

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 181**

51 Int. Cl.:

A61L 29/08	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61P 41/00	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2008 PCT/NZ2008/000219**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2009 WO09009720**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2008 E 08828839 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2195039**

54 Título: **Hidrogel quirúrgico**

30 Prioridad:

28.08.2007 US 968414 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2017

73 Titular/es:

OTAGO INNOVATION LIMITED (33.3%)
Centre for Innovation, 87 St David Street, P O Box 56
Dunedin, NZ;
ADELAIDE RESEARCH & INNOVATION PTY LTD. (33.3%) y
ROBINSON SQUIDGEL LIMITED (33.3%)

72 Inventor/es:

ATHANASIADIS, THEODORE;
HANTON, LYALL ROBERT;
MORATTI, STEPHEN CARL;
ROBINSON, BRIAN HARFORD;
ROBINSON, SIMON RAE;
SHI, ZHENG;
SIMPSON, JAMES y
WORMALD, PETER JOHN

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 619 181 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

Hidrogel quirúrgico

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La formación de adherencias es un resultado frecuente y desafortunado de muchas intervenciones quirúrgicas. Las adherencias son bandas fibrosas que unen superficies de tejido que normalmente están separadas. Las adherencias son particularmente comunes después de intervenciones quirúrgicas abdominales y pélvicas, como la reparación de hernias, las cirugías ginecológicas y las cirugías colorrectales.

10 El traumatismo en el tejido, causado por la manipulación y la desecación durante la cirugía, provoca que se libere un exudado fibrinoso. Si el exudado no se absorbe o se lisa, se puede acumular en la cavidad peritoneal o pélvica, donde se convierte en una adherencia. El exudado crece dentro de la carne con fibroblastos, el colágeno se deposita y los vasos sanguíneos empiezan a formarse, lo que permite la formación de la adherencia.

La formación de adherencias puede dar lugar a serias complicaciones, como la oclusión del intestino delgado, la esterilidad femenina y el dolor crónico. Los pacientes pueden necesitar someterse a más intervenciones quirúrgicas para disecar las adherencias, sin la garantía de que no se formen nuevas adherencias.

15 Las técnicas para reducir la formación de adherencias incluyen el lavado de la cavidad peritoneal, la administración de agentes farmacológicos y la separación mecánica de los tejidos. La hemostasia posoperatoria, el proceso fisiológico en el que se detiene el sangrado, también puede disminuir el riesgo de que se formen adherencias, además de ofrecer otros beneficios.

20 Desafortunadamente, los métodos actuales para reducir las adherencias y/o lograr las hemostasias no son particularmente efectivos y pueden resultar molestos para el paciente. Además, en algunas circunstancias, los tratamientos orientados a la hemostasia pueden aumentar el riesgo de que se formen adherencias.

25 Por ejemplo, después de la cirugía endoscópica nasosinusal (CENS), utilizada para tratar la sinusitis crónica, los pacientes tienen que soportar un incómodo taponamiento nasal para controlar el sangrado. Sin embargo, la retirada de los tapones nasales puede provocar un traumatismo en la mucosa que aumente la probabilidad de que se formen adherencias. Los estudios han demostrado que, incluso los apósitos que contienen agentes hemostáticos tópicos conocidos, como la trombina, la fibrina, el fibrinógeno y el colágeno, pueden causar un aumento significativo de la formación de adherencias (véase, por ejemplo, Chandra R. K., Kern R. C., Advantages and disadvantages of topical packing in endoscopic sinus surgery, Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004,12, 21-26). La formación de adherencias que requieren más intervenciones quirúrgicas tiene lugar en entre un 10 y un 30 % de los pacientes que se someten a CENS.

35 Se han aplicado soluciones y geles poliméricos a zonas diana para reducir las adherencias. Por ejemplo, se han utilizado geles para recubrir tejidos expuestos quirúrgicamente antes de cerrar el lecho quirúrgico. Algunas técnicas permiten añadir polímeros in situ al paciente, en una solución, y después hacerlos reaccionar para formar reticulaciones covalentes para crear una red polimérica. Por ejemplo, el SprayGel™ es un material basado en PEG que forma una barrera contra la adherencia cuando se aplica al tejido.

40 Los polímeros polisacáridos, como el quitosano, también son muy conocidos como agentes medicinales que forman geles. El quitosano es reconocido por tener propiedades cicatrizantes. Por ejemplo, US 5.836.970 divulga apósitos para heridas de quitosano y alginato que se pueden preparar en forma de fibras, polvos, películas, espumas o hidrocoloides hinchables en agua. US 5.599.916 divulga una sal de quitosano hinchable en agua e insoluble en agua que se puede utilizar en apósitos para heridas, y US 6.444.797 divulga una lámina microscópica de quitosano que se puede utilizar como un apósito para heridas o un recubrimiento para la piel.

También se ha demostrado que el quitosano tiene un efecto preventivo en la adherencia peritoneal en ratas (Preventive effects of chitosan on peritoneal adhesion in rats, Zhang, Zhi-Liang et al., World J Gastroenterol, 2006, 12(28) 4572-4577).

45 También se han investigado algunos derivados del quitosano por sus efectos en la cicatrización y la prevención de la adherencia. Por ejemplo, la publicación PCT WO 96/35433 describe el uso de N,O-carboximetilquitosano para prevenir adherencias quirúrgicas. El N,O-carboximetilquitosano también ha sido explicado en:

(i) Kennedy R et al., Prevention of experimental postoperative adhesions by N,O-carboxymethyl chitosan, Surgery, 1996, 120, 866-70;

5 (ii) Costain DJ et al., Prevention of postsurgical adhesions with N,O-carboxymethylchitosan: Examination of the most efficacious preparation and the effect of N,O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing, Surgery, 1997; 121, 314-9;

(iii) Krause TJ et al., Prevention of pericardial adhesions with N,O-carboxymethylchitosan in the Rat Model, Journal of Investigative Surgery, 2001, 14, 93-97;

(iv) Diamond, Michael P. et al., Reduction of postoperative adhesions by N,O-carboxymethylchitosan: a pilot study, Fertil Steril 2003, 80, 631-636;

10 (v) Diamond Michael P et al., Reduction of post operative adhesions by N,O-carboxymethylchitosan: A Pilot Study, The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists, 2004, 11(1), 127; y

(vii) Lee, Timothy D. G et al., Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of N,O-carboxymethyl chitosan, Surgery, 2004, 135, 307-312.

15 La publicación PCT WO 98/22114 explica el uso de quitosano combinado con mono-, di- u oligosacáridos sulfatados para potenciar la cicatrización en tejidos que contienen colágeno. La publicación PCT WO 96/02260 describe el quitosano combinado con heparina, sulfato de heparina o sulfato de dextrano. Se afirma que esta combinación promueve la cicatrización de las heridas dérmicas.

20 La publicación PCT WO 04/006961 describe un gel para inmovilizar y encapsular células formadas por quitosano neutro reticulante con un aldehído multifuncional bifuncional o un polímero que contiene hidroxilo tratado con aldehído.

La solicitud de patente US 2005/002893 describe una composición para pegar tejido biológico que comprende un polímero que tiene grupos amino (un polisacárido o un polímero sintético) y un aldehído que tiene, al menos, tres grupos aldehídos.

25 Weng Lihui et al. describen, en Biomacromolecules, 2007, 8, 1109-1115, hidrogeles reticulables formulados a partir de dextrano oxidado y N-carboxietil quitosano (un polímero de quitosano derivatizado con grupo monocarboxilo).

Pese a estos esfuerzos, la formación de adherencias sigue teniendo lugar en muchas áreas de la cirugía. Por ello, todavía existe una gran demanda de nuevos materiales poliméricos con eficacia médica para la hemostasia y la prevención de la adherencia que se pueden utilizar para mejorar los resultados quirúrgicos.

30 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un hidrogel que se pueda aplicar a una herida para contribuir a la cicatrización o proporcionar una elección útil para la población.

EXPLICACIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

35 La invención se refiere a un hidrogel que se puede aplicar a las heridas quirúrgicas y a otras heridas. El hidrogel se puede hacer combinando soluciones acuosas de dos polímeros que se reticulan para formar una red polimérica cuando se mezclan. Cuando tiene lugar la reticulación, el polímero resultante forma un hidrogel en una solución acuosa. El hidrogel se puede formar *in situ*, por ejemplo, pulverizando, aplicando en chorro o vertiendo las soluciones poliméricas sobre la zona afectada. De forma alternativa, el hidrogel se puede formar previamente y aplicar después a la zona afectada. En otra forma de realización, el hidrogel se puede formar humedeciendo un apósito para heridas que contenga los componentes poliméricos.

40 Los hidrogeles de la invención contribuyen a la cicatrización y pueden ayudar a prevenir que se formen adherencias entre tejidos adyacentes que han sido dañados de forma que se han hecho susceptibles de una formación de adherencias. Los hidrogeles de la invención también pueden afectar a la hemostasia reduciendo o deteniendo el sangrado de una herida. Los hidrogeles son biodegradables en condiciones quirúrgicas y se descomponen gradualmente en un periodo de días o semanas.

45 En un aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

ES 2 619 181 T3

En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que consiste en un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

5 En una forma de realización de los aspectos nombrados arriba, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo se reticula al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído mediante el grupo amina del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

En una forma de realización de los aspectos nombrados arriba, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un polímero de N-succinil-quitosano.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende N-succinil-quitosano reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que consiste en N-succinil-quitosano reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

15 En una forma de realización de los aspectos nombrados arriba, el N-succinil-quitosano se reticula al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído mediante el grupo amina del N-succinil-quitosano y el grupo aldehído del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, en donde la red polimérica forma un hidrogel en entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 5 minutos después de mezclar en una solución acuosa el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un N-succinil-quitosano reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, en donde la red polimérica forma un hidrogel en entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 5 minutos después de mezclar en una solución acuosa el N-succinil-quitosano y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

25 En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 30 s, preferiblemente, entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 20 s, más preferiblemente, entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 10 s. En otra forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 30 s y aproximadamente 5 minutos. En otra forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 5 s y aproximadamente 1 min.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, en donde la red polimérica forma un hidrogel en entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos después de mezclar en una solución acuosa el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

35 En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un N-succinil-quitosano reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, en donde la red polimérica forma un hidrogel en entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos después de mezclar en una solución acuosa el N-succinil-quitosano y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

40 En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 10 minutos.

En otra forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 20 minutos.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, en donde la red polimérica forma un hidrogel en entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 2 horas después de mezclar en una solución acuosa el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

ES 2 619 181 T3

En otro aspecto, la invención proporciona una red polimérica que comprende un N-succinil-quitosano reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, en donde la red polimérica forma un hidrogel en entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 2 horas después de mezclar en una solución acuosa el N-succinil-quitosano y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

- 5 En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 2 horas, preferiblemente, en entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora.

En una forma de realización, la red polimérica está en forma de hidrogel.

- 10 En una forma de realización, el hidrogel comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo. En una forma de realización, el hidrogel comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

- 15 Preferiblemente, el hidrogel comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 8 % p/v, más preferiblemente, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 6 % p/v de polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo. Como más preferiblemente, el hidrogel comprende aproximadamente un 5 % p/v de polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo.

Preferiblemente, el hidrogel comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 8 % p/v, más preferiblemente, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 6 % p/v de polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Con mayor preferencia, el hidrogel comprende aproximadamente un 5 % p/v de polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

- 20 En una forma de realización, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un N-succinil-quitosano.

En una forma de realización, la solución acuosa se selecciona del grupo que comprende agua, solución salina, amortiguador y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la solución acuosa es solución salina en un 0,9 % p/v.

En un aspecto, el hidrogel comprende una o más sustancias biológicamente activas.

- 25 En una forma de realización, la una o más sustancias biológicamente activas se seleccionan del grupo que comprende proteínas plasmáticas, hormonas, enzimas, antibióticos, antisépticos, antineoplásicos, antifúngicos, antivíricos, antiinflamatorios, anestésicos locales, factores de crecimiento, esteroides, suspensiones celulares, citotoxinas e inhibidores de la proliferación celular.

En un aspecto, el hidrogel comprende una o más sustancias no biológicamente activas.

- 30 En una forma de realización, la una o más sustancias no biológicamente activas se seleccionan del grupo que comprende espesantes y colorantes.

En un aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para prevenir o reducir la adherencia del tejido susceptible de formar adherencias.

En una forma de realización, la adherencia es una adherencia posquirúrgica.

- 35 En una forma de realización, el uso comprende aplicar al tejido un hidrogel de la invención. Preferiblemente, se extiende una capa de hidrogel sobre la superficie del tejido.

En una forma de realización, el uso comprende aplicar al tejido (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel en la superficie del tejido.

- 40 En una forma de realización, (a) y (b) se aplican simultáneamente al tejido.

En una forma de realización, (a) y (b) se pulverizan simultáneamente sobre el tejido. En una forma de realización, (a) y (b) se aplican en chorro simultáneamente sobre el tejido. En otra forma de realización, (a) y (b) se vierten simultáneamente sobre el tejido.

ES 2 619 181 T3

En una forma de realización, el uso comprende tratar el tejido con un hidrogel de la invención aplicando al tejido (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel en la superficie del tejido.

5 En otro aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para acelerar o favorecer la cicatrización.

En una forma de realización, el uso comprende aplicar a la herida un hidrogel de la invención. Preferiblemente, se extiende una capa de hidrogel sobre la superficie de la herida.

10 En una forma de realización, el uso comprende aplicar a la herida (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel.

En una forma de realización, (a) y (b) se aplican simultáneamente a la herida.

En una forma de realización, (a) y (b) se pulverizan simultáneamente sobre la herida. En una forma de realización, (a) y (b) se aplican en chorro simultáneamente sobre la herida. En otra forma de realización, (a) y (b) se vierten simultáneamente sobre la herida.

15 En una forma de realización, el uso comprende tratar la herida con un hidrogel de la invención aplicando a la herida (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel en la superficie de la herida.

En otro aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para reducir o detener el sangrado de una herida.

20 En una forma de realización, el uso comprende aplicar a la herida un hidrogel de la invención. Preferiblemente, se extiende una capa de hidrogel sobre la superficie de la herida.

En una forma de realización, el uso comprende aplicar a la herida (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel.

25 En una forma de realización, (a) y (b) se aplican simultáneamente a la herida.

En una forma de realización, (a) y (b) se pulverizan simultáneamente sobre la herida. En una forma de realización, (a) y (b) se aplican en chorro simultáneamente sobre la herida. En otra forma de realización, (a) y (b) se vierten simultáneamente sobre la herida.

30 En una forma de realización, el uso comprende tratar la herida con un hidrogel de la invención aplicando a la herida (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel en la superficie de la herida.

35 En otro aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para suministrar una o más sustancias biológicamente activas a un tejido tratando el tejido con un hidrogel de la invención, en donde el hidrogel comprende una o más sustancias biológicamente activas.

En una forma de realización, el uso comprende aplicar al tejido un hidrogel de la invención, en donde el hidrogel comprende una o más sustancias biológicamente activas. Preferiblemente, se extiende una capa de hidrogel sobre la superficie del tejido.

40 En una forma de realización, el uso comprende aplicar al tejido (a) una solución acuosa de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y (b) una solución acuosa de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído de forma que (a) y (b) se combinen para formar el hidrogel en la superficie del tejido, en donde una o las dos de (a) y (b) incluyen una o más sustancias biológicamente activas.

En los usos de la invención descritos arriba:

ES 2 619 181 T3

En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 5 minutos después de combinar (a) y (b) para producir el medicamento.

- 5 En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 30 s, preferiblemente, entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 20 s, más preferiblemente, entre aproximadamente 1 s y aproximadamente 10 s. En otra forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 30 s y aproximadamente 5 minutos. En otra forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 5 s y aproximadamente 1 min.

En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos después de combinar (a) y (b) para producir el medicamento.

- 10 En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 10 minutos. En otra forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 20 minutos.

En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 2 horas después de combinar (a) y (b) para producir el medicamento.

- 15 En una forma de realización, el hidrogel se forma en entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, preferiblemente, en entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora.

- 20 En una forma de realización, (a) comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo, preferiblemente, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 8 % p/v, y más preferiblemente, aproximadamente un 5 % p/v. En una forma de realización, (b) comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, preferiblemente, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 8 % p/, y más preferiblemente, aproximadamente un 5 % p/v.

En una forma de realización, (a) tiene un pH de entre aproximadamente 6 y 8, preferiblemente, entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

- 25 En una forma de realización, (b) tiene un pH de entre aproximadamente 6 y 8, preferiblemente, entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

En una forma de realización, el quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un N-succinil-quitosano.

En otro aspecto, la invención proporciona un apósito para heridas que puede liberar un hidrogel de la invención cuando se humedece.

- 30 En una forma de realización, el apósito para heridas contiene un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. En una forma de realización, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un N-succinil-quitosano.

En una forma de realización, el apósito para heridas se selecciona del grupo que comprende vendas, bandas, compresas, gasas, películas, medias y cintas.

- 35 En otro aspecto, la invención proporciona un kit para su uso en los métodos de la invención, en donde el kit comprende:

(a) un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y

(b) un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

- 40 En una forma de realización, el kit también comprende una solución acuosa en la que se pueden disolver (a) y (b) para permitir que tenga lugar la reticulación. En otra forma de realización, el kit también comprende una solución acuosa de uno o los dos de (a) y (b).

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para su uso en los métodos de la invención, en donde el kit comprende lo siguiente en recipientes separados:

(a) un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y

(b) un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

En una forma de realización, el kit también comprende una solución acuosa en la que se pueden disolver (a) y (b) para permitir que tenga lugar la reticulación. En otra forma de realización, el kit también comprende una solución acuosa de uno o los dos de (a) y (b).

5

En los kits de la invención descritos arriba:

En una forma de realización, el kit de la invención también comprende instrucciones para el uso en un método para prevenir o reducir la adherencia posquirúrgica del tejido que es susceptible de una formación de adherencia.

En una forma de realización, el kit de la invención también comprende instrucciones para el uso en un método para acelerar o favorecer la cicatrización.

10

En una forma de realización, el kit de la invención también comprende instrucciones para el uso en un método para reducir o detener el sangrado de una herida.

En una forma de realización, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído proporcionados en el kit de la invención están liofilizados. En una forma de realización, el kit también comprende una solución acuosa en la que se disuelven el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

15

En una forma de realización, al menos uno, y preferiblemente los dos, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, se proporcionan por separado en una solución acuosa. En una forma de realización, las soluciones acuosas están congeladas.

20

En una forma de realización, la solución acuosa del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo. Preferiblemente, la solución acuosa comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 8 % p/v, más preferiblemente, aproximadamente un 5% p/v de polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo.

25

En una forma de realización, la solución acuosa del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo tiene un pH de entre aproximadamente 6 y 8. Preferiblemente, la solución acuosa del polímero derivatizado con grupo dicarboxilo tiene un pH de entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

En una forma de realización, el quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un N-succinil-quitosano.

30

En una forma de realización, la solución acuosa del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Preferiblemente, la solución acuosa comprende entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 8 % p/v, más preferiblemente, aproximadamente un 5% p/v de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

35

En una forma de realización, la solución acuosa del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído tiene un pH de entre aproximadamente 6 y 8. Preferiblemente, la solución acuosa del polímero derivatizado con grupo dicarboxilo tiene un pH de entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

Opcionalmente, una o las dos soluciones acuosas pueden contener uno o más excipientes aceptables en farmacia.

En una forma de realización, la solución acuosa se selecciona del grupo que comprende agua, solución salina, amortiguador y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la solución acuosa es solución salina en un 0,9 % p/v.

40

En una forma de realización, una o las dos soluciones acuosas pueden contener una o más sustancias biológicamente activas y/o una o más sustancias no biológicamente activas.

En una forma de realización, uno o más de (a) y (b) también contiene una o más sustancias biológicamente activas.

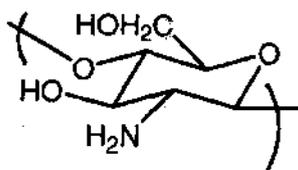
- 5 Cuando se hace referencia a un intervalo de números divulgado en la presente memoria (por ejemplo, de 1 a 10) se pretende que también incluya la referencia a todos los números que se encuentran racionalmente dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1; 1,1; 2; 3; 3,9; 4; 5; 6; 6,5; 7; 8; 9 y 10) y también cualquier intervalo racional de números que se encuentre en ese intervalo (por ejemplo, 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por tanto, se divulgan expresamente de esta forma todos los subintervalos de todos los intervalos divulgados en la presente memoria. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente, y, de forma similar, se tienen que considerar como nombradas expresamente en esta solicitud todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados.
- 10 En esta memoria, se ha hecho referencia a otros fascículos de patente, otros documentos externos u otras fuentes de información, en general, con el fin de proporcionar un contexto para explicar las características de la invención. Salvo que se especifique expresamente lo contrario, la referencia a estos documentos externos no se debe interpretar como una admisión de que esos documentos u otras fuentes de información, en cualquier jurisdicción, pertenezcan al estado de la técnica o fomen parte del conocimiento general común en el estado de la técnica.
- 15 También se puede afirmar, en líneas generales, que la invención consiste en las partes, los elementos y las características de las que se hace referencia o que se indican en la memoria de la solicitud, de forma individual o colectiva, en cualquiera o en todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características, y en los casos en los que en la presente memoria se mencionen números enteros específicos que tengan equivalentes conocidos en el estado de la técnica al que se refiere la invención, se deben considerar esos equivalentes conocidos como incluidos en la presente memoria como si se hubieran expuesto individualmente.
- 20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**
- La Figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de ovejas con adherencias en la pared nasal lateral después del tratamiento en cada grupo del ensayo descrito en el Ejemplo 6.
- La Figura 2 es un gráfico que muestra el grado medio de las adherencias en la pared nasal lateral (Ejemplo 6).
- 25 La Figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de ovejas con adherencias etmoidales en cada grupo (Ejemplo 6).
- La Figura 4 es un gráfico que muestra el grado medio de la adherencia etmoidal para todos los tratamientos en comparación con los controles emparejados (Ejemplo 6).
- La Figura 5 es un gráfico que muestra una comparación por microscopia óptica de la altura del epitelio a lo largo del tiempo (Ejemplo 6).
- 30 La Figura 6 es un gráfico que muestra una comparación por microscopia óptica del porcentaje de reepitelización (Ejemplo 6).
- La Figura 7 es un gráfico que muestra una comparación por microscopia electrónica de barrido del porcentaje del área de la superficie reciliada (Ejemplo 6).
- 35 La Figura 8 es un gráfico que muestra una comparación por microscopia electrónica de barrido del grado ciliar (Ejemplo 6).
- La Figura 9 es un gráfico que muestra la frecuencia del batido ciliar (FBC) media de cada uno de los grupos (Ejemplo 6).
- La Figura 10 es un gráfico que muestra la puntuación del grado del campo quirúrgico activo frente al placebo mediante el sistema de clasificación de Boezaart (Ejemplo 7).
- 40 La Figura 11 es un gráfico que muestra la puntuación del grado del campo quirúrgico activo frente al placebo mediante el sistema de clasificación de Wormald (Ejemplo 7).
- La Figura 12 es un gráfico que muestra la puntuación del grado del campo quirúrgico activo frente al control mediante el sistema de clasificación de Boezaart (Ejemplo 8).
- 45 La Figura 13 es un gráfico que muestra el tiempo necesario para completar la hemostasia del principio activo frente al control (Ejemplo 8).

La Figura 14 es un gráfico que compara puntuaciones de costra del campo quirúrgico activo frente al control a lo largo del tiempo (Ejemplo 8).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

1. Definiciones

- 5 En la presente memoria, el término «quitosano» significa un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina ligada por β -(1,4) y N-acetil-D-glucosamina distribuidas aleatoriamente. El quitosano se puede producir desacetilando la quitina. Tanto α - como β -quitosano son adecuados para su uso en la invención. El grado de desacetilación (% DA) influye en la solubilidad y en otras propiedades del quitosano. El quitosano disponible en el mercado tiene normalmente un grado de desacetilación de entre aproximadamente un 50 y un 100 %. En la Fórmula I, más abajo, se muestra una unidad monomérica de un quitosano completamente desacetilado.



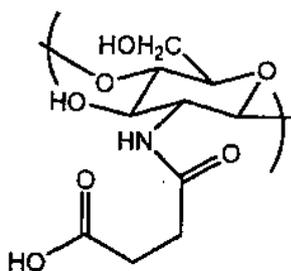
I

- 15 En la presente memoria, el término «polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo» significa un polímero de quitosano que ha sido derivatizado mediante la reacción de un anhídrido cíclico con el grupo amina de alguno de los residuos de D-glucosamina del polímero de quitosano. Ejemplos de grupos dicarboxilo incluyen el N-succinilo, el N-maloilo y el N-ftaloilo. Se prefiere el N-succinilo.

- 20 El «polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo» también se puede modificar parcialmente para derivatizarlo con otros grupos funcionales. Esta derivatización secundaria puede tener lugar, bien en posiciones amina que no estén derivatizadas con un grupo dicarboxilo, o bien en los grupos hidroxilo de los residuos de D-glucosamina. Por ejemplo, la reacción del anhídrido cíclico con un grupo OH del quitosano puede provocar que algunos monómeros contengan grupos éster, en lugar o además del sustituyente amida.

- 25 Si la derivatización secundaria está presente en la posición amina del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo, el polímero debe retener suficientes grupos amina libres para poder formar reticulaciones con el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Preferiblemente, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo solo se derivatiza mediante la reacción del anhídrido cíclico con el grupo amina de algunos de los residuos de D-glucosamina.

En la presente memoria, el término «polímero de N-succinil-quitosano» significa un quitosano que ha sido derivatizado añadiendo un grupo N-succinilo al grupo amina de alguno de los residuos de D-glucosamina del polímero de quitosano. En la Fórmula II, más abajo, se muestra una unidad monomérica de un polímero de N-succinil-quitosano.



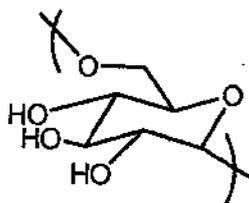
II

- 30 El grado de succinilación puede variar. Por lo general, este se encuentra entre aproximadamente el 30 y el 70 %, pero el polímero de N-succinil-quitosano debe retener suficientes grupos amina libres para poder formar

reticulaciones con el dextrano derivatizado con grupo aldehído. El polímero de N-succinil-quitosano también puede incluir una derivatización secundaria, como se ha explicado en el «polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo» (arriba).

5 En la presente memoria, el término «N-succinil-quitosano» significa un polímero de N-succinil-quitosano que solo se derivatiza con grupos N-succinilo en las posiciones amina y que no incluye ninguna derivatización secundaria con otros grupos funcionales.

En la presente memoria, el término «dextrano» significa un polisacárido de glucosa compuesto de enlaces α -(1,6) glucosídicos con cadenas α -(1,3) laterales cortas. En la Fórmula III, más abajo, se muestra una unidad monomérica del dextrano.

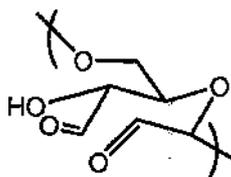


III

10

El dextrano se puede obtener fermentando medios que contengan sacarosa mediante *Leuconostoc mesenteroides* B512F. En el mercado se encuentran disponibles dextransos con pesos moleculares de 1 KDa a 2000 KDa.

15 En la presente memoria, el término «polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído» significa un polímero de dextrano en el que se ha oxidado algún grupo alcohol vecinal secundario para proporcionar un grupo funcional bisaldehído reactivo. Los polímeros de dextrano derivatizados con grupo aldehído también se pueden derivatizar en otras posiciones con otros grupos funcionales. Preferiblemente, el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído solo se derivatiza en grupos alcohol vecinales secundarios. En la Fórmula IV, más abajo, se muestra una unidad monomérica representativa del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.



IV

20 En la presente memoria, el término «liberación controlada», en el contexto de la liberación controlada de una sustancia biológicamente activa, significa un suministro más largo de lo esperado de una sustancia biológicamente activa, en comparación con lo que se esperaría en función solo de la difusión.

En la presente memoria, el término «hidrogel» significa un sistema de dos o más componentes que consiste en una red tridimensional de cadenas poliméricas y agua que llena los espacios entre las macromoléculas.

25 En la presente memoria, el término «tejido» significa un agregado de células morfológicamente parecidas con sustancia intercelular vinculada que actúa de manera conjunta para desarrollar una o más funciones específicas en el cuerpo de un organismo, incluido un ser humano. Ejemplos de tejidos incluyen, aunque no exclusivamente, el tejido muscular, epidérmico, nervioso y conjuntivo.

30 El término «tejido» también abarca los órganos que comprenden uno o más tipos de tejido, incluyendo, aunque no exclusivamente, los tejidos del tórax, como la aorta, el corazón, la cavidad pleural, la tráquea, los pulmones, el

5 pericardio y la cavidad pericárdica; los tejidos abdominal y retroperitoneal, como el estómago, el intestino grueso y delgado, el hígado, el páncreas, la vesícula biliar, los riñones y las glándulas suprarrenales; los tejidos de la cavidad pélvica, incluyendo los tejidos de los tractos urinario y reproductivo masculino y femenino; los tejidos del sistema nervioso central y periférico, como la columna vertebral y los nervios raquídeos, la duramadre y los nervios periféricos; los tejidos del sistema musculoesquelético, como el músculo esquelético, los tendones, los huesos y cartílagos; y los tejidos de la cabeza y el cuello, como el ojo, la oreja, el cuello, la laringe y los senos nasales y paranasales.

En la presente memoria, el término «adherencia» significa una unión anómala entre tejidos u órganos, o entre tejidos e implantes, que se forma después de un estímulo inflamatorio, como una cirugía.

10 Los tejidos que son susceptibles de formar adherencias son aquellos que han sido expuestos a un estímulo inflamatorio. Por ejemplo, los tejidos que han sido afectados en intervenciones quirúrgicas, como, aunque no exclusivamente, la cirugía endoscópica nasosinusal, la cirugía abdominal, la cirugía ginecológica, la cirugía musculoesquelética, la cirugía oftálmica, la cirugía ortopédica y la cirugía cardiovascular. Los tejidos también pueden ser susceptibles de formar adherencias con motivo de otros acontecimientos, como una lesión mecánica, una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria pélvica, un tratamiento de radioterapia y la presencia de cuerpos extraños, por ejemplo, un implante quirúrgico.

20 En la presente memoria, el término «herida» significa cualquier daño a un tejido en un organismo vivo, incluidos los organismos humanos. El tejido puede ser un tejido interno, como un órgano interno, o un tejido externo, como la piel. El daño puede haberse causado por una incisión quirúrgica o por la aplicación no intencionada de fuerza al tejido. Las heridas incluyen el daño causado por lesiones mecánicas, como excoiraciones, laceraciones, penetraciones y similares, así como quemaduras y lesiones por agentes químicos. El daño también puede haber surgido de forma gradual, como sucede con una úlcera, una lesión, una llaga o una infección. Ejemplos de heridas incluyen, aunque no exclusivamente, heridas contusas, heridas por incisión, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas punzantes y heridas subcutáneas.

25 En la presente memoria, el término «que comprende», como se utiliza en esta memoria, significa «que consiste al menos en parte en». A la hora de interpretar cada afirmación de esta memoria que incluya el término «que comprende», también se tienen que considerar otras características distintas a la o las expresadas por el término. Los términos relacionados, como «comprende» y «comprenden» también se deben interpretar del mismo modo.

2. La red polimérica

30 La invención se refiere a una red polimérica novedosa formada por una derivatización y reticulación de dos polímeros muy conocidos: el quitosano y el dextrano. El polímero forma rápidamente una red polimérica tridimensional, de forma que crea un hidrogel en una solución acuosa. Las propiedades del hidrogel se pueden adaptar a aplicaciones específicas modificando la derivatización y la reticulación de los dos componentes poliméricos.

35 En su aspecto más general, la invención proporciona una red polimérica que comprende un quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un dextrano derivatizado con grupo aldehído.

2.1 El componente quitosano

El quitosano es muy accesible y se puede obtener de una serie de fuentes en el mercado, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (www.sigma-aldrich.com).

40 Alternativamente, el quitosano se puede preparar desacetilando quitina. Se conocen muchos métodos de desacetilación en el estado de la técnica, por ejemplo, hidrolizar la quitina en una solución concentrada de hidróxido de sodio con calor y recuperar después el quitosano filtrando y lavando con agua. La quitina existe, bien como α -quitina, o bien como β -quitina, dependiendo de si el enlace entre las unidades de glucosamina es α o β . La quitina se encuentra en crustáceos, insectos, hongos, algas y levaduras. La α -quitina se obtiene principalmente de los caparzones de los crustáceos, así como de la langosta, el cangrejo y el camarón, mientras que la β -quitina proviene de plumas de calamar. Los dos tipos de quitina se pueden utilizar para preparar el quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo para usarlo en la invención.

Por lo general, el peso molecular medio (PMm) del quitosano disponible en el mercado se encuentra entre aproximadamente 1 y 1000 kDa. El quitosano con un peso molecular bajo tiene un PMm de aproximadamente 1 a

50 kDa. El quitosano con un peso molecular alto tiene un PMm de aproximadamente 250 a 800 kDa. Se puede utilizar quitosano con cualquier PMm en la invención.

5 La desacetilación de la quitina conlleva que el quitosano resultante tenga una mayoría de grupos amina primarios libres a lo largo de su cadena principal polimérica. El grado de desacetilación del quitosano puede influir en las propiedades de la red polimérica de la invención, porque solo aquellas unidades de glucosamina que están desacetiladas están disponibles para la derivatización o la reticulación. Además, la solubilidad del quitosano depende del grado de desacetilación.

10 Los polímeros de quitosano más adecuados para usar en la invención tienen un grado de desacetilación de entre aproximadamente un 40 % y un 100 %. Preferiblemente, el grado de desacetilación se encuentra entre aproximadamente 60 % y 95 %, más preferiblemente, entre el 70 % y el 95 %.

15 Los quitosanos para usar en la invención se derivatizan con grupo dicarboxilo en la amina liberada por la desacetilación de la quitina. Los polímeros de quitosano derivatizados con grupo dicarboxilo se pueden elaborar haciendo reaccionar el quitosano con un anhídrido de ácido cíclico. Los anhídridos de ácido cíclico adecuados para usar en la invención incluyen el anhídrido succínico, el anhídrido maleico, el anhídrido ftálico, el anhídrido glutárico, el anhídrido citraoónico, el anhídrido metilglutaoónico, el anhídrido metilsuccínico y similares.

Preferiblemente, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo se elabora a partir de la reacción del quitosano y uno o más de un anhídrido de succinilo, un anhídrido ftálico o un anhídrido glutárico. Más preferiblemente, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo se elabora a partir de la reacción del quitosano y un anhídrido de succinilo.

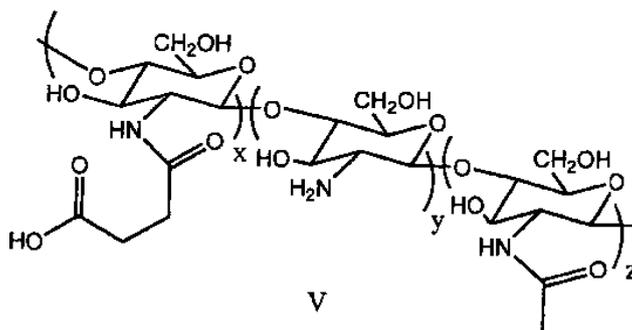
20 La derivatización se puede lograr por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede calentar el quitosano sólido en una solución de un anhídrido cíclico en DMF o solubilizar en una mezcla de metanol/agua y, después, hacerlo reaccionar con el anhídrido. Otros disolventes adecuados para su uso en el proceso de derivatización incluyen la dimetilacetamida. Se pueden añadir ácidos como el ácido láctico, el HCl o el ácido acético para mejorar la solubilidad del quitosano. Normalmente se suele añadir una base, como el NaOH, para desacetilar algunos de los grupos amina acetilados.

Se proporcionan métodos típicos en el Ejemplo 1. Los métodos utilizados se pueden seleccionar en función del anhídrido cíclico utilizado y/o del peso molecular medio del quitosano. Tanto el quitosano como el anhídrido cíclico se deben poder disolver o hinchar sustancialmente en el disolvente utilizado.

30 En una forma de realización preferida, el quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un N-succinil-quitosano. Son muy conocidos en el estado de la técnica los métodos para preparar N-succinil-quitosano. Véase, por ejemplo, «Preparation of N-succinyl chitosan and their physical-chemical properties», J Pharm Pharmacol. 2006, **58**, 1177-1181.

35 La reacción del anhídrido cíclico con el quitosano acila algunas de las posiciones amina libres con grupos dicarboxilo. Por ejemplo, cuando el anhídrido cíclico utilizado es el anhídrido succínico se N-succinilan algunos de los grupos amina. El tratamiento con NaOH posterior a la N-succinilación elimina algunos de los grupos acilo de los grupos amina del quitosano. Al aumentar la temperatura del tratamiento con NaOH aumenta el porcentaje de los grupos amina libres presentes, como se demuestra en el Ejemplo 4.

40 El grado de acilación viene indicado por la relación de C:N en el producto. El grado de acilación también puede determinarse por ¹H-rmn. Más abajo se representa un polímero de N-succinil-quitosano. La Fórmula V muestra los tres tipos de unidades de D-glucosamina presentes en el polímero: la D-glucosamina N-succinilada, la D-glucosamina libre y la N-acetil-D-glucosamina.



En una forma de realización, x es de entre aproximadamente un 60 y un 80 %, y es de entre aproximadamente un 1 y un 15 % y z es de entre aproximadamente un 10 y un 25 %.

5 En otra forma de realización, x es de entre aproximadamente un 60 y un 80 %, y es de entre aproximadamente un 1 y un 30% y z es de entre aproximadamente un 2 y un 25 %.

Cantidades altas de sustitución anhídrida hacen que el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo sea más soluble, pero pueden impedir la reticulación al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

10 En una forma de realización, el polímero de quitosano derivatizado con grupo carboxilo es derivatizado con grupo dicarboxilo en entre aproximadamente un 20 % y un 80 %. Preferiblemente, el polímero de quitosano derivatizado con grupo carboxilo es derivatizado con grupo dicarboxilo en entre aproximadamente un 30 % y un 60 %. Más preferiblemente, el polímero de quitosano derivatizado con grupo carboxilo es derivatizado con grupo dicarboxilo en entre aproximadamente un 45 % y un 50 %.

15 En una forma de realización, el polímero de quitosano derivatizado con grupo carboxilo es derivatizado con grupo dicarboxilo en entre aproximadamente un 50 % y un 90 %. Preferiblemente, el polímero de quitosano derivatizado con grupo carboxilo es derivatizado con grupo dicarboxilo en entre aproximadamente un 60 % y un 80 %.

2.2 El componente dextrano

El dextrano es un polisacárido elaborado a partir de unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces α -1,6. En el mercado se puede obtener dextrano bruto y con peso molecular alto cultivando *Leuconostoc mesenteroides* en sacarosa. El polisacárido resultante se hidroliza para obtener dextranos de peso molecular bajo.

20 El dextrano se tiene que activar antes de que se pueda reticular al polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo. Se pueden generar grupos funcionales bisaldehídos reactivos en el dextrano a partir de los grupos alcohol vecinales secundarios mediante oxidación. Se proporcionan métodos típicos en el Ejemplo 2. Entonces, el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído resultante se puede acoplar de forma reductora a los grupos amina primarios del quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo para formar una red polimérica reticulada de la invención.

25 En una forma de realización, el agente de oxidación es peryodato de sodio. Otros agentes de oxidación adecuados incluyen el peryodato de potasio y similares.

30 En realidad, el producto oxidado, el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, solo contiene una pequeña cantidad de grupos aldehído libres. La mayoría de los grupos aldehído están enmascarados como acetales y hemiacetales, que están en equilibrio con el estado de aldehído libre del dextrano. La reacción de alguno de los grupos aldehído libres provoca que el equilibrio se desplace de las formas acetal y hemiacetal a la formación de más grupos aldehído libres.

5 El grado de oxidación se puede alterar mediante la relación molar del agente de oxidación utilizado. Un grado de oxidación más elevado proporcionará más puntos disponibles para la reticulación al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Sin embargo, un grado de oxidación más reducido tendrá como resultado un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído más soluble. La reacción con peryodato también reduce significativamente el peso molecular del polímero de dextrano.

En una forma de realización, el grado de oxidación se encuentra entre aproximadamente el 30 % y el 100 %, más preferiblemente, entre el 50 % y el 100 %. Con mayor preferencia, el grado de oxidación se encuentra entre el 80 y el 100 %.

10 El Ejemplo 5 compara los tiempos de gelificación de las redes poliméricas de la invención preparadas con polímeros de dextrano derivatizados con grupo aldehído con diferentes grados de derivatización con grupo aldehído (u oxidación). Los polímeros de dextrano con más grado de derivatización con grupo aldehído tienen pesos moleculares más reducidos y forman geles con mayor rapidez cuando se combinan en una solución con soluciones de N-succinil-quitosano.

15 El grado de derivatización se puede medir mediante la reacción extendida con hidrócloruro de hidroxilamina y la subsiguiente titulación de los protones liberados (Zhao, Huiru, Heindel, Ned D, "Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method," Pharmaceutical Research (1991), 8, páginas 400-401).

2.3 Reticulación del componente de quitosano con el componente de dextrano

20 La invención proporciona una red polimérica que comprende un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. En una forma de realización, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un polímero de N-succinil-quitosano. En una forma de realización, el polímero de N-succinil-quitosano se reticula al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído mediante el grupo amina del polímero de N-succinil-quitosano y el grupo aldehído del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Preferiblemente, el polímero de N-succinil-quitosano es un N-succinil-quitosano.

25 La invención también proporciona un método para producir una red polimérica como se describe arriba.

Para elaborar una red polimérica de la invención se reticula el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Ello se puede conseguir mezclando soluciones acuosas de los dos polímeros. Por ejemplo, véase el Ejemplo 3.

30 Una vez realizado, las soluciones acuosas de cada componente polimérico pueden, o bien permanecer en solución, o bien secarse, por ejemplo por liofilización, para producir un producto sólido. Después, los componentes poliméricos sólidos se pueden volver a disolver en una solución acuosa antes de mezclarse para formar el hidrogel de la invención.

35 En una forma de realización, se desea que la solución acuosa en la que se forma la matriz polimérica tenga un pH de aproximadamente 6 a 8, preferiblemente de entre 6,5 y 7,5. Ello se puede conseguir ajustando el pH de las soluciones acuosas de los componentes poliméricos por separado para que esté dentro de este intervalo antes de mezclar las dos soluciones. De forma alternativa, se puede ajustar el pH de las soluciones acuosas de los componentes poliméricos individuales después de la diálisis, antes de la liofilización. El pH se puede ajustar mediante cualquier base o ácido adecuados. Por lo general, el pH se ajusta con NaOH.

40 En una forma de realización, una o las dos soluciones acuosas pueden contener individualmente uno o más excipientes aceptables en farmacia. En una forma de realización, las soluciones acuosas pueden contener independientemente NaCl. Preferiblemente, la concentración de NaCl es de entre aproximadamente 0,5 y 5 % p/v. Más preferiblemente, la concentración de NaCl es de entre aproximadamente 0,5 y 2 % p/v, con mayor preferencia de aproximadamente 0,9 % p/v.

45 En una forma de realización, las soluciones acuosas pueden contener, independientemente, uno o más amortiguadores, incluidos, aunque no exclusivamente, amortiguadores de fosfato, como el Na₂HPO₄, amortiguadores de acetato, amortiguadores de carbonato, amortiguadores de lactato, amortiguadores de citrato y amortiguadores de bicarbonato.

2.4 Los hidrogeles de la invención

- 5 El polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reacciona con el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído para producir una red polimérica tridimensional reticulada. Esta red polimérica forma un hidrogel con la solución acuosa en la que se forma. El hidrogel de la invención tiene propiedades que lo hacen adecuado para usarlo en procesos médicos, particularmente, en la cicatrización de heridas, la prevención de adherencias quirúrgicas y la reducción del sangrado (hemostasia).
- 10 Sin limitarnos a la teoría, se considera que aplicar el hidrogel de la invención a la superficie de una herida previene la formación de fibrina y de coágulos de sangre dentro de este espacio, previniendo así la formación posterior de adherencias.
- 10 Las propiedades del hidrogel se pueden adaptar a aplicaciones específicas modificando la derivatización y la reticulación de los dos polímeros.
- En las redes poliméricas de la invención, los grupos amina de los residuos de D-glucosamina del quitosano se pueden
- (a) reticular al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído,
- (b) acilar con un grupo dicarboxilo o
- 15 (c) acetilar (a partir del material de quitina original).
- 20 Unos grados de acetilación y/o dicarboxi-acilación elevados harán que menos grupos amina libres se reticulen con el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Por consiguiente, cuando se mezclan las soluciones acuosas de los dos polímeros, la cantidad de polimerización que tiene lugar se verá afectada por los patrones de acilación y acetilación del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo. A su vez, ello afectará a la rapidez, de darse el caso, con la que se forme el hidrogel. Si tiene lugar una polimerización muy reducida en una solución diluida de los polímeros no se formará ningún hidrogel.
- Las soluciones acuosas del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído comprenden entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % p/v de cada componente.
- 25 Por lo general, se mezclan soluciones acuosas con las mismas concentraciones de los dos polímeros para formar el hidrogel de la invención. Sin embargo, se pueden utilizar distintas relaciones del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, siempre y cuando las propiedades de los dos polímeros se constituyan de forma que se reticulen para formar un hidrogel de la invención cuando se mezclen.
- 30 Un experto en la técnica puede manipular los parámetros de
- (a) grado de desacetilación del quitosano,
- (b) grado de derivatización con grupo dicarboxilo del quitosano,
- (c) grado de oxidación de un dextrano derivatizado con grupo aldehído y
- (d) concentración en solución acuosa,
- 35 de forma que las soluciones poliméricas componentes se reticulen rápidamente para formar un hidrogel cuando se mezclen.
- De forma alternativa, el experto en la materia puede manipular estos parámetros para asegurar que el hidrogel se forme lentamente o dentro de un periodo de tiempo determinado, si se desea.
- 40 También se deben considerar otros factores, como la derivatización secundaria de los polímeros, la naturaleza de las soluciones acuosas y la adición de sustancias biológicamente o no biológicamente activas. Por ejemplo, un hidrogel de la invención se puede formar rápidamente cuando el pH de la solución acuosa que comprende los componentes poliméricos mezclados es de entre aproximadamente 6 y 8.

Mediante los métodos descritos en la presente memoria y manipulando los parámetros explicados arriba, los inventores han elaborado hidrogeles de la invención que se forman un segundo o dos después de mezclar las soluciones de los componentes poliméricos. Otros hidrogeles de la invención se forman a lo largo de un periodo de minutos, o incluso horas, después de haber mezclado las dos soluciones.

5 Las soluciones del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído se pueden esterilizar antes de su uso para asegurar que su aplicación a un tejido no introduzca microorganismos en el tejido. De forma alternativa, el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído sólidos y liofilizados se pueden esterilizar y, después, disolver en soluciones acuosas esterilizadas.

10 Las soluciones se pueden esterilizar mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. Por ejemplo, mediante esterilización por radiación con rayos gamma de una fuente radioisotópica (normalmente, cobalto-60), o haz de electrones o irradiación de rayos X.

15 La exposición a la radiación puede provocar cambios químicos que pueden afectar al funcionamiento de los polímeros del quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y del dextrano derivatizado con grupo aldehído. Por ejemplo, si se oxidan los grupos amina libres, estará disponible una cantidad menor para reticularse entre los componentes poliméricos y un gel podrá tardar más en formarse. La radiación también puede disminuir el peso molecular de los componentes poliméricos. Estos factores se deberían tener en cuenta al preparar componentes de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y dextrano derivatizado con grupo aldehído previstos para formar un hidrogel en un determinado espacio de tiempo al mezclarse en una solución.

20 El hidrogel de la invención también puede contener una o más sustancias biológicamente activas y/o una o más sustancias no biológicamente activas.

25 En una forma de realización, la una o más sustancias biológicamente activas se seleccionan del grupo que comprende proteínas plasmáticas, hormonas, enzimas, antibióticos, antisépticos, antineoplásicos, antifúngicos, antivíricos, antiinflamatorios, factores de crecimiento, esteroides, suspensiones celulares, citotoxinas e inhibidores de la proliferación celular.

Las sustancias biológicamente activas añadidas a la matriz del hidrogel se liberan cuando se descompone el hidrogel. De esta forma, el hidrogel de la invención se puede utilizar para suministrar sustancias biológicamente activas a la zona afectada.

30 También se pueden añadir sustancias no biológicamente activas a la matriz del hidrogel. Por ejemplo, se pueden añadir espesantes polisacáridos, como hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, goma guar, goma garrofin, goma xantana y similares, o espesantes poliméricos, como ácidos poliacrílicos y copolímeros, poli(acrilamidas y copolímeros, alcoholes, copolímeros anhídridos maleicos y similares, para producir un hidrogel más firme.

35 También se pueden añadir espesantes polisacáridos a las soluciones acuosas de los componentes poliméricos para asegurar que las soluciones tengan una viscosidad adecuada para su aplicación. Por ejemplo, si se tiene que formar el hidrogel *in situ* en una zona afectada, como una herida o un tejido, las soluciones acuosas de los componentes poliméricos deben tener la suficiente viscosidad como para que no sean exudadas de la misma antes de que pueda darse la reticulación. Por ello, si el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y/o el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído usados en cuestión forman soluciones acuosas muy poco viscosas, se puede utilizar un espesante para aumentar la viscosidad. En otras formas de realización, las
40 soluciones acuosas de los componentes poliméricos serán lo suficiente viscosas sin añadir un espesante.

De forma similar, se pueden añadir tintes, como fluoresceína y azul de metileno a la matriz del hidrogel, de forma que se pueda comprobar la localización y la cantidad precisas del hidrogel que se ha aplicado.

45 Estos agentes adicionales se pueden añadir al hidrogel mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si el agente es una sustancia sólida, se puede mezclar con uno de los componentes poliméricos secos. Después, el material seco combinado se disuelve en la solución acuosa, que después se mezcla con la solución acuosa del segundo componente polimérico.

Si el agente que añadir es un líquido, se puede combinar directamente con una de las soluciones poliméricas acuosas y, después, liofilizar para su almacenamiento. De forma alternativa, se puede añadir directamente a la mezcla de soluciones poliméricas acuosas antes de mezclar las soluciones para formar el hidrogel de la invención.

También es posible que un agente reaccione de manera covalente con uno de los componentes poliméricos. Si existen grandes cantidades de agente y un agente reacciona con los grupos amina libres del N-succinil-qitosano, es posible que el hidrogel resultante necesite más tiempo para formarse. Sin embargo, cualquier reacción covalente entre el agente y los componentes poliméricos debe impedir que se produzca la reticulación hasta el punto de que no se pueda formar el hidrogel.

Cuando el hidrogel se degrada, el agente se hidroliza del polímero.

3 Uso de los hidrogeles de la invención

En un aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para prevenir o reducir la adherencia del tejido susceptible de formar adherencias.

10 En una forma de realización, la adherencia es una adherencia posquirúrgica.

En otro aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para reducir o detener el sangrado de una herida.

En otro aspecto, el hidrogel de la invención se utiliza para acelerar o favorecer la cicatrización.

Para los usos de la invención descritos arriba:

15 En una forma de realización, los hidrogeles de la invención se producen *in situ*. Se pueden aplicar simultáneamente soluciones acuosas del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y del polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído, por ejemplo, pulverizando, aplicando en chorro o vertiendo las soluciones sobre la zona afectada. La zona afectada puede ser una herida, particularmente una herida quirúrgica, o un tejido.

20 Los dos componentes se encuentran y se mezclan en el aire o en la superficie de la herida o tejido y reaccionan para producir una red polimérica reticulada. La formación de la red polimérica en la solución acuosa provoca la creación del hidrogel.

25 Las soluciones se pueden pulverizar, aplicar en chorro o verter sobre la zona afectada mediante cualquier elemento conocido en la técnica. Cuando se pulverizan, las soluciones acuosas se expulsan simultáneamente de recipientes separados en un conjunto de gotículas dispersas. Los recipientes pueden estar sometidos a presión. Por ejemplo, la publicación PCT WO 00/09199 describe un aparato que permite pulverizar dos fluidos polimerizables. El aparato pulveriza fluidos almacenados en cámaras separadas, de forma que los fluidos solo se mezclan en la pulverización resultante.

30 Cuando se aplican en chorro, las soluciones acuosas que contienen los polímeros se expulsan simultáneamente de recipientes separados en una corriente líquida. Por ejemplo, las soluciones acuosas se pueden aplicar en chorro a una zona afectada mediante jeringas separadas y un aplicador que permita que las soluciones se mezclen en su punta mientras se están aplicando a la zona afectada. De forma alternativa, las soluciones se pueden verter simplemente sobre la zona afectada.

Las dos soluciones poliméricas se deben aplicar simultáneamente, pero no necesariamente tienen que alcanzar la zona afectada en exactamente las mismas cantidades y al mismo tiempo, siempre y cuando tenga lugar una reticulación suficiente para formar el hidrogel.

35 Para aplicar las soluciones acuosas de los polímeros para que formen el hidrogel de la invención, se pueden utilizar los diversos dispositivos y metodologías para desarrollar una gelificación *in situ* desarrollados para otros sistemas adhesivos o sellantes.

40 En otra forma de realización, el hidrogel de la invención se utiliza mezclando primero el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo con el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído para formar la red polimérica en la solución acuosa y, después, aplicar el hidrogel que se forma a la zona que tratar. El tiempo que transcurre entre la mezcla de los polímeros y la aplicación del hidrogel depende de la velocidad a la que se forme el gel. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para aplicar el hidrogel a la zona afectada. Por ejemplo, el hidrogel se puede aplicar utilizando una jeringa de cono ancho.

45 En una forma de realización, la cantidad de hidrogel utilizada debe ser suficiente para (a) reducir o minimizar el número de adherencias en la zona del tratamiento, (b) acelerar o favorecer la cicatrización de la herida a la que se aplica o (c) reducir o detener el sangrado de la herida a la que se aplica.

Si bien los hidrogeles de la invención se pueden utilizar para reducir o minimizar las adherencias de tejidos causadas por cualquier acontecimiento causante de adherencias, estos resultan particularmente útiles para prevenir o reducir las adherencias posquirúrgicas.

5 Los hidrogeles de la invención se pueden utilizar para tratar cualquier organismo. En una forma de realización, los hidrogeles se aplican a humanos.

10 La capacidad de los hidrogeles de reducir tanto el sangrado como las adherencias hace que sean una herramienta muy valiosa para prácticamente cualquier intervención quirúrgica. Ejemplos de intervenciones quirúrgicas en los que se puede utilizar los hidrogeles de la invención incluyen, aunque no exclusivamente, intervenciones abdominales, como cirugía intestinal, intervenciones torácicas, intervenciones neuroquirúrgicas, incluida la cirugía intercraneal y la cirugía vertebral y medular, intervenciones para la descompresión nerviosa e intervenciones en el revestimiento del cerebro, intervenciones pélvicas, como quistectomía de ovario e histerectomía, cirugía de los senos paranasales, intervenciones oftálmicas, intervenciones otológicas, intervenciones del cuello y la laringe, como intervenciones en las cuerdas vocales falsas y verdaderas, intervenciones ortopédicas, como la división de adherencias en los tendones flexores y extensores, e intervenciones por quemaduras.

15 El hidrogel de la invención se adecua particularmente para su uso en la cirugía ótica, nasal y faríngea. Una deficiencia de la formación de gel en los senos paranasales es que el aclaramiento mucociliar elimina lentamente los geles de la superficie de los senos paranasales. El batido ciliar del sistema de aclaramiento mucociliar nasal actúa transportando la capa de moco que cubre el epitelio nasal hacia la nasofaringe. De esta forma, cualquier sustancia que se aplique a la superficie de los senos paranasales se expulsará de forma similar. Los hidrogeles de
20 la invención adquieren bastante firmeza poco después de su aplicación y, por ello, resisten a ser aclarados por el sistema de aclaramiento mucociliar nasal.

Una vez aplicado, el hidrogel de la invención mantiene una barrera física entre los tejidos internos para prevenir las adherencias. A medida que cicatrizan las superficies de los tejidos, el hidrogel se degrada y se elimina de la zona.

25 Los hidrogeles de la invención también se pueden aplicar a heridas dermatológicas y cutáneas, bien directamente, o bien utilizando un apósito que contenga el hidrogel.

3.1 Administración de sustancias biológicamente activas mediante los hidrogeles de la invención

30 Los hidrogeles de la invención se pueden utilizar como vehículos de liberación controlada local para sustancias biológicamente activas. Por consiguiente, el hidrogel de la invención se utiliza para administrar una o más sustancias biológicamente activas a un tejido tratando el tejido con un hidrogel de la invención, en donde el hidrogel contiene una o más sustancias biológicamente activas.

35 La administración local de la sustancia biológicamente activa puede reducir los efectos secundarios asociados a la administración sistémica convencional y asegurar que la zona afectada sea alcanzada por una cantidad efectiva a nivel terapéutico de la sustancia biológicamente activa. Por ejemplo, la red polimérica de la invención se puede utilizar para tratar la insuficiencia venosa crónica y las úlceras de las extremidades inferiores. Los factores de crecimiento proangiogénicos y epiteliales añadidos a la red polimérica pueden ayudar a la cicatrización de las úlceras. La red polimérica de la invención se puede aplicar directamente a la herida como un gel o añadir a un apósito cicatrizante para aplicarlo a la herida.

40 Las sustancias biológicamente activas que se pueden añadir a la red polimérica de la invención incluyen, aunque no exclusivamente, proteínas plasmáticas, hormonas, enzimas, antibióticos, antisépticos, antineoplásicos, antifúngicos, antivíricos, antiinflamatorios, factores de crecimiento, anestésicos, esteroides, suspensiones celulares, citotoxinas e inhibidores de la proliferación celular.

45 La sustancia biológicamente activa puede actuar junto con el polímero de la invención para contribuir a la cicatrización. Por ejemplo, se pueden añadir a la red polimérica de la invención antibióticos, como la tetraciclina, la ciprofloxacina y similares; factores de crecimiento, como los factores de crecimiento de unión a la heparina, incluidos los factores de crecimiento de fibroblastos; factores de crecimiento derivados de plaquetas, factor de crecimiento de unión a la insulina tipo 1, factor de crecimiento de unión a la insulina tipo 2, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor plaquetario 4 y factores de unión a la heparina tipo 1 y 2.

Otras sustancias biológicamente activas que se pueden utilizar incluyen, aunque no exclusivamente, antifúngicos, como nistatina, diflucan, ketaconazol y similares; antivíricos, como ganciclovir, zidovudina, amantadina, vidarabina, ribavirina, trifluridina, aciclovir, didesoxiuridina y similares; antiinflamatorios, como alfa-1 antitripsina y alfa-1 antiqumiotripsina y similares; citotoxinas o inhibidores de la proliferación celular, como 5-fluorouracilo, taxol, taxotere, actinomomicina D, doxorubicina, azaribina, bleomicina, busulfano, ácido butírico, camustina, dorambucilo, cisplatino, citarabina, dacarbazina, estrógeno, lomustina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina C, prednisolona, prednisona, procarbazona, estreptozocina, tioguanina, tiotepa, tributirina, vinblastina, vincristina, gentamicina, carboplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, mafosfamida, ácido retinoico, ricina, toxina diftérica, venenos animales y similares; hormonas, como estrógeno, testosterona, insulina y similares; esteroides, como beclometasona, betametasona, budesónida, cortisona, dexametasona, fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, mometasona, prednisona/prednisolona, triamcinolona y similares; proteínas plasmáticas, como albúmina; inmunoglobulinas, incluidas las inmunoglobulinas A, M y G; fibrinógeno; factores de la coagulación, incluidos los factores II, VIII, IX, X y XIII; plasminógeno; proteína C; proteína S; inhibidores de proteinasas de plasma, incluidos antitrombina III, α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina y el inhibidor de la C1 esterasa; α 1-glicoproteína ácida; ceruloplasmina; haptoglobina; transferrina; componentes del complemento mediante la proteína de unión C1 a C91 C4b; inhibidor de la inter-alfa tripsina; apolipoproteínas, incluidas las A-1, A-11, B, C y E; fibronectina y angiostatina.

Los hidrogeles de la invención también pueden induir suplementos nutricionales, como péptidos, proteínas carbohidratos simples, carbohidratos complejos, lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas y minerales.

La adición de la sustancia biológicamente activa a los hidrogeles permite una administración local de la sustancia. La velocidad de liberación también se puede controlar adaptando la velocidad de degradación del hidrogel.

La sustancia biológicamente activa se puede añadir al hidrogel de la invención mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, añadiendo la sustancia a una solución de componentes poliméricos antes de mezclar las soluciones. Los medios para la adición dependerán de la naturaleza de la sustancia biológicamente activa.

La concentración de la sustancia biológicamente activa que se tenga que añadir variará dependiendo de la naturaleza de la sustancia, de la zona a la que se tiene que aplicar y de las características físicas del hidrogel. La concentración debería ser suficiente para suministrar a la zona afectada una cantidad efectiva desde un punto de vista terapéutico de la sustancia biológicamente activa. En una forma de realización, la concentración de la sustancia biológicamente activa es de entre aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 1 mg/ml del hidrogel. Preferiblemente, la concentración de la sustancia biológicamente activa es de entre aproximadamente 1 μ g/ml a aproximadamente 100 μ g/ml del hidrogel. La cantidad apropiada de la sustancia biológicamente activa que añadir puede ser calculada por el experto en la materia poniendo a prueba hidrogeles que contengan varias concentraciones de sustancias biológicamente activas y seleccionando el hidrogel que sea más efectivo para el objetivo en particular.

Las propiedades físicas del hidrogel de la invención aseguran que permanecerá sustancialmente en el mismo lugar en el que se aplicó y que no será arrastrado por otros líquidos corporales ni se hundirá debido a la gravedad. El hidrogel se moldeará a sí mismo alrededor del tejido al que se haya aplicado, asegurando el contacto con toda la superficie del tejido.

4. Kits

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para usarlo en los métodos de la invención, en donde el kit comprende:

- (a) un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y
- (b) un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.

Los kits de la invención proporcionan, de manera conveniente, los componentes poliméricos que se reticular para formar el hidrogel de la invención en la solución acuosa.

En una forma de realización, los kits de la invención también comprenden una solución acuosa en la que se pueden disolver los polímeros (a) y (b) para reticularse y formar el hidrogel. De forma alternativa, los kits de la invención pueden proporcionar (a) y/o (b) previamente disueltos en una solución acuosa lista para mezclarse con el segundo componente polimérico. Las soluciones acuosas se pueden proporcionar en estado líquido o congelado.

En una forma de realización, los kits de la invención proporcionan componentes poliméricos (a) y (b) en forma de polvos liofilizados. Para utilizar los kits de la invención, los polímeros liofilizados se disuelven en una solución acuosa adecuada y, después, se mezclan. De forma alternativa, tanto (a) como (b) se pueden añadir a una solución acuosa adecuada y mezclar hasta que se disuelvan y se reticulen. En una forma de realización, la solución acuosa se selecciona del grupo que comprende agua, solución salina, amortiguador y mezclas de los mismos.

En una forma de realización, los kits de la invención también pueden comprender una o más sustancias biológicamente activas. Por ejemplo, la una o más sustancias activas se pueden añadir en uno o en los dos componentes poliméricos, (a) y (b). De forma alternativa, la una o más sustancias biológicamente activas pueden encontrarse en la solución acuosa en la que se tiene que disolver (a) y/o (b).

5. Apósitos para heridas

La invención también proporciona apósitos para heridas que pueden liberar un hidrogel de la invención cuando se humedecen. El apósito para heridas puede ser cualquier apósito adecuado conocido en la técnica. Algunos ejemplos incluyen vendas, bandas, compresas, gasas, películas, medias y cintas.

En un aspecto, el apósito para heridas contiene un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído. Preferiblemente, el quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo es un N-succinil-quitosano.

Para preparar un apósito para heridas de la invención, se mezclan el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído sólidos y secos a la estructura del apósito. De forma alternativa, el apósito para heridas se puede empapar en una solución acuosa de un polímero y secar después, introduciendo el segundo polímero en forma de almohadilla. La almohadilla puede sujetarse mediante un tercer componente, por ejemplo, un adhesivo hidrosoluble. Como otra alternativa, se pueden secar y mezclar los dos polímeros, y después colocarse entre dos muestras de un tejido muy poroso como parte de la estructura del apósito cicatrizante.

Cuando se humedece el apósito para heridas, los dos componentes poliméricos se reticulan y forman un hidrogel en el componente acuoso del apósito para heridas. El apósito para heridas se puede humedecer, bien mediante fluidos externos, o bien internos. Por ejemplo, cuando se coloca sobre la herida, el apósito para heridas se puede humedecer mediante el contacto con la sangre o el exudado de la herida. Si la herida no es lo suficientemente húmeda, el apósito para heridas se puede humedecer mediante el contacto con un líquido adecuado y aceptable fisiológicamente, como agua o una solución salina.

La velocidad a la que se forma el hidrogel se puede adaptar modificando los componentes poliméricos. Es posible que distintas aplicaciones del apósito para heridas requieran distintas velocidades de formación del hidrogel.

Aplicar presión al apósito para heridas puede contribuir a la formación del hidrogel.

El apósito para heridas puede contener sustancias adicionales, como antisépticos y otras sustancias biológicamente activas, como se ha explicado arriba. Estas sustancias se pueden añadir a los materiales del apósito mediante métodos estándares conocidos en la técnica, o se pueden añadir a las soluciones poliméricas que se mezclan en la estructura del apósito.

A continuación, se ilustran varios aspectos de la invención de manera no limitativa tomando como referencia los siguientes ejemplos.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Polímero de N-succinil-quitosano (método de la DMF)

Lote A. Se añadió anhídrido succínico (2,15 g, 0,0215 mol) al quitosano (1,5 g, 0,007 mol) en 100 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). La mezcla se calentó a 150 °C en nitrógeno durante 3 h.

ES 2 619 181 T3

Al enfriarse, se recogió el sólido de la mezcla y se lavó con metanol y luego acetona. El sólido seco se disolvió en hidróxido de sodio (400 ml, 2 M) y la solución se removió hasta el día siguiente. No se había disuelto todo el sólido. El sólido no disuelto se filtró, y la solución se evaporó hasta aproximadamente 30 a 50 ml.

5 La solución se dializó en un vaso de precipitados de 3 L mediante bolsa de diálisis durante entre 48 y 60 horas, con cambios periódicos del agua. Después, la solución se concentró y se secó por liofilización. Se obtuvo el producto N-succinil-QUITOSANO en forma de un sólido algodonoso.

10 **Lote B.** Se calentó quitosano (de plumas de calamar) (30 g) y anhídrido succínico (42 g) en DMF (500 ml) a 140 °C durante 20 h. Se recuperó el N-succinilo resultante por filtración y se lavó con etanol y, después, con dietiléter, y se secó en una bomba. Se añadió el sólido seco a la solución de hidróxido de sodio (10 g en 800 ml de agua) y se removió hasta el día siguiente. Se filtró la solución por celita y se dializó durante 3 días con cambios del agua cada 12 h. La liofilización produjo 14 g de N-succinil-QUITOSANO (analizado C 39,2 %, H 5,9 %, N 5,1 %)

15 **Lote C.** Se calentó quitosano (30 g, puro, de Aldrich, peso molecular medio) y anhídrido succínico (42 g) a 130 °C en DMF (1 L) durante 3 horas. El quitosano se hinchó, pero no se disolvió. Al enfriarse, el quitosano se filtró y se lavó con metanol en el filtro. Después, el quitosano se añadió a una solución de NaOH (50 g en 1,5 L de agua) y se mezcló con un mezclador superior de alta velocidad hasta que se volvió homogéneo (normalmente, 30 minutos). En algunas ocasiones, el quitosano no es completamente soluble, en cuyo caso cualquier gel que quede se elimina mediante filtración con celita. La solución se calentó a 50 °C durante 14 h y se dializó en tubos de celulosa durante 3 días en agua destilada (4 cambios de 50 L). Se ajustó el pH a 8,0 con un poco de hidróxido de sodio. Después, la solución se redujo en volumen a aprox. 700 mL a presión reducida en un evaporador rotatorio para obtener una
20 solución muy espesa, y después se liofilizó para obtener aprox. 35 g de producto.

N-succinil-QUITOSANO (método del metanol)

25 Se disolvió quitosano (de Aldrich, grado puro) (20 g) en ácido láctico (20 ml) y agua (650 ml) removiendo durante 3 h. Se añadió metanol (650 ml) y se calentó la mezcla a 35 °C. Se añadió anhídrido succínico (29 g) y se removió la mezcla enérgicamente durante 4 h a 35 °C. El anhídrido succínico tardó varias horas en disolverse. Se añadió una solución de hidróxido de sodio (35 g en 300 ml de agua) y, después, se removió la mezcla enérgicamente durante 1 h. La mezcla turbia parcialmente gelificada que se obtuvo se dializó durante 1 día para eliminar el metanol, después, se removió enérgicamente para descomponer el gel final restante y se dializó en agua destilada durante 3 días más (con un cambio de agua cada 12 h) y se filtró. La liofilización dio como resultado el producto (16,5 g).

Ejemplo 2

30 Dextrano derivatizado con grupo aldehído

Lote A. Se disolvió el dextrano (1 g, PM 60.000 a 90.000) en 20 ml de agua destilada. Se añadió peryodato de sodio (2 g) a la solución, que se removió durante 3 horas a temperatura ambiente. La solución se dializó en un vaso de precipitados 3 L hasta el día siguiente, con cambios periódicos del agua. Después se concentró la solución y se liofilizó para obtener el dextrano derivatizado con grupo aldehído en forma de polvo blanco.

35 **Lote B.** Se disolvió dextrano (20 g, de Aldrich, Mn 21.500, PM 142.000) en agua (200 ml) y después se añadió a una mezcla en agitación de peryodato de sodio (40 g en 200 ml). La temperatura de la reacción exotérmica se mantuvo por debajo de 35 °C mediante un enfriamiento externo y, después, se desarrolló la reacción en nitrógeno. Después de 3 h, la solución se dializó durante 3 días (con cambios del agua cada 12 h), se filtró y se liofilizó para obtener el dextrano derivatizado con grupo aldehído en forma de polvo blanco (14,7 g, detectado C 39,8 %, H 5,9 %). El peso molecular final fue de Mn 2570, PM 4700.

40 **Lote C.** Se agitó dextrano (36 g, de Aldrich, grado alimenticio, pm 80.000) enérgicamente en agua (800 mL) mientras se añadía peryodato de sodio sólido (50 g). Se controló la reacción exotérmica mediante un enfriamiento externo, de forma que la temperatura se mantuvo por debajo de 30 °C. Después de 2 h, se filtró la solución y se dializó en tubos de celulosa durante 3 días (4 cambios de 50 L de agua destilada). Se ajustó el pH a 8,0 con un poco de hidróxido de sodio, y después se redujo la solución en volumen a presión reducida a aprox. 300 mL y se liofilizó. El rendimiento fue de aprox. 30 g.

Ejemplo 3

Red polimérica que comprende N-succinil-quitosano reticulado con un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído en una solución acuosa

5 Se disolvió el N-succinil-quitosano del Ejemplo 1 (30 mg) en 0,6 ml de agua destilada para elaborar una solución acuosa de 5 % p/v (Solución A). Se disolvió el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído (30 mg) en 0,6 ml de agua destilada para elaborar una solución acuosa de 5 % p/v (Solución B).

Se mezclaron la Solución A y la Solución B hasta que se formó un hidrogel (aproximadamente 2 minutos). El hidrogel es la red polimérica que comprende N-succinil-quitosano reticulado con un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído en una solución acuosa.

Ejemplo 4**10 Efecto del tratamiento con base a niveles de grupos funcionales del N-succinil-quitosano y tiempo de gelificación del hidrogel**

15 Se preparó el N-succinil-quitosano según el Ejemplo 1 (método de la DMF, Lote C), pero la solución de quitosano y NaOH se calentó durante 14 horas a las temperaturas mostradas en la Tabla 1 más abajo. La Tabla 1 muestra que las temperaturas más altas provocan una desacilación mayor y, por ello, una mayor proporción de grupos amina libres. Las propiedades relativas de los grupos amina libres frente a grupos acetilo y N-succinilo fueron determinadas por ¹H-rmn.

Los hidrogeles preparados mediante la reticulación del N-succinil-quitosano y el dextrano derivatizado con grupo aldehído según el Ejemplo 3 se formaron más rápidamente en los casos en los que el N-succinil-quitosano tenía una proporción mayor de grupos amina.

20 Tabla 1 - Efecto del tratamiento con base a niveles de grupos funcionales del N-succinil-quitosano y tiempo de formación del gel para el hidrogel

T. ^a	% mol grupos acetilo	% mol grupos succinicos	% mol grupos amina libres	Tiempo de gelificación (s)
sin tratamiento con base	16	93	0	-
35 °C	15	91	resto	-
55 °C	11	81	12	35
65 °C	5	75	22	5

Ejemplo 5**Efecto del % mol de peryodato en la derivatización con grupo aldehído del dextrano y en el tiempo de formación del gel para el hidrogel**

25 Se prepararon dextranos derivatizados con grupo aldehído según el Ejemplo 2, pero se utilizaron distintos % mol del peryodato. Las reacciones tuvieron lugar a temperatura ambiente durante 2 horas. La Tabla 2 muestra el peso molecular del dextrano derivatizado con grupo aldehído resultante, el % mol de los grupos aldehídos y el tiempo transcurrido para formar un hidrogel cuando se mezcla una solución del dextrano derivatizado con grupo aldehído con una solución de N-succinil-quitosano.

30

Tabla 2

% mol de peryodato (2 h, ta)	PM dextrano (Mn)	% mol grupos aldehídos	Tiempo de gelificación (s)
0	95.500	0	-
26	20.270	32	220
52	14.059	75	70
78	10.010.	118	45
105	3700	165	35

El % mol máximo teórico de los grupos aldehídos presentes por residuo de quitosano es 200, que se conseguiría si cada mol de peryodato reaccionara con un residuo de quitosano. Un % mol de 200 representa un 100 % de oxidación (o un 100 % de derivatización con grupo aldehído).

5 Ejemplo 6

Efecto del hidrogel en las adherencias después de la cirugía endoscópica nasosinusal en ovejas

Se realizaron heridas profundas estandarizadas en la mucosa de 20 ovejas (merinas cruzadas y castradas) mediante un protocolo consolidado de cicatrización de una herida producida por cirugía endoscópica endonasal. En cada oveja se realizaron dos lesiones en la pared nasal lateral y una lesión etmoidal a cada lado. Las regiones lesionadas se distribuyeron al azar en 4 grupos de tratamiento y se trataron con uno de (a) un control (ningún tratamiento), (b) SprayGel™, (c) factor tisular recombinante y (d) el hidrogel de la invención.

Para los grupos (b), (c) y (d) se pulverizaron 5 ml de sustancia activa sobre la superficie de la herida mediante un dispositivo de atomización para la mucosa. El SprayGel™ y el hidrogel de la invención se pulverizaron respectivamente como dos componentes líquidos separados que se combinan al instante en el pulverizador para formar un gel mucoadhesivo.

Se evaluaron las ovejas en los días 28, 56, 84 y 112. En cada revisión, se sedaron las ovejas moderadamente mediante una inyección intramuscular de 4 mg de xilacina. Se inspeccionó la cavidad nasal en cada una de estas 4 visitas semanales señalando la presencia de adherencias, registrando su localización y asignando un grado a cada adherencia mediante un observador independiente (auxiliar de laboratorio de investigación con animales) según un sistema de clasificación publicado anteriormente (Tabla 3).

Tabla 3 - Sistema de clasificación de las adherencias nasales de las ovejas

Grado 1	Menos de un 25 % de la altura del cornete nasal medio
Grado 2	Entre un 25 y un 50 % de la altura del cornete nasal medio
Grado 3	Más del 50 % del tamaño del cornete nasal medio

Se recogieron células ciliadas por cepillado de cuatro regiones en cada oveja por visión endoscópica en un punto distante de la biopsia mediante un cepillo recogedor de células cytobrush plus (Medscand Medical, Suecia) sin anestesia local. Se organizaron y se registraron cuidadosamente puntos de cepillado durante el periodo de 16 semanas para tomar como muestra zonas intactas.

Se aplicaron cuatro pulverizaciones de una combinación de pulverización anestésica y descongestionante (Co-Phenylcaine - ENT technologies, Nueva Zelanda) a cada cavidad nasal antes de la biopsia de los puntos de lesión de la pared nasal lateral. Se hizo una incisión y se levantó un pequeño colgajo utilizando un elevador de Freer afilado, y se tomaron dos muestras de biopsia de cada punto de lesión mediante pinzas de biopsia. Se tomaron 30 biopsias en cada intervalo de cuatro semanas organizando y registrando cuidadosamente los puntos de la biopsia

durante el periodo de 16 semanas para tomar como muestra zonas intactas. Después de la biopsia final, se sacrificaron los animales por inyección intravenosa de pentobarbital de sodio (>100 mg/kg).

5 Las muestras para microscopía óptica se fijaron en fomal durante 4 horas y después se colocaron en etanol al 70 % y se procesaron. Las muestras se introdujeron en bloques de parafina, se cortaron a un espesor de 4 µm y se colocaron de seis a ocho secciones en 2 portaobjetos de vidrio para cada muestra de biopsia. Después, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Se examinó cada muestra por microscopía óptica utilizando un software de captura de imágenes (Image Master Pro). Se calculó el porcentaje de reepitelización midiendo la longitud del área de la superficie de la mucosa nasal con lámina propia y la longitud de esta superficie que tenía una cubierta epitelial. Se midieron cuatro secciones al azar por cada muestra de biopsia. También se midió la altura epitelial mediante estas mismas imágenes digitales. Se midieron cuatro áreas de epitelio al azar de una sección por cada muestra utilizando como marcadores la membrana basal y la superficie apical del epitelio.

15 Las muestras para la microscopía electrónica de barrido (SEM) se introdujeron en una solución salina amortiguada con fosfato y, después, se lavaron durante 20 minutos mediante un aparato de limpieza por ultrasonidos para eliminar coágulos de sangre, moco, residuos y biopelícula. Después, las muestras se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4 %/glutaraldehído al 1,25 % en solución salina amortiguada con fosfato + sacarosa al 4 %, con un pH de 7,2, y se almacenaron a 4 °C hasta que se procesaron. El procesado comprendió una deshidratación progresiva de la muestra mediante tetraóxido de osmio, seguida de concentraciones en aumento de etanol (70 %, 90 %, 95 %, 100 % y 100 %) utilizando tecnología de microondas (PELCO BioWave®) para un procesado más rápido. Después, las muestras se secaron con un secador por punto crítico de dióxido de carbono y, después, se montaron en un portamuestras para microscopía electrónica. Por último, las muestras se recubrieron de oro y de carbono. Se examinó cada muestra por SEM (microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Phillips XL30) y se tomaron cuatro imágenes de la superficie a un aumento de 500x. Se asignó un grado a las muestras según un sistema de clasificación publicado anteriormente. Cuando se necesitó hacer aclaraciones, las muestras también se examinaron a un aumento mayor, de 2000x y 5000x. Se utilizaron cuatro imágenes por muestra (a un aumento del 500x) para calcular el porcentaje del área de la superficie cubierta por los cilios mediante un software de análisis de imagen y una técnica homologada anteriormente. (Macintosh D, Cowin A, Adams D, Wormald P J, Am. J. Rhinol. 2005, 19(6), 557-81).

30 Se suspendieron las células del cepillado en 1 ml de un medio de cultivo Dulbecco y se agitaron para liberar las células en el medio de cultivo. Este se mantuvo a 36,5 °C hasta que se realizó un análisis de la FBC. Se colocaron veinte µl de cada muestra en un portaobjetos de microscopio calentado a 36,5 °C y se utilizó un microscopio de contraste de fase. Se analizaron individualmente diez células por muestra y se tomó su media como la FBC.

35 El bienestar de las ovejas que participaron en el estudio fue supervisado por personal veterinario de un animalario con experiencia en la manipulación de ovejas. Se supervisaron las ovejas cuatro veces al día durante 2 días después de la aplicación de las sustancias, midiendo su temperatura, frecuencia cardíaca, movilidad e ingesta oral. Después de ello, se supervisaron dos veces al día durante el resto del estudio, midiendo su movilidad y su ingesta oral.

Análisis estadístico

40 Se desarrolló un análisis de la varianza de dos factores junto con una corrección de Bonferroni como pruebas posteriores para analizar la altura epitelial, la reepitelización, la reciliación, el grado ciliar y el porcentaje y el grado de la adherencia de la pared nasal lateral. Se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para analizar los pares emparejados de los índices de adherencia etmoidal. La significación estadística se fijó en $p < 0.05$.

Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 5.

Resultados

45 En la Figura 1 se muestra el porcentaje de ovejas de cada grupo que presentó adherencias en la pared nasal lateral a lo largo del tiempo. Con los métodos empleados de realizar heridas profundas, el grupo de control mostró un índice de adherencia del 15 %, el grupo del factor tisular presentó un índice de adherencia del 25 %, mientras que el grupo del SprayGel™ mostró un índice del 10 %. El grupo del hidrogel mostró un índice de adherencia del 10 %, sin embargo, este se redujo al 5 % en el día 56 y se mantuvo a este nivel a lo largo del estudio. El grupo del hidrogel mostró un porcentaje significativamente más bajo de adherencias que el grupo del factor tisular en los días 50 56, 84 y 112 (5 % frente a 25 %, $p < 0.05$).

El grado medio de adherencia tendió a ser menos severo en el grupo del SprayGel™, e incluso menos severo en el grupo del hidrogel, sin embargo, estas diferencias no resultaron ser significativas (Figura 2).

5 En la Figura 3 se muestran los índices de adherencia etmoidal para cada grupo a lo largo del tiempo. Con el método descrito arriba, se estableció un índice de formación de adherencia etmoidal del 40 % en los grupos de control. Este aumentó al 50 % en el grupo del factor tisular. El grupo del SprayGel™ mostró un índice de adherencia más bajo, del 14 %, sin embargo, el grupo del hidrogel no experimentó adherencias etmoidales. A pesar de las pequeñas cifras en el estudio de estos pares emparejados, el grupo del hidrogel experimentó una cantidad de adherencias significativamente menor que el grupo del factor tisular (0 % frente al 50 %, $p < 0.05$), véase Figura 4.

10 Al analizar la altura epitelial a lo largo del tiempo con microscopía óptica no se observó ninguna diferencia significativa entre los cuatro grupos (Figura 5).

15 En la Figura 6 se puede observar el porcentaje de mucosa de cada grupo que se había reepitelizado. El grupo del hidrogel mostró un porcentaje de reepitelización significativamente mayor en el día 28, comparado con el grupo del factor tisular (70 % frente al 33 %, $p < 0.001$). Además, el grupo del SprayGel™ mostró una reepitelización significativamente mayor en el día 84 que el grupo del factor tisular (89 % frente a 61 %, $p < 0.05$).

20 La Figura 7 muestra el porcentaje de la superficie reciliada (media \pm desviación estándar) de los cuatro grupos. En el día 28, el grupo del hidrogel estaba significativamente más ciliado que el control (62 % frente al 31 %, $p < 0,01$) y que el grupo del factor tisular (62 % frente al 23 %, $p < 0,001$), mientras que el grupo del SprayGel™ también mostraba una superficie significativamente más ciliada que el factor tisular (47 % frente al 23 %, $p < 0,05$). En el día 56, el grupo del hidrogel se mantuvo significativamente más ciliado que el grupo del factor tisular (67 % frente al 40 %, $p < 0.05$). En general, el grupo del hidrogel tendió a una reciliación mejorada, si bien esta no fue significativa en todo momento.

25 En cada momento resultaron inutilizables una media de entre 1 y 2 muestras por grupo y se les asignó un grado de 5. La Tabla 4, a continuación, muestra el sistema de clasificación de las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los cilios nasales de las ovejas.

Tabla 4 - Sistema de clasificación para imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los cilios nasales de las ovejas

Grado Aspecto en la SEM

I	Cilios normales con orientación normal
30 II	Epitelio ciliado pero desorientado
III	Bases ciliares, cilios en regeneración
IV	Cilios no identificables
V	Inutilizable (epitelio cubierto de costra o coágulos)

35 El ANOVA de dos factores no reveló ninguna diferencia significativa entre los números de muestras inutilizables de cada grupo en cada momento. Por ello, estas se excluyeron del análisis posterior (datos no mostrados). La Figura 8 muestra el grado medio \pm SD (desviación estándar) ciliar de cada grupo en cada momento. En el día 84, el grado medio ciliar del SprayGel™ era significativamente mejor que el del factor tisular (1,8 frente a 2,6, $p < 0.05$), y en el día 112, el grado medio del hidrogel era significativamente mejor que el del control (1,9 frente a 2,7, $p < 0.05$).

40 La FBC no se mostró significativamente distinta entre ninguno de los cuatro grupos a lo largo del tiempo (Figura 9). El grupo del hidrogel tendió a una función ciliar mejorada en todo momento, sin embargo, esta no resultó ser significativa.

Cabe destacar que ninguna de las ovejas experimentó acontecimientos adversos durante este estudio. No se registró ninguna detección de fiebre, taquicardia, movilidad reducida o ingesta oral escasa durante el periodo del estudio.

Comentario

Tanto el SprayGel™ como el hidrogel de la invención mostraron propiedades preventivas de las adherencias. Particularmente, el hidrogel mostró una formación de adherencias significativamente reducida tanto en la pared nasal lateral como en el etmoide anterior en comparación con el factor tisular.

- 5 En cuanto a la cicatrización, los resultados mostraron un patrón similar tanto con el hidrogel como con el SprayGel™, mostrando índices mejorados de repitelización, reciliación y grado ciliar en comparación con el control y, especialmente, en comparación con el factor tisular. La característica más llamativa de la cicatrización fue la rápida recuperación del epitelio de los grupos del hidrogel, reflejada en la repitelización significativamente mayor y en el porcentaje de la superficie que estaba reciliada en el día 28. Al principio de este estudio, los grados ciliares de los cuatro grupos no eran significativamente distintos. Sin embargo, en la última parte del estudio, el grupo del hidrogel mostró un grado de cilios significativamente mejorado en comparación con el factor tisular y el control.

Ejemplo 7 Ensayo con humanos

- 15 Se realizó un ensayo piloto comparativo aleatorizado prospectivo. Se distribuyeron al azar seis pacientes sometidos a una cirugía endoscópica nasosinusal completa para recibir 20 ml de hidrogel mientras que el lado opuesto no recibió ningún tratamiento. Se aplicó la solución por visión endoscópica en forma de pulverización cuando se finalizó la operación en ambos lados. Se documentó el sangrado mediante una videoendoscopia estandarizada y se le asignó un grado cada 2 minutos hasta un máximo de 10 minutos en base a 2 escalas homologadas anteriormente.

Resultados

- 20 El hidrogel mostró una mejora clínica significativa en el campo quirúrgico en los minutos 4, 6, 8 y 10 después de la aplicación (véase Tabla 5 y Figuras 10 y 11).

Tabla 5 - Puntuaciones del sangrado de los lados que recibieron placebo frente a los que recibieron el principio activo en 6 pacientes mediante escalas de sangrado del campo quirúrgico

Tiempo (min.)	Escala de sangrado de Boezaar			Escala de sangrado de Wombald		
	Placebo	Activo	Valor P	Placebo	Activo	Valor P
Situación inicial	2,33	2,17	0,71	4,17	4	0,71
2	1,83	0,83	0,096	3,67	1,17	0,093
4	1,83	0,67	*0,037	3,5	1	0,058
6	1,83	0,33	*0,041	3,17	0,67	0,041
8	1,67	0,33	*0,039	2,67	0,5	0,039
10	1,67	0,33	*0,039	2,5	0,5	0,041

- 25 Además, el cirujano consideró que el hidrogel de la invención era más efectivo que el placebo en 5 de los 6 casos, con un caso que se consideró como no distinto. Otros parámetros de los que se conoce que afectan a la hemostasia, como la presión arterial media, la frecuencia cardíaca y el CO₂ espirado, no fueron significativamente distintos entre los lados que recibieron placebo y el principio activo.

Ejemplo 8

Efecto del hidrogel en la hemostasia después de la cirugía endoscópica nasosinusal en ovejas

- 30 En este estudio participaron veintiuna ovejas (merinas cruzadas y castradas) infestadas con la mosca del carnero nasal *Oestrus ovis*. Se confirmó visualmente la infestación nasal mediante endoscopia nasal y se documentó la

5 sinusitis eosinofílica con torundas nasales teñidas con tinte Leishman. Se indujo una anestesia general mediante una inyección de tiopental de sodio (19 mg/kg de peso corporal) en la vena yugular. Después, siguió una intubación endotraqueal con mantenimiento de la anestesia por inhalación de halotano al 1,5-2,0 %. Se retiró el comete nasal
 10 medio antes de realizar una lesión estandarizada en la mucosa entre el complejo etmoidal anterior y las paredes de la cavidad nasal utilizando un microdesbridador (Medtronic ENT, Jacksonville, Florida, EE. UU). La duración de la realización de las heridas a cada lado se midió durante un periodo de 30 segundos mediante un cronómetro. Inmediatamente después de la lesión en la mucosa se determinó un grado del campo quirúrgico de referencia mediante un observador independiente utilizando el sistema de clasificación del campo quirúrgico de Boezaart (Boezaart AP, Van Der Merne J, Coetzee A, Comparison on sodium nitroprusside and esmolol induced controlled hypertension for functional endoscopic sinus surgery, Can J Anaesth 1995, 42, página 373-376) (Tabla 6).

Tabla 6 - Escala de clasificación del campo quirúrgico de Boezaart

Grado	Evaluación
0	Sin sangrado (condiciones cadavéricas)
1	Sangrado mínimo - no requiere succión
2	Sangrado mínimo - requiere succión ocasional
3	Sangrado mínimo - requiere succión frecuente El sangrado cubre el campo quirúrgico unos segundos después de retirar la succión
4	Sangrado moderado - requiere succión frecuente y el sangrado cubre el campo quirúrgico inmediatamente después de que se retire la succión
5	Sangrado severo - requiere succión frecuente El sangrado aparece más rápido de lo que se puede eliminar por succión Campo quirúrgico cubierto de forma severa y normalmente ausencia de posibilidad de cirugía

15 Cada una de las cavidades nasales se distribuyó al azar por ordenador para recibir, o bien ningún tratamiento (control), o 5 ml del hidrogel de la invención aplicado a la región etmoidal inmediatamente después de calcular un grado del campo quirúrgico de referencia. El hidrogel de la invención se tiñó con fluoresceína para ayudar en la visualización. Se calculó un grado del campo quirúrgico para cada lado cada dos minutos después de determinar el grado del valor de referencia hasta que cesó el sangrado o hasta un máximo de diez minutos de observación.

20 Se extubaron las ovejas y se devolvieron a sus compartimentos individuales. Se supervisaron las ovejas tres veces al día, midiendo variables como la ingesta de alimentos, la secreción nasal y la temperatura. Operarios cuidadores de animales formados documentaron la secreción nasal manchada de sangre persistente durante las 2 semanas después de la operación. Se sedaron las ovejas y se realizó una videoendoscopia para documentar la presencia de costras/gel en el punto de la herida todos los días después de la operación. Después, se le asignó un grado en una escala de 3 grados de puntuación del 0 al 2 (Tabla 7). La observación diaria continuó durante un periodo de 14 días después de la operación.

Tabla 7- Disolución de la costra/del gel en el complejo etmoidal

Grado	Evaluación
0	Sin presencia de costra/gel entre las superficies etmoidales
1	Menos del 50 % del área de la superficie del complejo etmoidal cubierta por costra/gel
2	Más del 50 % del área de la superficie del complejo etmoidal cubierta por costra/gel

Resultados

5 Se analizaron las puntuaciones del grado del campo quirúrgico mediante GraphPad Prism y SPSS 11.0. Puesto que los datos no estaban distribuidos normalmente, se utilizaron pruebas emparejadas para datos no paramétricos utilizando los rangos con signo de Wilcoxon para analizar la diferencia en el grado quirúrgico entre los lados. Se aplicó la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples a todos los análisis del grado quirúrgico, y la significación estadística se fijó en $p < 0.05$. Se utilizó la prueba T de Student para comparar medias de tiempo hasta completar la hemostasia.

10 **Comparación de la hemostasia con el control frente a la hemostasia con el hidrogel de la invención a lo largo del tiempo**

15 En esta parte del estudio participaron veintiuna ovejas (merinas cruzadas y castradas). No hubo diferencias significativas en los tiempos de sangrado de referencia entre el control y el hidrogel ($2,4 \pm 0,67$ frente a $2,4 \pm 0,74$). El lado del hidrogel resultó ser significativamente más hemostático en los minutos 2, 4 y 6 después de la aplicación. Las puntuaciones medias de los grados y los intervalos al 95 % de confianza con el control frente al hidrogel a los 2 minutos eran de $1,6 (\pm 0,92)$ frente a $0,9 (\pm 0,53)$, a los 4 minutos eran de $1,0 (\pm 0,66)$ frente a $0,24 (\pm 0,43)$ y a los 6 minutos eran de $0,4 (\pm 0,59)$ frente a $0,048 (\pm 0,21)$ ($p < 0.05$) (Figura 12).

Tiempo hasta la compleción de la hemostasia

20 Todos los lados del hidrogel habían completado la hemostasia a los 6 minutos. El tiempo medio hasta la hemostasia resultó ser significativamente mejor para el lado del hidrogel a $4,09 (\pm 1,61)$ frente a $6,57 (\pm 2,20)$ para los lados de control ($p = 0,049$) (Figura 13). Se detectó un sangrado persistente en el lado de control en 3 lados a los 8 minutos y en 1 lado a los 10 minutos. Esto se compara con ningún sangrado más pasados 6 minutos en el lado del hidrogel.

25 Una oveja murió en el 5.º día después de la operación. Se descubrió en la autopsia que se debió a una aspiración del contenido gástrico. No existían pruebas de un sangrado en esta oveja. En el resto de ovejas, no hubo secreción nasal manchada de sangre persistente pasado el primer día después de la operación ni se detectó que ninguna oveja tuviera un sangrado excesivo persistente que requiriese una intervención.

Puntuaciones de la disolución de la costra/del hidrogel

30 En esta parte del estudio participaron veinte ovejas. No hubo diferencias significativas entre la media de la costra en el lado de control y las puntuaciones de la disolución del hidrogel en los días 1, 3, 7 y 14 después de la operación. Las puntuaciones medias de la disolución de la costra/del hidrogel y los intervalos al 95 % de confianza con el control frente al hidrogel en el día 1 eran de $2,0 (\pm 0,00)$ frente a $1,9 (\pm 0,31)$, en el día 3 eran de $1,6 (\pm 0,60)$ frente a $1,65 (\pm 0,59)$, en el día 7 eran de $0,47 (\pm 0,61)$ frente a $0,53 (\pm 0,70)$ y en el día 14 eran de $0,00 (\pm 0,00)$ frente a $0,53 (\pm 0,22)$ (Figura 14).

Conclusión

35 En el modelo de oveja con sinusitis crónica, el hidrogel de la invención mejora significativamente la hemostasia en comparación con el control en los minutos 2, 4 y 6 después de la lesión en la mucosa. También muestra unas características de disolución de la costra similares en comparación con el control. Al combinar los efectos positivos en la cicatrización conocidos con sus efectos hemostáticos significativos, el hidrogel de la invención muestra un

gran potencial como apósito posoperatorio para heridas para después de la CENS en pacientes que se van a someter a una CENS.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

5 La invención proporciona un hidrogel biodegradable con base de agua que se puede aplicar a heridas para contribuir a la cicatrización y prevención de adherencias. Los hidrogeles también tienen un efecto positivo en la hemostasia y se pueden aplicar a vendas y apósitos de campo para ayudar a detener el sangrado en heridas traumáticas hemorrágicas y después de la cirugía.

Los hidrogeles de la invención son adecuados para su aplicación durante intervenciones quirúrgicas. Su uso puede mejorar el resultado de los pacientes que se sometan a cirugía.

10 Los hidrogeles de la invención pueden ser preparados fácilmente por personal sin formación médica y se pueden utilizar en situaciones de emergencia para prevenir una pérdida excesiva de sangre en una víctima hasta que la víctima pueda ser transportada a un centro médico.

REVINDICACIONES

1. Red polimérica que comprende un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo reticulado a un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.
- 5 2. Red polimérica según la reivindicación 1, en donde el polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo se reticula al polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído mediante el grupo amina del polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y el polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.
3. Red polimérica según la reivindicación 1 en forma de hidrogel.
- 10 4. Red polimérica según las reivindicaciones 2 a 3, en donde la composición comprende entre aproximadamente un 2 % y un 10 % p/v de un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y entre aproximadamente un 2 % y un 10 % p/v de un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.
5. Red polimérica según las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polímero derivatizado con grupo dicarboxilo es N-succinil-quitosano.
6. El hidrogel de la reivindicación 3, que comprende además una o más sustancias activas biológicamente.
- 15 7. El hidrogel de la reivindicación 6, en donde la una o más sustancias biológicamente activas se seleccionan del grupo que comprende proteínas plasmáticas, hormonas, enzimas, antibióticos, antisépticos, antineoplásicos, antifúngicos, antivíricos, antiinflamatorios, factores de crecimiento, esteroides, suspensiones celulares, citotoxinas e inhibidores de la proliferación celular.
- 20 8. El hidrogel de la reivindicación 3 para usar en la prevención o reducción de adherencias de los tejidos susceptibles de formar adherencias, para acelerar o favorecer la cicatrización o para detener el sangrado de una herida.
9. El hidrogel de la reivindicación 3 para usar en la cirugía ótica, nasal y faríngea.
10. Kit que comprende
 - (a) un polímero de quitosano derivatizado con grupo dicarboxilo y
 - (b) un polímero de dextrano derivatizado con grupo aldehído.
- 25 11. Kit según la reivindicación 10, en donde uno o los dos de (a) y (b) se proporcionan en soluciones acuosas separadas.
12. Kit según la reivindicación 10, que comprende además una o más sustancias biológicamente activas.
13. Kit según la reivindicación 10 para usar en la cirugía ótica, nasal y faríngea.
14. El hidrogel de la reivindicación 3 para usar en la cirugía de la cavidad nasal o de los senos paranasales.
- 30 15. Kit según la reivindicación 10 para usar en la cirugía de la cavidad nasal o de los senos paranasales.

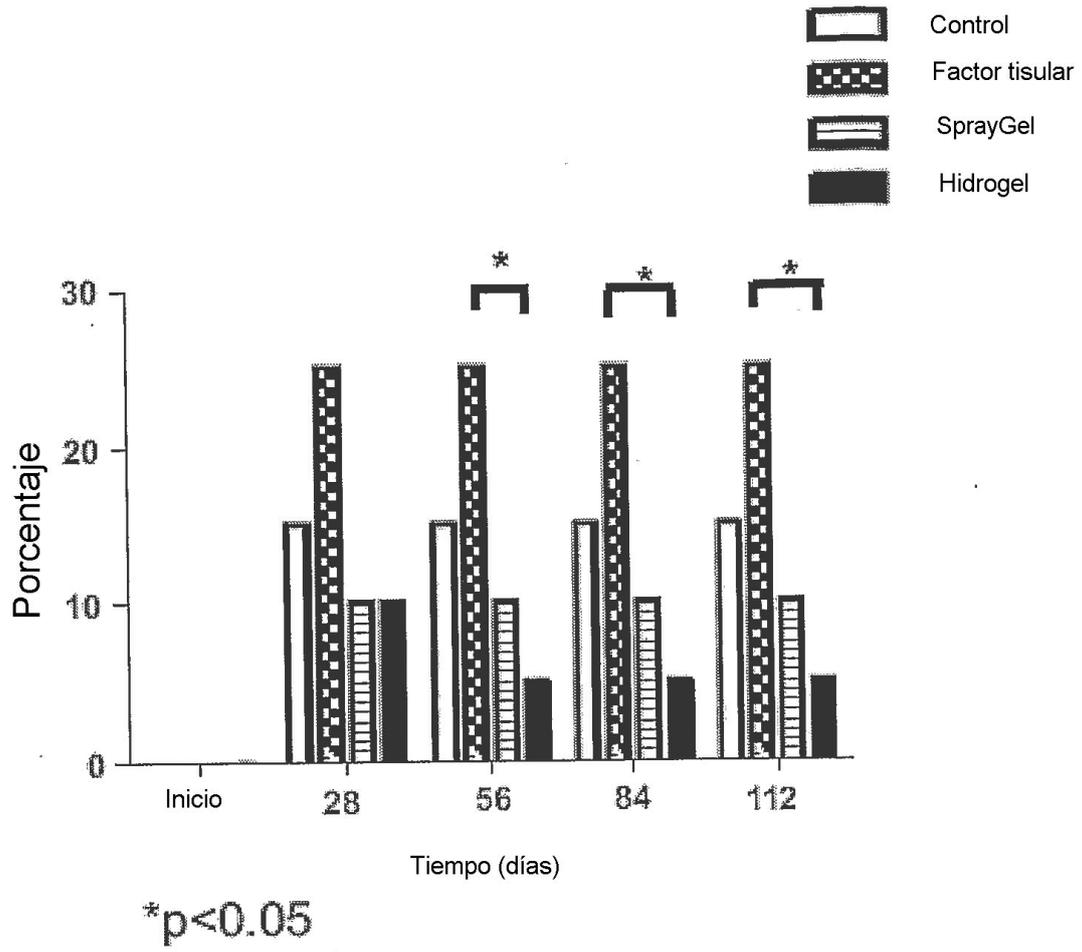


FIGURA 1

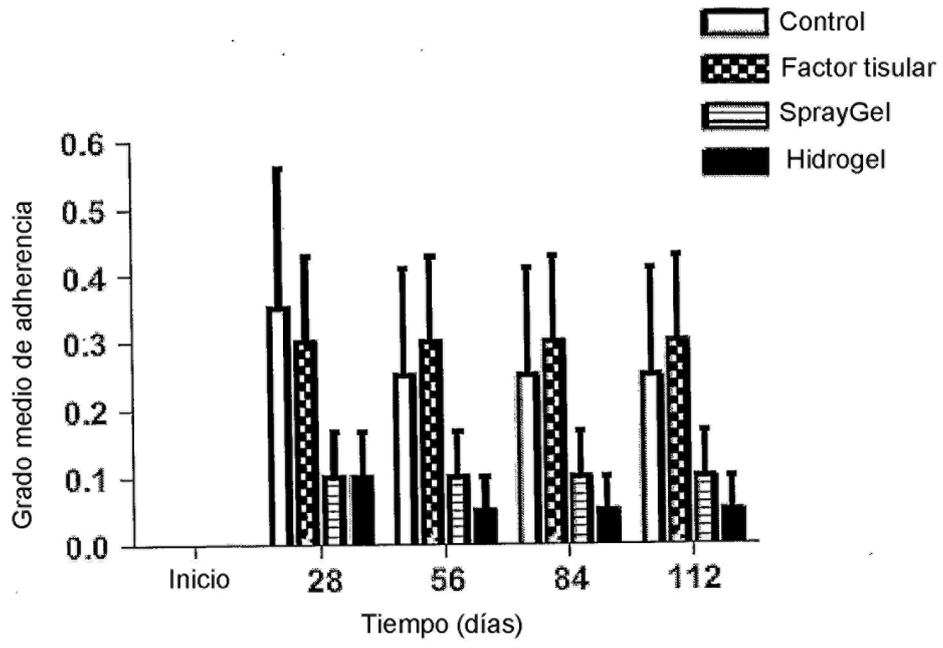
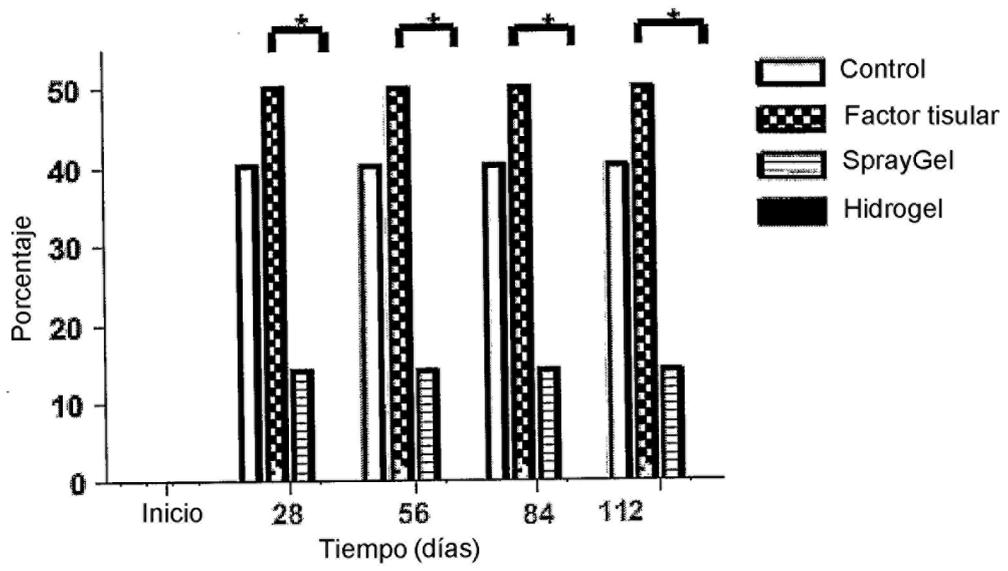


FIGURA 2



*p<0.05

FIGURA 3

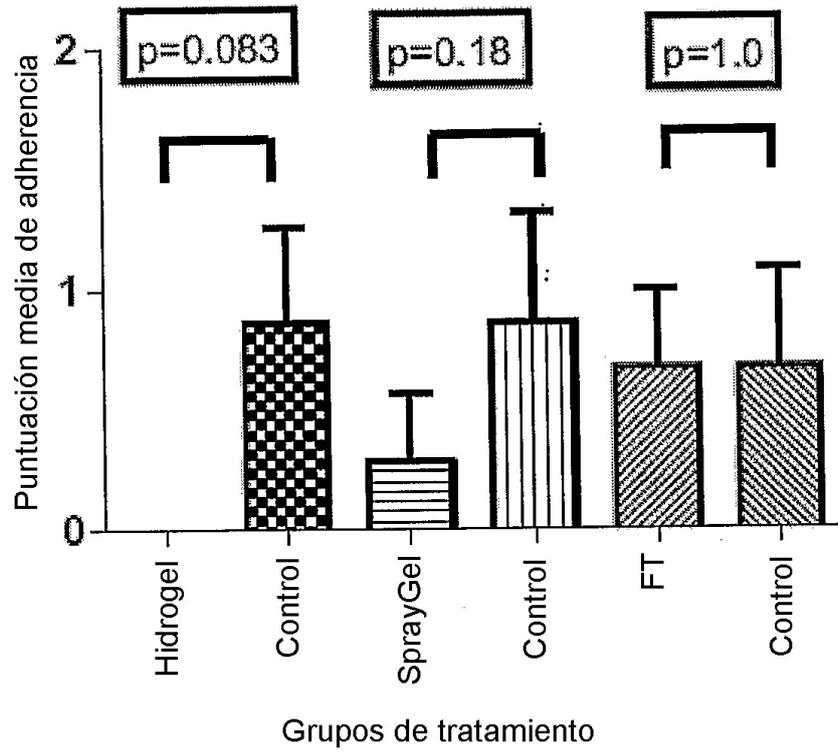


FIGURA 4

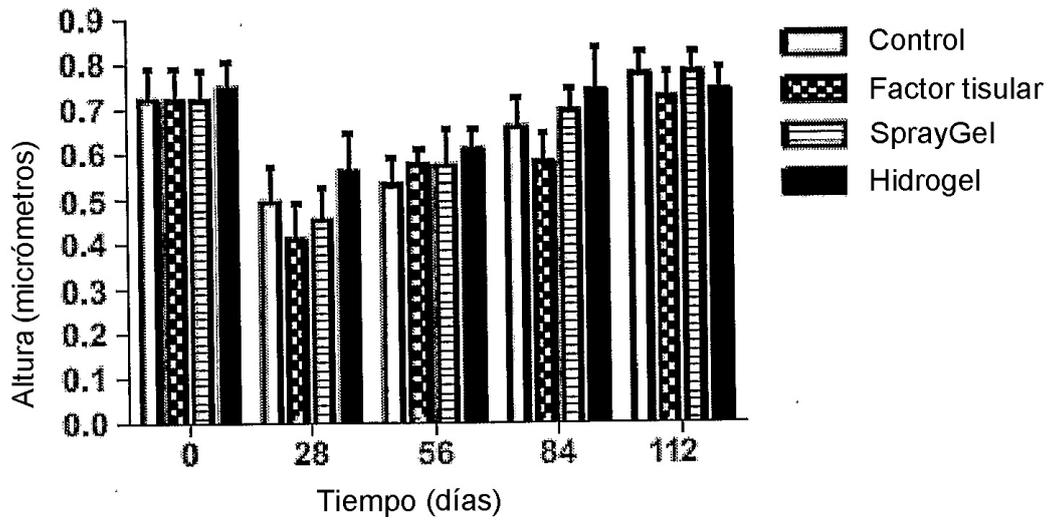
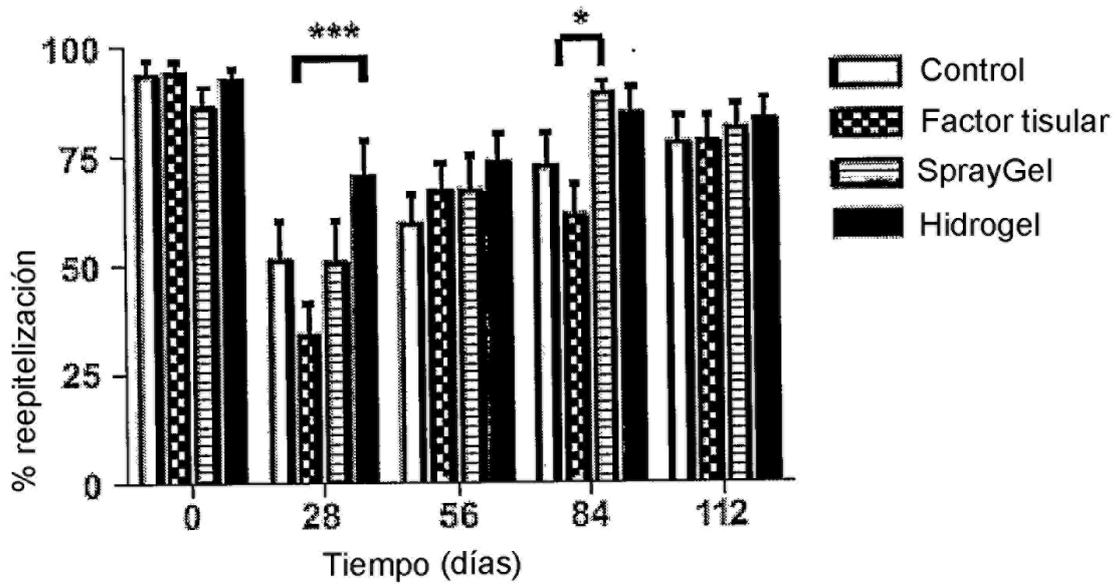
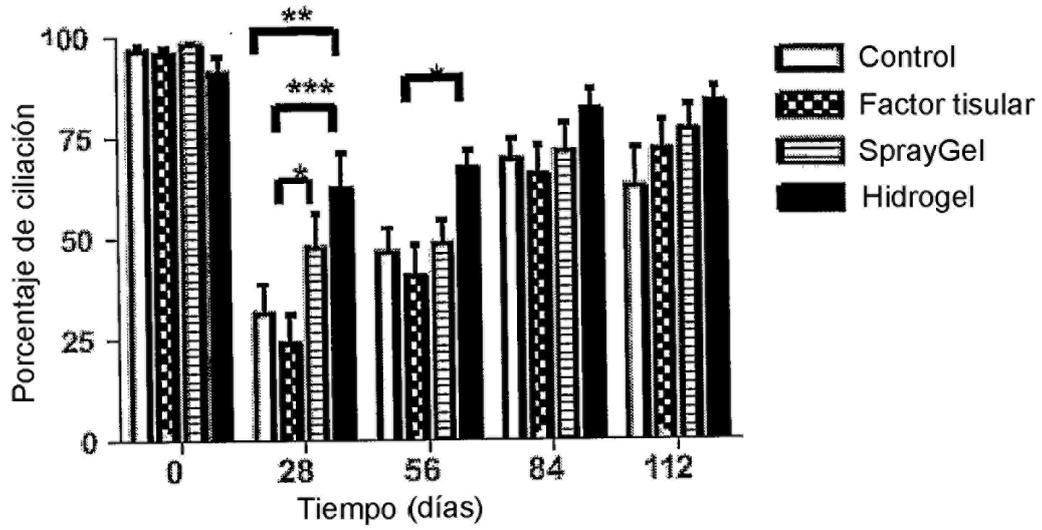


FIGURA 5



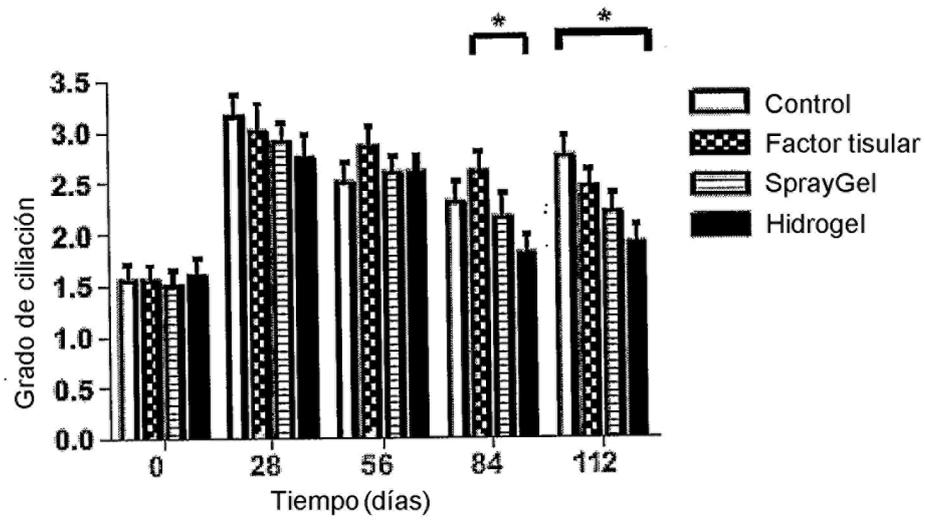
*p<0.05
 ***p<0.001

FIGURA 6



*p<0.05
 **p<0.01
 ***p<0.001

FIGURA 7



*p<0.05

FIGURA 8

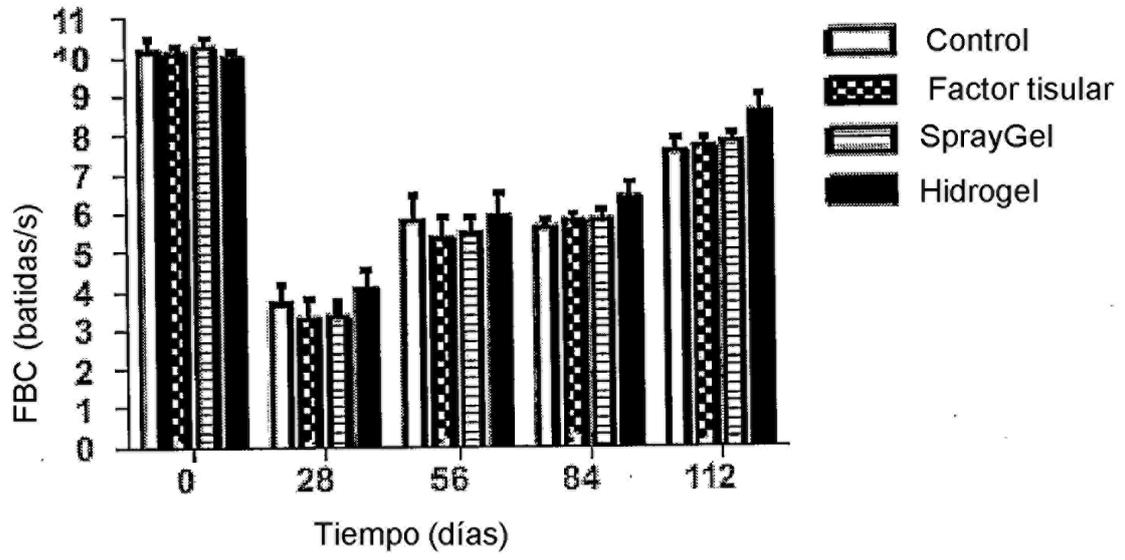


FIGURA 9

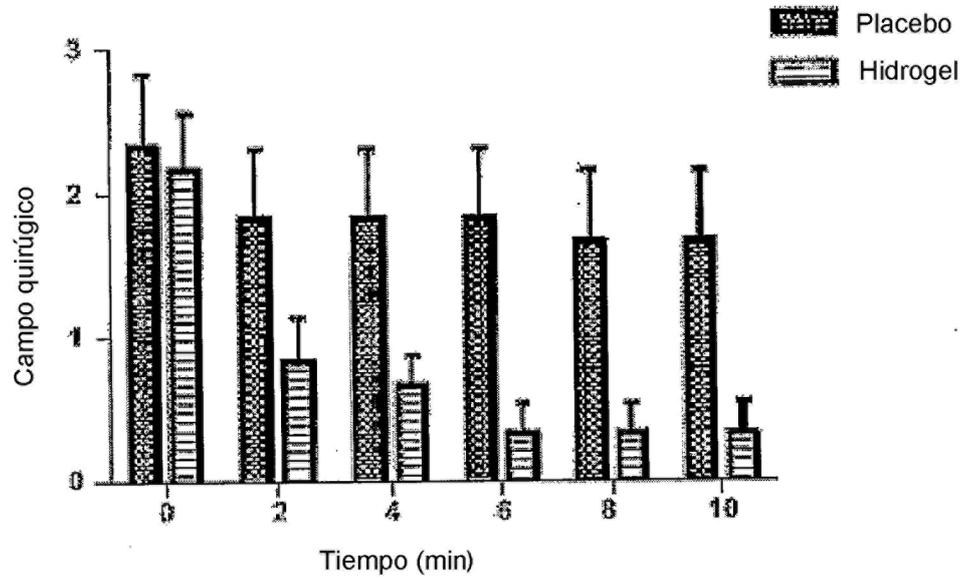


FIGURA 10

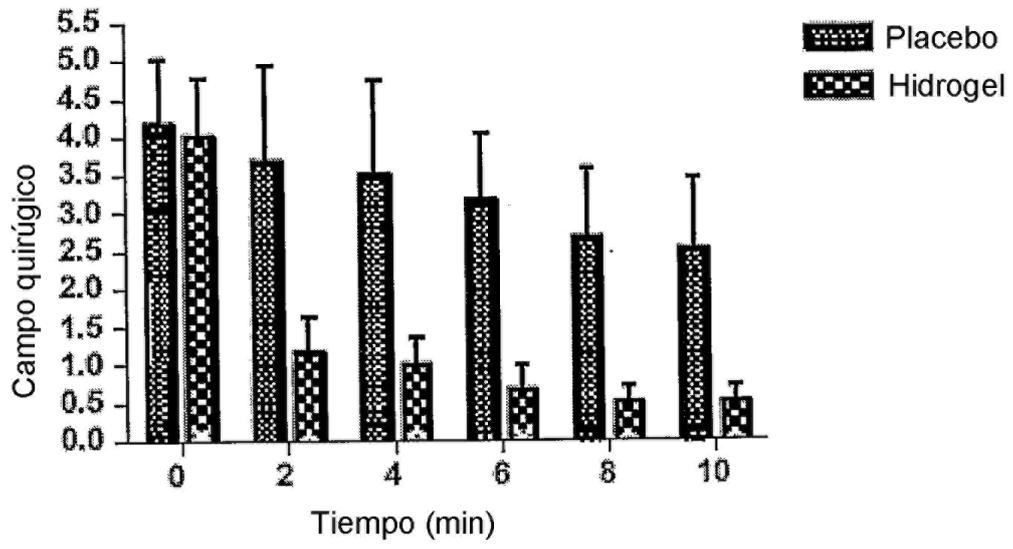


FIGURA 11

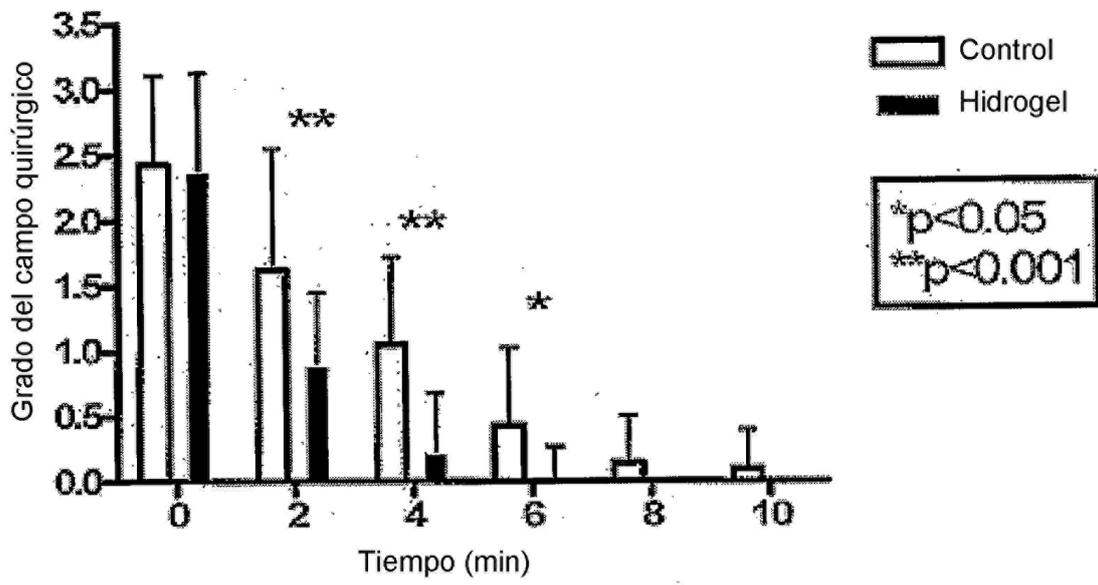


FIGURA 12

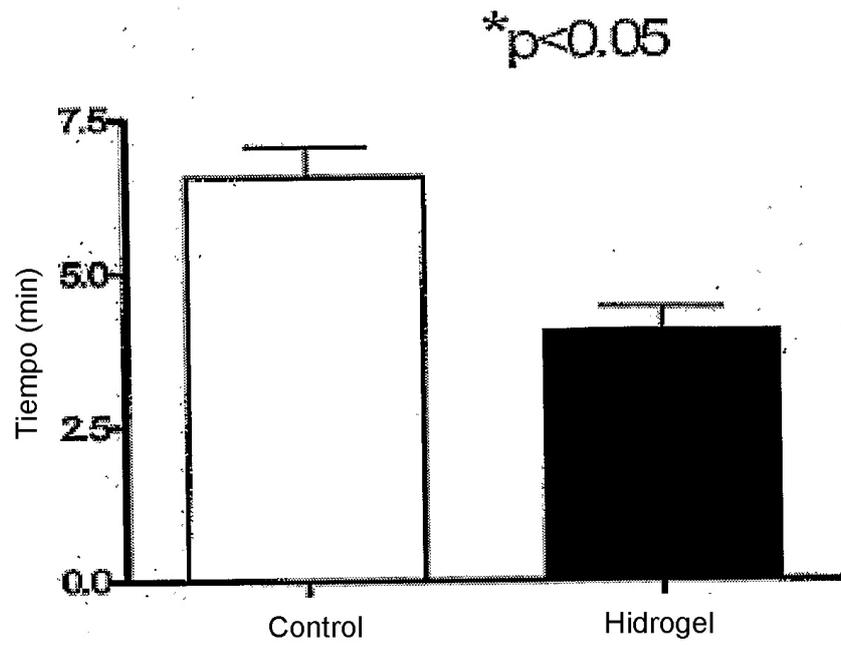


FIGURA 13

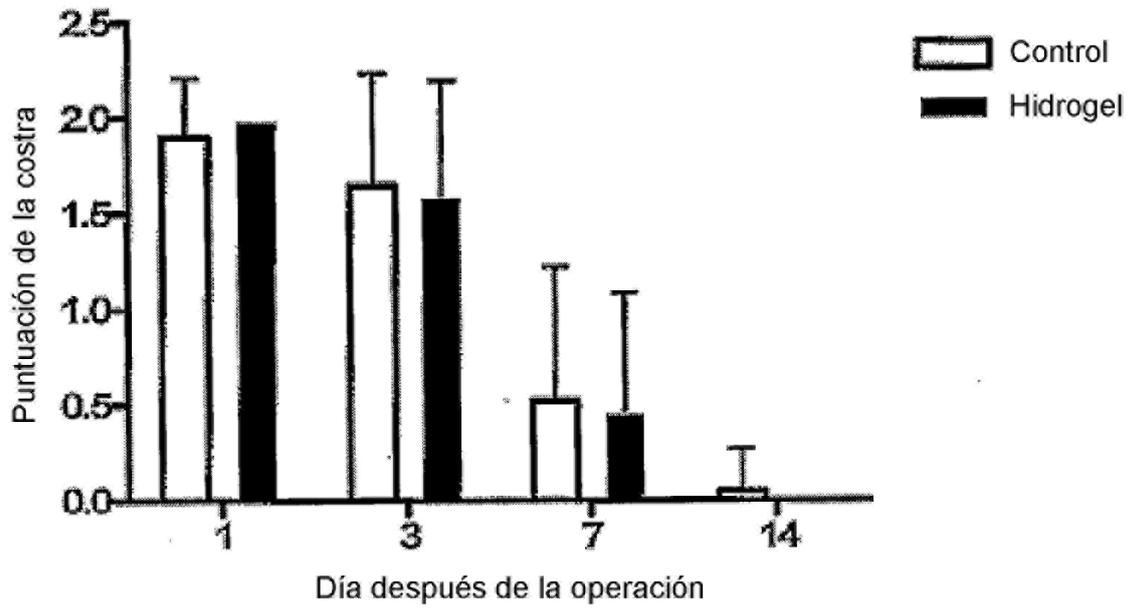


FIGURA 14