Día 0 (60 seg) 40°C
45	AFD-15-90 (19% en p)	P8-10-1 (20% en p)	94% (Día 20)	56% (Día 20)
46	AFD-16-92 (20% en p)	P8-10-1 (20% en p)	96% (Día 26)	58% (Día 26)
47	AFI-12-49 (25% en p)	P8-10-2/P8-10-1 (2:1) 20% en p	94% (Día 26)	81% (Día 26)
48, Comparativo	D10-50 (25% en p)	P8-10-1 (20% en p)	75% (Día 30)	No gelificó (Día 30)

Los resultados en la Tabla 6 indican que los polisacáridos funcionalizados con aldehído son más estables en una

solución acuosa que el dextrano oxidado.

Ejemplo 49

Estabilidad térmica de AFD-13-64 en una solución acuosa utilizando mediciones de reometría

5 El objeto de este Ejemplo fue demostrar la estabilidad térmica del dextrano funcionalizado con aldehído AFD-13-64 en una solución acuosa utilizando reometría de disco oscilante.

10 Se prepararon dos jeringas de doble cilindro, cada una contenía una solución acuosa de AFD-13-64 (20% en p) en un cilindro y una solución acuosa de P8-10-1 (20% en p) en el otro cilindro. Se calentó una jeringa a 40°C durante 19 días; la otra jeringa se almacenó a 4°C durante el mismo período de tiempo. Luego, se midió el módulo de almacenamiento de las mezclas que resultan de cada jeringa utilizando un reómetro modelo APA2000 (Alpha Technologies, Akron, OH). El módulo de almacenamiento obtenido para la mezcla que resulta de la jeringa que se almacenó a 40°C durante 19 días fue básicamente idéntico al obtenido de la mezcla que resulta de la jeringa que se almacenó a 4°C durante el mismo período de tiempo, lo que indica que el dextrano funcionalizado con aldehído AFD-13-64 tiene buena estabilidad térmica.

Ejemplo 50, comparativo

15 Carboximetildextrano funcionalizado con aldehído con grupos aldehído colgantes unidos por un enlace amida

El objeto de este Ejemplo fue demostrar que un polisacárido funcionalizado con aldehído con grupos aldehído colgantes que se unen al polisacárido mediante un enlace amida no es estable en una solución acuosa como un polisacárido funcionalizado con aldehído con grupos aldehído colgantes que se unen al polisacárido mediante un enlace éter.

20 Preparación de carboximetildextrano de 11 kDa con grado de carboximetilación de 1,1 (CMDX-11-1.1):

25 Se disolvió dextrano con un peso molecular promedio de 8,5-11 kDa (Sigma) en 123,75 mL de NaOH 6 N a 0°C. TA esta solución fría se agregaron 30,75 g de ácido cloroacético (Aldrich). Esa mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 20 min, luego se enfrió y se neutralizó a pH 7,0 con HCl concentrado. Se precipitó el producto al agregar la solución neutralizada gota a gota a 1,0 L de metanol. Se recolectaron los sólidos por filtración y se volvió a precipitar con metanol. Luego se repitió todo el procedimiento tres veces para elevar el grado de sustitución al nivel deseado. Luego de la repetición final, se purificó adicionalmente el producto mediante ultrafiltración. Se diafiltró la solución utilizando un sistema TFF Pellicon II de Millipore. Se recolectó un total de 6 volúmenes de permeado mientras se agregaba continuamente agua para mantener un volumen de retención constante. Lo retenido se recolectó luego y se liofilizó para proporcionar 14,25 g de un sólido blando blanco. El grado de carboximetilación se determinó mediante el método de Ho et al. (Anal. Chem. 52:916, 1980), que fue 1.1. Este producto de carboximetildextrano se denomina en la presente memoria CMDX-11-1.1.

30 ^1H NMR δ 4,9-5,2 mult. (1 H), 3,4-4,4 mult (9,5H).

Preparación de carboximetildextrano funcionalizado con aldehído con grupos aldehído colgantes unidos mediante un enlace amida:

35 A un matraz de 3 cuellos de 3 litros se agregaron 13,7 g de CMDX-60-1.7 y 916,6 mL de una solución 1:1 de solución tamponada con terametilendiamina y dimetilformamida (DMF). Se formó una solución clara con un pH de 4,94. Se ajustó el pH a 4,7 mediante la adición de HCl 1,0 M. A la solución se agregaron 47,74 g de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma) seguidos por 28,87 g de n-hidroxisuccinimida (Aldrich). Se volvió a ajustar el pH de la solución a 4,7 y se agitó durante 2 horas. Luego, se agregó 4-aminobutiraldehído dietil acetal (53,88 g) en porciones durante 3,5 horas de modo que el pH no aumentara por encima de 4,7. Hacia el final de la reacción, se permitió que el pH aumentara a 6,25 y luego se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se transfirió la mezcla de reacción a un frasco de vidrio, se diluyó con agua y se filtró en un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore con filtros de corte de 1 kDa. Se recolectó un total de 5 volúmenes como permeado mientras se reciclaba de forma continua y se agregaba agua dulce para reemplazar el permeado. Se liofilizó la solución filtrada para proporcionar un producto sólido blanco. El procedimiento que antecede se repitió luego comenzando con el producto sólido blanco para aumentar la carga de grupos acetal colgantes. El rendimiento final fue 20,3 g.

45 Los grupos acetal se eliminaron al disolver el sólido en 400 mL de agua y tratar con HCl 1,0 M a un pH de 2,5 durante la noche. Luego de neutralizar con NaOH, se filtró la solución en un sistema de ultrafiltración Pellicon II de Millipore tal como se describió anteriormente y se liofilizó para proporcionar 16,45 g de sólido blanco. Se determinó el peso molecular mediante cromatografía por exclusión de tamaño, que fue 49 kDa. El grado de sustitución de aldehído por anillo se determinó mediante RMN de la muestra hidrolizada, que fue 0,37. En el método por RMN, se determinan los integrales para dos intervalos de picos, específicamente, $-\text{O}_2\text{CHx}-$ de aproximadamente 6,2 partes por millón (ppm) a aproximadamente 4,15 ppm (menos el pico HOD) y $-\text{OCHx}-$ de aproximadamente 4,15 ppm a aproximadamente 2,8 ppm (menos cualquier pico de metanol, si estuviera presente). El cálculo del nivel de óxido se basa en la relación calculada (R) para estas áreas, específicamente $R = (\text{OCH})/(\text{O}_2\text{CH})$.

55

Inestabilidad del carboximetildextrano funcionalizado con aldehído en una solución acuosa:

5 Se elaboró una solución acuosa de carboximetildextrano funcionalizado con aldehído con grupos aldehído colgantes unidos por un enlace amida al disolver 5,1 g del producto sólido obtenido tal como se describió anteriormente en 15,3 g de agua sometida a autoclave. Se agitó la mezcla a 190 rpm en una incubadora a 37°C durante 1 hora. La solución resultante se filtró mediante una membrana de 5,0 mm y dos muestras de 5 mL de la solución se colocaron en la incubadora a 55°C. Luego de 19 horas ambas muestras formaron geles ámbar que no exhibían flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:
 - 5 a) al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído individuales o dialdehídos unidos al polisacárido mediante un grupo de enlace que comprende átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero no contiene un átomo de nitrógeno, mediante un enlace éter a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido o, de forma alternativa, en el caso de dialdehídos mediante un enlace éster a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido, donde dicho polisacárido funcionalizado con aldehído tiene un peso molecular promedio en peso de 1.000 a 1.000.000 Daltons y un grado de sustitución de aldehído de 10% a 200%; y
 - 10 b) al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario, dicha amina de múltiples brazos tiene un peso molecular numérico promedio de 450 a 200.000 Daltons.
2. El kit según la reivindicación 1 en donde el polisacárido funcionalizado con aldehído es un componente de una primera solución o dispersión acuosa y la amina de múltiples brazos dispersable en agua es un componente de una segunda solución o dispersión acuosa.
- 15 3. El kit según la reivindicación 2 en donde la primera solución o dispersión acuosa comprende el polisacárido funcionalizado con aldehído a una concentración de 5% a 40% en peso respecto al peso total de la solución o dispersión.
4. El kit según la reivindicación 2 en donde la segunda solución o dispersión acuosa comprende la amina de múltiples brazos dispersable en agua a una concentración de 5% a 70% en peso respecto al peso total de la solución o dispersión.
- 20 5. Una composición de hidrogel reticulado que comprende:
 - 25 a) al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído individuales o dialdehídos unidos al polisacárido mediante un grupo de enlace que comprende átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero no contiene un átomo de nitrógeno, mediante un enlace éter a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido o, de forma alternativa, en el caso de dialdehídos mediante un enlace éster a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido, donde dicho polisacárido funcionalizado con aldehído tiene un peso molecular promedio en peso de 1.000 a 1.000.000 Daltons y tiene un grado de sustitución de aldehído de 10% a 200%; y
 - 30 b) al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario, dicha amina de múltiples brazos tiene un peso molecular numérico promedio de 450 a 200.000 Daltons;

en donde al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído y al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua se reticulan mediante enlaces covalentes formados entre los grupos aldehído colgantes del polisacárido y los grupos amina primarios de la amina de múltiples brazos dispersable en agua.
- 35 6. El kit según la reivindicación 1 o la composición de hidrogel reticulado según la reivindicación 5 en donde la amina de múltiples brazos dispersable en agua se selecciona del grupo que consiste en poliéteraminas de múltiples brazos dispersables en agua, poliamidoaminas dendríticas con terminación amino y aminas de extremo ramificado de múltiples brazos.
7. El kit o la composición de hidrogel reticulado según la reivindicación 6 en donde la amina de múltiples brazos dispersable en agua es una poliéteramina de múltiples brazos dispersable en agua.
- 40 8. El kit o la composición de hidrogel reticulada según la reivindicación 7 en donde la poliéteramina de múltiples brazos dispersable en agua se selecciona del grupo que consiste en óxidos de polietileno en forma de estrella con terminación amino, óxidos de polietileno dendríticos con terminación amino, óxidos de polietileno en estructura de panal con terminación amino, óxidos de polipropileno en forma de estrella con terminación amino, óxidos de polipropileno dendríticos con terminación amino, óxidos de polipropileno en estructura de panal con terminación amino, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de polietileno con forma de estrella con terminación amino, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de polietileno dendríticos con terminación amino, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de polietileno en estructura de panal con terminación amino y polioxialquientriaminas.
- 45 9. La composición de hidrogel reticulado según la reivindicación 5 en donde la composición se forma al hacer reaccionar:
 - 50 a) al menos un polisacárido funcionalizado con aldehído que contiene grupos aldehído individuales o dialdehídos unidos al polisacárido mediante un grupo de enlace que comprende átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero no contiene un átomo de nitrógeno, mediante un enlace éter a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido o, de forma alternativa, en el caso de dialdehídos mediante un enlace éster a uno de los grupos hidroxilo de anillo del polisacárido, donde dicho polisacárido funcionalizado con aldehído tiene un peso molecular promedio en peso de

1.000 a 1.000.000 Daltons y un grado de sustitución de aldehído de 10% a 200%, con

b) al menos una amina de múltiples brazos dispersable en agua en donde al menos tres de los brazos terminan en al menos un grupo amina primario, dicha amina de múltiples brazos tiene un peso molecular numérico promedio de 450 a 200.000 Daltons.

- 5 10. La composición de hidrogel reticulado según la reivindicación 5 en donde la composición se encuentra forma de un hidrogel seco.
11. El hidrogel seco según la reivindicación 10 en donde dicho hidrogel seco se encuentra en forma de una película.
12. El uso del kit de la reivindicación 1 o el hidrogel seco de la reivindicación 10 en la elaboración de un medicamento para formar un recubrimiento en un punto anatómico en el tejido de un organismo vivo.