(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 617 766**

(51) Int. CI.:

A61L 24/04 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/US2012/036929**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO2012158401**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12723004 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2707042**

(54) Título: **Sellantes de tejido a partir de proteínas derivadas del plasma**

(30) Prioridad:

13.05.2011 US 201113107375 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2017

(73) Titular/es:

ETHICON, INC (100.0%)
U.S. Route 22
Somerville, NJ 08876, US

(72) Inventor/es:

BORDOLOI, BINOY, K.;
ZAVATSKY, JOSEPH;
KHATRI, CHETAN, ANIRUDH y
MOLOYE-OLABISI, OLAJOMPO

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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).

Sellantes de tejido a partir de proteínas derivadas del plasma

Descripción

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención se refiere a adhesivos o sellantes tisulares formados a partir de una proteína de plasma nucleofílico y un agente de reticulación que comprende un ligador de diácido sobre el cual se fija un núcleo soluble en agua, seleccionado de una amina terciaria o polietilenglicol bifuncional, y un electrófilo, tal como N-hidroxi-succinimida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Se conocen selladores biológicos que comprenden fibrinógeno y trombina. El sellante de fibrina reticulado se forma cuando el fibrinógeno y la trombina se mezclan entre sí, pero el sellante de fibrina formado está sujeto a sufrir degradación enzimática con plasmina. Dichos selladores se degradan y absorben en aproximadamente 4 a 7 días, mientras que la resistencia mecánica del sellante y la capacidad de unión al tejido deben mantenerse hasta que la herida cicatriza, lo que puede llevar hasta aproximadamente 14 días. Un método para controlar la degradación enzimática del sellante de fibrina ha sido mediante la incorporación de ácido tranexámico o aprotinina en los componentes de formulación del sellador tisular. Se han explorado otros medios para mejorar la resistencia de adhesivos/sellantes a base de fibrina, tales como la incorporación de colágeno.

[0003] La Publicación PCT WO1999/066964 publicada de Tammishetti y col. titulada "albumina reticulada de carbodiimida para bioadhesivos, selladores quirúrgicos y dispositivos implantables", enseña un procedimiento para producir una composición de albúmina reticulada para su uso en un sellante quirúrgico bioadhesivo o dispositivo implantable, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una preparación de albúmina; (b) proporcionar una preparación de carbodiimida; y (c) mezclar dicha preparación de albúmina y dicha preparación de carbodiimida en condiciones que permitan la reticulación de dicha albúmina.

[0004] La Patente de EE.UU. Nº 6.371.975 de Cruise y col. titulada "composiciones, sistemas y procedimientos para crear in situ, protectores mecánicos, quimicamente reticulados, desvela un material protector biocompatible y biodegradable que se aplica a una región de tejido, por ejemplo, para sellar un sitio de punción vascular. El material protector comprende un compuesto, que se retícula químicamente sin el uso de una enzima para formar una matriz mecánica no líquida. El compuesto incluye preferentemente una proteína que comprende albúmina sérica recombinante o natural, que se mezcla con un polímero que comprende poli (etilen) glicol (PEG) y, más preferentemente, un polímero PEG de múltiples brazos.

[0005] La Patente de EE.UU. Nº 6.833.408 de Sehl y col. expedida el 21 de diciembre de 2004, muestra un procedimiento de reparación de tejido dañado en un paciente que comprende las etapas de: poner en contacto con el tejido dañado una composición adhesiva que comprende: (i) un polímero hidrófilo; (ii) un componente reticulable que tiene varios grupos nucleófilos; y (iii) un componente reticulable que tiene varios grupos electrófilos capaces de reaccionar con los grupos nucleófilos para formar enlaces covalentes, en los que componentes reticulables son biocompatibles y no inmunogénicos, y al menos uno de los componentes es polímero hidrófilo, y la reticulación de la composición da como resultado una matriz biocompatible, no inmunogénica, reticulada.

[0006] La Patente de EE.UU. Nº 7.868.123 de Khatri y Bordoloi, expedida el 11 de enero de 2011 y titulada "aminas terciarias derivadas y sus usos", muestra intermediarios de amina terciaria y monómeros electrófilos derivados de los mismos. La invención también se refiere a adhesivos o sellantes derivados de tales radicales electrófilos.

[0007] La solicitud de patente de EE.UU. publicada Nº. 2008/0220047 de Sawhney y col. publicada el 11 de septiembre de 2008 y titulada "hidrogeles biocompatibles de bajo hinchamiento", muestra el tratamiento quirúrgico para tratar un tejido dentro de una columna vertebral formando un hidrogel biodegradable de bajo hinchamiento in situ que es adherente a un tejido dentro de la columna vertebral. Sawhney y col. muestran un procedimiento que comprende: formar un hidrogel biodegradable de bajo hinchamiento por polimerización in situ que es adherente al tejido dentro de una columna vertebral y sustancialmente exterior a una teca en la columna vertebral, en la que los primeros grupos funcionales comprenden nucleófilos y los segundos grupos funcionales comprenden electrófilos, en el que el primer precursor sintético se selecciona del grupo que consiste en dilinas, trilisinas, y tetralisinas, en el que el segundo precursor sintético comprende un precursor multibrazo que posee un núcleo y brazos, comprendiendo cada uno de los brazos un polietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 5000, en el que el núcleo se selecciona del grupo que consiste en poliéteres, poliaminoácidos, proteínas y polioles y en el que la formación del hidrogel comprende hacer reaccionar un primer precursor sintético que comprende al menos tres de un primer grupo funcional con un segundo precursor de polímero sintético que comprende al menos tres brazos que comprenden cada uno un segundo grupo funcional, en el que el primer grupo funcional reacciona

con el segundo grupo funcional para formar enlaces cruzados covalentes entre el primer precursor sintético y el segundo precursor de polímero sintético, y en el que el hidrogel se hincha tras la exposición a una solución fisiológica.

[0008] La solicitud de patente de los EE.UU. publicada Nº. 2007/0280988 de Ludwig y col. publicada el 6 de diciembre de 2007 y titulada "capas de revestimiento para dispositivos médicos y procedimientos para fabricar el mismo" muestra procedimientos para controlar la morfología y la velocidad de liberación del agente activo desde capas de revestimiento para dispositivos médicos que comprenden una matriz polimérica y uno o más agentes activos. Los procedimientos comprenden fijar la morfología o distribución de fases del agente activo antes de eliminar el disolvente de la composición de revestimiento. Las capas de recubrimiento se pueden usar para la administración controlada de un agente activo o una combinación de agentes activos.

[0009] La solicitud de patente de EE.UU. publicada Nº 2010/0173843 de Hnojewyj titulada "composiciones adherentes a tejidos" desvela un procedimiento que mezcla un primer componente, un segundo componente y un material tampón. El primer componente incluye un material polimérico electrofílico que comprende poli (etilenglicol) que tiene una funcionalidad de al menos tres. El segundo componente incluye un material nucleófilo que comprende una proteína natural o sintética a una concentración de aproximadamente 25 % o menos que, cuando se mezcla con el primer componente dentro de un intervalo de pH de reacción, se reticula con el primer componente para formar un protector no líquido, tridimensional. El material tampón incluye tris-hidroximetilaminometano que tiene un pH dentro del intervalo de pH de reacción. El procedimiento aplica la mezcla para adherirse a una región de tejido.

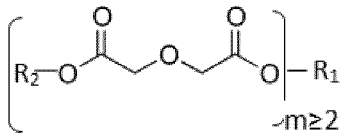
BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0010]

La Figura 1 muestra éster de PEG-tetra diglicolato-tetra-NHS de 4 brazos o éster activo de PEG-diglicolato-NHS (también designado simplemente PEG-DG-N).
La Figura 2 muestra éster activo de TKHEED-digicolato-NHS de 4 brazos (T-DG-N). La Figura 3 muestra éster activo de PEG diácido NHS de 2 brazos (PEG-NHS). La Figura 4 muestra velocidades de hidrólisis en D_2O a 25 ºC.
La Figura 5 muestra fuerza de desprendimiento sobre Corium a 90 º (longitudinal).
La Figura 6 muestra la fuerza para un desprendimiento a 90 º sobre Corium a 37 ºC en transversal frente a la longitudinal de parches T-DG-N / BAC-2.
La Figura 7 muestra la fuerza para un desprendimiento a 90 º sobre Corium (longitudinal) a 37 ºC. La Figura 8 muestra la fuerza para un desprendimiento a 90 º sobre Corium (longitudinal) a 37 ºC. La Figura 9 muestra la fuerza para un desprendimiento a 90º sobre Corium a 37 ºC.
La Figura 10 muestra la fuerza para un desprendimiento a 90 º sobre Corium a 37 ºC (longitudinal).
La Figura 11 muestra los resultados del ensayo de rotura HBLT sobre Corium con defecto de 4mm en solución salina.
La Figura 12 muestra perfiles de degradación en solución de plasmina a 37 ºC. La Figura 13 muestra perfiles de degradación en solución de PBS a 37 ºC.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

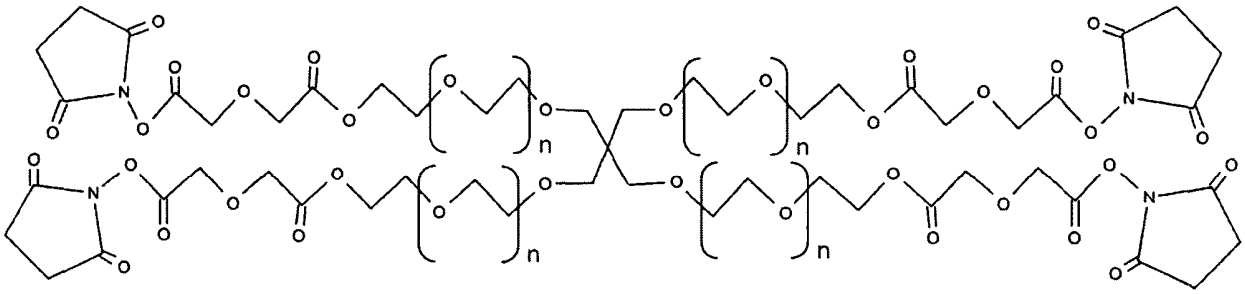
[0011] La presente invención se dirige en una realización a una composición adhesiva o selladora de tejido que comprende un grupo electrófilo que contiene un compuesto reticulante de fórmula 1



[1]

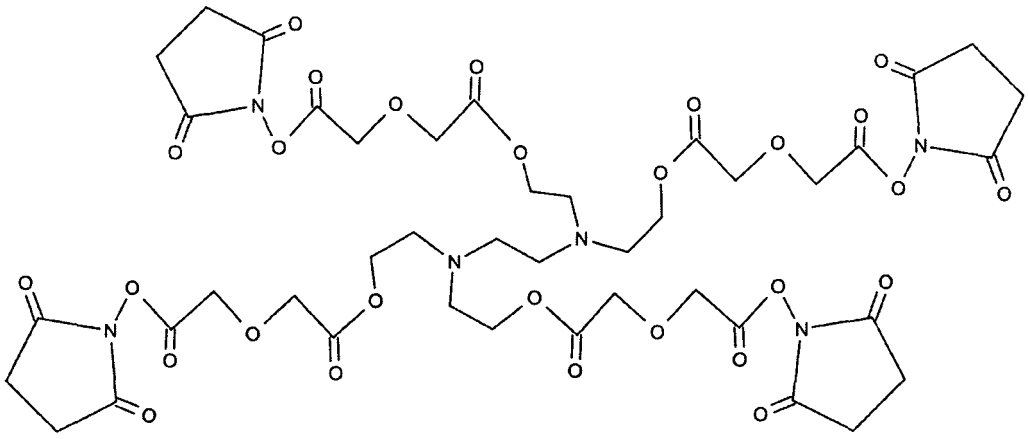
que tiene un radical enlazador de un ácido diglicólico, un radical R_1 con núcleo soluble en agua y un grupo electrófilo R_2 que está unido covalentemente al resto enlazador de ácido diglicólico y fibrinógeno. El radical de núcleo R_1 soluble en agua se deriva de compuestos seleccionados del grupo que consiste en aminas terciarias bifuncionales y glicoles de polietileno y tiene al menos dos brazos de la cadena lateral "m" que están unidos covalentemente a dicho radical enlazador ácido diglicólico. El fibrinógeno puede estar en forma de una partícula liofilizada. Ejemplos de aminas terciarias bifuncionales preferentes son TKHEED o TKHPED, que se describen más detalladamente en la patente de EE.UU. Nº. 7.868.123, mientras que el polietilenglicol es preferentemente un polietilenglicol que tiene al menos cuatro brazos de cadena lateral.

[0012] En una realización, los radicales electrófilos R_2 son grupos terminales de NHS tales que el compuesto reticulante que contiene el grupo electrófilo de fórmula 1 anterior está representado por el compuesto de fórmula 2 o fórmula 3



[2]

en la que "n" es un número dentro del intervalo 5-100; más preferentemente dentro del intervalo de 15-25, más preferentemente en promedio n
es aproximadamente 20;



[3].

[0013] El adhesivo o sellador tisular puede estar en forma de polvo seco antes del contacto con la humedad o con un tejido al que se aplica el adhesivo o sellante. El adhesivo o sellador tisular puede disponerse sobre un sustrato absorbible o no absorbible con fines de suministro en un entorno de tratamiento, tal como un procedimiento quirúrgico. El adhesivo o sellador tisular puede estar en forma de una solución del grupo electrófilo que contiene un compuesto reticulante y una solución del fibrinógeno que se mantienen separadamente antes de su uso en una aplicación médica y se mezclan para su uso en la solicitud médica. Alternativamente, el adhesivo o sellante tisular puede ser una forma en polvo seco del compuesto reticulante que contiene el grupo electrófilo y el fibrinógeno.

[0014] En otra realización, la presente invención está dirigida a un dispositivo de suministro que tiene al menos una primera y una segunda cámara; en el que el compuesto reticulante que contiene el grupo electrófilo está contenido en dicha primera cámara y el fibrinógeno está contenido en dicha segunda cámara, y en el que el compuesto reticulante que contiene el grupo electrófilo y el fibrinógeno se expresan a partir de dicha primera cámara y dicha segunda cámara y se mezclan formando de este modo dicho adhesivo o sellador tisular. La humedad que permite la reacción entre el compuesto reticulante que contiene el grupo electrófilo y el fibrinógeno puede suministrarse al menos en parte por la humedad en la configuración de la aplicación, particularmente del tejido circundante.

[0015] En otra realización, la presente invención se refiere a un dispositivo médico, tal como una sutura, una grapa, un injerto vascular, un clip de nudo de sutura, un pasador ortopédico, una pinza, un tornillo, una placa o una pinza, o en el que el adhesivo o sellador de tejido descrito ha sido recubierto, pulverizado, incorporado u otro aplicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0016] La presente invención se refiere a una composición adhesiva y/o sellante que comprende un fibrinógeno y un agente reticulante que tiene un grupo electrófilo que reacciona con los grupos nucleófilos del fibrinógeno para formar una matriz de fibrinógeno. Una matriz de fibrinógeno está compuesta principalmente de fibrinógeno

interconectado y aglomerado al contrario que las matrices de fibrina que se derivan principalmente de hebras de fibrina derivadas de la activación de fibrinógeno por trombina en la secuencia convencional de cascada de coágulos. La composición adhesiva o sellante de acuerdo con la presente invención tiene múltiples aplicaciones médicas y puede usarse en muchos tipos de cirugía, incluyendo, pero sin limitarse a, gastrointestinal, cardiovascular, periférica-vascular, cardio-torácica, ginecológica, y cirugía neuro- y abdominal general.

[0017] Por ejemplo, la composición adhesiva o sellante puede usarse como un adhesivo quirúrgico interno en procedimientos ortopédicos tales como reparación del ligamento cruzado anterior, reparación del desgarro meniscal (o como hidrogel para la sustitución del menisco), reconstrucción de la cápsula posterior, reparación del manguito rotador, y como adhesivo óseo. Estas composiciones también pueden usarse como un adhesivo para la reducción del volumen pulmonar, fijación de parche, reparación de tejido subcutáneo y disección aórtica. En una realización, estas composiciones se pueden usar como adhesivo estomacal para reducción del volumen estomacal y como adhesivo para fijación de malla para reparación de hernia, fijación de drenaje, fijación de válvula, fijación para películas de prevención de adhesión, fijación de tejido a tejido (por ejemplo, armazón de tejido sintético o biológico a tejido, tejido de bioingeniería a tejido), tejido a dispositivo (por ejemplo, malla, clip, película) y dispositivo a dispositivo.

[0018] En segundo lugar, las composiciones adhesivas o sellantes descritas en el presente documento pueden usarse para la reparación del tejido subcutáneo y para la prevención del seroma en procedimientos tales como mastectomía, reconstrucción y aumento mamario, abdominoplastia reconstructiva o cosmética y liposucción, lifting facial, sección C, histerectomía en pacientes obesos, ortopedia en la región del muslo, reparación de hernia incisional, extirpación de lipoma, lesiones traumáticas, tratamiento de fístula, fijación de injerto y reparación de nervios.

[0019] En tercer lugar, las composiciones adhesivas o sellantes descritas en el presente documento pueden usarse como un sellante para unir y sellar productos de parches dural, conductos biliares, fugas de bilis en el lecho hepático, fugas de vejiga, injerto óseo, vendaje de injerto de quemadura y vendaje líquido oclusivo. Como sellante, las composiciones pueden recubrirse en un tejido, dispositivo, e interfaz tejido-dispositivo y usarse como sellante dural-craneal, sellador dural-espinal, sellador vascular cardio/periférico, sellador GI (por ejemplo, esófago, intestino, intestino grueso, páncreas, estómago y úlcera gástrica), sellador de pulmón, sellador de órganos blandos (por ejemplo, hígado, bazo, páncreas), sustituto de cera ósea, sellante tumoral, combinación de grapas/pegamento, sellador, combinaciones hemostáticas, sellador de uretra. Estas composiciones se pueden usar en procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, bypass gástrico, resección de órganos parenquimatosos, traqueotomía, diverticulosis de colitis ulcerosa, prostatectomía radical, reconstrucción sinusal, esternotomía, coledocoduodenostomía, y sellado del lecho vesical y colecistectomía. Adicionalmente, las composiciones adhesivas o sellantes pueden recubrirse en dispositivos médicos tales como suturas o grapas.

[0020] En cuarto lugar, las composiciones adhesivas o sellantes se pueden usar como carga o agente de carga periuretral en procedimientos que incluyen, aunque sin limitarse a, eliminación del espacio muerto en cirugías reconstructivas y cosméticas (por ejemplo, plástico/cosmético/reconstructivo, defecto en la cara/facial o relleno de huecos), incontinencia urinaria y otros procedimientos ginecológicos, y fisura/fístula anal, inyección de catéter en el miocardio para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, aumento nuclear, obliteración de quiste/fístula pancreático/hepático y fístula esofágica pediátrica.

[0021] En quinto lugar, las composiciones adhesivas o sellantes pueden usarse como una matriz para la ingeniería de tejidos (por ejemplo, armazones de tejido, matriz de suministro para células, matriz de suministro para agentes de braquiterapia (terapia de radiación), matriz de suministro para factores de crecimiento, matriz de inyección para formación in situ para el armazón de células vacías, matriz de inyección de armazón para la entrega de células madre, lisado celular, u otros productos biológicos, bioactivos, productos farmacéuticos, y nutracéuticos, matriz de localización para quimioterapia, y matriz de localización para agente de contraste.

[0022] En sexto lugar, las composiciones adhesivas o sellantes pueden usarse como protector de prevención de adhesiones en procedimientos tales como cirugías cardíacas abiertas, cirugía general, cirugías ginecológicas y obstétricas, cirugías ortopédicas y columna vertebral (por ejemplo, disco artificial).

[0023] En séptimo lugar, las composiciones adhesivas o sellantes pueden usarse como material oclusivo para la embolización (por ejemplo, fístula GI, aneurisma cerebral oclusivo cerebral/vascular, aneurisma cerebral oclusivo, oclusión tubárica, y oclusión de venas varicosas).

[0024] De acuerdo con una realización de la presente invención, se prepara un sellador basado en fibrinógeno reticulado libre o sustancialmente libre de la adición de trombina usando un novedoso sistema de agente de reticulación electrofílico en un entorno acuoso. El sellante forma hidrogeles que tienen atributos deseables para selladores de tejidos. Una mezcla en polvo seco del reticulante y del componente biológicamente activo (BAC-2), que comprende principalmente fibrinógeno, pero que también contiene otras proteínas derivadas del plasma, incluyendo albúmina, forma rápidamente un sellante tras la hidratación cuando se aplica sobre un tejido húmedo. Los datos de rendimiento mecánico para el sellante muestran una excelente adherencia sobre el tejido húmedo de

Corium. Cuando se aplica sobre una incisión en un segmento gastrointestinal (GI), el sellante demuestra resistencia deseable a la fuga de fluido bajo presión. El sellante instantáneo, a diferencia del coágulo de fibrina iniciado por la trombina, no experimenta degradación enzimática por la plasmina, sino que forma un sistema de hidrogel en red que se degrada hidrolíticamente y se absorbe debido a la incorporación de enlaces éster a través del reticulador multibrazo.

[0025] Para los fines de las presentes solicitudes, la expresión "sustancialmente libre de trombina añadida" significa que la composición sellante o adhesiva contiene cantidades insuficientes de trombina para iniciar la conversión de fibrinógeno en fibrina en un medio acuoso. Sin embargo, debe observarse que la trombina estará naturalmente presente en el entorno en el que se aplica el sellante tisular o el adhesivo.

[0026] Todas las proteínas derivadas del plasma por fraccionamiento son de naturaleza nucleofílica debido a la presencia de residuos de lisina y arginina en la proteína. Importantes productos de fraccionamiento de relevancia aquí son la albúmina y el fibrinógeno. Pueden usarse en forma de solución o de polvo liofilizado.

[0027] El agente de reticulación utilizado en las presentes composiciones es un derivado de un compuesto que contiene un grupo ácido, preferentemente un derivado de un compuesto diácido, que tiene un grupo soluble en agua y un grupo electrófilo. De acuerdo con una realización de la presente invención, se utiliza un derivado NHS (N-hidroxi succinimida) de un compuesto ácido conocido como compuesto éster activo que reacciona rápidamente con agua o radicales nucleófilos. El sistema de entrecruzamiento de la presente invención es preferentemente un éster activo de ácido diglicólico en el que un grupo terminal de NHS ha reaccionado a través de su funcionalidad N-hidroxilo con el diácido o utilizando cualquier otro reactivo adecuado, por ejemplo, un carbonato. La reacción se une al grupo terminal NHS con la funcionalidad carboxílica del diácido. El diácido, a su vez, puede unirse más a la entidad central soluble en agua mediante la reacción del otro grupo carboxilo del diácido y la funcionalidad hidroxilo de la entidad central soluble en agua. En la práctica preferente, la entidad de núcleo soluble en agua se hace reaccionar primero con un anhídrido del diácido. Este ácido derivatizado se convierte entonces en éster activo tapando el grupo carboxilo libre con el grupo terminal NHS. Se ha descubierto que los derivados de entrecruzamiento de ésteres activos de diglicolato resultantes proporcionan (i) una cura rápida con una solución que contiene fibrinógeno, y (ii) un periodo de adsorción relativamente prolongado como sellante y o adhesivo.

[0028]Para sintetizar agentes de entrecruzamiento adecuados para uso en la presente invención se han usado núcleos solubles en agua a base de PEG (polietilenglicol) y no basados en PEG que tienen brazos de cadena lateral variables y diferentes compuestos de partida diácidos. Un agente reticulante preferente es TKHEED - diglicolato - NHS (o T-DG-N, tetrakis - hidroxietiletilendiamina-digli-colato - NHS).

[0029] Los inventores descubrieron que el sellante resultante de la reacción de la composición proteica derivada del plasma que contiene fibrinógeno y el éster activo preferente descrito anteriormente tiene (a) facilidad de uso con un paso para la preparación, (b) gelificación o velocidad de curado de 1 a 2 minutos (y 3 minutos para el ensayo de desprendimiento), (c) manejo normal para la fabricación de parches que contienen revestimiento sellante y ensayo de dichos parches, (d) estabilidad en entorno enzimático y longevidad de unas pocas semanas en medio hidrolítico a pH 7,4 y 37 ºC, y (e) las propiedades mecánicas deseables de la adherencia de desprendimiento a 90 º y del ensayo hidráulico de fuga y rotura (HBLT) al Corium bovino y la explosión aguda *in-vivo* en el segmento GI porcino.
[0030] De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un sellador tisular que tiene las propiedades de curado rápido en 1-2 minutos o menos formando un sellante tras la hidratación de polvo seco y que tiene un perfil de absorción adecuado para la cicatrización de heridas GI (aproximadamente 2 semanas).

[0031] En una realización, el presente sellante enzimáticamente no degradable se fabrica a partir de fibrinógeno sin conversión significativa a fibrina por estar sustancialmente libre de cualquier adición de trombina al sitio de aplicación. En una realización, el sellante a base de fibrinógeno reticulado y degradables hidrolíticamenteos se entrecruza través del reticulante de éster activo de diglicolato.

[0032] En una realización, el presente sistema sellante se puede usar sobre matriz absorbible o no absorbible, soporte, soporte secundario o almohadilla en la que se deposita una mezcla de polvo sellante sobre la matriz formando un parche, demostrando un excelente comportamiento mecánico ex vivo del desprendimiento de tejido y fuerzas de ruptura. En una realización, el sellante seco se mezcla con su componente electrófilo que tiene una temperatura de transición vítrea (Tg) de aproximadamente 20 ºC, dando como resultado una buena retención de la mezcla sobre la matriz y reduciendo el desprendimiento del polvo sellante de la matriz soporte.

[0033] De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición sellante demuestra una hidratación rápida de formulaciones de dos componentes y capacidad para reaccionar rápidamente con la proteína proporcionando una resistencia significativa al desprendimiento y a la ruptura.

[0034] De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición sellante puede combinarse con colágeno o gelatina para mejorar la resistencia del sellante.

[0035] De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición sellante a base de fibrinógeno se emplea en combinación y/o dispersa sobre un sustrato tejido o no tejido que tiene un polisacárido oxidado, tal como celulosa oxidada, más preferentemente celulosa regenerada oxidada.

[0036] De acuerdo con una realización de la presente invención, se forma una composición adhesiva o selladora tisular al contacto con humedad o tejido por reacción de fibrinógeno y un agente reticulante que comprende un reticulante de éster de ácido diácido al que se une un núcleo soluble en agua y un electrófilo. Un material de sellado a base de fibrinógeno reticulado puede fabricarse a partir de una composición que contiene fibrinógeno y un reticulante fabricado de forma sintética sin el uso de trombina añadida. No se esperaría que el nuevo sellante resultante sufriera degradación enzimática con plasmina debido a la ausencia o reducción de la cantidad de fibrina en la matriz resultante. Se esperaría que la porción de matriz de fibrinógeno se absorbiera por hidrólisis de éster en los enlaces éster formados por reacción de reticulación de éster de ácido diglicólico.

[0037] De acuerdo con una realización de la presente invención, el sistema de reticulación de sellador de tejidos es un electrófilo que contiene NHS (N-hidroxi succinimida) que forma un enlace de "éster activado" con un ácido carboxílico y que reacciona rápidamente con nucleófilos, produciendo un nuevo enlace covalente eliminando el subproducto de condensación del NHS. Esta química es compatible en un medio acuoso. El electrófilo reacciona con el radical nucleofílico de aminas primarias en proteínas biológicas derivadas de plasma que producen enlaces amida; por ejemplo, los residuos de lisina en fibrinógeno y albúmina reaccionarán con el electrófilo. El fibrinógeno humano con un peso molecular de 340.000 g/mol tiene 208 residuos de lisina, y la albúmina humana con un peso molecular de 67.000 g/mol tiene aproximadamente 60 residuos de lisina. Se necesita un agente de reticulación con al menos dos radicales electrófilos para formar una red de interconexión de proteínas nucleófilas y para fabricar un sellante de la presente invención. Aumentar el número de brazos de la cadena lateral de los radicales electrófilos en el agente de reticulación aumenta la probabilidad de curado de reacción, y por tanto la velocidad de curado y el grado de reticulación. De acuerdo con una realización de la presente invención, agentes de reticulación con dos, cuatro, o más brazos de cadena lateral se usan, con un sellante biológico reticulado que es degradable y absorbible después del período de cicatrización de heridas.

[0038] De acuerdo con una realización de la presente invención, las unidades de éster se construyen en el agente de reticulación tal que la proteína nucleófila reticulada pueda someterse a hidrólisis en los enlaces éster que producen moléculas de proteína lineales con grupos ácido carboxílicos unidos a través de enlaces amida que son solubles en agua.

[0039] De acuerdo con una realización de la presente invención, el agente de reticulación es un compuesto que tiene dos o más brazos de cadena lateral de enlaces éster activos de NHS y una estructura fraccional central con un alto grado de solubilidad en agua.

[0040] De acuerdo con una realización de la presente invención, el agente de reticulación comprende:

(1) un radical de núcleo soluble en agua de

(I) PEG (polietilenglicol) con dos o más brazos de cadena lateral; o
(II) de amina terciaria bi-funcional con cuatro brazos de la cadena lateral con funcionalidad de hidroxilo, tales como (a) N, N, N ', N'-tetraquis (2-hidroxietil) etilendiamina (TKHEED), o (b) N, N, N ', N'-tetrakis (2-hidroxipropil) etilendiamina (TKHPED, quadrol);

(2) un radical de ácido dicarboxílico para la unión covalente con cada brazo del radical del núcleo soluble en agua que produce un enlace éster y un grupo carboxilo terminal, tales como,

(I) ácido diglicólico,

y

(3) un radical NHS como un grupo terminal que se une con cada resto carboxilo del brazo, para formar un electrófilo éster activado.

[0041] El adhesivo resultante o de sellado se forma cuando se expone a, o en contacto con humedad o tejido en presencia de fibrinógeno. Puede ser deseable usar los componentes adhesivos o de sellado en polvo o en forma sólida, con o sin sustrato. Además, los componentes adhesivos o de sellado se pueden usar en polvo o en forma sólida en combinación con una matriz o sustrato tejida o no tejida de celulosa oxidada regenerada (ORC), copolímeros de glicólido-láctido o una combinación de los mismos. Los sustratos adecuados para su uso con los componentes adhesivos o de sellado pueden ser absorbibles o no absorbibles.

[0042] La composición de polímero resultante también puede funcionar como un revestimiento que se aplica a cualquier dispositivo medico, incluyendo, pero sin limitarse a, suturas, grapas, injertos vasculares, clip de sutura nudo, alfileres ortopédicos, abrazaderas, tornillos, y placas, pinzas (por ejemplo, para la vena cava). Por ejemplo, el

dispositivo médico se puede recubrir con una solución del radical nucleófilo seguido de un recubrimiento con una solución del radical electrófilo, y los radicales nucleófilos y electrófilos se dejan reaccionar para formar un polímero reticulado que funciona como revestimiento del dispositivo. En el caso de una sutura o grapa, puede ser deseable tener un revestimiento que se hincha tras el contacto con el fluido fisiológico después del uso de sutura o grapa para cerrar una herida, de este modo se forma el sellado del agujero de una aguja de sutura o la grapa. Por lo tanto, puede ser preferente usar un componente que contiene PEG, puesto que los materiales abase de PEG se hinchan tras entrar en contacto con la humedad, en particular, agua.

[0043] Se ha demostrado que cinco agentes de reticulación ejemplares forman sellante de tejido adecuado de la presente invención. Dos de los agentes de reticulación ejemplares, quadrol-diglicolato-NHS (Q-DG-N) de 4 brazos y TKHEED-glutarato-NHS (T-Glu-N) de 4 brazos se describen más detalladamente en la patente de los Estados Unidos. Nº 7.868.123. La síntesis de otros tres agentes de reticulación ejemplares se describe a continuación. Los cinco agentes de reticulación ejemplares se evaluaron con un plasma biológico, un producto derivado de sangre, conocido como BAC2 (componente biológicamente activo), que contiene principalmente fibrinógeno aproximadamente al 40 % en peso, el resto incluye albúmina, tampones y otros componentes protéicos que se encuentran convencionalmente en productos derivados de plasma sanguíneo.

EJEMPLO 1. Síntesis de PEG-NHS-diglicolato de 4 brazos y su caracterización

[0044] Con referencia ahora a la Figura 2, se muestran éster de PEG (peso molecular de 4000) tetra diglicolato-tetra-NHS de 4 brazos o éster activo de PEG-diglicolato- NHS (también designado simplemente PEG-DG-N), PM = 4800 aproximadamente.

[0045] Se describe aquí un PEG-4000 de 4 brazos, fabricado a partir del núcleo de pentaeritritol con sus cuatro funcionalidades hidroxilo combinadas con óxido de etileno para fabricar las cuatro cadenas de PEG con un peso molecular total de 4.000 g/mol, para derivatización adicional al reticulante. Se disuelve PEG-4000 (200 g, 0,050 mol) de 4 brazos en tolueno (200 ml) con calentamiento y se elimina el disolvente con el fin de eliminar azeotrópicamente el agua atrapada en el material de partida de PEG. El residuo se re-disuelve en tolueno anhidro (500 ml) a 70 º C y anhídrido diglicólico (23,2 g, 0,20 mol). La solución se calienta a 95 º C y se agita bajo una atmósfera de nitrógeno durante 41 horas, se enfrió, y el disolvente se elimina en vacío. El residuo se disuelve en agua (700 ml) y se lava con éter (2 x 200 ml) a continuación se extrae con diclorometano (5 x 200 ml). Los orgánicos combinados se secan sobre MgSO4 , se filtran, y el disolvente se elimina para proporcionar una cera aceitosa. Este residuo se disuelve en diclorometano y el disolvente se elimina para eliminar azeotrópicamente cualquier agua residual, a continuación, se vuelve a disolver en diclorometano anhidro (750 mL). Se añadió N-hidroxisuccinimida (23,2 g, 0,21 mol) con agitación y a continuación se disuelve N, N-diciclohe-xilcarbodiimida, conocida como DCC, (42,3 g, 0,21 mmol) en diclorometano (200 mL) y se goteó más de 1 hora. La mezcla de reacción se volvió gradualmente turbia y se calentó a reflujo. La mezcla se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se filtra una mezcla heterogénea de color de blanco lechoso, y el residuo se concentra hasta aproximadamente 500 mL del volumen total y se añade éter (1000 mL). Se separa un residuo oleoso y se decanta la capa orgánica superior. El material oleoso restante se disuelve en acetona anhidra (200 mL) y se añade éter (1 L) lentamente con agitación. El material se tapa herméticamente y se almacena toda la noche a -10 º C. La capa inferior se transforma en un sólido ceroso blanco lechoso que se aisla y se coloca a alto vacío a temperatura ambiente (3 días) (205 g, rendimiento, 85 %). El material es un sólido ceroso blanco que se puede romper en trozos a temperatura ambiente. Se almacena bajo una atmósfera de nitrógeno a -10 º C. El material se caracterizó por RMN-1H ($CDCl_3$). Acetona residual, DCC y éter no se detectaron mediante análisis por RMN. Se calculó NHS residual que fue 1,4 % (p/p) mediante integración RMN-1H.

EJEMPLO 2. Síntesis de TKHEED-DiglIcolatO-NHS y su caracterización por RMN

[0046] Con referencia a la Figura 3, se muestra el éster de TKHEED-tetra diglicolato-tetra-NHS de 4 brazos o TKHEED-diglicolato-NHS (o simplemente T-DG-N), en el que TKHEED es N,N,N',N'-tetrakis(2-hidroxietil)etilenediamina. Se disuelven TKHEED, (25 g, 106 mmol) y etoxiquina (1 g) en acetonitrilo seco (150 ml) y piridina (75 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añade anhídrido diglicólico (50 g, 431 mmol). Hay una reacción exotérmica y la mezcla se vuelve homogénea. A continuación, la solución se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se añade carbonato de disuccinimidilo (120 g, 468 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche. La reacción implica gas y el carbonato de disuccinimidilo se disuelve lentamente para proporcionar una solución nítida. Los disolventes se eliminan bajo presión reducida y el residuo se disuelve en acetonitrilo seco (100 ml). Dos porciones (40 ml) de la solución se colocan en dos botellas de centrífuga de 250 ml y se añade alcohol isopropílico (175 ml) a cada botella. La mezcla se agita y después se centrifuga. Se decanta la capa líquida superior y el residuo de cada botella se recogió en acetonitrilo seco (25 ml). El procedimiento se repite tres veces más. Despues de cuatro tratamientos con alcohol isopropílico, el residuo en cada botella se disuelve en acetonitrilo seco (25 ml) y se añade una mezcla 60:40 de acetato de etilo/heptano (175 ml). La mezcla se agita y después se centrifuga. La capa superior del líquido se decanta y se repite el procedimiento. El residuo en cada botella se transfiere directamente a un matraz de 2 L. El producto se seca a una espuma de color blanquecino bajo alto vacío durante 3 días. El resto del material de se procesa de forma identica para proporcionar un total de 85 g (75 %) de producto. La espuma se tritura y se transfiere a una botella de plástico, y se almacena bajo una atmósfera de nitrógeno a -10 º C. El éster de tetra-NHS se preparó a partir de TKHEED, anhídrido diglicólico, y carbonato de

NHS en acetonitrilo para proporcionar el producto junto con NHS residual y una pequeña cantidad de acetonitrilo y acetato de etilo. La pureza global caracterizada por la Integración de RMN fue: 84,4 % de T-DG-N, 13,9 % de NHS libre,1,3 % de acetonitrilo, y 0,39 % de acetato de etilo.

EJEMPLO 3. PEG-diácido-NHS

[0047] Refiriéndose a la Figura 4 el éster activo PEG-NHS de 2 brazos o PEG-diácido-NHS, también conocido como éster de bis-DPEG- NHS, PM = 708 g/mol (Quanta Biodesign Ltd., Ohio). El compuesto se puede sintetizar, por ejemplo, a partir del correspondiente diol de PEG, en el que los dos grupos terminales de alcohol primario de un diol de PEG se oxidan para formar dos grupos terminales de ácido carboxílico, que a continuación son derivatizados para formar los grupos terminales de NHS.

EJEMPLO 4. Metodologías para la formulación del agente de reticulación con BAC-2 y preparación del parche

[0048] Agentes ejemplares de reticulación, que se describen arriba, se evaluaron con BAC-2 en una mezcla en polvo. El rendimiento mecánico se caracterizó en forma de parche. Se describen a continuación diversos procedimientos utilizados en el procesamiento de muestras.

Criomolienda

[0049] Se usó un molino criogénico para la criomolienda asistida por nitrógeno líquido en T-DG-N y agentes de reticulación PEG-DG-N. Los parámetros del proceso incluyen tiempo de molienda/T1 de 3 minutos, tiempo de refrigeración /T2 de 2 minutos, tiempo de preenfriamiento/T3 de 15 minutos y nº. de ciclos de enfriamiento/cic 6. BAC-2 en polvo, un producto derivado de plasma sanguíneo se obtuvo a partir de Omrix BioPharmaceuticals y se puede producir como se describe en la solicitud de patente de EEUU publicada 2011/0086175, solicitud de patente de EEU 2010/0068196 publicada y solicitud de la patente de EEUU 2009/0246238 publicada. Se fabricaron partículas de colágeno a partir del hemoestático INSTAT MCH disponible comercialmente de Ethicon, Inc.

Inmersión de la estación con disolvente HFE-7000 para la fabricación del parche

[0050] Se utilizó una estación de inmersión automatizada asistida bajo vacío, conocida como máquina manual para el procedimiento de inmersión controlada (mCIM) que es adecuada para la fabricación de parches de 2 × 4 pulgadas cuadradas. Cada unidad de 2 x 4 pulgadas cuadradas comprendía una capa de ORC de interceed ™ perforado por aguja con hilos de fibra Vicryl ™. Se usó disolvente HFE-7000 para elaborar una preparación en polvo en suspensión/pasta que contiene el agente de reticulación y la proteína nucleófila. Se aplicó 7 a 8 ml de la suspensión en cada unidad de matriz. El proceso y el equipo de inmersión se describen más detalladamente en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2011/0086175.

[0051] Otros detalles sobre la preparación del parche también se describen en el Ejemplo 8. Caracterización de la distribución del tamaño de partícula

[0052] Se utilizó un analizador de tamaño de partícula LS 13 320 Beckman Coulter para la caracterización del tamaño de partícula del agente de reticulación T-DG-N, el componente BAC-2 y colágeno particulado.

Evaluación del rendimiento mecánico de parches

[0053]Se utilizaron varios métodos descritos a continuación para caracterizar el comportamiento mecánico de las unidades de matriz resultantes.

La prueba de adhesión de desprendimiento a 90 °:

[0054] El ensayo estándar según AST-20089-0121 fue el procedimiento más comúnmente utilizado. El tiempo estándar de activación de humedad de 3 minutos para la curación se utilizó para todas las muestras de parche y una unidad de control.

HBLT (Probador de fugas y roturas hidráulicas):

[0055] Se utilizó un cortador para estampar fuera de la muestra de ensayo de un diámetro fijo. El tejido de Corium recogido se mantuvo en un medio salino. Se realizó un defecto de 4 mm en el centro de Corium con un punzón de biopsia. Se utilizó un medio de solución salina con una bomba de jeringa a un caudal constante, un volumen de 500 gL de solución salina para mojar la muestra antes de la aplicación del parche, y dos alícuotas de 500 mL después de la aplicación de parche a Corium. Tras el curado del sellante con una permanencia de 5 minutos después de la aplicación del parche a Corium, se inició el ensayo.

Prueba aguda In vivo:

[0056] Para la prueba aguda in vivo, el parche o polvo se aplicó sobre una incisión de 10 mm con un solo nudo de sutura en un segmento de un tubo gastrointestinal porcino. Se aplicó presión de aire para el inflado y se notó la presión de fuga.

Estudios de degradación enzimática

[0057] Los sellantes basados en las composiciones de la invención se prepararon usando una solución acuosa de BAC-2 (aproximadamente 7 % de fibrinógeno, o 70 mg/ml) en la que el agente de reticulación en forma de polvo se añadió a una composición seleccionada y se mezcló bien durante 1 a 2 minutos hasta gelificación.

Estudios de degradación hidrolítica

[0058] Se evaluó el sellante con enlaces éster sometidos a degradación hidrolítica en PBS a 37 ºC mediante el método de pérdida de peso en %. La degradación del sellante en agua desionizada (DI) hace que aumente el nivel de pH de la solución, que se puede titular por adición de un compuesto básico para mantener un pH constante de 7,4 a 37 ºC hasta el punto que no se necesitara más compuesto básico para mantener una solución neutral; se indicó el tiempo total para la titulación.

EJEMPLO 5. Determinación de las velocidades relativas de reactividad de ésteres activos por RMN

[0059] La reactividad relativa de los ésteres activos se determinó mediante seguimiento de la velocidad de degradación hidrolítica en D_2O a temperatura ambiente por RMN como se muestra en la Figura 4.

[0060] Diversos ésteres activos de NHS mostrados en la Figura 4 son el TKHEED-diglicolato-NHS de 4 brazos (T-Dig-NHS o T-DG-N), el quadrol-diglicolato-NHS de 4 brazos (Q-Dig-NHS o Q-DG-N), el PEG-diglicolato-NHS de 4 brazos (PEG-Dig-NHS o PEG-DG-N), el TKHEED-glutarato-NHS de 4 brazos (T-glut-NHS o T-glut-N), y el PEG-diácido-NHS (PEG- NHS). Se observó que los ésteres que contienen diglicolato son los ésteres activos hidrolizantes más rápidos, lo que significa que se hidrolizan más del 95 % en aproximadamente 30 a 60 minutos independientemente de la estructura del núcleo. El glutarato o los agentes basados en el diácido de PEG, que no tienen el enlace alfa-éter de diglicolato o ácido diglicólico, se hidrolizan a velocidades mucho más lentas. Estos compuestos parecen hidrolizar sólo aproximadamente 10 % o menos en aproximadamente 80 a 100 minutos. La presencia de ácido residual debido a la hidrólisis previa muestra la caída inicial del glutarato.

[0061] Los datos demuestran además que el enlazador diglicólico produce inesperadamente una hidrólisis más rápida de ésteres correspondientes que se degradan más del 95 % en 30 a 60 minutos independientemente de la estructura del núcleo. Como se demostrará a continuación, la degradación correspondiente de la proteína reticulada con un reticulante diglicolato será relativamente rápida y adecuada para la absorción como sellante tisular. Se anticipa que dicho sellador reticulado mostrará una velocidad de degradación in vitro más rápida que la de un reticulante de glutarato, pero probablemente será más lenta que la de un mecanismo de degradación enzimática.

[0062] Los parámetros de degradación de hidrólisis se resumen en la Tabla 1 cualitativamente del gráfico en la Figura 4. Se observa que la velocidad relativa, m, (en la ecuación exponencial) para todos los ésteres de diglicolato-NHS está dentro de un 20 % aproximadamente entre sí. Sin embargo, las velocidades son mucho más rápidas que las otras; por ejemplo, T-dig-NHS (o T-DG-N) es 144 veces más rápido que T-glut-NHS, y 98 veces más rápido que PEG-NHS. Los perfiles de degradación del reticulante A (T-DG-NHS), B (Q-Dig-NHS) y C (PEG-Dig-NHS) corresponden a la presente invención, mientras que el agente de reticulación D (T-GLUT-NHS) y e (PEG-NHS) corresponde a los grupos de control.

Tabla 1: Resumen de los parámetros cualitativos y cuantitativos de hidrólisis en D_2O a 25 ºC

Reticulante del éster NHS	Tiempo estimado para una hidrólisis del 10 % (minutos)	Tiempo estimado para una hidrólisis del 95% (minutos)	Hidrolisis en %, y = k Exp(-mx) en la que, x = tiempo, m = velocidad relativa, k = constante, R^2 = coeficiente de correlación
(A) TKHEED-diglicolato-NHS de 4 brazos (T-Dig- NHS)	-	30	k = 62; m = 0.104; (R^2 = 96%)
(B) Quadrol- diglicolato-NHS de 4 brazos (Q-Dig- NHS)	-	60	k = 107; m = 0.084; (R^2 = 99%)
(C) PEG-diglicolato- NHS de 4 brazos (PEG-dig-	-	60	k = 70; m = 0.079; (R^2 = 97%)
(D) TKHEED- glutarato-NHS de 4 brazos (T-Glut-NHS)	100	-	k = 65; m = 0.00072; (R^2 = 81%)
(E) PEG- diácido-NHS de 2 brazos (PEG-NHS)	80	-	k = 98; m = 0.00106; (R^2 = 99%)

EJEMPLO 6. Velocidades cualitativas de gelificación de la solución BAC-2 con agente de reticulación de éster activo

[0063] Los datos sobre velocidad de curado o velocidades cualitativas de gelificación de diversos ésteres activos en la formación de selladores con una solución acuosa de fibrinógeno (BAC-2) se muestran en la Tabla 2 a continuación. Los agentes de reticulación A, B, C corresponden a la presente invención, mientras que D y E corresponden a grupos de control.

[0064] El éster NHS sólido, preferentemente en forma de polvo, se añadió a la solución de BAC-2 a temperatura ambiente en un tubo de ensayo en una relación en peso de 1 a 1 para éster activo a fibrinógeno, y se mezcló bien. El tiempo de gelificación, definido cualitativamente como el punto en el que la solución de BAC-2 en el tubo de ensayo ya no fluía, se indicó y se registró como se muestra en la Tabla 2. Se observa que los diversos ésteres activos de diglicolato-NHS gelificaron en aproximadamente 1 a 2 minutos, el éster de PEG-diácido-NHS en aproximadamente 15 a 30 minutos y el éster de glutarato-NHS en aproximadamente 30 a 60 minutos. Por tanto, los diglicolatos fueron los agentes reticulantes gelificantes más rápidos independientemente de su estructura de núcleo. Los núcleos de TKHEED, quadrol o PEG con sus pesos moleculares variables o pesos equivalentes o la presencia o ausencia de aminas terciarias no parecen marcar ninguna diferencia.

[0065] El TKHEED se consideró un núcleo mejor que quadrol, ya que el anterior éster diglicolato-NHS tenía una solubilidad en agua muy alta, más del 85 %, en comparación con sólo aproximadamente el 25 % para este último. Los cuatro grupos metilo hidrofóbicos en quadrol disminuyeron significativamente la solubilidad acuosa.

[0066] Se encontró que el diglicolato-NHS basado en TKHEED era un mejor reticulante por su facilidad de manipulación como polvo en comparación con el diglicolato-NHS basado en PEG, que era un material ceroso y pegajoso. Se esperaba que TKHEED con sus dos radicales amina terciarios tuviera un efecto catalítico sobre la reacción de cura de electrófilo-nucleófilo a diferencia del reticulante de PEG.

Tabla 2: Velocidades cualitativas de gelificación de una solución de fibrinógeno con reticulantes de éster activos

Reticulante de éster de NHS	Peso equivalente del reticulante, aprox.	Relación de peso del contenido de reticulante y fibrinógeno en la solución (a 79 mg/ml, aprox.)	Observación cualitativa de la gelificación
TKHEED-diglicolato-NHS de 4 brazos (A)	250	1: 1	1 - 2
Quadrol-diglicolato- NHS de 4 brazos (B)	260	1: 1	1 - 2
PEG-diglicolato- NHS de 4 brazos (C)	1,200	1: 1	1 - 2
TKHEED-glutaratO- NHS de 4 brazos (D)	250	1: 1	30-60
PEG-diácido- NHS de 2 brazos (E)	350	1: I	15-30

EJEMPLO 7. Preparación del parche

[0067] La estación de inmersión para la preparación del parche se describe en el Ejemplo 5 (B). Los aspectos de manipulación del material se describen con más detalles aquí. Se optimizaron composiciones selladoras del agente de reticulación diglicolato frente a sus propiedades mecánicas de unión a tejidos y velocidades de degradación en medio acuoso de relevancia fisiológica.

[0068] Se utilizó una matriz que comprende tejido de punto de celulosa regenerada oxidada (ORC) de interceed ™ e hilos de fibra de Vicryl ™perforados con aguja. El contenido de Interceed ™ y Vicryl ™ fue 50 % y 50 % en peso en la matriz. Cada unidad matricial tenía dos direcciones designadas como 'longitudinal' (l) y 'transversal' (t), dependiendo de la dirección de a estructura tricotada. Cada unidad de matriz, también denominada tela de múltiples capas reabsorbible reforzada, se describe más detalladamente en la patente de EE.UU. N º 7,666,803 de Shetty y col., que enseña una tela multicapa que comprende una primera tela no tejida absorbible y una segunda tela tejida o tricotada absorbible.

[0069] Para el parche de ensayo descrito como "parche TDGN" o "parche T-DG-N", el TKHEED-diglicolato-NHS de 4 brazos (T-DG-N o TDGN) fue crio-molido a un polvo fino. El tamaño de partícula fue 569 +/- 263 micras (<90 % 827 y <10 % 136 micras), aunque los tamaños más grandes parecían ser aglomerados. El polvo se almacenó en el refrigerador por debajo de su temperatura de transición vítrea de 20 º C y se mezcló con una composición que contenía fibrinógeno en forma de polvo en varias proporciones. El tamaño de partícula de la composición que contiene fibrinógeno en polvo fue de 20 +/- 11 micras (<90 % 36 micras y <10 % y 7). Se depositó una cantidad conocida de mezcla en polvo sobre la matriz usando la estación de inmersión mCiM. El material resultante se almacenó en una caja de bandejas y se almacenó en una bolsa de lámina sellada en una caja de nitrógeno. Se utilizó un papel de liberación de silicona para evitar que se pegase de la mezcla a la superficie interior de la caja de plástico.

[0070] U parche de la invención fabricado a partir de PEG-diglicolato-NHS de 4 brazos se describe a continuación como "parche PEG-DG-N". A diferencia de T-DG-N, el PEG-DG-N no se dispersó bien en disolvente HFE-7000. Tenía una tendencia a separarse por fases del componente en polvo de fibrinógeno en el medio disolvente. Por lo tanto, la mezcla de la crio-molida se calentó a 37 º C, lo que estaba por encima del punto de fusión de PEG-DG-N, y la pasta resultante se aplicó sobre la misma matriz. Tras transferir a la bandeja de matriz y aplicar una presión suave, se convirtió en un revestimiento liso. Se utilizó un papel de liberación de silicona para evitar que se pegase a la caja de plástico.

[0071] Los datos de adhesión de desprendimiento se discuten a continuación y muestran resultados comparativos para el parche PEG-DG-N y el parche T-DG-N.

EJEMPLO 8. Parche de PEG-DG-N: Desprendimiento de 90 º sobre Corium

[0072] Se probó la adhesión de desprendimiento y los datos para el parche de PEG-DG-N se muestran en la Figura 5, que representa una fuerza de desprendimiento de 90º sobre Corium (longitudinal) a 37 ºC de los parches de PEG-DG-N/Fibrinógeno con un peso de capa de 1,8 a 2,0 gm por unidad matricial y que demuestra el efecto del contenido de PEG-DG-N % en peso sobre la fuerza de desprendimiento.

[0073] Datos sobre las diversas composiciones se muestran en la Tabla 3. Las composiciones que contienen sólo un nivel bajo de reticulante, aproximadamente 10 % en peso, mostraron una unión razonable a Corium de 59 +/- 0,1 N/m. Un mayor contenido de reticulante parecía proporcionar una menor resistencia al desprendimiento, lo que puede atribuirse a la estructura más grande del reticulante con un peso molecular de 4.800 g/mol (o un peso equivalente de 1.200, como se muestra en la Tabla 2), creando tal vez impedimento estérico con fibrinógeno.

Tabla 3: Parche de PEG-DG-N/BAC-2: Desprendimiento de 90º sobre Corium a 37 ºC

ID #	TorL	PEG-DG-N/BAC2 (Proporción % en peso)	Peso de la capa, (gm/unidad)	BAC-2 (gm/unidad)	N (#)	Desprendimiento; media. (N/m)	Desprendimiento; +/- Std. Dev. (N/m)
2	L	10/90	2,0	1,80	2	59,0	0,1
3	L	20/80	1,9	1,52	2	15,0	1,5
4	L	50/50	1,8	0,90	2	15,0	1,5
5	T(MC*)	50/50	1,7	0,85	2	17,0	1,6
* fabricado a partir de cloruro de metileno (se disuelve PEG-DG-N) en lugar de HFE-7000							

EJEMPLO 9. Parche de T-DG-N: Desprendimiento de 90 º sobre Corium

[0074] Los datos de rendimiento para el parche T-DG-N/BAC-2 se resumen en la Tabla 4. Los diversos parámetros de interés incluyen la dirección de la matriz, % en peso de T-DG-N en la composición, peso de la capa por unidad matricial, contenido total de BAC-2 por unidad matricial, número de repeticiones en las pruebas, y el promedio y desviación estándar.

Tabla 4: Parche de TDGN/BAC-2: Desprendimiento de 90º sobre Corium a 37 ºC

ID#	TorL	TDGN/BAC2 (proporción % en peso)	Peso de la capa. (gm/unida	BAC-2 (gm/unidad)	N (#)	Desprendimiento	Desprendimiento; +/- Std. Dev.
2	L	0/100	1,0	-	-	-	-
3	L	10/90	1,4	1,26	2	50,5	7,8
4	L	20/80	0,8	0,64	2	44,0	11,3
5A	T	30/70	1,6	1,12	5	106,7	27,7
5B	L	30/70	1,0	0,70	2	44,0	9,9
5C	L	30/70	1,4	0,98	4	84,0	7,7
6A	T	40/60	1,0	0,60	2	41,5	19,1
6B	L	40/60	1,0	0,60	4	71,0	22,1
7A	T	50/50	1,5	0,75	4	90,2	13,1
7B	T	50/50	1,8 (a 37 ºC/2 hrs)	0,90	2	73,0	5,2
7C	T	50/50	1,7 (en 2 más maduración,	0,85	2	31,0	5,7
7D	L	50/50	1,3	0,65	2	143,0	22,6
8	L	60/40	0,7	0,28	2	57,0	5,6
9	L	100/0	0,9	0,00	1	4,0	-
10	L	33/50/17**	1,0	0,50	2	46,0	0,1
11	L	50/33/17**	1,5	0,50	2	94,5	9,2
se utilizó la matriz descrita anteriormente con TDGN/BAC-2 **= 17 % es colágeno particulado a partir de INSTAT MCH							

[0075] Haciendo referencia ahora a la Tabla 4, se puede ver el efecto de la matriz 'longitudinal' frente a la matriz 'transversa'. Los ejemplos del parche T-DG-N (# 6) se muestran en la Figura 6 que representa la fuerza para un desprendimiento de 90 º sobre Corium a 37 º C en los parches transversales vs longitudinales de T-DG-N/fibrinógeno. Se observa que la dirección "l" proporciona consistentemente una mayor resistencia al desprendimiento que la dirección "t", 69 % para 6A frente a 6B, en la que el peso del revestimiento se mantiene constante para un parche dado.

[0076] Haciendo referencia ahora a la Figura 7, que muestra la fuerza para un desprendimiento de 90 º sobre Corium (longitudinal) a 37 º C y demuestra el efecto del peso de capa sobre el parche T-DG-N/fibrinógeno, se puede observar que cuanto mayor es el peso de capa para una composición dada probada en la misma dirección, mayor es la resistencia al desprendimiento; por ejemplo, el parche 5B frente al 5C de la Tabla 4.

[0077] Refiriéndose ahora a la Figura 8, que muestra la fuerza para un desprendimiento de 90 º sobre Corium (longitudinal) a 37 º C y demuestra el efecto del T-DG-N en % en peso a un peso de capa constante (con el gráfico de la izquierda que muestra pesos de capa bajos y el gráfico de la derecha que muestra pesos de capa altos), se puede observar el efecto de la composición a dos niveles de pesos de capa, mostrando buen rendimiento a una concentración tan baja como 10 % en peso de T-DG-N. Las composiciones ensayadas a un peso de capa razonablemente constante de 0,7 a 1,0 gramos por unidad matricial en el amplio intervalo de composiciones muestran una tendencia central de mayor rendimiento alrededor del 50 % en peso de T-DG-N. Se observa claramente a un peso de capa constante de 1,3 a 1,4 gramos por unidad matricial que cuanto más alto sea el reticulante (hasta el 50 % en peso), mayor será el rendimiento de desprendimiento.

[0078] Refiriéndose ahora a la Figura 9, que muestra la fuerza para un desprendimiento de 90 º sobre Corium a 37 º C (transversa o longitudinal):
(A) Al 30 % TDGN (gráfico izquierdo), (B) al 50 % TDGN (gráfico derecho). Como se muestra, el parche TDGN puede formularse con un nivel de reticulante inferior (por ejemplo, 30 %) o mayor (por ejemplo 50 %). Un nivel inferior de reticulante obviamente tiene un mayor contenido de fibrinógeno como se muestra. En el nivel más alto de 50 % en peso de T-DG-N, se observa un nivel de rendimiento estadísticamente significativo más alto con un contenido más bajo de fibrinógeno (0,65 ó 0,75 gm). Este comportamiento se señala tanto en la dirección "l" como en la dirección "t". El nivel del reticulante se puede reducir si se puede reducir el contenido en tampón de arginina y glicina, que es un total del 22 % en peso en la composición de fibrinógeno.

[0079] Refiriéndose ahora a la Figura 10, que muestra la fuerza para un desprendimiento de 90 º sobre Corium a 37 º C (longitudinal) y demuestra el efecto de TDGN en % en peso a un nivel de colágeno particulado constante (INSTAT MCH) de 17 % en peso; el contenido de fibrinógeno por unidad matricial se mantiene constante ajustando el peso de la capa. Se demuestra que el efecto de refuerzo del colágeno producido por crio-molienda de INSTAT MCH ™ (bovino, disponible de Ethicon, Inc.), siendo el tamaño de partícula un promedio de 125 +/- 79 micras (<90 % 238 micras y <10 % 28 y). Aquí el contenido de fibrinógeno se mantiene constante ajustando el peso de la capa, y manteniendo un nivel constante de colágeno en un 17 % en peso. El nivel más alto de 50 % en peso de TDGN muestra un nivel razonablemente alto de rendimiento de 95 +/- 9 N/m de resistencia al desprendimiento a sólo 0,5 gramos de fibrinógeno por unidad matricial.

EJEMPLO 10. Rendimiento de los parches por HBLT

[0080]HBLT (Ensayo hidráulico de Fuga y rotura, según el método ASTM F 2392-04, "Método de prueba estándar de resistencia a la rotura de selladores quirúrgicos") es otro método cuantitativo para caracterizar la resistencia del sellante. Refiriéndose ahora a la Figura 11, se resumen los datos sobre el tejido de Corium utilizando los parches TDGN mencionados anteriormente. Figura 14 muestra los resultados del ensayo de rotura HBLT sobre Corium con un defecto de 4 mm en solución salina y el rendimiento comparado del parche TDGN con y sin 17% de colágeno (INSTAT MCH) a un TDGN constante del 50 %. El sustrato de Corium tiene un agujero de perforación de biopsia de 4 mm para el defecto de fuga de líquido. El parche TDGN con 50 % en peso de TDGN muestra una fuga a 95 ± 13 mm Hg (en la que N = 4, un peso de capa de 1,2 gramos y un contenido de fibrinógeno de 0,60 gramos por unidad matricial).

[0081] Aquí de nuevo el colágeno particulado a una carga del 17 % en peso con TDGN del 50 % en peso muestra el efecto de refuerzo con un rendimiento de 122 +/- 9 mm Hg (en el que N = 2 y un peso de capa de 1,3 gramos) con un contenido en fibrinógeno de sólo 0,43 gramos por unidad matricial.

EJEMPLO 11. Caracterización aguda *in vivo*

[0082] El TDGN / BAC-2 de 50/50 % en peso de mezcla se evaluó aquí como un polvo. Se utilizó un Interceed ™ como un portador de la mezcla de polvo sobre la incisión en el segmento GI. Se dejó el portador y se aplicó solución salina sobre él de modo que el polvo se humedeciera en el tejido. El vehículo se unió bien a la GI porcina en aproximadamente 2 a 3 minutos. Este ensayo se realiza con una incisión de 10 mm y un único nudo de sutura en el centro que mostró una presión de rotura de aproximadamente 58 mm Hg, demostrando una resistencia aumentada a la fuga de fluido. Una fuga en la línea de base sería igual o inferior a 5 mm Hg.

EJEMPLO 12. Degradación enzimática del sellante por la plasmina a 37 º C

[0083] Los sellantes se prepararon usando una solución acuosa de fibrinógeno (solución al 7% aproximadamente), en la que se añadió polvo de T-DG-N o PEG-DG-N a una composición seleccionada a base de contenido de fibrinógeno. Tras la disolución del éster activo en la solución de fibrinógeno, se forma un hidrogel en aproximadamente 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. La velocidad de degradación *in vitro* del hidrogel (o sellante) se determinó en un medio enzimático de plasmina a una concentración de 3,3 microgramos/ml determinando el % de coágulo que permanecía por método gravimétrico después de una duración de exposición determinada. Los datos se muestran en la Figura 12 en comparación con un coágulo basado en fibrina. La Figura 15 muestra una comparación del coágulo basado en fibrina frente al fibrinógeno/TDGN en una solución de plasmina de 3,3 mg/ml a 37 ºC. Se observa claramente que el éster NHS "fibrinógeno reticulado" muestra resistencia a la degradación enzimática a diferencia de la fibrina reticulada iniciada por la trombina, en la que el primero se degradó al 100 % en aproximadamente 22 horas, mientras que en el último sólo se degradó un 20 % durante el mismo período.

EJEMPLO 13. Degradación hidrolítica del sellante en PBS 37 º C

[0084] La degradación de los dos sellantes (o coágulos) anteriores también se investigó en un medio tampón PBS, como se muestra en la Figura 13, que muestra una comparación de sellador a base de fibrina frente a fibrinógeno/TDGN en PBS a 37 ºC. Se observó que el TDGN comenzó a mostrar cierta degradación hidrolítica en aproximadamente 22 horas a 37 ºC, a diferencia del sellador a base de fibrina.

EJEMPLO 14. Degradación hidrolítica del sellante en agua desionizada a 37 º C

[0085] Como el sistema diglicolato-NHS/BAC-2 es un hidrogel de fibrinógeno con enlaces cruzados basados en éster, su degradación se siguió en el perfilador de pH de agua desionizada a 37 ºC, en el que se añadió una base para neutralizar el ácido formado tras la hidrólisis de éster con el tiempo, para mantener un pH neutro constante. Los datos se resumen en la Tabla 5. El % en peso del reticulante se varió en base a el contenido de fibrinógeno. La duración variable de la longevidad in vitro se observa en la Tabla 5 para los selladores fabricados a partir de fibrinógeno con T-DG-N o PEG-DG-N.

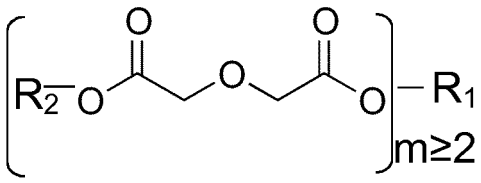
Tabla 5: longevidad de sellantes de composiciones variables en un medio hidrolítico de agua desionizada a 37 º C según la medida del perfilador de pH para mantener un pH constante a 7.4

Tipo de reticulante diglicólico-NHS	Reticulante NHS en (% peso)	N (#)	Promedio (días)	+/- Std Dev
T-DG-N	30	2	2,7	+/- 0.4
T-DG-N	50	3	7,1	+/- 3.7
T-DG-N	60	1	16.7	-
PEG-DG-N	50	3	19.8	+/- 8.7

Reivindicaciones

1. Una composición de adhesivo o sellador tisular que comprende:

(a) un compuesto de reticulación que contiene un grupo electrófilo de fórmula 1



[1]

que tiene

(1) un radical enlazador de un ácido diglicólico;
(2) un radical de núcleo R soluble en agua que se deriva de los compuestos en el grupo que consiste en aminas terciarias glicoles de polietileno bifuncionales, en los que dicho radical de núcleo soluble en agua tiene al menos dos brazos de la cadena lateral "m" que están unidos de forma covalente a dicho radical enlazador de ácido diglicólico;
(3) un grupo R_2 electrófilo que está unido covalentemente al fibrinógeno del radical enlazador

y

(b) del ácido diglicólico.

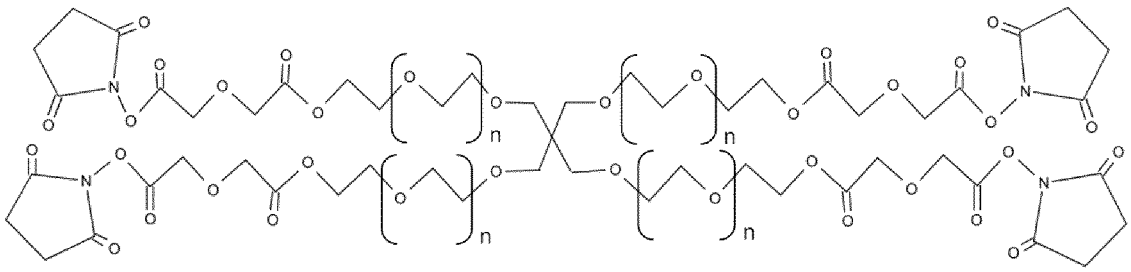
2. La composición adhesiva o sellante tisular de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el fibrinógeno se deriva del plasma sanguíneo.

3. La composición adhesiva o sellante tisular de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en las que el fibrinógeno está en forma de partícula liofilizada.

4. La composición adhesiva o sellante tisular de la reivindicación 1 en la que R1 se deriva de aminas terciarias bifuncionales seleccionadas del grupo que consiste en TKHEED o TKHPED.

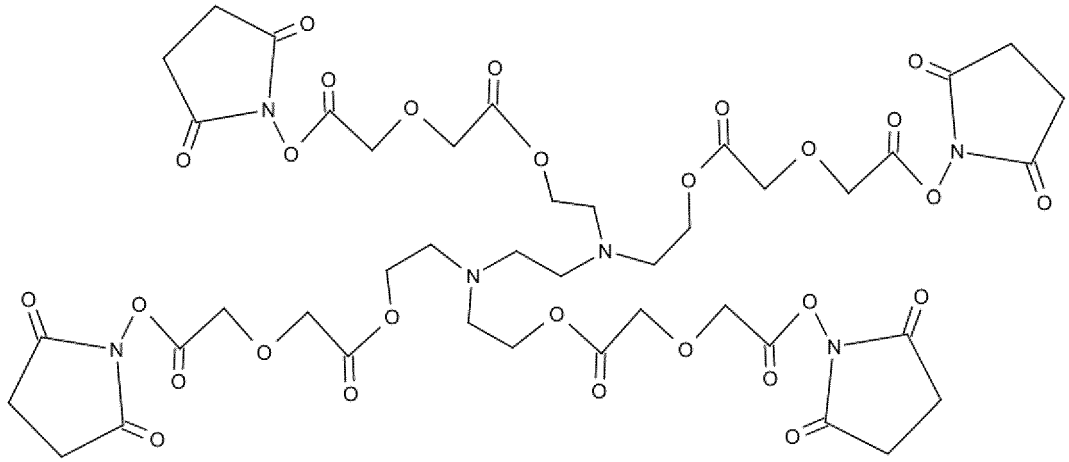
5. La composición adhesiva o sellante tisular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en las que R1 se deriva de un polietilenglicol que tiene al menos cuatro brazos de la cadena lateral "m".

6. La composición adhesiva o sellante tisular de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que radicales electrófilos R2 son grupos terminales NHS tal que el compuesto de reticulación de fórmula 1 que contiene el grupo electrófilo es un compuesto representado por la fórmula 2 o la fórmula 3



[2]

en las que "n" es un número dentro del intervalo 5-100;



[3].

7. La composición adhesiva o sellante tisular de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en las que la composición adhesiva o sellante tisular está en forma de polvo seco antes del contacto con humedad o con un tejido.

8. La composición adhesiva o sellante tisular de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en las que la composición adhesiva o sellante tisular está dispuesta sobre un sustrato absorbible o no absorbible.

9. La composición adhesiva o sellante tisular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en las que la composición adhesiva o sellante tisular comprende una solución del componente (a) y una solución del componente (b) que se mantienen por separado antes de su uso en una aplicación médica y se mezclan para su uso en una aplicación médica.

10. Una composición adhesiva o sellante tisular de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende una forma en polvo seca del compuesto reticulante que contiene un grupo electrófilo de fórmula 1 de acuerdo con la reivindicación 1 y una forma en polvo seca de fibrinógeno.

11. Una composición adhesiva o sellante tisular de la reivindicación 10 que comprende además un dispositivo de entrega que tiene al menos una primera y una segunda cámara; en las que el compuesto de reticulación que contiene un grupo electrófilo de fórmula 1 conforme a la reivindicación 1 está contenido en dicha primera cámara y el fibrinógeno está contenido en la dicha segunda cámara, y en las que el compuesto de reticulación que contiene un grupo electrófilo de fórmula 1 conforme a la reivindicación 1 y el fibrinógeno se expresan a partir de dicha primera cámara y de dicha segunda cámara y se mezclan formando de este modo una composición adhesiva o sellante tisular.

12. La composición adhesiva o sellante tisular de las reivindicaciones 10 u 11, en las que la humedad es suministrada por el tejido.

13. Un dispositivo médico que comprende una sutura, una grapa, un injerto vascular, una pinza de nudo de sutura, una clavija ortopédica, una abrazadera, un tornillo, una placa o un clip, y la composición adhesiva o sellante tisular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

FIG. 1

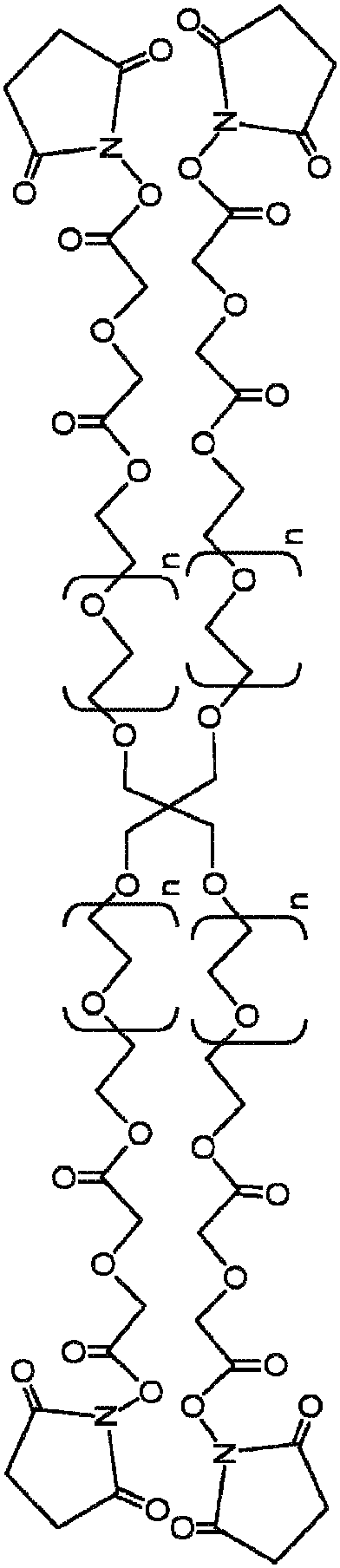


FIG. 2

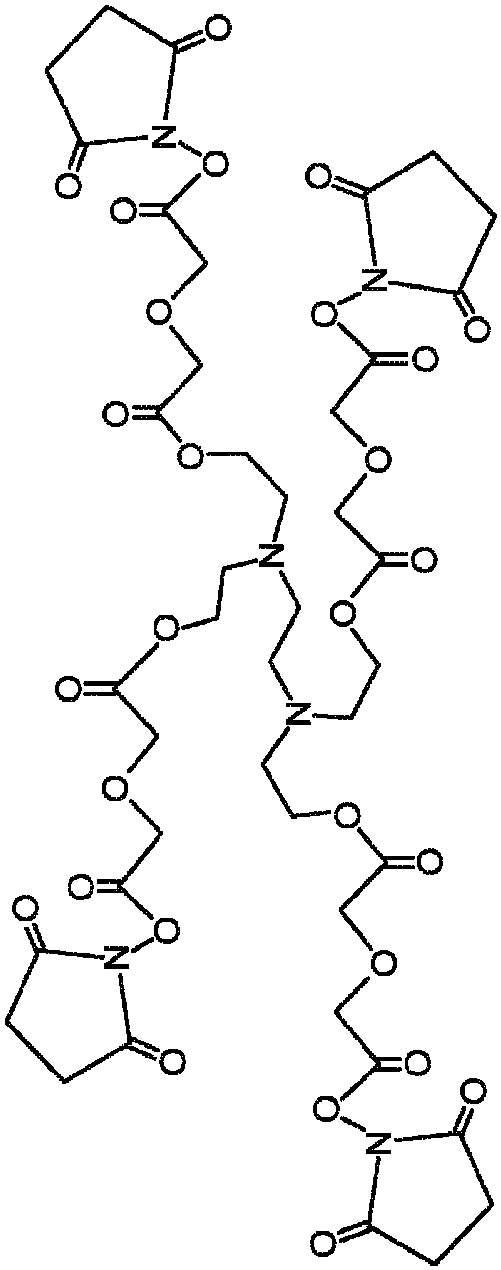


FIG. 3

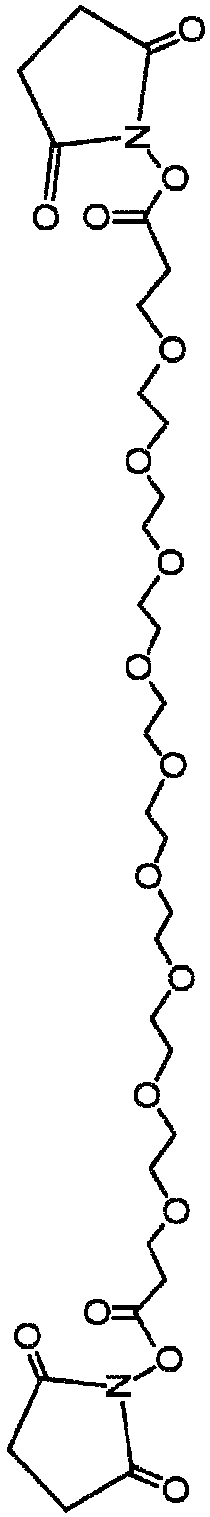


FIG. 4

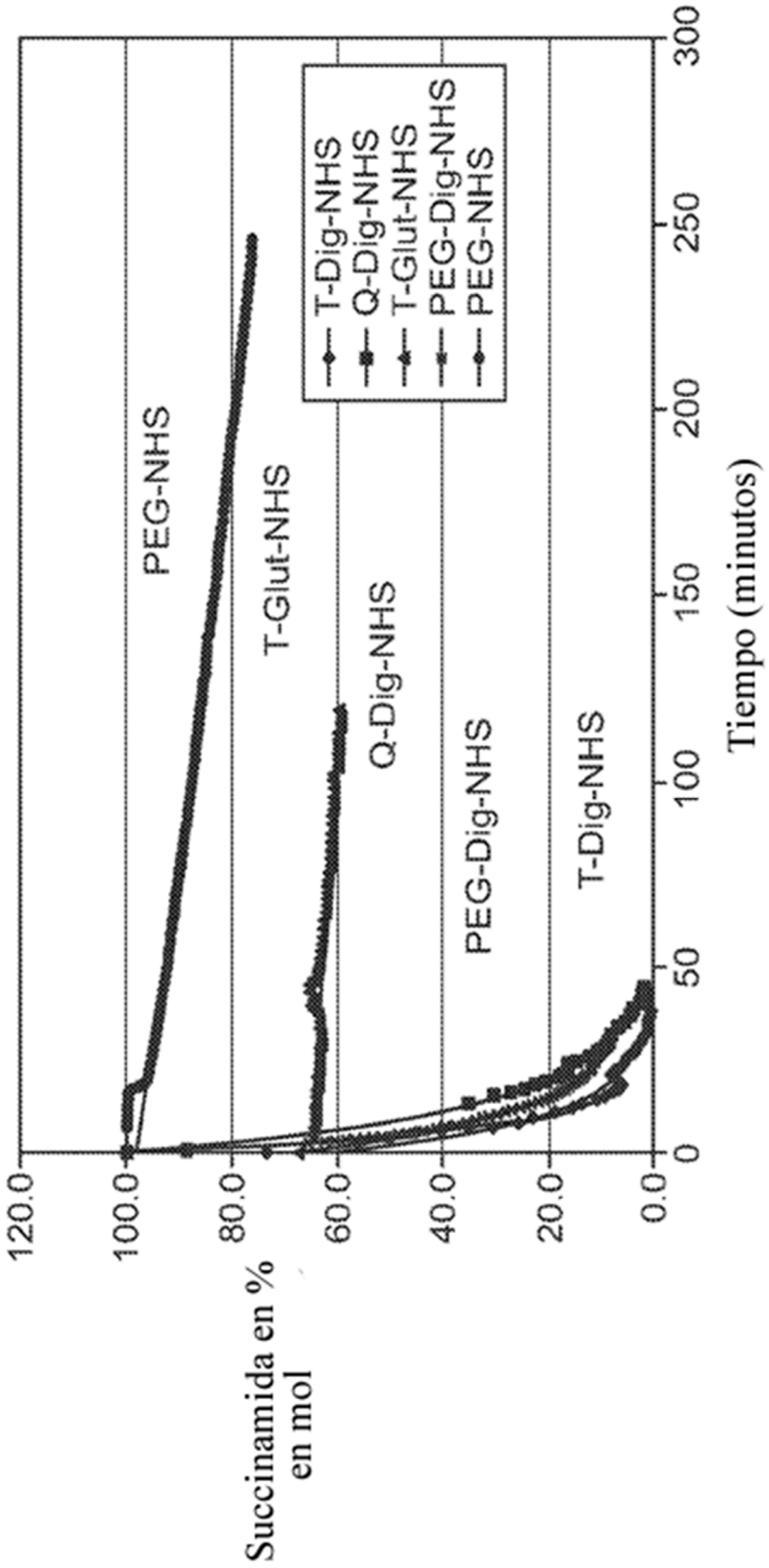

Degradación del éster NHS
Succinamida en % en mol
Tiempo (minutos)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
50
100
150
200
250
300
PEG-NHS
T-Glut-NHS
Q-Dig-NHS
PEG-Dig-NHS
T-Dig-NHS
T-Dig-NHS
Q-Dig-NHS
T-Glut-NHS
PEG-Dig-NHS
PEG-NHS

FIG. 5

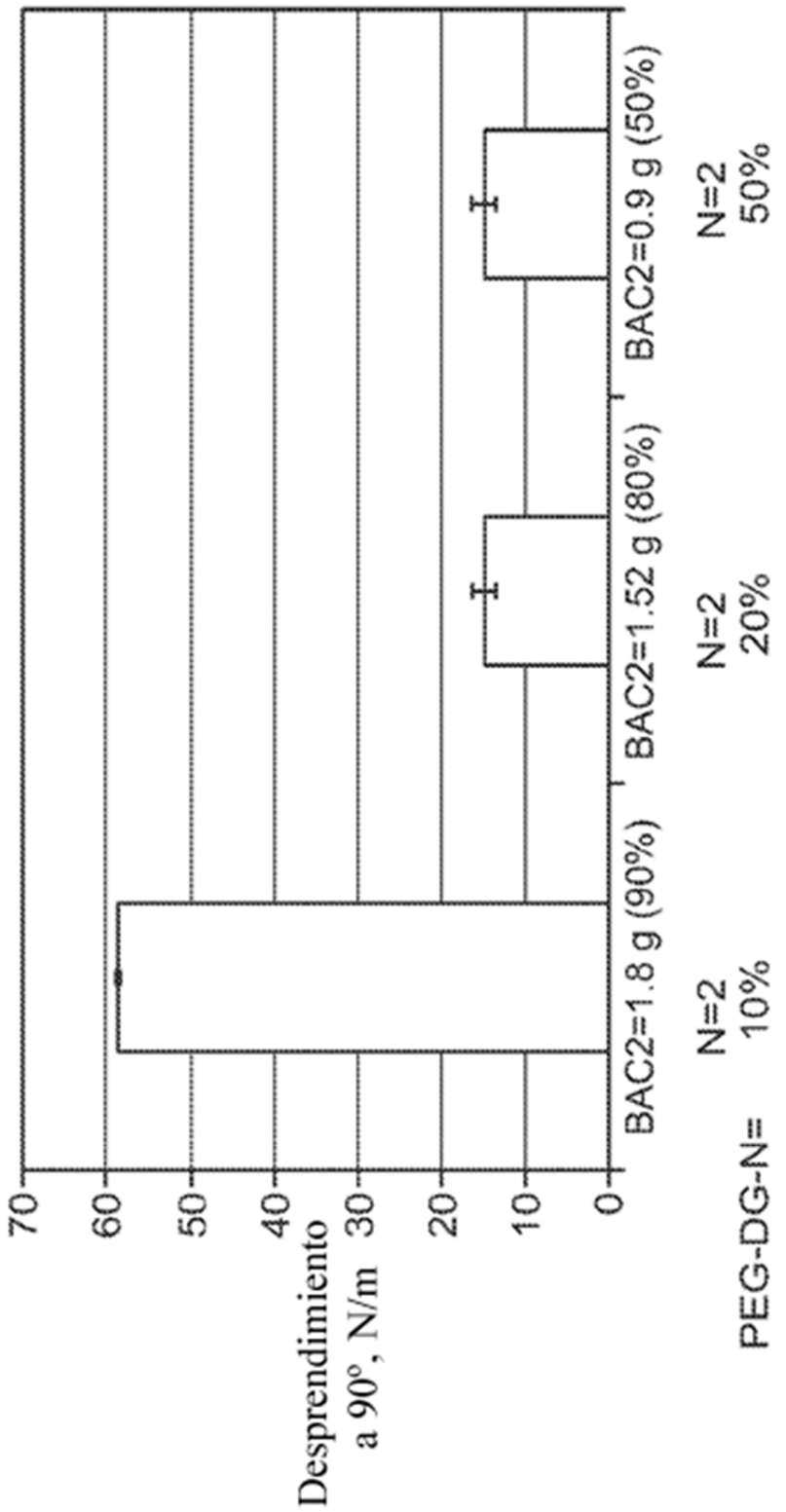

Desprendimiento a 90°, N/m
70
60
50
40
30
20
10
0
BAC2=1.8 g (90%)
BAC2=1.52 g (80%)
BAC2=0.9 g (50%)
N=2
10%
N=2
20%
N=2
50%
PEG-DG-N=

FIG. 6

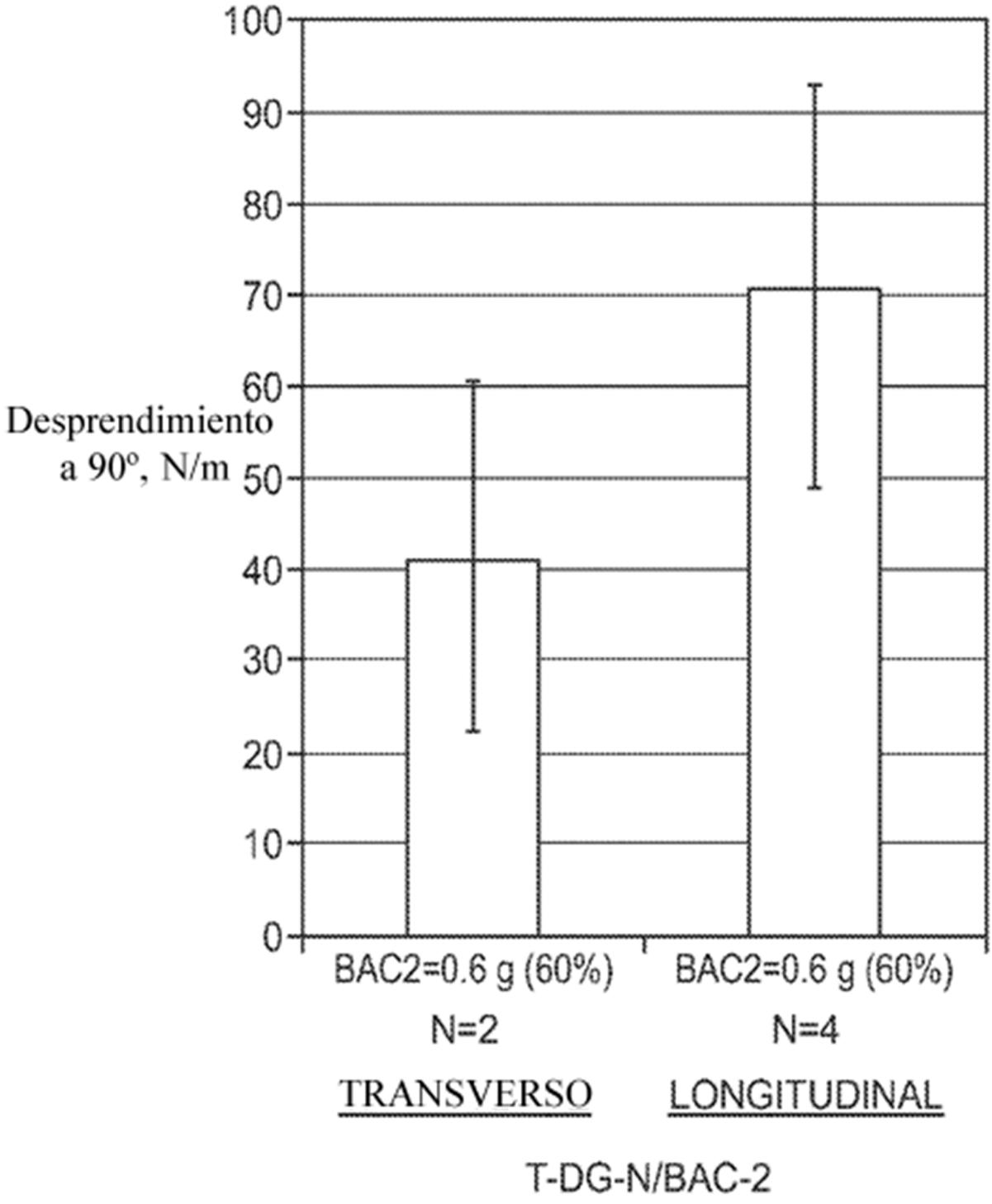

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Desprendimiento a 90°, N/m
BAC2=0.6 g (60%)
N=2
TRANSVERSO
BAC2=0.6 g (60%)
N=4
LONGITUDINAL
T-DG-N/BAC-2

FIG. 7

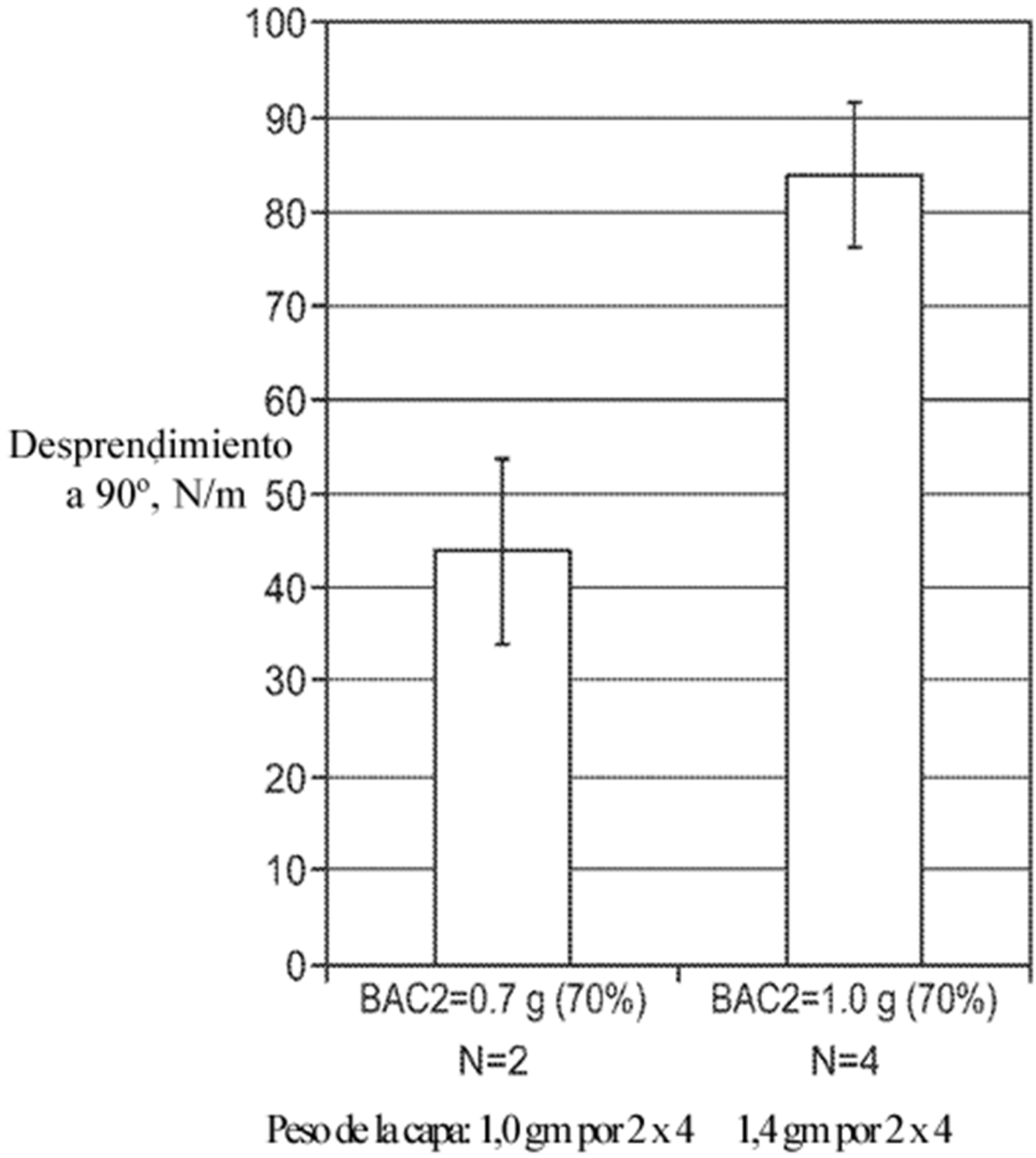

100
90
80
70
60
Desprendimiento
a 90°, N/m
50
40
30
20
10
0
BAC2=0.7 g (70%)
BAC2=1.0 g (70%)
N=2
N=4
Peso de la capa: 1,0 gm por 2 x 4
1,4 gm por 2 x 4

FIG. 8

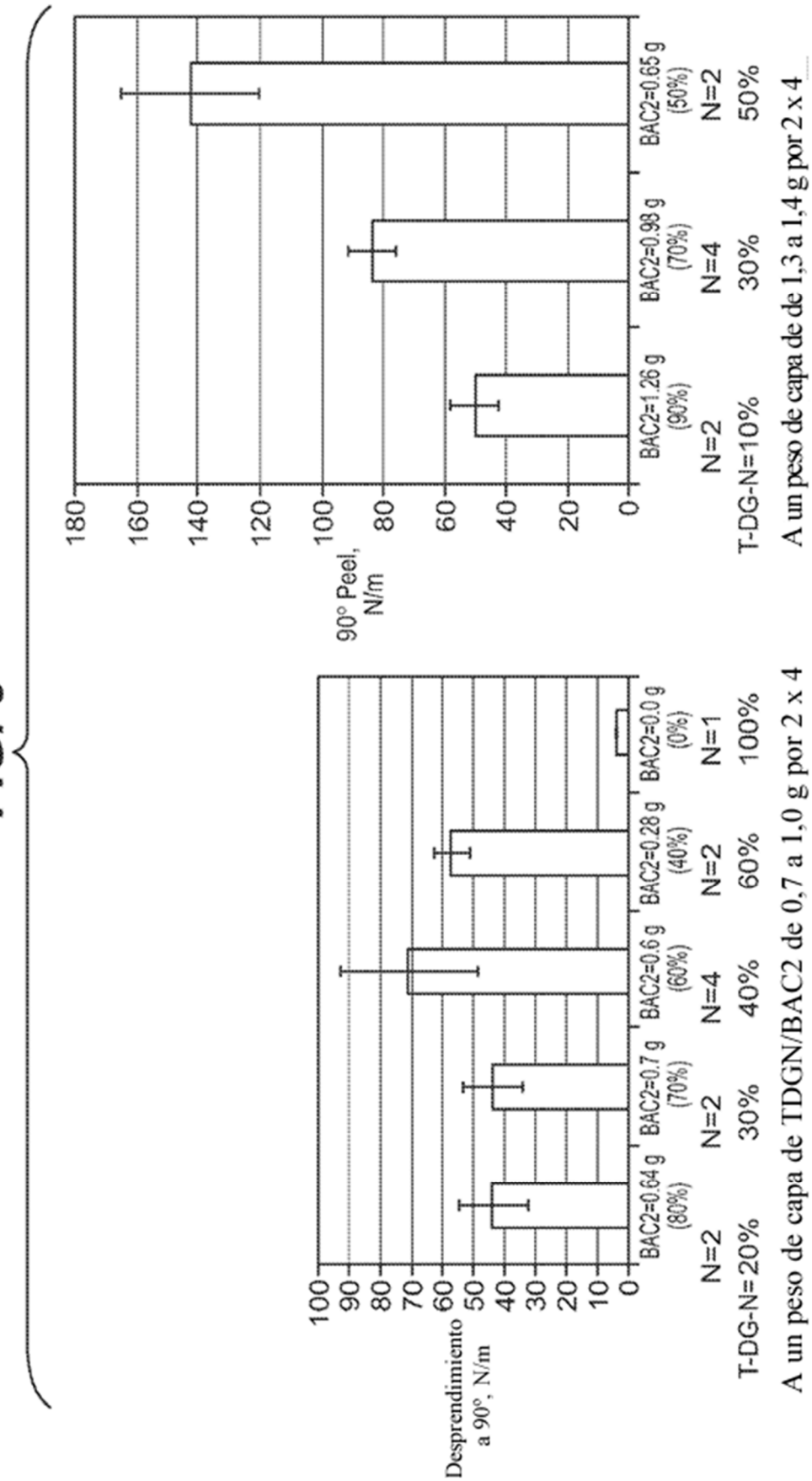

Desprendimiento a 90°, N/m
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
BAC2=0.64 g (80%)
BAC2=0.7 g (70%)
BAC2=0.6 g (60%)
BAC2=0.28 g (40%)
BAC2=0.0 g (0%)
N=2
N=2
N=4
N=2
N=1
T-DG-N=20%
30%
40%
60%
100%
A un peso de capa de TDGN/BAC2 de 0,7 a 1,0 g por 2 x 4
90° Peel, N/m
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
BAC2=1.26 g (90%)
BAC2=0.98 g (70%)
BAC2=0.65 g (50%)
N=2
N=4
N=2
T-DG-N=10%
30%
50%
A un peso de capa de 1,3 a 1,4 g por 2 x 4

FIG. 9

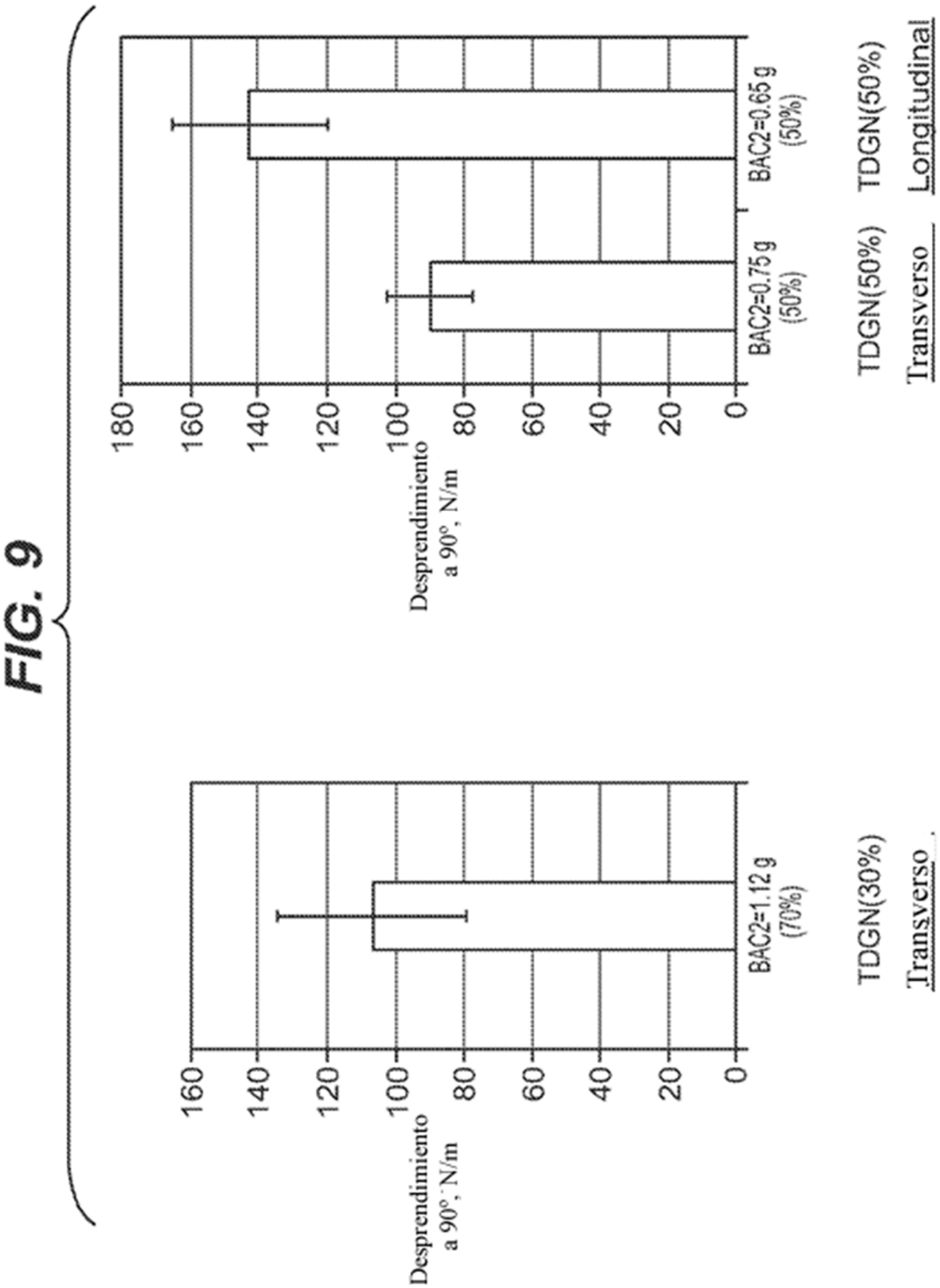

Desprendimiento a 90°, N/m
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
BAC2=0.75 g (50%)
BAC2=0.65 g (50%)
TDGN(50%)
TDGN(50%)
Transverso
Longitudinal
Desprendimiento a 90°, N/m
160
140
120
100
80
60
40
20
0
BAC2=1.12 g (70%)
TDGN(30%)
Transverso

FIG. 10

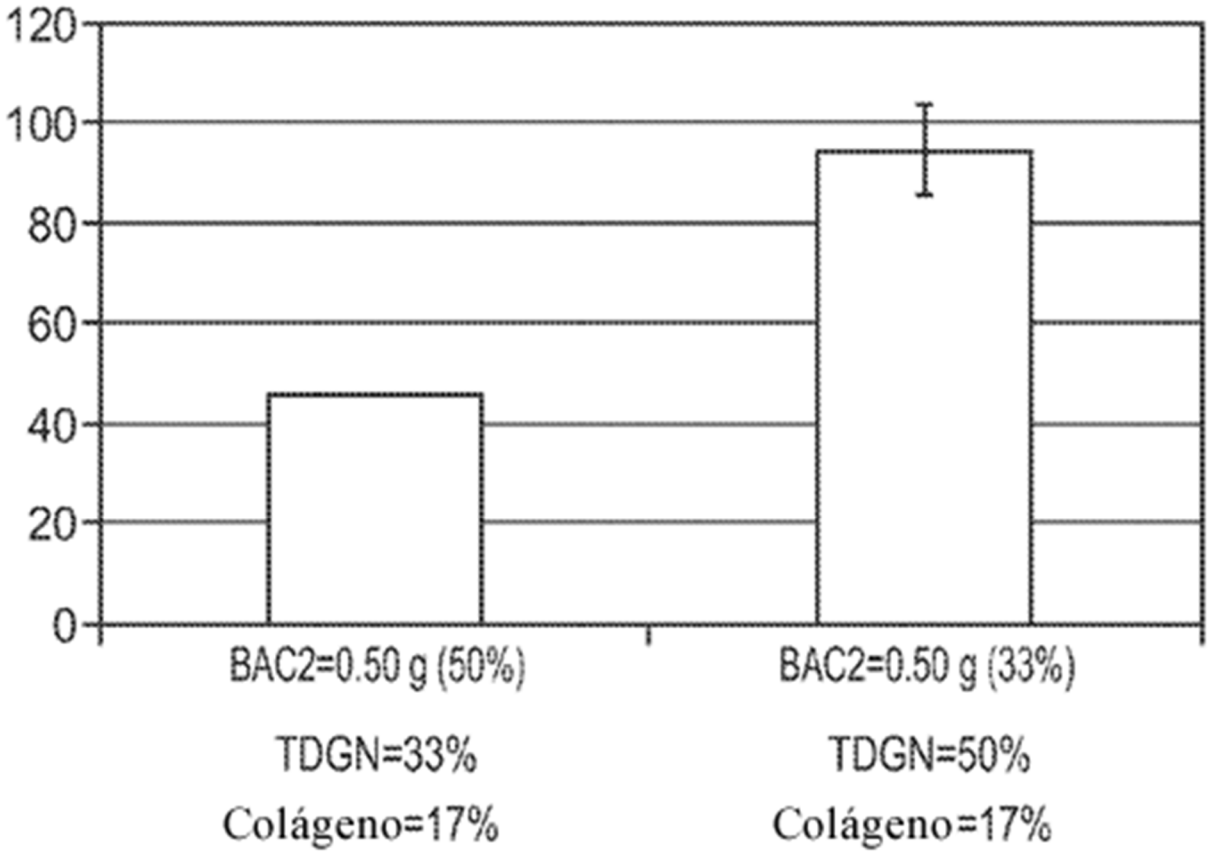

120
100
80
60
40
20
0
BAC2=0.50 g (50%)
TDGN=33%
Colágeno=17%
BAC2=0.50 g (33%)
TDGN=50%
Colágeno=17%

FIG. 11

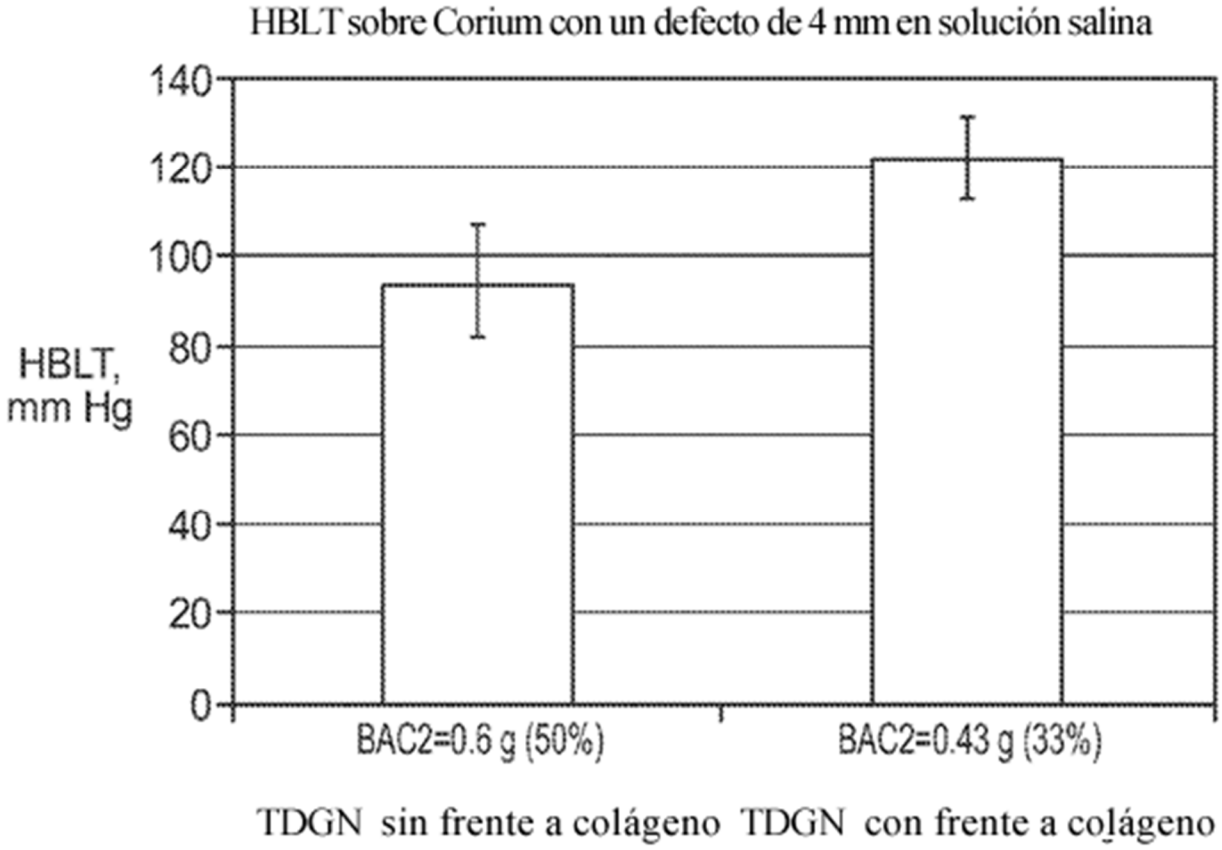

HBLT sobre Corium con un defecto de 4 mm en solución salina
HBLT, mm Hg
140
120
100
80
60
40
20
0
BAC2=0.6 g (50%)
BAC2=0.43 g (33%)
TDGN sin frente a colágeno
TDGN con frente a colágeno

FIG. 12

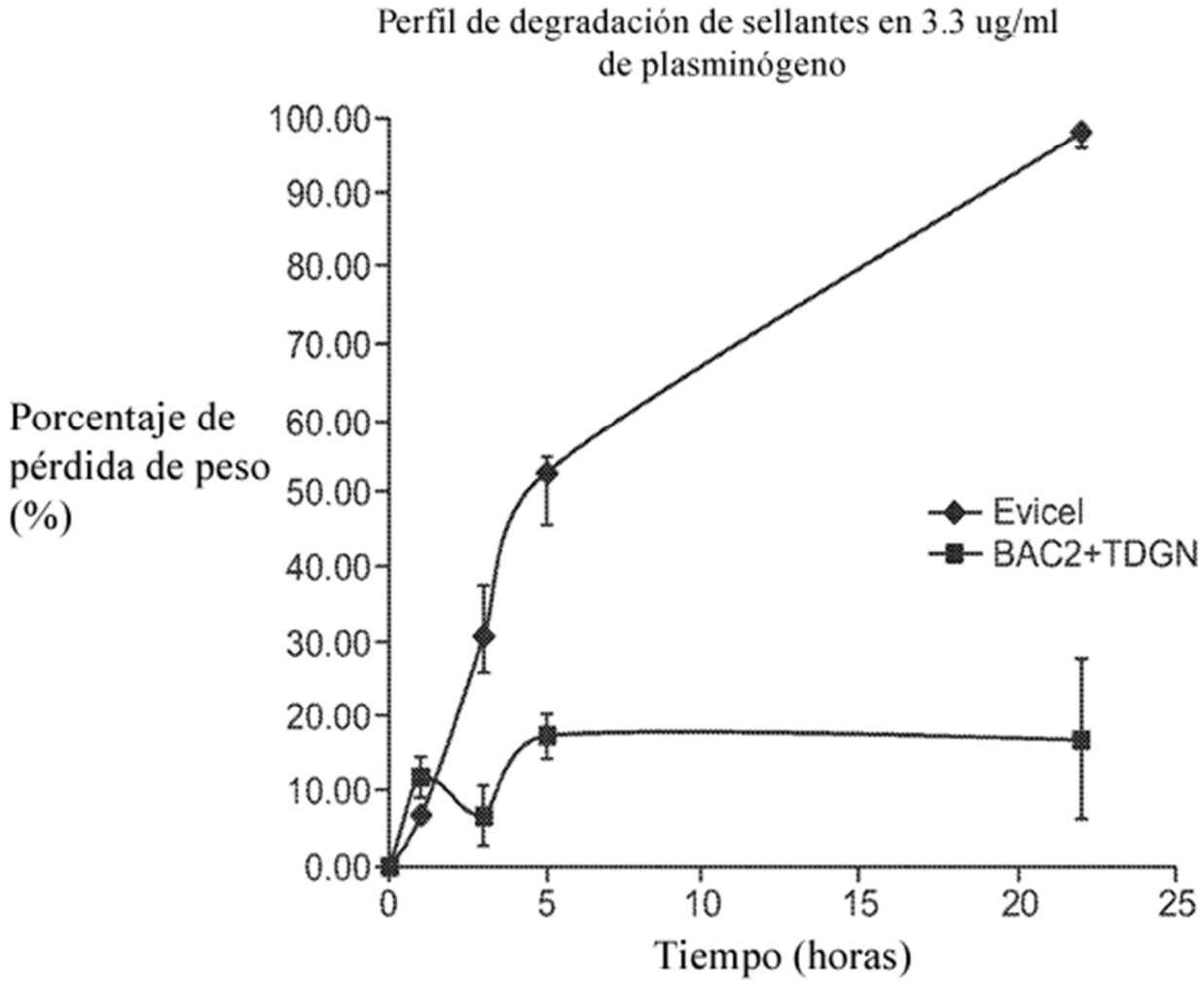
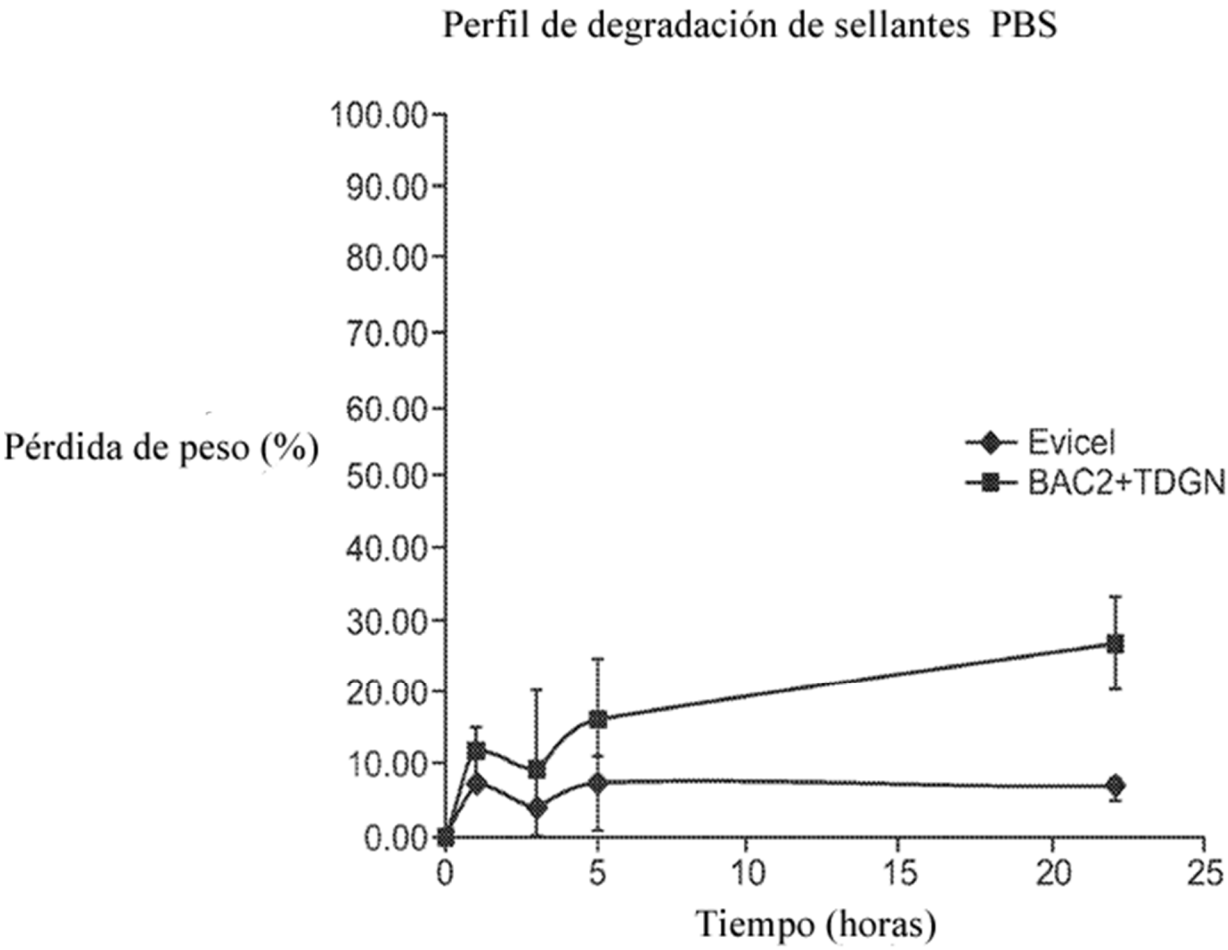

Perfil de degradación de sellantes en 3.3 ug/ml de plasminógeno
Porcentaje de pérdida de peso (%)
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
5
10
15
20
25
Tiempo (horas)
Evicel
BAC2+TDGN

FIG. 13


Perfil de degradación de sellantes PBS
Pérdida de peso (%)
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
5
10
15
20
25
Tiempo (horas)
Evicel
BAC2+TDGN