

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 416**

51 Int. Cl.:

A61L 24/00 (2006.01)
A61L 24/06 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2007** **E 12150108 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2468310**

54 Título: **Material sellante seco de acción rápida y métodos para su uso y fabricación**

30 Prioridad:

02.08.2006 US 821190 P

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

03.05.2019

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

RHEE, WOONZA M;
REICH, CARY J;
OSAWA, EDWARD A y
VEGA, FELIX

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 711 416 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

Material sellante seco de acción rápida y métodos para su uso y fabricación

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La patente US 5.162.430, concedida el 10 de noviembre de 1992 a Rhee y col., se refiere a conjugados de colágeno-polímero sintético preparados por unión covalente de colágeno a polímeros hidrofílicos sintéticos, tales como diversos derivados de polietilenglicol. La patente US 5.324.775, concedida el 28 de junio de 1994 a Rhee y col., se refiere a diversos polímeros biocompatibles naturales de injerto (tales como polisacáridos) enlazados de forma covalente a polímeros de polietilenglicol hidrofílicos sintéticos no inmunógenos. La patente US 5.328.955, concedida el 12 de julio de 1994 a Rhee y col., se refiere a diversas formas activadas de polietilenglicol y diversos enlaces a utilizar para producir conjugados de colágeno-polímero sintético con una determinadas propiedades físicas y químicas.

10 La US nº 08/403.358, solicitada el 14 de marzo de 1995, se refiere a una composición de biomaterial reticulado que se prepara utilizando un agente reticulante hidrófobo o una mezcla de agentes reticulantes hidrofílicos e hidrofobos. Los agentes reticulantes hidrofobos pueden incluir cualquier polímero hidrófobo que contenga dos o más grupos succinimidilo o que se pueda derivar químicamente para que los contenga.

15 La patente US 5.580.923, concedida el 3 de diciembre de 1996 a Yeung y col., se refiere a una composición útil en la prevención de adhesiones quirúrgicas que comprende un material sustrato y un agente enlazante antiadhesión, incluyendo el material sustrato preferentemente colágeno e incluyendo el agente enlazante preferentemente al menos un grupo funcional reactivo frente al tejido y al menos un grupo funcional reactivo frente al sustrato.

20 La patente US 5.614.587, concedida el 25 de marzo de 1997 a Rhee y col., se refiere a composiciones bioadhesivas que comprenden colágeno reticulado utilizando un polímero hidrófilo sintético multifuncionalmente activado y a métodos para la utilización de estas composiciones con el fin de generar una adhesión entre una primera superficie y una segunda superficie, donde al menos una de estas dos superficies puede ser una superficie de tejido nativo.

25 La publicación de patente japonesa nº 07090241 se refiere a una composición utilizada para la adhesión temporal de un material de lente a un soporte con el fin de montar el material en un dispositivo de mecanizado, y que comprende una mezcla de polietilenglicol con un peso molecular medio entre 1.000 y 5.000 y poli-N-vinilpirrolidona con un peso molecular medio entre 30.000 y 200.000.

30 West y Hubbell, Biomaterials (1995) 16:1153-1156, describen la prevención de adhesiones post-operatorias mediante la utilización de un hidrogel de polietilenglicol co-diacrilato de ácido láctico fotopolimerizado y un hidrogel de polietilenglicol co-propilenglicol reticulado físicamente, Poloxamer 407®.

35 Las patentes US 5.672.336 y 5.196.185 describen un apósito que comprende un colágeno fibrilar microparticulado con un tamaño de partícula de 0,5-2,0 µm. En general, esta composición comprende una fase acuosa y no puede formar un hidrogel tal como el descrito en la presente invención. La patente US 5.698.213 describe un hidrogel de poliéster alifático reticulado que puede emplearse como dispositivo quirúrgico absorbible y vehículo de suministro de fármacos. La patente US 5.674.275 describe un adhesivo de hidrogel basado en acrilato o metacrilato. La patente US 5.306.501 describe un hidrogel termorreversible basado en polioxialquileno que puede emplearse como vehículo para el suministro de fármacos.

Las patentes US 4.925.677 y 5.041.292 describen un hidrogel que comprende un componente proteico reticulado con un polisacárido o mucopolisacárido, el cual puede ser utilizado como vehículo en el suministro de fármacos.

40 En la patente US 5.384.333 y en el documento de Jeong y col. (1997) "Nature" 388: 860-862 se describen medicamentos inyectables biodegradables. En la patente US 4.925.677 se describen hidrogeles biodegradables para el suministro de liberación controlada de fármacos. En las patentes US 4.347.234 y 4.291.013 se describen sistemas de suministro de fármacos basados en colágeno reabsorbible. En las patentes US 5.300.494 y 4.946.870 se describen películas biocompatibles basadas en aminopolisacáridos para el suministro de fármacos. En la patente US 5.648.506 se describen vehículos solubles en agua para el suministro de taxol.

45 Los polímeros se han utilizado como vehículos de agentes terapéuticos con el fin de una liberación localizada y sostenida (Langer y col., Rev. Macro. Chem. Phys., C23 (1), 61, 1983; Controlled Drug Delivery, Vol. I y II, Bruck, S.D., (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1983; Leong y col., Adv. Drug Delivery Review, 1:199, 1987). Estos sistemas de suministro de agentes terapéuticos simulan la infusión y ofrecen el potencial de una mayor eficacia terapéutica y una toxicidad sistémica reducida.

50

Otras clases de polímeros sintéticos que han sido propuestos para el suministro de fármacos de liberación controlada incluyen poliésteres (Pitt y col., en *Controlled Release of Bioactive Materials*, R. Baker, Ed., Academic Press, Nueva York, 1980); poliamidas (Sidman y col., *Journal of Membrane Science*, 7:227, 1979); poliuretanos (Maser y col., *Journal of Polymer Science, Polymer Symposium*, 66:259, 1979); poliortoésteres (Heller y col., *Polymer Engineering Science*, 21:727, 1981); y polianhídridos (Leong y col., *Biomaterials*, 7:364, 1986).

En las patentes US 5.428.024, 5.352.715 y 5.204.382 se describen composiciones que contienen colágeno que ha sido sometido a ruptura mecánica para modificar sus propiedades físicas. En general estas patentes se refieren a colágenos fibrilares e insolubles. En la patente US 4.803.075 se describe una composición de colágeno inyectable. En la patente US 5.516.532 se describe una composición ósea/cartilago inyectable. En la WO 96/39159 se describe una matriz de suministro basada en colágeno que comprende partículas secas con un tamaño entre 5 μm y 850 μm , la cual puede estar suspendida en agua y con una densidad de carga superficial determinada. En la patente US 5.196.185 se describe una preparación de colágeno con un tamaño de partícula de 1 μm a 50 μm útil como pulverizador de aerosol para formar un apósito. Otras patentes que describen composiciones de colágeno incluyen las US 5.672.336 y 5.356.614. En la WO 96/06883 se describe un hidrogel polimérico no erosionable que se puede reticular e inyectar mediante una jeringuilla.

La WO2006/005340 A describe una esponja hemostática que comprende un material bioabsorbible y ácido hialurónico o un derivado del mismo y que tienen un menor hinchamiento y mejores propiedades hemostáticas.

Las siguientes solicitudes pendientes, asignadas al cesionario de la presente solicitud, contienen materia relacionada: US 2008 085316, presentada el 31 de julio de 1997; US 2004 214770, presentada el 18 de junio de 1997; US 2002 193448, presentada el 27 de agosto de 1996; US Ser. n° 08/673,710, presentada el 19 de junio de 1996; US Ser. n° 60/011,898, presentada el 20 de febrero de 1996; US Ser. n° 60/006,321, presentada el 7 de noviembre de 1996; US Ser. n° 60/006,322, presentada el 7 de noviembre de 1996; US Ser. n° 60/006,324, presentada el 7 de noviembre de 1996; y US Ser. n° 08/481,712, presentada el 7 de junio de 1995. Existen diversos materiales adecuados para ser utilizados como bioadhesivos, para el aumento de tejidos, para la prevención de adhesiones quirúrgicas, para revestir superficies de implantes sintéticos, como matrices de suministro de fármacos, para aplicaciones oftálmicas y similares. Sin embargo, en muchos casos el tiempo de endurecimiento de estos materiales no es el óptimo teniendo en cuenta que, para la cirugía y otras aplicaciones médicas, con frecuencia es preferible un material de acción rápida. En otros casos, los materiales actualmente disponibles pueden presentar propiedades de hinchamiento que no son deseables en determinadas aplicaciones quirúrgicas. Por consiguiente, existe la necesidad de un material de acción rápida para su uso, por ejemplo, como material sellante de tejidos en aplicaciones hemostáticas y/o de cierre de heridas. También sería deseable disponer de materiales que presenten propiedades de hinchamiento mínimas.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones que permiten la hemostasia u otra contención de fluidos en un contexto *in vivo* tal como se menciona en las reivindicaciones. Las composiciones de la invención comprenden un primer y un segundo componente reticulable y al menos un componente formador de hidrogel en una composición adecuada para ser aplicada a un vertebrado con el fin de facilitar la contención de fluidos. Las composiciones incluyen materiales de acción rápida para su uso, por ejemplo, como materiales sellantes de tejidos en aplicaciones hemostáticas y/o de cierre de heridas. Las composiciones presentan propiedades de hinchamiento mínimas.

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

En un primer aspecto, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan una composición que incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable, bajo condiciones que posibilitan la reacción, y un componente formador de hidrogel. El primer y el segundo componente reticulable se reticulan para formar una matriz porosa que presenta intersticios y el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios. En ciertos aspectos, el pH del componente formador de hidrogel puede afectar al tiempo de reacción para formar una matriz barrera matriz de sellado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición que incluye un componente formador de hidrogel con un pH de 6,75 proporciona un tiempo de reacción más lento que una composición que incluye un componente formador de hidrogel con un pH de 9,5.

El primer componente reticulable puede incluir múltiples grupos nucleófilos y el segundo componente reticulable puede incluir múltiples grupos electrófilos. En algunos aspectos, el primer componente reticulable incluye un óxido de polialquileno multinucleófilo que tiene m grupos nucleófilos y el segundo componente reticulable incluye un óxido de polialquileno multielectrófilo que tiene n grupos electrófilos, donde m y n en cada caso son mayores que o iguales a dos y donde m+n es mayor o igual que cinco. En algunos aspectos, n es dos y m es mayor o igual a tres. El óxido de polialquileno multinucleófilo se puede activar de forma tetrafuncional. En algunos aspectos, m es dos y n es mayor o igual a tres. El óxido de polialquileno multielectrófilo se puede activar de forma tetrafuncional. En algunos casos, tanto el óxido

de polialquileo multinucleófilo como el óxido de polialquileo multielectrófilo se activan de forma tetrafuncional. El óxido de polialquileo multinucleófilo puede incluir dos o más grupos nucleófilos, por ejemplo NH_2 , $-\text{SH}$, $-\text{H}$, $-\text{PH}_2$ y/o $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$. En algunos casos, el óxido de polialquileo multinucleófilo incluye dos o más grupos amino primarios. En algunos casos, el óxido de polialquileo multinucleófilo incluye dos o más grupos tiol. El óxido de polialquileo multinucleófilo puede ser un polietilenglicol o un derivado del mismo. En algunos casos, el polietilenglicol incluye dos o más grupos nucleófilos que pueden incluir un grupo amino primario y/o un grupo tiol. El óxido de polialquileo multielectrófilo puede incluir dos o más grupos electrófilos tales como $-\text{CO}_2\text{N}(\text{COCH}_2)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CHO}$, $-\text{CHOCH}_2$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{N}(\text{COCH})_2$ y/o $-\text{S}-\text{S}-(\text{C}_5\text{H}_4\text{N})$. El óxido de polialquileo multielectrófilo puede incluir dos o más grupos maleimidilo. En algunos casos, el óxido de polialquileo multielectrófilo puede ser un polietilenglicol o un derivado del mismo.

En algunos aspectos, la composición incluye un polisacárido o una proteína. El polisacárido puede ser un glicosaminoglicano tal como ácido hialurónico, quitina, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B, sulfato de condroitina C, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina o un derivado de éstos. La proteína puede ser colágeno o un derivado del mismo. El óxido de polialquileo multinucleófilo o el óxido de polialquileo multielectrófilo o ambos, el óxido de polialquileo multinucleófilo y el óxido de polialquileo multielectrófilo, pueden incluir un grupo enlazante. En algunos casos, el óxido de polialquileo multinucleófilo puede representarse por la fórmula: polímero- Q^1-X_m . El óxido de polialquileo multielectrófilo puede representarse por la fórmula: polímero- Q^2-Y_n . X puede ser un grupo electrófilo e Y puede ser un grupo nucleófilo, m y n pueden tener en cada caso un valor de 2 a 4, m+n puede ser ≤ 5 , y tanto Q^1 como Q^2 pueden ser grupos enlazantes tales como $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{n-}$, $-\text{S}-$, $-(\text{CH}_2)_{n-}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n-}$, $-\text{O}_2\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n-}$, $-\text{O}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{n-}$, $-\text{O}_2\text{C}-\text{CR}^1\text{H}$ y/u $-\text{O}-\text{R}^2-\text{CO}-\text{NH}$. En algunos casos, n' puede tener un valor de 1 a 10, R^1 puede ser $-\text{H}$, $-\text{CH}_3$ o $-\text{C}_2\text{H}_5$, R^2 puede ser $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, y Q^1 y Q^2 pueden ser iguales o diferentes o no estar presentes. En algunos aspectos, Y puede ser $-\text{CO}_2\text{N}(\text{COCH}_2)_2$ o $-\text{CO}_2\text{N}(\text{COCH}_2)_2$. En algunos casos, el óxido de polialquileo multinucleófilo o el óxido de polialquileo multielectrófilo o ambos, el óxido de polialquileo multinucleófilo y el óxido de polialquileo multielectrófilo, incluyen adicionalmente un grupo biodegradable. El grupo biodegradable puede ser una lactida, glicolida, ϵ -caprolactona, poli(α -hidroxiácido), poli(aminoácido) o un poli(anhídrido). En algunos aspectos, el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel biocompatible fragmentado que incluye gelatina y absorbe agua cuando se suministra en un sitio diana de tejido húmedo. El hidrogel puede incluir subunidades de tamaños entre aproximadamente 0,01 mm y aproximadamente 5 mm cuando está completamente hidratado, siendo el hinchamiento de equilibrio de entre aproximadamente el 400% y aproximadamente el 5.000%. En algunos casos, el hidrogel tiene un tiempo de degradación *in vivo* inferior a un año. En algunos casos, el hidrogel está al menos parcialmente hidratado en un medio acuoso e incluye un principio activo que puede comprender un agente coagulante tal como trombina.

También se describe aquí un método para suministrar un principio activo a un paciente. El método puede incluir la administración a un sitio diana del paciente de una cantidad de una composición tal como la aquí descrita. El método puede incluir suministrar un agente sellante a un paciente. El método puede incluir la administración a un sitio diana que sangra de una composición tal como la aquí descrita en una cantidad suficiente para inhibir la hemorragia. El método puede incluir suministrar trombina a un paciente. El método puede incluir la administración a un sitio diana que sangra de una composición tal como la aquí descrita en una cantidad suficiente para inhibir la hemorragia.

En otro aspecto, realizaciones de la presente invención incluyen una composición que incluye un óxido de polialquileo multinucleófilo, un óxido de polialquileo multielectrófilo y un componente formador de hidrogel. El óxido de polialquileo multinucleófilo puede incluir además al menos un grupo amino primario y al menos un grupo tiol. El óxido de polialquileo multinucleófilo y el óxido de polialquileo multielectrófilo se pueden reticular de forma esencialmente inmediata bajo condiciones que posibilitan la reacción. Algunas realizaciones incluyen composiciones donde el óxido de polialquileo multinucleófilo incluye dos o más grupos tiol y el óxido de polialquileo multielectrófilo incluye dos o más grupos electrófilos tales como grupos succinimidilo y/o grupos maleimidilo. Algunas realizaciones también incluyen composiciones donde el óxido de polialquileo multinucleófilo incluye dos o más grupos nucleófilos tales como grupos amino primarios y/o grupos tiol. El óxido de polialquileo multielectrófilo puede incluir dos o más grupos succinimidilo. En algunos casos, las realizaciones se refieren a composiciones que comprenden un primer polietilenglicol con dos o más grupos tiol, un segundo polietilenglicol con dos o más grupos succinimidilo o maleimidilo y un componente formador de hidrogel. La suma de los grupos tiol y succinimidilo o maleimido puede ser igual a cinco o más, pudiéndose reticular el primer polietilenglicol y el segundo polietilenglicol de forma esencialmente inmediata bajo condiciones que posibilitan la reacción. En algunos casos, el primer polietilenglicol incluye cuatro grupos tiol y el segundo polietilenglicol incluye cuatro grupos succinimidilo. En algunos casos, la composición incluye una proteína o un polisacárido. El polisacárido puede ser un glicosaminoglicano tal como ácido hialurónico, quitina, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B, sulfato de condroitina C, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina o un derivado de éstos. La proteína puede ser colágeno o un derivado del mismo.

También se describe aquí un método para sellar un tracto tisular. El método puede incluir el rellenado al menos parcial de un tracto tisular con una composición que incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que posibilitan la reacción y un componente formador de hidrogel. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular para formar una matriz porosa que presenta intersticios y el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios. En algunos casos, el hidrogel incluye subunidades con tamaños entre

aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 5 mm cuando está completamente hidratado y con un hinchamiento de equilibrio entre aproximadamente el 400% y aproximadamente el 1.300%, y que se degradan en el tracto tisular después de un tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 días. El primer componente reticulable incluye múltiples grupos nucleófilos y el segundo polímero comprende múltiples grupos electrófilos.

- 5 También se describe aquí un método para inhibir el sangrado en un sitio diana del cuerpo de un paciente. El método puede incluir el suministro de una composición al sitio diana en una cantidad suficiente para inhibir la hemorragia, incluyendo dicha composición un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que posibilitan la reacción y un componente formador de hidrogel. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular para formar una matriz porosa que presenta intersticios y el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios. El hidrogel puede incluir subunidades con tamaños entre 0,05 mm y 5 mm cuando está completamente hidratado y con un hinchamiento de equilibrio entre el 400% y el 1.300%, y que se degradan en el tracto tisular después de un tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 días. El primer componente reticulable incluye múltiples grupos nucleófilos y el segundo componente reticulable incluye múltiples grupos electrófilos. También se describe aquí un método para suministrar una sustancia bioactiva a un sitio diana del cuerpo de un paciente. El método puede incluir el suministro de una composición en combinación con la sustancia bioactiva al sitio diana, incluyendo dicha composición un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que posibilitan la reacción y un componente formador de hidrogel. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular para formar una matriz porosa que presenta intersticios y el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios. El hidrogel puede incluir subunidades con tamaños entre 0,05 mm y 5 mm cuando está completamente hidratado, con un hinchamiento de equilibrio entre el 400% y el 1.300% y que se puede degradar en el tracto tisular después de un tiempo de 1 a 120 días. El primer componente reticulable incluye múltiples grupos nucleófilos y el segundo componente reticulable incluye múltiples grupos electrófilos. La sustancia bioactiva puede ser un agente hemostático, por ejemplo trombina.
- 25 También se describe aquí un método para suministrar una composición hinchable a un sitio diana de un tejido. El método puede incluir la aplicación de la composición al sitio diana, incluyendo dicha composición un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que posibilitan la reacción y un componente formador de hidrogel. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular para formar una matriz porosa que presenta intersticios y el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios. El hidrogel puede incluir subunidades con tamaños entre 0,05 mm y 5 mm cuando está completamente hidratado y con un hinchamiento de equilibrio entre el 400% y el 1.300%, degradándose en el tracto tisular después de un tiempo de 1 a 120 días. La composición puede estar hidratada en una medida inferior a su hinchamiento de equilibrio cuando se aplica en el sitio diana, donde se hincha hasta el valor de equilibrio. El primer componente reticulable incluye múltiples grupos nucleófilos y el segundo componente reticulable incluye múltiples grupos electrófilos. En algunos aspectos, el sitio diana del tejido puede ser músculo, piel, tejido epitelial, músculo liso, esquelético o cardíaco, tejido conjuntivo o de soporte, tejido nervioso, tejido oftálmico y de otros órganos sensoriales, tejido vascular y cardíaco, órganos y tejidos gastrointestinales, tejido pleural y otros tejidos pulmonares, riñón, glándulas endocrinas, órganos reproductivos masculinos y femeninos, tejido adiposo, hígado, páncreas, linfa, cartilago, hueso, tejido oral y tejido mucosal, y bazo y otros órganos abdominales. En algunos aspectos, el sitio diana incluye una región hueca dentro del tejido seleccionado, tal como un desprendimiento de tejido, un tracto tisular, un espacio intervertebral o una cavidad corporal. En algunos casos, el hidrogel tiene un grado de hidratación entre el 50% y el 95% de la hidratación correspondiente al hinchamiento de equilibrio. En algunos casos, el hidrogel incluye un plastificante tal como polietilenglicol, sorbitol o glicerol. El plastificante puede estar presente en una cantidad entre el 0,1% en peso y el 30% en peso de la composición del componente de hidrogel. En algunos casos, el hidrogel incluye un hidrogel proteico reticulado. La proteína puede incluir gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, fibrinógeno, fibrina, caseína, fibronectina, elastina, queratina, laminina y derivados y combinaciones de las mismas. En algunos casos, el hidrogel incluye un polisacárido reticulado. El polisacárido puede incluir glicosaminoglicanos, derivados de almidón, derivados de celulosa, derivados de hemicelulosa, xilano, agarosa, alginato y quitosano y combinaciones de los mismos. En algunos casos, el hidrogel incluye un polímero reticulado no biológico. El polímero reticulado no biológico puede incluir poliácridatos, polimetacrilatos, poliácridamidas, resinas de polivinilo, polilactida-glicólidos, policaprolactonas, polioxietilenos y combinaciones de éstos. En algunos casos, el hidrogel incluye al menos dos componentes seleccionados de entre un grupo que incluye proteínas reticuladas, polisacáridos reticulados y polímeros reticulados no biológicos. El hidrogel puede incluir un polímero de hidrogel y un agente reticulante de hidrogel. El polímero de hidrogel y el agente reticulante de hidrogel pueden haber reaccionado bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas del polímero de hidrogel. En algunos casos, el hidrogel incluye un polímero de hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante irradiación del hidrogel bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas del polímero de hidrogel. En algunos casos, el hidrogel incluye un hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante la reacción de monómeros de hidrogel monoinsaturados y poliinsaturados bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas del polímero de hidrogel.
- 60 También se describe aquí un método para formar una matriz polimérica sintética tridimensional. El método incluye proporcionar un primer componente reticulable que contiene m grupos nucleófilos y un segundo componente reticulable

que contiene n grupos electrófilos. Los grupos electrófilos reaccionan con los grupos nucleófilos para formar enlaces covalentes con los mismos, siendo m y n en cada caso mayores o iguales a dos y siendo $m+n$ mayor o igual a cinco. El método también incluye combinar el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable, añadir un componente formador de hidrogel a los componentes reticulables primero y segundo y dejar que los componentes reticulables primero y segundo se reticulen entre sí para formar una matriz tridimensional. El método también puede incluir poner en contacto una primera superficie de tejido y una segunda superficie con el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente formador de hidrogel. En algunos casos, la segunda superficie es una superficie de tejido nativo. En algunos casos, la segunda superficie es una superficie de tejido no nativo, por ejemplo un implante sintético. El implante sintético puede ser una córnea de un donante, un vaso sanguíneo artificial, una válvula cardíaca, un órgano artificial, una prótesis de unión, una lente implantable, un injerto vascular, un *stent*, una combinación *stent*/injerto. En algunos casos, el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente formador de gel se aplican en cada caso en forma de polvo en la primera superficie de tejido. En algunos casos, el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente formador de gel se aplican en cada caso en forma de polvo como una formulación de polvo mixto combinado simple en la primera superficie de tejido. La formulación en polvo mixto puede incluir una proteína y/o un polisacárido. La primera superficie de tejido puede estar situada sobre o dentro de un tejido duro o blando. La primera superficie de tejido puede incluir, rodear o ser adyacente a un punto quirúrgico. El método también puede incluir el cierre del punto quirúrgico. En algunos casos, la formulación en polvo mixto incluye colágeno. En algunos casos, la formulación en polvo mixto incluye un agente biológicamente activo. En algunos aspectos, las realizaciones de la presente invención se refieren a una composición en polvo mixto que comprende un primer componente reticulable en polvo con múltiples grupos nucleófilos, un segundo componente reticulable en polvo con múltiples grupos electrófilos y un componente formador de hidrogel en polvo. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular de forma esencialmente inmediata bajo condiciones que posibilitan la reacción.

En un aspecto relacionado, el primer componente reticulable añadido al segundo componente reticulable proporciona una composición de componentes reticulables combinados. El primer componente reticulable puede estar presente en una concentración entre aproximadamente el 0,5 y aproximadamente el 20 por ciento en peso de la composición de componentes reticulables combinados. En algunos casos, el segundo componente reticulable puede estar presente en una concentración entre aproximadamente el 0,5 y aproximadamente el 20 por ciento en peso de la composición de componentes reticulables combinados. La relación en peso entre el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable puede oscilar entre aproximadamente el 45% y aproximadamente el 55%. Similarmente, la relación en peso entre el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable puede ser de aproximadamente el 50%. En algunos casos, la relación en peso entre el primer y segundo componente reticulable y el componente formador de hidrogel puede oscilar entre el 28% y el 42% p/p. Similarmente, la relación en peso entre el primer y el segundo componente reticulable y el componente formador de hidrogel puede oscilar entre el 20% y el 30% p/p. En algunos aspectos, el primer componente reticulable puede estar presente en una concentración entre el 0,5 y el 20 por ciento en peso de la composición de componentes reticulables combinados. Similarmente, el segundo componente reticulable puede estar presente en una concentración entre el 0,5 y el 20 por ciento en peso de la composición de componentes reticulables combinados. La relación en peso entre el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable puede oscilar entre el 45% y el 55%. Similarmente, la relación en peso entre el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable puede ser de aproximadamente el 50%.

La presente invención también proporciona un *kit* que comprende un recipiente y una composición en polvo mixta dispuesta en su interior de acuerdo con la reivindicación 13. La composición incluye un primer componente reticulable con múltiples grupos nucleófilos y un segundo componente reticulable con múltiples grupos electrófilos. El primer componente reticulable y el segundo componente reticulable están en forma de polvo. El *kit* también incluye un componente formador de hidrogel en polvo. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular de forma esencialmente inmediata bajo condiciones que posibilitan la reacción. En algunos casos, el recipiente incluye un cuerpo de jeringuilla y un émbolo de jeringuilla. Un *kit* también puede incluir instrucciones escritas para la aplicación de la composición en polvo mixta en un sitio diana que sangra de un paciente. En algunos casos, el polvo mixto incluye un principio activo. El principio activo puede incluir trombina. La invención también proporciona una esponja de colágeno y una composición en polvo mixta fijada a la superficie de la esponja según la reivindicación 14. La composición incluye un primer componente reticulable con múltiples grupos nucleófilos y un segundo componente reticulable con múltiples grupos electrófilos. El primer componente reticulable y el segundo componente reticulable están en forma de polvo. El *kit* también incluye un componente formador de hidrogel en polvo. El primer y el segundo componente reticulable se pueden reticular de forma esencialmente inmediata bajo condiciones que posibilitan la reacción.

Para una mayor comprensión de la naturaleza y las ventajas de la presente invención, véase la siguiente descripción detallada junto con las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: ilustra un primer componente reticulable de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

- FIG 2:** ilustra un segundo componente reticulable de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- FIG. 3:** muestra la formación de una composición de matriz reticulada a partir de un polímero hidrófilo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- 5 **FIG. 4:** muestra la formación de una composición de matriz reticulada a partir de un polímero hidrófobo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- FIG. 5:** ilustra una subunidad del componente formador de hidrogel de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- 10 **FIG. 6:** ilustra la correlación entre el porcentaje de hinchamiento y el porcentaje de sólidos de un gel polimérico reticulado fragmentado útil como componente formador de hidrogel en una composición sellante de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- FIG. 7A-E:** ilustran la aplicación de una composición de matriz sellante para tratar una punción arterial esplénica.
- FIG. 8A-E:** ilustran la aplicación de una composición de matriz sellante.
- 15 **FIG. 9:** ilustra el procesamiento y envasado de una composición de matriz sellante de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- FIG. 10:** ilustra el procesamiento y envasado de una composición de matriz sellante de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- FIG. 11:** ilustra el efecto de la concentración de PEG en la resistencia del gel, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- 20 **FIG. 12:** ilustra el efecto de la concentración de PEG en la proporción de hinchamiento de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- FIG. 13:** ilustra el efecto de la concentración de PEG en la proporción de hinchamiento de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.
- 25 **FIG. 14:** ilustra el efecto de la concentración de PEG en la proporción de hinchamiento de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona composiciones de matriz sellante secas para la hemostasia u otra contención de fluidos en un contexto *in vivo* de acuerdo con la reivindicación 1, un kit de acuerdo con la reivindicación 13 y una esponja de colágeno según la reivindicación 14. Las composiciones de algunas realizaciones de la invención comprenden un primer y un segundo componente reticulable y al menos un componente formador de hidrogel en una composición seca adecuada para ser aplicada a un tejido de un vertebrado con el fin de facilitar la contención de fluidos. El primer y el segundo componente de las composiciones de la invención reaccionan bajo condiciones *in vivo* para formar una matriz reticulada, mientras que el componente formador de hidrogel absorbe rápidamente el fluido biológico que sale por la brecha del tejido y también refuerza como barrera la matriz sellante física resultante formada cuando se reticulan el primer y el segundo componente. Tal como se describe en esta solicitud, el concepto "composiciones de matriz sellante" se refiere a composiciones de la invención antes de su aplicación en el sitio del tejido *in vivo* y el concepto "barrera matriz sellante" se refiere a la barrera de la matriz resultante después de que las composiciones de la invención entren en contacto con los fluidos biológicos y el primer y el segundo componente se reticulen formando una matriz reticulada porosa que contiene el hidrogel. Las composiciones de matriz sellantes se pueden producir en diversos formatos, incluyendo polvos, tortas, compresas y similares. Las realizaciones en forma de torta incluyen muestras de polvo de composición de la matriz sellante que han sido calentadas o cocidas para formar un cuerpo agregado. Las realizaciones en forma de compresa incluyen muestras de polvo de composición de la matriz sellante que han sido dispuestas sobre una esponja, tal como una esponja de colágeno u otro soporte, que después se cuece para crear un polvo solidificado fundido con la esponja o soporte.

Aunque la presente invención se puede utilizar para contener fluidos biológicos no sanguíneos (por ejemplo fluido linfático o espinal), la matriz sellante formada por la composición de algunas realizaciones de la presente invención también se puede denominar "matriz hemostática", ya que este es un principal uso aquí descrito.

Además de proporcionar una hemostasia rápida y una barrera de alta adherencia a los tejidos circundantes, la matriz sellante de algunas realizaciones de la presente invención tiene diversas ventajas sobre otros materiales utilizados para lograr la hemostasia previamente descritos. En primer lugar, la matriz sellante de algunas realizaciones de la presente invención se pueden utilizar bajo condiciones en las que la brecha del tejido está bastante húmeda (por ejemplo en hemorragias arteriales donde la sangre sale rápidamente o a chorros, como traumatismos abrasivo o cortes o incisiones de órganos internos). En comparación, muchas de las composiciones comercializadas actualmente para la hemostasia requieren un sitio relativamente seco para lograr la apropiada adherencia de la composición y mantener la hemostasia. Por ejemplo, en algunos casos se pueden disponer determinadas mezclas de PEG en un sitio que sangra rápidamente. Sin embargo, es probable que éstas sean arrastradas por la sangre. Similarmente, en algunos casos determinadas composiciones de gelatina se podrían hidratar en un sitio que sangra rápidamente, pero probablemente es difícil que éstas permanezcan en el sitio. Ventajosamente se ha descubierto que algunas preparaciones que incluyen un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel pueden proporcionar

un material que, bajo condiciones que posibilitan la reacción, permanece inmovilizado incluso en caso de hemorragia considerable, formando un material tipo coágulo mecánicamente estable para restañar la hemorragia. En segundo lugar, la matriz sellante de algunas realizaciones de la presente invención actúa obturando físicamente la brecha del tejido, sin depender de la capacidad de coagulación endógena del vertebrado. Por consiguiente, la matriz sellante se puede utilizar en vertebrados con baja concentración de fibrinógeno en sangre o incluso con sustitutivos de sangre que no contienen fibrinógeno. Por ejemplo, cuando el primer y el segundo componente reticulable se combinan con un componente formador de hidrogel y se aplican a una superficie que sangra, se puede producir una interacción sinérgica entre los componentes reticulables y el componente formador de hidrogel. De acuerdo con algunas realizaciones, el primer y el segundo componente reticulable pueden reaccionar en presencia del componente formador de hidrogel y reticularse en el sitio diana que sangra para formar una estructura relativamente rígida. En relación con esto, el componente formador de hidrogel se puede introducir en la estructura relativamente rígida e intervenir en la formación de un sello físico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se pueden preparar composiciones de matriz sellantes mezclando un primer componente reticulable con un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel bajo condiciones en las que el primer y el segundo componente no se reticulan (es decir, ausencia de humedad, pH, temperatura, etc. apropiados). Al entrar en contacto con el fluido biológico, o en otras condiciones que posibilitan la reacción, el primer y el segundo componente se reticulan para formar una matriz porosa que presenta intersticios, hidratándose el componente formador de hidrogel para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios. Opcionalmente, los componentes reticulables también se pueden reticular con el componente formador de hidrogel y/o los tejidos circundantes.

20 I. Componentes reticulables de la matriz sellante

El primer componente reticulable contiene dos o más grupos nucleófilos y el segundo componente reticulable contiene dos o más grupos electrófilos que se pueden unir de forma covalente a los grupos nucleófilos del primer componente reticulable. El primer y el segundo componente se pueden reticular para formar una matriz porosa. En las patentes US 5.874.500, 6.166.130, 6.312.725, 6.328.229 y 6.458.889 se describen ejemplos de primeros y segundos componentes y matrices porosas.

Los componentes primeros y segundos se seleccionan típicamente de modo que no sean inmunógenos y, en consecuencia, no requieran ninguna "prueba cutánea" antes de comenzar el tratamiento. Además, estos componentes y el componente formador de hidrogel se pueden seleccionar de modo que se opongan al desdoblamiento enzimático por metaloproteinasas de matriz (por ejemplo colagenasa) para proporcionar una mayor persistencia a largo plazo *in vivo* que las composiciones de colágeno actualmente disponibles. Alternativamente, los primeros y segundos componentes y los componentes formadores de hidrogel se pueden seleccionar de modo que sean eliminados o reabsorbidos durante la curación de la herida para evitar la formación de tejido fibroso alrededor de la matriz sellante *in vivo*.

En una realización, el primer componente puede ser un polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleófilos (representado más abajo como "X") y que puede reaccionar con un segundo polímero sintético que contiene múltiples grupos electrófilos (representado más abajo como "Y") produciendo una red polimérica unida de forma covalente, de la siguiente manera:



donde

$$m \geq 2, n \geq 2 \text{ y } m + n \geq 5;$$

40 X = -NH₂, -SH, -OH, -PH₂, -CO-NH-NH₂, etc., y pueden ser iguales o diferentes;

Y = -CO₂N(COCH₂)₂, -CO₂H, -CHO, -CHOCH₂, -N=C=O, SO₂CH=CH₂, -N(COCH)₂, -S-S-(C₅H₄N), etc., y pueden ser iguales o diferentes; y

Z = un grupo funcional resultante de la unión de un grupo nucleófilo (X) y un grupo electrófilo (Y).

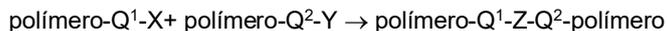
45 Como se indica más arriba, X e Y pueden ser iguales o diferentes, es decir, el primer componente puede tener dos grupos nucleófilos diferentes y/o el segundo componente puede tener dos grupos electrófilos diferentes. La **FIG. 1** ilustra un ejemplo de un polímero de primer componente o un primer componente reticulable. La **FIG. 2** ilustra un ejemplo de un polímero de segundo componente o un segundo componente reticulable.

El esqueleto polimérico de los componentes primero y segundo puede consistir en un óxido de alquileno, en particular óxido de etileno, óxido de propileno y mezclas de éstos. Ejemplos de óxidos de alquileno difuncionales se pueden representar de la siguiente manera:

X-polímero-X Y-polímero-Y

donde X e Y tienen el significado arriba definido y el término "polímero" representa $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ - o $-(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_n$ - o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - (\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_n$ -.

- El grupo funcional X o Y se acopla normalmente al esqueleto polimérico mediante un grupo enlazante (representado más abajo como "Q"), muchos de los cuales son conocidos o posibles. Aunque los componentes de la invención tienen dos o más grupos funcionales, los ejemplos dados más abajo sólo muestran un grupo funcional y la reticulación resultante para simplificar. Existen muchos modos de preparar los diversos polímeros funcionalizados, algunos de los cuales se muestran más abajo:



Donde Q =	estructura total =
-O-(CH ₂) _n -	polímero-O-(CH ₂) _n -X (o Y)
-S-(CH ₂) _n -	polímero-S-(CH ₂) _n -X (o Y)
-NH-(CH ₂) _n -	polímero-NH-(CH ₂) _n -X (o Y)
-O ₂ C-NH-(CH ₂) _n -	polímero-O-O ₂ C-NH-(CH ₂) _n -X (o Y)
-O ₂ C-(CH ₂) _n -	polímero-O ₂ C-(CH ₂) _n -X (o Y)
-O ₂ C-CR ¹ H-	polímero-O ₂ C-CRH-X (o Y)
-O-R ² -CO-NH-	polímero-O-R-CO-NH-X (o Y)

- 10 donde

n = 1-10 en cada caso;

R¹ = H, CH₃, C₂H₅,..., C_pH_{2p+1};

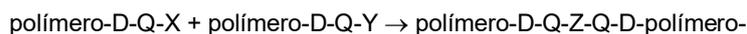
R² = CH₂, CO-NH-CH₂CH₂.

Q¹ y Q² pueden ser iguales o diferentes.

- 15 Por ejemplo, cuando Q² = OCH₂CH₂ (no hay Q¹ en este caso), Y = -CO₂N(COCH₂)₂ y X = -NH₂, -SH u -OH, las reacciones resultantes y los grupos Z serían los siguientes:



- 20 Entre el polímero y el grupo enlazante se puede insertar un grupo adicional, representado más abajo como "D", para aumentar la degradación de la composición polimérica reticulada *in vivo*, por ejemplo para su uso en aplicaciones de suministro de fármacos:



- 25 Algunos grupos "D" biodegradables útiles incluyen lactida, glicolida, ε-caprolactona, poli(α-hidroxiácido), poli(aminoácidos), poli(anhídrido) y diversos di- o tripéptidos.

A. Primeros y segundos componentes de esqueleto polimérico

- 30 Tal como se indica más arriba, para preparar las composiciones de la presente invención resulta útil disponer de un primer componente polimérico que contiene dos o más grupos nucleófilos, tales como grupos amino primarios o tiol, y un segundo componente polimérico que contiene dos o más grupos electrófilos que se pueden unir de forma covalente a los grupos nucleófilos del primer polímero componente. Los polímeros del primer y el segundo componente pueden ser sintéticos.

Tal como se utiliza en relación con el primer y el segundo polímero componente, el término "polímero" se refiere, entre otras cosas, a polialquilos; di-, tri-, oligo- y poliaminoácidos; y tri-, oligo- o polisacáridos.

- 35 Tal como se utiliza en relación con el primer y el segundo polímero componente, el concepto "polímero sintético" abarca polímeros que no son naturales y que se producen por síntesis química. Como tales, proteínas naturales como colágeno y polisacáridos naturales como ácido hialurónico, se pueden excluir. Si están incluidos el colágeno sintético y el ácido hialurónico sintético y sus derivados. Los polímeros sintéticos que contienen grupos nucleófilos o electrófilos incluyen "polímeros sintéticos activados de forma multifuncional". El concepto "activado de forma multifuncional" (o simplemente "activado") se refiere a polímeros sintéticos que tienen o que han sido modificados químicamente para tener, dos o más grupos nucleófilos o electrófilos que pueden reaccionar entre sí (es decir, los grupos nucleófilos reaccionan con los grupos electrófilos) formando enlaces covalentes. Los diferentes tipos de polímeros sintéticos activados de forma multifuncional

incluyen polímeros activados de forma difuncional, polímeros activados de forma tetrafuncional y polímeros ramificados en estrella.

Los polímeros sintéticos activados de forma multifuncional a utilizar en la presente invención contienen a menudo al menos dos o al menos tres grupos funcionales para formar una red reticulada tridimensional con polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleófilos (es decir, "polímeros multinucleófilos"). Dicho de otro modo: típicamente están activados al menos de forma difuncional o están activados de forma trifuncional o tetrafuncional. Si el primer polímero sintético es un polímero sintético activado de forma difuncional, el segundo polímero sintético contiene típicamente tres o más grupos funcionales para obtener una red reticulada tridimensional. Tanto el primer como el segundo polímero componente pueden contener al menos tres grupos funcionales.

10 B. Polímero del primer componente

Los polímeros del primer componente contienen múltiples grupos nucleófilos y aquí también se designan genéricamente como "polímeros multinucleófilos". Para su uso en la presente invención, los polímeros multinucleófilos frecuentemente contienen al menos dos o al menos tres grupos nucleófilos. Si se utiliza un polímero sintético que sólo contiene dos grupos nucleófilos, habitualmente se utilizará un polímero sintético que contenga tres o más grupos electrófilos para obtener una red reticulada tridimensional.

Polímeros multinucleófilos a utilizar en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen polímeros sintéticos que contienen o que han sido modificados para contener múltiples grupos nucleófilos tales como grupos amino primarios y grupos tiol. Estos polímeros multinucleófilos pueden incluir: (i) polipéptidos sintéticos sintetizados para que contengan dos o más grupos amino primarios o grupos tiol; y (ii) polietilenglicoles modificados para que contengan dos o más grupos amino primarios o grupos tiol. En general, la reacción de un grupo tiol con un grupo electrófilo tiende a producirse más lentamente que la reacción de un grupo amino primario con un grupo electrófilo.

Los polipéptidos multinucleófilos pueden ser polipéptidos sintéticos sintetizados para incorporar aminoácidos con grupos amino primarios (como lisina) y/o aminoácidos con grupos tiol (como cisteína). Por ejemplo, el polímero del primer componente puede ser dilisina, trilisina, tetralisina, pentalisina o una dicisteína, tricisteína, tetracisteína, pentacisteína, u oligopéptidos o polipéptidos que comprenden dos o más lisinas o cisteínas y otros aminoácidos (por ejemplo glicina, alanina), preferentemente aminoácidos no hidrófobos. Frecuentemente se utiliza poli(lisina), un polímero producido sintéticamente del aminoácido lisina (145 MW). Se han preparado poli(lisinas) que tienen entre 6 y aproximadamente 4.000 grupos amino primarios, correspondientes a pesos moleculares de aproximadamente 870 a aproximadamente 580.000. Peninsula Laboratories, Inc. (Belmont, Calif.) comercializa poli(lisinas) de diversos pesos moleculares.

El polietilenglicol se puede modificar químicamente para que contenga múltiples grupos amino primarios o grupos tiol de acuerdo con métodos descritos, por ejemplo en el capítulo 22 de Poly(ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, N.Y. (1992). Los polietilenglicoles modificados para que contengan dos o más grupos amino primarios se denominan aquí "PEG multiamino". Los polietilenglicoles modificados para que contengan dos o más grupos tiol se denominan aquí "PEG multitio". Tal como se utiliza aquí, el término "polietilenglicol(es)" incluye polietilenglicol(es) modificado(s) y/o derivado(s).

Existen diversas formas de PEG multiamino comerciales de Shearwater Polymers (Huntsville, Ala.) y de Texaco Chemical Company (Houston, Tex.) bajo el nombre "Jeffamine". PEG multiamino útiles en la presente invención incluyen diaminas (serie "D") y triaminas (serie "T") Jeffamine de Texaco, que contienen dos y tres grupos amino primarios por molécula, respectivamente.

Como polímero sintético de primer componente que contiene múltiples grupos neutrófilos también se pueden utilizar poliaminas tales como etilendiamina ($H_2N-CH_2CH_2-NH_2$), tetrametilendiamina ($H_2N-(CH_2)_4-NH_2$), pentametilendiamina (cadaverina) ($H_2N-(CH_2)_5-NH_2$), hexametilendiamina ($H_2N-(CH_2)_6-NH_2$), bis(2-hidroxiethyl)amina ($HN-(CH_2CH_2OH)_2$), bis(2-aminoethyl)amina ($HN-(CH_2CH_2NH_2)_2$) y tris(2-aminoethyl)amina ($N-(CH_2CH_2NH_2)_3$).

C. Polímero del segundo componente

Los polímeros del segundo componente que contienen múltiples grupos electrófilos también se denominan aquí "polímeros multielectrófilos". Para su uso en la presente invención, los polímeros multielectrófilos habitualmente contienen al menos dos o al menos tres grupos electrófilos para formar una red reticulada tridimensional con polímeros multinucleófilos.

Polímeros multielectrófilos a utilizar en las composiciones de la invención pueden ser polímeros que contienen dos o más grupos succinimidilo capaces de formar enlaces covalentes con grupos nucleófilos de otras moléculas. Los grupos succinimidilo son altamente reactivos con materiales que contienen grupos amino primarios ($-NH_2$), tales como PEG multiamino, poli(lisina) o colágeno. Los grupos succinimidilo son ligeramente menos reactivos con materiales que contienen grupos tiol ($-SH$), tales como PEG multitio o polipéptidos sintéticos que contienen múltiples residuos de cisteína.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “que contiene dos o más grupos succinimidilo” se refiere tanto a polímeros comerciales y que contienen dos o más grupos succinimidilo como a polímeros derivados químicamente para que contengan dos o más grupos succinimidilo. Tal como se utiliza aquí, el concepto “grupo succinimidilo” abarca grupos sulfosuccinimidilo y otras variaciones de este tipo del grupo succinimidilo “genérico”. La presencia de la fracción de sulfito de sodio en el grupo sulfosuccinimidilo sirve para aumentar la solubilidad del polímero.

D. Polímeros hidrófilos a utilizar como esqueletos del primer o el segundo componente

Algunos polímeros hidrófilos, en particular diversos polietilenglicoles, se pueden utilizar en los esqueletos poliméricos del primer y el segundo componente de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Tal como se utiliza aquí, el concepto “PEG” abarca polímeros que tienen la estructura repetitiva $(OCH_2CH_2)_n$.

10 En la **FIG. 3** se muestra una estructura de una forma de PEG activada de forma tetrafuncional, ya que es un producto de reacción generalizado obtenido mediante la reacción de un PEG activado de forma tetrafuncional con un PEG multiamino. Tal como muestra la figura, el grupo succinimidilo es una estructura anular de cinco miembros representada como $-N(COCH_2)_2$. En la **FIG. 3**, el símbolo \wedge indica un enlace abierto.

15 Algunas realizaciones incluyen la reacción de glutarato de succinimidilo PEG activado de forma tetrafuncional, designado aquí como SG-PEG, con PEG multiamino, y el producto de reacción así obtenido. Otra forma activada de PEG se designa como propionato de succinimidilo PEG (SE-PEG). Algunas realizaciones incluyen SE-PEG activados de forma tetrafuncional y el producto obtenido mediante la reacción de éstos con PEG multiamino. En algunas realizaciones existen tres grupos CH_2 que se repiten a cada lado del PEG. Otras realizaciones comprenden un conjugado que incluye un enlace “éter”, que es menos propenso a la hidrólisis. Este conjugado es distinto del mostrado en la **FIG. 3**, donde está previsto un enlace éster. El enlace éster es propenso a la hidrólisis bajo condiciones fisiológicas. Las realizaciones de la presente invención contemplan otras formas de polietilenglicol activadas funcionalmente, por ejemplo conjugados formados por la reacción de PEG activados de forma tetrafuncional con un PEG multiamino. En algunas realizaciones, el conjugado incluye tanto un enlace éter como un enlace amida. Estos enlaces son estables bajo condiciones fisiológicas.

25 Otra forma de PEG activada funcionalmente se designa como succinimidil succinamida PEG (SSA-PEG). Algunas realizaciones incluyen la forma tetrafuncionalmente activada de este compuesto y el producto obtenido sometiendo ésta con PEG multiamino. Estos y otros compuestos relacionados pueden ser también utilizados en las composiciones de acuerdo con realizaciones de la invención. Algunas realizaciones también comprenden un conjugado que incluye un enlace “amida” que, como el enlace éter anteriormente descrito, es menos propenso a la hidrólisis y, en consecuencia, es más estable que un enlace éter. Otra forma activada de PEG está prevista en una realización de un compuesto designado como carbonato de succinimidilo PEG (SC-PEG). Algunas realizaciones incluyen SC-PEG activado de forma tetrafuncional y el conjugado formado sometiendo éste a reacción con PEG multiamino.

35 Tal como se describe más arriba, los derivados de polietilenglicol activados a utilizar en realizaciones de la invención pueden contener grupos succinimidilo como grupos reactivos. No obstante, también se pueden unir diferentes grupos de activación en lugares a lo largo de la molécula de PEG. Por ejemplo, el PEG se puede derivar para formar propionaldehído de PEG activado funcionalmente (A-PEG). Algunas realizaciones comprenden la forma tetrafuncionalmente activada y el conjugado formado por la reacción de un A-PEG con PEG multiamino. El enlace se puede designar como enlace $-(CH_2)_m-NH$, siendo $m = 1-10$.

40 Otra forma más de polietilenglicol activado es el glicidil éter PEG activado funcionalmente (E-PEG). Algunas realizaciones comprenden el compuesto activado de forma tetrafuncional y también el conjugado formado por la reacción de éste con PEG multiamino. Otro derivado de polietilenglicol activado es el isocianato PEG activado funcionalmente (I-PEG). Algunas realizaciones incluyen el conjugado formado sometiendo a reacción dicho derivado con PEG multiamino. Otro derivado de polietilenglicol activado es la vinilsulfona PEG activada funcionalmente (V-PEG). Algunas realizaciones incluyen el conjugado formado sometiendo a reacción dicho derivado con PEG multiamino.

45 Polietilenglicoles activados de forma multifuncional a utilizar en las composiciones y otras realizaciones de la presente invención pueden incluir polietilenglicoles que contienen grupos succinimidilo, tal como SG-PEG y SE-PEG, que pueden estar en forma activada de modo trifuncional o tetrafuncional. Muchas de las formas de polietilenglicol activadas arriba descritas son ahora comerciales, de Shearwater Polymers, Huntsville, Ala., y Union Carbide, South Charleston, W.Va.

E. Derivación de los polímeros del primer y el segundo componente para que contengan grupos funcionales

50 Determinados polímeros, tales como los poliácidos, se pueden derivar para que contengan dos o más grupos funcionales tales como grupos succinimidilo. Los poliácidos a utilizar en la presente invención incluyen, sin limitación, ácido tricarbóxico basado en trimetilolpropano, ácido tetracarboxílico basado en di(trimetilolpropano), ácido heptanoico, ácido octanodioico (ácido subérico) y ácido hexadecanodioico (ácido tápsico). Muchos de estos poliácidos están comercialmente disponibles de DuPont Chemical Company.

De acuerdo con un método general, los poliácidos se pueden derivar químicamente para que contengan dos o más grupos succinimidilo por reacción con una cantidad molar apropiada de N-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

5 Polialcoholes tales como trimetilolpropano y di(trimetilolpropano) se pueden convertir en formas de ácido carboxílico utilizando diversos métodos y después se pueden derivar adicionalmente por reacción con NHS en presencia de DCC para producir polímeros activados de forma trifuncional y tetrafuncional, respectivamente, tal como se describe en la solicitud US Ser. No. 08/403.358. Poliácidos tales como el ácido heptanodioico ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$), ácido octanodioico ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$) y ácido hexadecanodioico ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$) se derivan mediante la adición de grupos succinimidilo para producir polímeros activados de forma difuncional.

10 Poliaminas tales como etilendiamina ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$), tetrametilendiamina ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$), pentametilendiamina (cadaverina) ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$), hexametilendiamina ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$), bis(2-hidroxiethyl)amina ($\text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), bis(2-aminoethyl)amina ($\text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$) y tris(2-aminoethyl)amina ($\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3$) se pueden derivar químicamente para obtener poliácidos, los cuales después se pueden derivar para que contengan dos o más grupos succinimidilo por reacción de cantidades molares apropiadas de N-hidroxisuccinimida en presencia de DCC, tal como se describe en la solicitud US
15 N° 08/403.358. Muchas de estas poliaminas son comerciales, disponibles de DuPont Chemical Company.

En algunas realizaciones, el primer componente reticulable (por ejemplo PEG multiamino) está presente en una concentración entre el 0,5 y el 20 por ciento en peso de la composición de componente reticulable total y el segundo componente reticulable está presente en una concentración entre el 0,5 y el 20 por ciento en peso de la composición de componente reticulable total. Por ejemplo, una composición de componente reticulable final que tiene un peso total de 1
20 gramo (1.000 miligramos) podría contener entre aproximadamente un 5 y aproximadamente 200 miligramos del primer componente reticulable (por ejemplo PEG multiamino) y entre 5 y 200 miligramos del segundo componente reticulable.

En algunas realizaciones, la proporción en peso entre el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable oscila entre el 20% y el 80%. En realizaciones relacionadas, dicha proporción oscila entre el 45% y el 55%. En algunos casos, la proporción es de aproximadamente el 50%. La proporción en peso se determina en base a un ensayo
25 de resistencia del gel. El primer componente reticulable y el segundo componente reticulable pueden tener el mismo peso molecular.

II. Componentes formadores de hidrogel a utilizar en la composición de matriz sellante

Los componentes formadores de hidrogel a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden incluir hidrogeles y geles reticulados moleculares biocompatibles reabsorbibles tal como los descritos en las patentes US 4.640.834, 5.209.776,
30 5.292.362, 5.714.370, 6.063.061 y 6.066.325. Algunos materiales producidos mediante las técnicas descritas en dichas patentes están comercialmente disponibles bajo la marca FLOSEAL, de Baxter Healthcare Corporation, en un *kit* para mezcla con una solución de trombina para su uso como agentes hemostáticos. Alternativamente, en la invención se puede utilizar cualquier polímero reticulado hidratable como componente formador de hidrogel. Por ejemplo, se pueden utilizar
35 alginatos, agarosas, gelatinas (por ejemplo polvo SURGIFOAM[™]) u otros polímeros reticulados hidratables sintéticos basados en carbohidratos o proteínas. Las características principales de los componentes formadores de hidrogel útiles son la biocompatibilidad, la rápida absorción y la retención de fluidos. Por consiguiente, aunque en la invención se puede utilizar poliacrilamida como componente formador de hidrogel, ésta sería menos preferente debido a su baja biocompatibilidad en muchas aplicaciones internas. Con frecuencia, los polímeros reticulados hidratables a utilizar como
40 componente formador de hidrogel tienen un tamaño de partícula de 70 a 300 micras y un pH de 6,8 a 9,5. Los componentes formadores de hidrogel pueden proporcionar estabilidad mecánica al primer y el segundo componente reticulable, en particular cuando la matriz sellante se ve sometida a fuerzas, presiones o diluciones.

En algunas realizaciones, la proporción en peso entre el primer y el segundo componente reticulable y el componente formador de hidrogel oscila entre el 28% y el 42% p/p. En algunos casos, la composición puede contener una
45 concentración del primer y el segundo componente reticulable combinados que constituye del 5% al 75% de la masa total de la composición y una concentración del componente formador de hidrogel que constituye del 95% al 25% de la masa total de la composición. En relación con esto, la composición puede contener una concentración del primer y el segundo componente reticulable combinados que constituye del 5% al 40% de la masa total de la composición y una concentración del componente formador de hidrogel que constituye del 95% al 60% de la masa total de la composición. Similarmente,
50 la composición puede contener una concentración del primer y el segundo componente reticulable combinados que constituye del 10% al 30% de la masa total de la composición y una concentración del componente formador de hidrogel que constituye del 90% al 70% de la masa total de la composición. Por ejemplo, una composición puede contener aproximadamente un 20% del primer y el segundo componente reticulable combinados y aproximadamente un 80% de
componente formador de hidrogel. En algunas realizaciones, la composición del primer y el segundo componente reticulable combinados puede tener una proporción en peso fija de 50:50% y la relación en peso de la composición del
55 primer y el segundo componente reticulable combinados con respecto al componente formador de hidrogel puede oscilar entre el 20% y el 30%. La relación p/p de la composición del primer y el segundo componente reticulable combinados con respecto al componente formador de hidrogel se puede seleccionar en base a ensayos de resistencia/adherencia del gel.

El componente formador de hidrogel puede actuar como absorbente para proporcionar una superficie semiseca que permite la polimerización del primer y el segundo componente reticulable. Algunas realizaciones de la presente invención comprenden *kits* de composición de matriz sellante seca que incluye componentes reticulables y componentes formadores de gel en cantidades correspondientes a dichas proporciones.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones, el término “biocompatible” se refiere a materiales que cumplen los criterios de la norma # ISO 10993-1 promulgada por la Organización Internacional de Normalización (NANSA, Northwood, Ohio). De acuerdo con algunas realizaciones, el término “reabsorbible” se refiere a composiciones que, cuando se disponen directamente en un sitio diana del cuerpo de un paciente (y no están protegidos dentro de un dispositivo de implante tal como un implante de mama), se degradan o solubilizan en un período de tiempo inferior a un año, normalmente de 1 a 120 días. Son conocidos métodos para medir la reabsorción y la degradación. De acuerdo con algunas realizaciones, el concepto “reticulado molecular” se refiere a materiales que incluyen moléculas poliméricas (es decir, cadenas individuales) que están unidas por puentes formados por un elemento, un grupo o un compuesto, estando unidos los átomos del esqueleto de las moléculas poliméricas por enlaces químicos primarios. La reticulación se puede realizar de diversos modos, tal como se describe más abajo de forma más detallada.
- 10
- 15 De acuerdo con algunas realizaciones, el término “hidrogel” abarca composiciones que incluyen un coloide acuoso en fase simple donde un polímero biológico o no biológico, tal como se define más abajo de forma más detallada, absorbe agua o un tampón acuoso. Un hidrogel puede comprender múltiples subredes, consistiendo cada subred en un hidrogel reticulado molecular cuyas dimensiones dependen del grado de hidratación y que están dentro de los márgenes arriba indicados. Con frecuencia, los hidrogeles contienen poca o nada de agua libre, es decir, el agua no se puede eliminar del hidrogel mediante filtración simple.
- 20

El concepto “hinchamiento porcentual” se puede definir como el peso seco restado del peso húmedo, dividido entre el peso seco y multiplicado por 100, midiendo el peso húmedo después de eliminar el agente humectante de la forma más completa posible del exterior del material, por ejemplo por filtración, y midiendo el peso seco después de una exposición a temperatura elevada durante un tiempo suficiente para evaporar el agente humectante, por ejemplo 2 horas a 120°C.

- 25 El concepto “hinchamiento de equilibrio” se puede definir como el hinchamiento porcentual en equilibrio después de que el material polimérico reticulado hidratable se ha sumergido en un agente humectante durante un período de tiempo suficiente para que el contenido de agua sea constante, típicamente de 18 a 24 horas.

- El “sitio diana” es típicamente el lugar al que suministra la composición de matriz sellante, normalmente una brecha o defecto en tejido. Con frecuencia, el sitio diana será el lugar de interés del tejido, pero en algunos casos la composición de matriz sellante se puede administrar o disponer en un lugar cercano al lugar de interés, por ejemplo cuando el material se hincha *in situ* cubriendo el lugar de interés.
- 30

- Los polímeros reticulados hidratables a utilizar como componentes formadores de hidrogel en al menos algunas de las realizaciones de la presente invención se pueden formar a partir de polímeros biológicos y no biológicos. Polímeros biológicos adecuados incluyen proteínas como gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, caseína, fibrinógeno, fibrina, fibronectina, elastina, queratina, laminina y derivados y combinaciones las mismas. El colágeno no fibrilar soluble también es adecuado. Más abajo se muestran ejemplos de formulaciones de gelatinas. Otros polímeros biológicos adecuados incluyen polisacáridos como glicosaminoglicanos (por ejemplo ácido hialurónico y sulfato de condroitina), derivados de almidón, xilano, derivados de celulosa, derivados de hemicelulosa, agarosa, alginato, quitosano y derivados y combinaciones de éstos. Los polímeros no biológicos adecuados se pueden seleccionar para que sean biodegradables mediante cualquiera de dos mecanismos, es decir, (1) descomponiendo el esqueleto polimérico, o (2) degradando cadenas laterales, lo que resulta en que son solubles en agua. Ejemplos de polímeros no biológicos incluyen materiales sintéticos tales como poliácridatos, polimetacrilatos, poliácridamidas, resinas de polivinilo, polilactida-glicólidos, policaprolactonas, polioxitilenos y derivados y combinaciones de los mismos.
- 35
- 40

- Las moléculas poliméricas reticuladas hidratables a utilizar como componentes formadores de hidrogel se pueden reticular mediante cualquier método adecuado para formar un hidrogel acuoso. Por ejemplo, estas moléculas poliméricas se pueden reticular utilizando agentes reticulantes bi- o polifuncionales que se unen de forma covalente a dos o más cadenas de moléculas poliméricas. Ejemplos de agentes reticulantes bifuncionales incluyen aldehídos, epoxis, succinimidias, carbodiimidias, maleimidias, azidas, carbonatos, isocianatos, divinilsulfona, alcoholes, aminas, imidatos, anhídridos, haluros, silanos, diazoacetatos, aziridinas y similares. Alternativamente, la reticulación se puede lograr utilizando oxidantes y otros agentes, como peryodatos, que activan cadenas laterales o fracciones poliméricas de modo que éstas pueden reaccionar con otras cadenas laterales o fracciones para formar los enlaces de reticulación. Otro método de reticulación consiste en exponer los polímeros a radiación, por ejemplo radiación gamma, para activar el polímero lateral con el fin de posibilitar las reacciones de reticulación. También son adecuados los métodos de reticulación deshidrotérmica. La reticulación deshidrotérmica de gelatina se puede lograr manteniendo ésta a una temperatura elevada, típicamente a 120°C, durante un período de al menos 8 horas. La amplitud de la reticulación se puede incrementar (lo que se manifiesta en una disminución del hinchamiento porcentual en equilibrio) elevando la temperatura, prolongando el tiempo de mantenimiento de dicha temperatura o combinando ambos métodos. Si se trabaja a presión
- 45
- 50
- 55

reducida, se puede acelerar la reacción de reticulación. Más abajo se describen métodos preferentes para reticular moléculas de gelatina.

5 Los hidrogeles pueden incluir un plastificante para aumentar la maleabilidad, la flexibilidad y la tasa de degradación del hidrogel. El plastificante puede ser un alcohol tal como polietilenglicol, sorbitol o glicerol. Con frecuencia, el plastificante será un polietilenglicol con un peso molecular entre 200 y 1.000 D o con un peso molecular de aproximadamente 400 D. Los plastificantes pueden estar presentes en el hidrogel en una cantidad entre el 0,1% en peso y el 30% en peso, preferentemente entre el 1% en peso y el 5% en peso de la composición polimérica. Los plastificantes pueden ser particularmente beneficiosos cuando se utilizan con hidrogeles de alto contenido en sólidos, típicamente por encima del 10% en peso de la composición (sin plastificante).

10 A continuación se describen métodos ilustrativos para producir gelatinas reticuladas moleculares. Se obtiene gelatina y se dispone en un tampón acuoso para formar un gel no reticulado, típicamente con un contenido en sólidos del 1% al 70% en peso o del 3% al 10% en peso. La gelatina se reticula, típicamente mediante exposición a glutaraldehído (por ejemplo del 0,01% al 0,05% p/p, durante una noche a temperatura de 0°C a 15°C en tampón acuoso), peryodato de sodio (por ejemplo 0,05M, mantenido a una temperatura de 0°C a 8°C durante 48 horas) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ("EDC") (por ejemplo, del 0,5% al 1,5% p/p, durante una noche a temperatura ambiente) o mediante exposición a aproximadamente 0,3 - 3 megarad de radiación gamma o haz electrónico. Alternativamente se pueden suspender partículas de gelatina en un alcohol, tal como metanol o etanol, en un contenido de sólidos del 1% al 70% en peso o del 3% al 10% en peso, y reticular mediante exposición a un agente reticulante, típicamente glutaraldehído (por ejemplo del 0,01% al 0,1% p/p, durante una noche a temperatura ambiente). En el caso de los aldehídos, el pH se mantiene típicamente en un valor entre aproximadamente 6 y aproximadamente 11 o entre 7 y 10. Cuando se reticula con glutaraldehído, la reticulación se consigue a través de bases de Schiff que se pueden estabilizar por reducción subsiguiente, por ejemplo por tratamiento con borohidruro de sodio. Después de la reticulación, los gránulos resultantes se pueden lavar con agua y opcionalmente enjuagar en un alcohol, secar y resuspender hasta el grado de hidratación deseado en un medio acuoso que tiene un tampón y un valor pH deseados. Los hidrogeles resultantes se pueden cargar después en los dispositivos de aplicación de la presente invención, tal como se describe más abajo de forma más detallada. Alternativamente, los hidrogeles se pueden romper mecánicamente antes o después de la reticulación, también tal como se describe más abajo de forma más detallada.

30 A continuación se describen ejemplos de métodos para producir composiciones de gelatina reticulada molecular que presentan hinchamientos porcentuales de equilibrio entre el 400% y el 1.300% o entre el 600% y el 950%. Se obtiene gelatina y se dispone en un tampón acuoso (típicamente con un pH de 6 a 17 o entre 7 y 10) que contiene un agente reticulante en solución (habitualmente glutaraldehído, típicamente a una concentración del 0,01% al 0,1% p/p) para formar un gel que típicamente tiene un contenido en sólidos entre el 1% y el 70% en peso, normalmente entre el 3% y el 10% en peso. El gel se mezcla bien y se mantiene durante una noche a una temperatura de 0°C a 15°C mientras se produce la reticulación. Después se enjuaga tres veces con agua desionizada, dos veces con un alcohol (preferentemente metanol, etanol o isopropanol) y se deja secar a temperatura ambiente. Opcionalmente, el gel se puede tratar con borohidruro de sodio para estabilizar adicionalmente la reticulación. En algunos casos, el componente formador de hidrogel puede incluir una gelatina que tiene, por ejemplo, una gran cantidad de residuos glicina (por ejemplo 1 de 3 dispuestos cada tercer residuo), prolina y residuos 4-hidroxiprolina. La **FIG. 5** muestra un ejemplo de una subunidad de gelatina. Algunas realizaciones de gelatina incluyen moléculas con la siguiente composición de aminoácidos: glicina 21%, prolina 12%, hidroxiprolina 12%, ácido glutámico 10%, alanina 9%, arginina 8%, ácido aspártico 6%, lisina 4%, serina 4%, leucina 3%, valina 2%, fenilalanina 2%, treonina 2%, isoleucina 1%, hidroxilisina 1%, metionina e histidina <1% y tirosina <0,5%. La **FIG. 6** ilustra la correlación entre el hinchamiento porcentual y el porcentaje de sólidos de una realización de gel polimérico reticulado fragmentado útil como componente formador de hidrogel en una composición sellante.

45 Preferentemente, los hidrogeles reticulados moleculares se rompen mecánicamente en un proceso por lotes antes de ser utilizados como componente formador de hidrogel. El objetivo principal de este paso de ruptura mecánica es crear múltiples subunidades de hidrogel con un tamaño que aumenta la capacidad para rellenar y empaquetar el espacio donde son suministradas. Sin la ruptura mecánica, los hidrogeles reticulados moleculares tienen dificultad para rellenar y adaptarse a espacios diana con formas irregulares a tratar. Mediante la ruptura del hidrogel en subunidades de menor tamaño, dichos espacios se pueden rellenar mucho más eficazmente, manteniendo al mismo tiempo la integridad mecánica y la persistencia del hidrogel reticulado.

50 La reticulación molecular de las cadenas poliméricas del hidrogel se puede llevar a cabo antes o después de su ruptura mecánica. Los hidrogeles se pueden someter a ruptura mecánica en operaciones por lotes, por ejemplo de mezclado, siempre que la composición de hidrogel se rompa en subunidades con un tamaño dentro del intervalo de 0,01 mm a 5,00 mm arriba indicado. Otros procesos de ruptura mecánica por lotes incluyen el bombeo a través de una homogeneizadora o mezcladora o a través de una bomba que comprime, estira o corta el hidrogel hasta un nivel que supera un límite elástico de rotura del hidrogel. En algunos casos, la extrusión de la composición polimérica provoca que el hidrogel se transforme de una red esencialmente continua, es decir una red que se extiende en las dimensiones de la masa de hidrogel original, en un grupo de subredes o subunidades con dimensiones dentro de los intervalos arriba indicados.

En una realización actualmente preferente, el polímero reticulado hidratable se puede preparar inicialmente (por ejemplo mediante secado por pulverización) y/o se puede romper mecánicamente antes de reticularlo, con frecuencia normalmente antes de la hidratación para formar un hidrogel. El polímero reticulado hidratable se puede suministrar en forma de un sólido seco finamente dividido o en un polvo que se puede someter a una trituration adicional para obtener partículas del tamaño deseado, normalmente limitado estrechamente dentro de un intervalo pequeño. Además se pueden llevar a cabo pasos de selección de tamaño y modificación, por ejemplo tamizado, clasificación en ciclón, etc. En el caso de los ejemplos de materiales de gelatina descritos más abajo, el tamaño de partícula seca oscila preferentemente entre 0,01 mm y 1,5 mm, de forma especialmente preferente entre 0,05 mm y 1,0 mm. En un ejemplo de distribución granulométrica, más de aproximadamente un 95% en peso de las partículas tienen un tamaño entre 0,05 y 0,7 mm. Como métodos para triturar el material polimérico inicial se incluyen homogeneización, pulverización, coacervación, molienda, molienda por chorro y similares. Los materiales poliméricos iniciales también se pueden formar mediante secado por pulverización. Además, la distribución granulométrica se puede controlar y refinar mediante técnicas convencionales, tales como tamizado, agregación, molienda adicional y similares.

Después, el sólido en polvo seco se puede suspender en un tampón acuoso, tal como se describe en otro lugar de este documento, y reticularse. En otros casos, el polímero reticulado hidratable se puede suspender en un tampón acuoso, reticular y después secar. El polímero seco reticulado se puede someter a ruptura y el material roto se puede suspender a continuación en un tampón acuoso. En todos los casos, el material resultante consiste en un hidrogel reticulado que tiene subredes diferenciadas con las dimensiones arriba indicadas.

Típicamente, después de la ruptura mecánica, los polímeros reticulados hidratables útiles como componentes formadores de hidrogel serán reabsorbibles, es decir se biodegradarán en el cuerpo del paciente en un período de menos de un año, normalmente de 1 a 120 días, preferentemente de 1 a 90 días y de forma especialmente preferente de 2 a 30 días desde su aplicación inicial. Existen técnicas conocidas para medir el tiempo necesario de reabsorción.

III. Preparación y utilización de un grupo de realizaciones de las composiciones de matriz sellantes: combinación de matriz porosa y polímero reticulado hidratable

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden un primer componente reticulado combinado con un segundo componente reticulado que se pueden reticular para formar una matriz porosa que presenta intersticios y que se combina con un polímero reticulado hidratable que se puede hidratar para formar un gel que rellena al menos algunos de los intersticios. Se entenderá que las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para diversas aplicaciones biomédicas, incluyendo cada una de las aplicaciones arriba descritas con referencia a la modificación de (1) el primer y el segundo componente (es decir, la matriz porosa) y (2) el polímero reticulado hidratable. Por ejemplo, estas composiciones pueden actuar como un material de sellado mecánico para detener o inhibir una hemorragia mediante la formación rápida de una barrera física para la sangre. Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención pueden dar resultado sin ningún efecto "hemostático" directo (por ejemplo, efecto bioquímico en la cascada de coagulación; aportación de iniciadores de coagulación).

El componente formador de hidrogel puede servir como absorbente (por ejemplo para sangre y otros fluidos y tejidos). Al absorber la sangre, el componente formador de hidrogel puede asegurar el mantenimiento de una mayor concentración del primer y el segundo componente reticulado en el sitio de tratamiento, y también puede asegurar la provisión de una superficie semiseca para que el primer y el segundo componente reticulables se reticulen entre sí y con los tejidos circundantes. En algunas realizaciones, el primer y el segundo componente se pueden reticular al mismo tiempo que el componente formador de hidrogel absorbe sangre. Esta absorción y reticulación se pueden producir en cuestión de segundos y la barrera de matriz sellante resultante puede alcanzar plena resistencia en un plazo de 30 minutos a una hora.

En general, las composiciones de matriz sellante están "secas", aunque puede existir un cierto contenido mínimo de humedad, por ejemplo en el componente formador de hidrogel. En algunos casos es posible prehidratar parcialmente el polímero reticulado hidratable antes de la aplicación, aunque puede ser necesario hacerlo a un pH superior al pH fisiológico o bajo otras condiciones que impidan que el primer y el segundo componente se reticulen antes de la aplicación en el sitio diana. Con frecuencia, las composiciones de matriz sellante estarán en forma de polvo o de torta fundida.

Las concentraciones del primer componente y el segundo componente utilizados para preparar las composiciones de matriz sellante pueden variar en función de una serie de factores, incluyendo el tipo y el peso molecular de los componentes reticulables particulares utilizados y el uso final deseado. En algunas realizaciones, la proporción en peso entre el primer y el segundo componente y el componente formador de hidrogel oscila entre el 10 y el 50% p/p, 15-45% p/p, 20-42% p/p, 30-40% p/p y 28-42% p/p. En algunas realizaciones, los tamaños de partícula del primer y el segundo polímero pueden oscilar entre 50 y 90 micras. En algunas realizaciones, los tamaños de partícula del polímero reticulado hidratable pueden oscilar entre aproximadamente 250 y aproximadamente 400 micras.

En algunas realizaciones, el primer y el segundo componente se pueden suministrar en forma particulada o como polvo seco. En esta forma, el primer y el segundo componente se pueden mezclar entre sí y también se pueden mezclar con el

componente formador de hidrogel, también en forma de partículas o polvo seco. Los componentes se pueden mezclar por cualquier medio de mezcla mecánico, por ejemplo con cuchillas de molienda. La composición de matriz sellante en polvo seco resultante se puede envasar en diversos recipientes, por ejemplo cajas de cartón, sobres, tarros y similares. La mezcla y el envasado se pueden llevar a cabo bajo condiciones asépticas o la composición de matriz sellante se puede esterilizar después del envasado, por ejemplo con radiación gamma. Después, las realizaciones en polvo seco de la invención están listas para el uso. El primer y el segundo polímero reticulable reaccionarán reticulándose bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo a pH sanguíneo) y, en consecuencia, la composición de matriz sellante de tres componentes se puede aplicar directamente de forma seca en el sitio deseado para obturar un defecto de un tejido, siempre que haya suficiente fluido corporal hidratante presente. Por consiguiente, la composición de matriz sellante en polvo se puede echar simplemente encima y dentro del sitio diana en el defecto del tejido y mantener en dicho lugar (por ejemplo con una compresa de gasa o un guante estéril) hasta que se forme la barrera de matriz sellante. Esto es particularmente útil y conveniente en situaciones de emergencia (por ejemplo en una sala de emergencias o en un campo de batalla) en las que es deseable disponer de productos listos para el uso que puedan ser utilizados para heridas en tejidos de diferente tamaño.

En otras realizaciones, el primer y el segundo componente y el componente formador de hidrogel se pueden inmovilizar sobre un soporte, o apoyo, formando una "compresa de matriz sellante". En estas realizaciones se prepara un soporte, tal como una esponja de colágeno, y la composición de matriz sellante se fija sobre el soporte para el uso. Debido a que las composiciones de matriz sellante se unen fácilmente a tejidos, materiales orgánicos y materiales sintéticos, estas realizaciones pueden resultar ventajosas, ya que permiten utilizar un soporte que se maneja más fácilmente para aplicar la composición de matriz sellante. Dado que para crear una barrera de matriz sellante eficaz se requiere una cantidad relativamente pequeña de composición de matriz sellante, sobre el soporte se puede fijar una capa relativamente delgada de dicha composición. A modo ilustrativo, en los ejemplos mostrados más abajo, tan solo 0,5 - 1,0 g de composición de matriz de obturación fijados sobre la superficie crearon una compresa de 3 cm x 3 cm con muy buenas propiedades hemostáticas. Como entenderán los expertos en la técnica quirúrgica, estas realizaciones son deseables en situaciones en las que se prevé el tamaño del defecto del tejido y cuando se desean unas características de manipulación mejoradas en comparación con un polvo. Como en las realizaciones de polvo seco, las realizaciones en compresas de matriz sellante de las composiciones de matriz sellante se pueden aplicar directamente al defecto del tejido, sin más preparación, apretando el lado de la composición de la compresa contra el defecto del tejido hasta que se hayan reticulado los componentes reticulables.

El soporte para las realizaciones en compresa de matriz sellante de la invención puede ser cualquier material biocompatible. Aunque aquí se describen detalladamente soportes de colágeno, también se pueden utilizar otros materiales para soportes. Por ejemplo se puede utilizar otro material de soporte de proteína o polisacárido que sea biocompatible. Estos materiales de soporte se pueden degradar *in vivo* aproximadamente a la misma velocidad que la barrera de matriz sellante o se pueden degradar a velocidades diferentes de la citada. Las esponjas de colágeno y su preparación son bien conocidas en la técnica quirúrgica, la preparación y manipulación del colágeno se describe con todo detalle más abajo. También se pueden utilizar esponjas preparadas a partir de fibrina. Igualmente se pueden emplear materiales basados en carbohidratos, tales como celulosa (para aplicaciones externas) o quitosano. Además se pueden utilizar polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables. Los expertos en la técnica quirúrgica entenderán que, para los soportes de las realizaciones en compresa de matriz sellante de la invención, se pueden utilizar otras formas diferentes a las esponjas. Por ejemplo, se puede utilizar una lámina o película de colágeno o de otros materiales. Además, el soporte puede tener cualquier forma útil, tal como forma de cono, hemisferio, barra, cuña y similares, para disponer de una compresa que se aproxime más a la forma del defecto del tejido. Por ejemplo, una compresa de matriz sellante que utilice una esponja de colágeno en forma de cono como soporte puede ser útil para tratar una herida de bala.

Típicamente, estos soportes actuarán como componente estructural o mecánico. Los soportes pueden tener cierto grado de porosidad para permitir que la sangre u otros líquidos se filtren en él y tengan un mayor contacto con las composiciones. Estas construcciones pueden presentar un factor de hinchamiento de 1,3X a 1,5X y, en consecuencia, pueden ser ideales para aplicaciones quirúrgicas. Por ejemplo, las composiciones con soporte en esponja se pueden utilizar en neurocirugía para sellar la duramadre, donde un hinchamiento excesivo puede ejercer una presión no deseada sobre el cerebro. En general, los soportes han de ser lo suficientemente flexibles para adaptarse a un defecto de tejido típico y han de presentar buenas propiedades de manipulación en el contexto de la cirugía.

Las composiciones de matriz sellante se pueden inmovilizar sobre el soporte por diversos medios. En algunas realizaciones descritas más abajo, un calor moderado es suficiente para inmovilizar las composiciones de matriz sellante en polvo que contienen un primer y un segundo componente de PEG de 4 brazos y un componente formador de hidrogel de gelatina reticulada. En estas realizaciones, la composición de matriz sellante en polvo se dispuso sobre una esponja de colágeno y se calentó a 60-70°C durante aproximadamente 1-2 minutos. La matriz en polvo seco se fundió ligeramente con este calor, fijándose a la superficie de la esponja de colágeno. Alternativamente, la composición de matriz sellante se puede fijar al soporte utilizando agentes aglutinantes u otros excipientes conocidos en la técnica farmacéutica. En general, la técnica utilizada para fijar la composición de matriz sellante al soporte dependerá del primer y el segundo componente y del componente formador de hidrogel de la composición. El método utilizado para fijar la composición de matriz sellante sobre el soporte no debería reducir de forma apreciable la capacidad del primer y el segundo componente para reticularse

al ser expuestos a condiciones fisiológicas, ni la capacidad del componente formador de hidrogel para absorber fluidos biológicos.

5 En otras realizaciones, la composición de matriz sellante se puede conformar en una lámina o película sin ningún soporte. Esta conformación de la composición de matriz sellante se puede lograr utilizando los métodos arriba descritos para fijar la composición de matriz sellante a un soporte en las realizaciones en compresión de matriz sellante.

IV. Adición de componentes adicionales a la composición de matriz sellante

10 En realizaciones adicionales de la presente invención, a las composiciones de matriz sellante de la invención se pueden añadir otros componentes además del primer y el segundo componente adicional y el componente formador de hidrogel. En general, estos componentes adicionales se pueden mezclar con el primer y el segundo componente y con el componente formador de hidrogel en seco. Los componentes adicionales pueden aportar más resistencia mecánica o mejorar de otro modo el rendimiento de las composiciones de matriz sellante de la invención para aplicaciones particulares. Por ejemplo, como es opaco o menos pegajoso que el colágeno no fibrilar, el colágeno fibrilar a veces puede ser menos preferible para su uso en composiciones bioadhesivas. No obstante, tal como se describe en la patente US 5.614.587, el colágeno fibrilar o las mezclas de colágeno fibrilar y no fibrilar pueden ser preferibles para su uso en 15 composiciones adhesivas previstas para una persistencia a largo plazo *in vivo*. En la composición se pueden incorporar diversos derivados de glicosaminoglicano desacetilados y/o desulfatados de modo similar al arriba descrito en relación con el colágeno.

20 En la barrera de matriz sellante se pueden incorporar proteínas naturales como colágeno y derivados de diversos polisacáridos naturales como glicosaminoglicanos cuando el primer y el segundo componente de la invención reaccionan y se reticulan bajo condiciones fisiológicas. Si estos otros componentes también contienen grupos funcionales reactivos con los grupos funcionales de los polímeros sintéticos, su presencia durante la reticulación del primer y el segundo componente en el sitio diana conducirá a la formación de una matriz de polímero sintético-polímero natural reticulada. En particular, si el polímero natural (proteína o polisacárido) también contiene grupos nucleófilos, tales como grupos amino primarios, los grupos electrófilos del segundo componente reticulable reaccionarán con los grupos amino primarios de éstos, al igual que los grupos nucleófilos del primer componente reticulable, haciendo que estos otros componentes pasen a formar parte de la barrera de matriz sellante. 25

30 En general, los glicosaminoglicanos típicamente se derivan químicamente por desacetilación, desulfatación, o ambas, para que contengan grupos amino primarios disponibles para la reacción con los grupos electrófilos del segundo componente reticulable. Los glicosaminoglicanos que se pueden derivar de acuerdo con cualquiera de los dos métodos arriba mencionados o con ambos incluyen los siguientes: ácido hialurónico, sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B (sulfato de dermatán), sulfato de condroitina C, quitina (que se puede derivar en quitosano), sulfato de queratano, queratosulfato y heparina. La derivación de glicosaminoglicanos por desacetilación y/o desulfatación y enlace covalente de los derivados de glicosaminoglicano resultantes con polímeros hidrófilos sintéticos se describe más detalladamente en la patente US 5.510.418.

35 Similarmente, los grupos electrófilos del segundo componente reticulable pueden reaccionar con los grupos amino primarios de residuos de lisina o con grupos tiol de residuos de cisteína de determinadas proteínas naturales. Las proteínas ricas en lisina, como el colágeno y sus derivados, son especialmente reactivas con grupos electrófilos de polímeros sintéticos. Tal como se utiliza aquí, el término "colágeno" abarca colágeno de cualquier tipo, de cualquier procedencia, incluyendo, de forma no limitativa, colágeno extraído de tejido o producido de forma recombinante, análogos de colágeno, derivados de colágeno, colágenos modificados y colágenos desnaturalizados tales como gelatinas. El enlace covalente del colágeno con los polímeros hidrófilos sintéticos se describe detalladamente en la patente US 5.162.430, concedida el 10 de noviembre de 1992 a Rhee y col.. 40

45 En general, en las composiciones de la invención se puede utilizar colágeno de cualquier procedencia. Por ejemplo, se puede extraer y purificar colágeno procedente de un humano o mamífero, por ejemplo de corion bovino o porcino y de placenta humana, o se puede producir mediante técnicas de recombinación o de otro modo. La preparación de colágeno purificado (esencialmente no antigénico) en solución a partir de piel bovina es bien conocida en la técnica. La patente US 5.428.022, concedida el 27 de junio de 1995 a Palefsky y col., describe métodos de extracción y purificación de colágeno de placenta humana. La patente US 5.667.839 describe métodos para producir colágeno humano recombinante de leche de animales transgénicos, incluyendo vacas transgénicas. Tal como se utiliza aquí, el concepto "colágeno" o "material de colágeno" se refiere a todas las formas de colágeno, incluyendo aquellas que han sido procesadas o modificadas de otro modo. 50

55 En las composiciones de la invención se puede utilizar colágeno de cualquier tipo, incluyendo, de forma no limitativa, los tipos I, II, III, IV o cualquier combinación de éstos, aunque con frecuencia es preferible el tipo I. Se puede utilizar colágeno atelopéptido o con contenido en telopéptidos. No obstante, cuando se utiliza colágeno de una fuente xenogénica, tal como colágeno bovino, frecuentemente es preferible el colágeno atelopéptido debido a su inmunogenicidad reducida en comparación con el colágeno que contiene telopéptidos.

En las composiciones de la invención se puede utilizar colágeno que no ha sido previamente reticulado mediante métodos tales como calor, irradiación o agentes reticulantes químicos y también se puede utilizar colágeno previamente reticulado. El colágeno fibrilar atelopéptido no reticulado está comercialmente disponible de Collagen Corporation (Palo Alto, Calif.) en concentraciones de colágeno de 35 mg/ml y 65 mg/ml bajo las marcas Zydem® I Collagen y Zydem Collagen, respectivamente. El colágeno fibrilar atelopéptido reticulado con glutaraldehído está comercialmente disponible de Collagen Corporation en una concentración de colágeno de 35 mg/ml bajo la marca Zyplast® Collagen. Los colágenos utilizados en la presente invención están generalmente en forma de polvo liofilizado seco.

Debido a su consistencia pegajosa, el colágeno no fibrilar se utiliza típicamente en composiciones de la invención previstas para ser utilizadas como bioadhesivos. El concepto "colágeno no fibrilar" abarca cualquier material de colágeno modificado o no modificado que está en forma esencialmente no fibrilar a pH 7, tal como indica la claridad óptica de una suspensión acuosa del colágeno.

En las composiciones de la invención se puede utilizar colágeno que ya está en forma no fibrilar. Tal como se utiliza aquí, el concepto "colágeno no fibrilar" abarca tipos de colágeno que no son fibrilares en forma nativa y también colágenos que han sido modificados químicamente para que se encuentren en forma no fibrilar a pH neutro o aproximadamente neutro. Los tipos de colágeno que no son fibrilares (o microfibrilares) en forma nativa incluyen los tipos IV, VI y VII.

Los colágenos modificados químicamente que se encuentran en forma no fibrilar a pH neutro incluyen colágeno succinilado y colágeno metilado, ambos producibles de acuerdo con métodos descritos en la patente US 4.164.559, concedida el 14 de agosto de 1979 a Miyata y col. Debido a su pegajosidad inherente, el colágeno metilado se utiliza típicamente en composiciones bioadhesivas, tal como se describe en la patente US 5.614.587.

Los colágenos a utilizar en las composiciones de matriz sellante de la presente invención se pueden encontrar en principio en forma fibrilar y después volverse no fibrilares por la adición de uno o más agentes de descomposición de fibras. El agente de descomposición de fibras está presente típicamente en una cantidad suficiente para hacer que el colágeno se vuelva esencialmente no fibrilar a pH 7, tal como se describe más arriba. Los agentes de descomposición de fibras a utilizar en la presente invención incluyen, de forma no limitativa, diversos alcoholes biocompatibles, aminoácidos, sales inorgánicas y carbohidratos, siendo particularmente preferentes los alcoholes biocompatibles. Los alcoholes biocompatibles preferentes incluyen glicerol y propilenglicol. En algunos casos, los alcoholes no biocompatibles, como etanol, metanol o isopropanol, pueden no ser deseables para su uso en el primer y el segundo polímero de la presente invención debido a los efectos perjudiciales que producen en el cuerpo del paciente que los recibe. Los ejemplos de aminoácidos incluyen arginina. Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen cloruro de sodio y cloruro de potasio. Aunque en la práctica de la presente invención se pueden utilizar carbohidratos, por ejemplo diversos azúcares incluyendo sacarosa, éstos no son tan preferentes como otros tipos de agentes de descomposición de fibras, ya que pueden tener efectos citotóxicos *in vivo*.

Para su uso en la adhesión de tejidos además de como sellante, puede ser deseable incorporar a la misma proteínas tales como albúmina, fibrina o fibrinógeno para promover la adhesión celular. Además, la introducción de hidrocoloides como carboximetilcelulosa puede promover la adhesión de tejidos y/o la capacidad de hinchamiento.

Las composiciones de matriz sellante de la presente invención pueden incluir también uno o más agentes o compuestos biológicamente activos adicionales. En una realización se pueden añadir agentes biológicamente activos tales como derivados de taxol a la composición de matriz sellante para evitar la adhesión en el sitio del defecto del tejido. En otras realizaciones se pueden añadir agentes biológicamente activos tales como antibióticos o agentes antimicrobianos a la matriz sellante para utilizar éstas, por ejemplo, en heridas inducidas por traumatismo (por ejemplo heridas de cuchillo o de bala), en las que organismos patógenos pueden haber entrado en el sitio del defecto del tejido o herida. En otras realizaciones, la composición puede suministrar agentes biológicamente activos tales como factores de crecimiento a un sitio de tejido local para facilitar la curación y regeneración del tejido. En otras realizaciones se pueden añadir agentes de coagulación sanguínea, por ejemplo trombina, para mejorar el sellado y la regeneración del tejido mediante la activación de la cascada de coagulación. Ejemplos de componentes bioactivos incluyen, de forma no limitativa, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y moléculas biológicamente activas inorgánicas y orgánicas tales como enzimas, antibióticos, agentes antineoplásicos, agentes bacteriostáticos, agentes de formación antiadhesión (tales como derivados de taxol), bactericidas, antivirales, hemostáticos, anestésicos locales, antiinflamatorios, hormonas, antiangiogénicos, anticuerpos, neurotransmisores, fármacos psicoactivos, fármacos que afectan a órganos reproductores y oligonucleótidos tales como oligonucleótidos antisentido. Tal como se utiliza aquí, el concepto "agente biológicamente activo" o "agente activo" abarca moléculas orgánicas e inorgánicas que ejercen efectos biológicos *in vivo*. Ejemplos de agentes activos incluyen, de forma no limitativa, enzimas, antagonistas o agonistas de receptores, hormonas, factores de crecimiento, médula espinal autógena, antibióticos, agentes de formación antiadhesión, agentes antimicrobianos, otros agentes farmacéuticos y anticuerpos. El concepto "agente activo" también abarca combinaciones o mezclas de dos o más agentes activos, tal como se define más arriba.

Típicamente, estos componentes bioactivos estarán presentes en concentraciones relativamente bajas, típicamente inferiores al 10% en peso de la composición, normalmente inferiores al 5% en peso y con frecuencia inferiores al 1% en

5 peso. Dos o más de estos agentes activos se pueden combinar en una composición simple y/o dos o más composiciones se pueden utilizar para suministrar diferentes componentes activos, pudiendo interactuar dichos componentes en el sitio de suministro. Ejemplos de agentes hemostáticos incluyen trombina, fibrinógeno y factores de coagulación. Los agentes hemostáticos, como la trombina, se pueden añadir en concentraciones que oscilan, por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 10.000 unidades de trombina por ml de hidrogel o de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000 unidades de trombina por ml de hidrogel.

Las composiciones del primer y el segundo polímero reticuladas también se pueden preparar de modo que contengan diversos agentes de formación de imágenes tales como yodo o sulfato de bario o flúor, para ayudar a visualizar las composiciones después de su administración por rayos X o ¹⁹F-MRI, respectivamente.

10 Los agentes activos preferentes a utilizar en las composiciones de la presente invención incluyen factores de crecimiento tales como factores de crecimiento de transformación (TGF), factores de crecimiento fibroblástico (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), péptidos activados por tejido conjuntivo (CTAP), factores osteogénicos y análogos, fragmentos y derivados biológicamente activos de estos factores de crecimiento. De forma particularmente preferente se utilizan miembros de la familia supergénica de los factores de crecimiento de transformación (TGF), que son proteínas reguladoras multifuncionales. Los miembros de la familia supergénica de los TGF incluyen factores de crecimiento de transformación beta (por ejemplo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), proteínas morfogénicas óseas (por ejemplo BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); factores de crecimiento de unión a heparina (por ejemplo, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)); inhibinas (por ejemplo inhibina A, inhibina B); factores de diferenciación de crecimiento (por ejemplo, GDF-1); y activinas (por ejemplo, activina A, activina B, activina AB).

15 Los factores de crecimiento se pueden aislar de fuentes nativas o naturales, por ejemplo de células de mamífero, o se pueden preparar sintéticamente, por ejemplo mediante técnicas de ADN recombinante o por diversos procesos químicos. También se pueden utilizar análogos, fragmentos o derivados de estos factores, siempre que muestren al menos parte de la actividad biológica de la molécula nativa. Por ejemplo, se pueden preparar análogos mediante la expresión de genes alterados por mutagénesis específica puntual u otras técnicas de ingeniería genética.

20 Los agentes biológicamente activos se pueden incorporar a la composición de matriz sellante por mezcla. En una realización, los agentes activos se pueden mezclar en las composiciones de matriz sellante en polvo en forma seca o liofilizada. En otra realización, esta mezcla se puede fijar sobre un soporte sólido, por ejemplo de colágeno tal como se describe más arriba en relación con las composiciones de matriz sellante. En otras realizaciones, los agentes se pueden incorporar a las composiciones de matriz sellante, tal como se describe más arriba, uniendo estos agentes a los grupos funcionales del primer o el segundo polímero sintético del componente. En la patente US 5.162.430, concedida el 10 de noviembre de 1992 a Rhee y col., se describen procesos para unir de forma covalente agentes biológicamente activos, tales como factores de crecimiento, utilizando polietilenglicoles activados funcionalmente. Preferentemente, estas composiciones incluyen enlaces que se pueden biodegradar con facilidad, por ejemplo como consecuencia de una degradación enzimática, lo que conduce a la liberación del agente activo en el tejido diana, donde ejercerá su efecto terapéutico deseado.

25 Un método simple para incorporar agentes biológicamente activos que contienen grupos nucleófilos en la composición polimérica reticulada consiste en mezclar el agente activo con el primer componente, el segundo componente y el componente formador de hidrogel antes de la administración en estado seco. Después de la aplicación de la composición de matriz sellante en el defecto del tejido y del contacto de ésta con fluido biológico, el agente biológicamente activo reaccionará con el segundo componente y se reticulará en la matriz reticulada porosa del primer y el segundo componente a medida que el componente formador de hidrogel absorbe el fluido biológico. Este procedimiento conducirá al enlace covalente del agente activo con la parte de matriz de polímero del componente reticulado de la barrera de matriz sellante formada, produciendo una composición de liberación prolongada muy eficaz.

El tipo y la cantidad del agente activo utilizado dependerá, entre otros factores, del sitio y la afección particular a tratar y de la actividad biológica y la farmacocinética del agente activo seleccionado.

V. Utilización de composiciones de matriz sellante como bioadhesivos

30 En general, las composiciones de matriz sellante de la presente invención son adhesivas y se unen fuertemente a los tejidos, ya que los grupos electrófilos del segundo componente reticulable reaccionan con los grupos nucleófilos del colágeno del tejido del sitio diana. Algunas composiciones de matriz porosa de la invención pueden tener una pegajosidad excepcionalmente alta. Por consiguiente, además de utilizarlas como matriz de barrera para la hemostasia, las composiciones de matriz sellante de la presente invención son útiles como bioadhesivos para unir tejidos mojados o húmedos bajo condiciones fisiológicas. Tal como se utiliza aquí, los conceptos "bioadhesivo", "adhesivo biológico" y "adhesivo quirúrgico" se pueden utilizar de manera intercambiable para abarcar composiciones biocompatibles que

pueden realizar una unión temporal o permanente entre las superficies de dos tejidos nativos o entre una superficie de tejido nativo y una superficie de tejido no nativo o una superficie de un implante sintético.

5 En un método general para realizar la unión de una primera superficie con una segunda superficie, la composición de matriz sellante se aplica (por ejemplo en polvo seco o en forma de lámina) sobre una primera superficie. Después, la primera superficie se pone en contacto con la segunda superficie, preferentemente de forma inmediata, para que se produzca la adhesión entre ambas. Al menos la primera o la segunda superficie consiste preferentemente en una superficie de tejido nativo. Cuando en la composición se utiliza un componente formador de hidrogel mecánicamente estable, tal como la gelatina reticulada utilizada en los ejemplos, la matriz porosa resultante tiene una mayor resistencia mecánica que una composición que sólo contiene el primer y el segundo componente reticulable. Por consiguiente, también se incrementa la resistencia de la adhesión entre las dos superficies de tejido, ya que es menos probable que la capa de matriz porosa entre los tejidos se separe internamente bajo una tensión mecánica fisiológica.

10 Mientras se desarrolla la reacción de reticulación hasta completarse, las dos superficies se pueden mantener unidas manualmente o utilizando medios adecuados. La reticulación se completa típicamente en un plazo de 5 a 60 minutos después de la aplicación de la composición de matriz sellante. No obstante, el tiempo necesario para que se complete la reticulación depende de una serie de factores, incluyendo el tipo y el peso molecular del primer y el segundo componente reticulable y, más particularmente, de la concentración efectiva de los dos componentes en el sitio diana (es decir, concentraciones más altas conducen a una reticulación más rápida).

15 Al menos la primera o la segunda superficie es preferentemente una superficie de tejido nativo. Tal como se utiliza aquí, el concepto "tejido nativo" abarca tejidos biológicos pertenecientes al cuerpo del paciente específico tratado. Tal como se utiliza aquí, el concepto "tejido nativo" comprende tejidos biológicos que han sido levantados o retirados de una parte del cuerpo de un paciente para ser implantados en otra parte del cuerpo del mismo paciente (por ejemplo en autoinjertos óseos, autoinjertos de colgajos de piel, etc.). Por ejemplo, las composiciones de algunas realizaciones de la invención se pueden utilizar para adherir una pieza de piel de una parte del cuerpo de un paciente a otra parte del cuerpo, como en el caso de quemaduras graves.

20 La otra superficie puede consistir en una superficie de tejido nativo, una superficie de tejido no nativo o una superficie de un implante sintético. Tal como se utiliza aquí, el concepto "tejido no nativo" abarca tejidos biológicos que han sido retirados del cuerpo de un paciente donante (que puede ser de la misma especie o de una especie diferente a la del paciente receptor) para implantarlos en el cuerpo de un paciente receptor (por ejemplo trasplantes de tejidos y órganos). Por ejemplo, las composiciones poliméricas reticuladas de la presente invención se pueden utilizar para fijar un injerto heterólogo de válvula cardíaca en el corazón de un paciente y sellar el perímetro de la válvula cardíaca para evitar fugas.

25 Tal como se utiliza aquí, el concepto "implante sintético" abarca cualquier material biocompatible previsto para ser implantado en el cuerpo de un paciente y no incluido en las definiciones dadas más arriba para el tejido nativo y el tejido no nativo. Los implantes sintéticos incluyen, por ejemplo, vasos sanguíneos artificiales, válvulas cardíacas, órganos artificiales, prótesis óseas, lenticulas implantables, injertos vasculares, *stents* y combinaciones *stent/injerto*, etc.

35 VI. Utilización de las composiciones de matriz sellante para prevenir adhesiones

Otro uso de las composiciones sellantes de la invención es revestir tejidos para prevenir la formación de adhesiones después de una cirugía o de una lesión en tejidos internos u órganos. En un método general para revestir tejidos con el fin de prevenir la formación de adhesiones después de la cirugía, el primer y el segundo polímero sintético se mezclan con el polímero reticulado hidratable o ya están previamente mezclados, y después se aplica una capa delgada de la mezcla de reacción en los tejidos que comprenden, rodean y/o son adyacentes al punto quirúrgico antes de que se haya producido una reticulación sustancial entre los grupos nucleófilos del primer polímero sintético y los grupos electrófilos del segundo polímero sintético. La mezcla de reacción se puede aplicar en el tejido por extrusión, por irrigación, a brocha, por pulverización (tal como se describe más arriba), en el caso de las composiciones en polvo, mediante disposición de una película delgada o lámina de la composición de matriz de obturación sobre el tejido o por cualquier otro medio conveniente.

40 Después de aplicar la mezcla de reacción al punto quirúrgico, se deja que la reticulación continúe *in situ* antes de cerrar la incisión. Una vez que la reticulación ha alcanzado el equilibrio, los tejidos que se ponen en contacto con los tejidos revestidos no se pegan a éstos. En este momento, el sitio quirúrgico se puede cerrar utilizando medios convencionales (suturas, etc.).

45 En general, preferentemente se emplean composiciones que alcanzan una reticulación completa en un período de tiempo relativamente corto (es decir, 5-15 minutos después de mezclar el primer polímero sintético y el segundo polímero sintético) para la prevención de adhesiones quirúrgicas, de modo que el sitio quirúrgico se puede cerrar relativamente poco tiempo después de completarse la operación. Además, en las composiciones se utiliza preferentemente un polímero reticulado hidratable con una resistencia mecánica relativamente alta, tal como la gelatina reticulada utilizada en los ejemplos, para aumentar la estabilidad mecánica del revestimiento.

Los siguientes ejemplos describen la producción y caracterización de un primer componente reticulable con un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel para formar composiciones de matriz sellante, y se proporcionan con el fin de ofrecer al experto medio en la materia una muestra y descripción completa sobre cómo llevar a la práctica las realizaciones preferentes de los conjugados, composiciones y dispositivos, no siendo limitativos del alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se ha intentado asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, peso molecular, etc.), pero se ha de considerar la posibilidad de errores y desviaciones experimentales. A no ser que se indique de otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la presión atmosférica o aproximadamente la presión atmosférica.

10 **VII. Ejemplos**

Ejemplo 1: Composiciones de primer y segundo componente a utilizar en la matriz sellante: preparación de composiciones de PEG multiamino reticuladas

Se prepararon las siguientes soluciones madre de diversos PEG diamino: diez (10) gramos de Jeffamine ED-2001 (obtenida de Texaco Chemical Company, Houston, Tex.) se disolvieron en 9 ml de agua. Diez (10) gramos de Jeffamine ED-4000 (también obtenida de Texaco Chemical Company) se disolvieron en 9 ml de agua. 0,1 gramos de PEG diamino (3400 MW, obtenido de Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.) se disolvieron en 300 µl de agua. Cada una de las tres soluciones de PEG diamino arriba preparadas se mezcló con soluciones acuosas de SC-PEG activado de forma trifuncional (TSC-PEG, PM 5000, también obtenido de Shearwater Polymers), tal como muestra la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Preparación de composiciones poliméricas reticuladas	
PEG diamino	TSC-PEG + disolvente acuoso
50 µl	0 mg + 50 µl agua
50 µl	10 mg + 50 µl PBS
50 µl	10 mg + 100 µl PBS
250 µl	50 mg + 500 µl PBS

Las soluciones de PEG diamino y TSC-PEG se mezclaron por mezcla jeringuilla-a-jeringuilla. Cada uno de los materiales se extruyó desde la jeringuilla y se dejó endurecer durante 1 hora a 37°C. Cada uno de los materiales formó un gel. En general, los geles eran más blandos cuanto mayor era el contenido de agua; los geles que contenían la menor cantidad de disolvente acuoso (agua o PBS) eran los más firmes.

25 **Ejemplo 2: Composiciones de primer y segundo componente a utilizar en la matriz sellante: preparación de composiciones de poli(lisina) reticuladas**

Diez (10) miligramos de bromhidrato de poli-L-lisina (PM 8.000, obtenida de Peninsula Laboratories, Belmont, Calif.) en 0,1 ml de tampón de fosfato (0,2M, pH = 6,6) se mezclaron con 10 mg de SE-PEG activado de forma tetrafuncional (PM 10.000, obtenido de Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.) en 0,1 ml de PBS. Prácticamente de forma inmediata, la composición formó un gel blando.

Ejemplo 3: Composiciones de primer y segundo componente a utilizar en la matriz sellante: efecto del pH en la formación de gel de las formulaciones PEG tetramino/tetra SE-PEG

En placas Petri se prepararon geles que comprendían diversas concentraciones de PEG tetramino y tetra SE-PEG a pH 6, 7 y 8. Después de mezclar el PEG tetramino y tetra SE-PEG, las placas se inclinaron de forma reiterada. El tiempo de gelificación se consideró como el punto en el que la formulación dejó de fluir. En la siguiente Tabla 2 se muestra el efecto del pH en el tiempo de gelificación de las diversas formulaciones de PEG tetramino/tetra SE-PEG a temperatura ambiente.

Tabla 2

Efecto del pH en la formación de gel de las formulaciones PEG tetramino / tetra SE-PEG			
PEG tetramino conc. (mg/ml)	Tetra SE-PEG conc. (mg/ml)	pH	Tiempo de gelificación
20	20	6	> 90,0 min
20	20	7	20,0 min
20	20	8	1,4 min
50	50	6	24,0 min
50	50	7	3,5 min
50	50	8	10,0 s
100	100	6	9,0 min
100	100	7	47,0 s
100	100	8	10,0 s
200	200	6	2,0 min

Efecto del pH en la formación de gel de las formulaciones PEG tetramino / tetra SE-PEG			
PEG tetramino conc. (mg/ml)	Tetra SE-PEG conc. (mg/ml)	pH	Tiempo de gelificación
200	200	7	9,0 s
200	200	8	5,0 s

El tiempo necesario para la formación de gel disminuía cuanto mayor era el pH y mayores eran las concentraciones de PEG tetramino y tetra SE-PEG.

5 Ejemplo 4: Evaluación de materiales del componente formador de hidrogel y métodos de reticulación y medida del hinchamiento porcentual

Se dejó que partículas de gelatina se hincharan en un tampón acuoso (por ejemplo fosfato de sodio 0,2M, pH 9,2) que contenía un agente reticulante (por ejemplo del 0,005 al 0,5% en peso de glutaraldehído). La mezcla de reacción se mantuvo refrigerada durante una noche y después se enjuagó tres veces con agua desionizada y dos veces con etanol, dejándose secar a temperatura ambiente. La gelatina reticulada seca se resuspendió en un tampón acuoso a baja concentración de sólidos (2-3%) a temperatura ambiente durante un período de tiempo fijo. El tampón se utilizó en un exceso sustancial con respecto a la concentración necesaria para el hinchamiento de equilibrio, existiendo dos fases (una fase hidrogel y un tampón). Después, la suspensión que contenía el hidrogel húmedo se filtró por la aplicación de vacío en una membrana filtrante de corte nominal de 0,8 µm (Millipore, Bedford, Mass.). Después de retirar el tampón superfluo, se registró el peso combinado del hidrogel húmedo retenido y la membrana de filtro húmeda. Luego se secaron el hidrogel y la membrana a aproximadamente 120°C durante al menos dos horas y se registró el peso combinado del residuo de hidrogel seco y la membrana de filtro seca. También se realizaron diversas medidas de muestras de membrana de filtro húmeda sin residuo de hidrogel y membrana de filtro seca sin hidrogel, que se utilizaron para deducir el peso neto del hidrogel húmedo y el hidrogel seco. El "hinchamiento porcentual" se calculó de la siguiente manera:

$$\text{hinchamiento \%} = 100 \times [(\text{peso húmedo hidrogel} - \text{peso seco hidrogel}) / \text{peso seco hidrogel}]$$

20 Se realizaron medidas de hinchamiento al menos por triplicado y se obtuvo la media de una muestra de gelatina dada. El valor del hinchamiento porcentual de muestras resuspendidas en tampón durante 18 a 24 horas antes de medir el peso húmedo se definió como "hinchamiento de equilibrio".

Los materiales de gelatina reticulada resultantes presentaban valores de hinchamiento de equilibrio entre el 400% y el 1.300%. El nivel del hinchamiento de equilibrio dependía del método y la magnitud de la reticulación.

25 Ejemplo 5: Componentes formadores de hidrogel a utilizar en la matriz sellante: producto polimérico reticulado hidratable fragmentado compuesto por gelatina reticulada mediante EDC

30 Se disolvió gelatina (Atlantic Gelatin, General Foods Corp., Woburn, Mass.) en agua destilada hasta un contenido de un 1 a un 10% de sólidos (p/p) (preferentemente hasta el 8%) a 70°C. Después se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma, St. Louis, Mo.) del 0,2% al 3,5% (o del 0,2% al 0,3%). El hidrogel resultante formado con agitación se dejó a temperatura ambiente durante una hora. El hidrogel se secó utilizando un sistema de liofilización Freezezone 12 (Labconco, Mo.) y se molió finamente utilizando un Waring Blender modelo nº 31BC91 (VWR, Willard, Ohio). La composición polimérica seca se cargó después en jeringuillas y se equilibró con un tampón. Se determinó que el hinchamiento de equilibrio era de al menos el 1.000%. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Gelatinas (mg)	EDC	Hinchamiento (%)
500 (8%)	13,5 mg (0,25%)	1080
500 (8%)	13,5 mg (0,25%)	1126
100 (7,4%)	0,945 mg (0,35%)	1620
100 (7,4%)	9,45 mg (3,5%)	1777

35 Ejemplo 6: Componentes formadores de hidrogel a utilizar en la matriz sellante: producto polimérico reticulado hidratable fragmentado compuesto por gelatina y ácido poli(L)glutámico, reticulados mediante EDC

40 Se disolvió gelatina (Atlantic Gelatin, General Foods Corp., Woburn, Mass.) en agua destilada hasta un contenido de un 1 a un 10% de sólidos (p/p) (preferentemente del 6 al 8%) a 70°C. Después se añadió de un 0 a un 10% (p/p) (preferentemente 2-5%) de ácido poli(L)glutámico (PLGA) (Sigma, St. Louis, Mo.) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma) del 0,2% al 3,5% (o del 0,2 al 0,4%). El hidrogel resultante formado con agitación se dejó a temperatura ambiente durante una hora. Después se dejó que el hidrogel se hinchara en un exceso de solución salina durante un período de tiempo fijo (por ejemplo 20 horas). Luego se filtró el hidrogel por aplicación de vacío a una membrana de filtro (Millipore, Bedford, Mass.). Se determinó que el hinchamiento de equilibrio era de al menos 45 el 1.500%. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Gelatina (mg)	PLGA (mg)	EDC	Hinchamiento (%)
375 (6%)	125 (2%)	13,5 mg (0,25%)	1510
375 (6%)	125 (2%)	13,5 mg (0,25%)	1596
250 (4%)	250 (4%)	13,5 mg (0,25%)	2535
250 (4%)	250 (4%)	13,5 mg (0,25%)	2591
250 (4%)	250 (4%)	13,5 mg (0,25%)	2548
250 (4%)	250 (4%)	13,5 mg (0,25%)	2526
200 (3,2%)	300 (4,8%)	13,5 mg (0,25%)	2747
200 (3,2%)	300 (4,8%)	13,5 mg (0,25%)	2677
200 (3,2%)	300 (4,8%)	13,5 mg (0,25%)	2669
150 (2,4%)	350 (5,6%)	13,5 mg (0,25%)	3258
150 (2,4%)	350 (5,6%)	13,5 mg (0,25%)	3434
150 (2,4%)	350 (5,6%)	13,5 mg (0,25%)	3275
75 (5,5%)	25 (1,9%)	0,945 mg (0,35%)	2437
50 (3,7%)	50 (3,7%)	0,945 mg (0,35%)	2616
25 (1,9%)	75 (5,5%)	0,945 mg (0,35%)	5383
75 (5,5%)	25 (1,9%)	9,45 mg (3,5%)	1976
50 (3,7%)	50 (3,7%)	9,45 mg (3,5%)	2925
25 (1,9%)	75 (5,5%)	9,45 mg (3,5%)	4798

Ejemplo 7: Componentes formadores de hidrogel a utilizar en la matriz sellante: producción de un hidrogel polimérico reticulado hidratable fragmentado

- 5 En una solución acuosa de hidróxido de sodio (Spectrum Chemical Co., CA) (0,1M a 1,5M o 0,4 a 1,2M) se agitó corion bovino (Spears Co. PA) durante un período de tiempo de 1 a 18 horas (o de 1 a cuatro horas) a una temperatura de 2°C a 30°C (preferentemente de 22°C a 30°C). La suspensión espesa de corion se neutralizó después utilizando un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico (Spectrum Chemical Co., CA), y la fase líquida neutralizada se separó del corion insoluble por filtración a través de un tamiz. Después, el corion se lavó con agua no pirogénica y un alcohol, tal como alcohol isopropílico (Spectrum Chemical Co., CA). Después de tres a doce lavados, el corion se suspendió en agua no pirogénica y la suspensión espesa acuosa de corion se pudo calentar después a una temperatura de 50°C a 90°C, preferentemente de 60°C a 80°C, para gelatinizar térmicamente el corion. Durante el ciclo de gelatinización, el pH de la suspensión espesa acuosa de corion se ajustó y controló a un valor de 3 a 11 o de 7 a 9. Además, el corion insoluble en la suspensión espesa se sometió a ruptura por agitación y/u homogeneización. La ruptura puede tener lugar antes o después del ciclo de gelatinización térmica. La gelatinización térmica se llevó a cabo durante un tiempo de una a seis horas. Después de la gelatinización, la suspensión espesa se clarificó por filtración. La suspensión espesa de gelatina se deshidrató mediante secado al aire a una temperatura de 15°C a 40°C, preferentemente de 20°C a 35°C. La gelatina seca, entendiéndose por "seca" un contenido de humedad de menos del 20% en peso, se sometió después a ruptura por molienda.
- 10
- 15
- 20 La gelatina seca se añadió a una solución acuosa fría (5°C a 15°C) de glutaraldehído (Amresco Inc., OH) del 0,0025% al 0,075% en peso y con un pH entre 7 y 10. La concentración de gelatina en esta solución oscilaba entre el 1% y el 10% en peso. El glutaraldehído reticuló los gránulos de gelatina durante un período de 1 a 18 horas y después se separó la gelatina de la fase acuosa por filtración o sedimentación. A continuación, las partículas de gelatina se añadieron a una solución acuosa que contenía del 0,00833% al 0,0667% en peso de borohidruro de sodio (Spectrum Chemical Co., CA), oscilando la concentración de gelatina de nuevo entre el 1% y el 10% en peso y el pH entre 7 y 12 o entre 7 y 9. Después de una a seis horas, la gelatina reticulada se separó de la fase acuosa por filtración o sedimentación. Después, la gelatina se pudo resuspender en agua no pirogénica, oscilando la concentración de gelatina entre el 1% y el 10% para eliminar los agentes reticulantes y reductores residuales, y después se separó de la fase acuosa por filtración o sedimentación. La recogida final de la gelatina reticulada se realizó en una malla de filtro o tamiz y la gelatina se sometió a un enjuague final con agua no pirogénica. La gelatina reticulada húmeda se dispuso después en una cámara de secado a una temperatura de 15°C a 40°C. La gelatina reticulada seca (es decir, gelatina reticulada con un contenido de humedad inferior al 20% en peso) se sacó de la cámara de secado y después se molió utilizando un molino triturador mecánico para producir un polvo con una distribución granulométrica típica de 0,020 mm a 2,000 mm.
- 25
- 30

Ejemplo 8: Polvo seco sellante hemostático de acción rápida

- 35 Se preparó un polvo seco sellante hemostático de acción rápida combinando un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel. El primer componente reticulable (PEG-A) consistía en un polvo de PEG-succinimidilo, el segundo polímero reticulable (PEG-B) consistía en un polvo de PEG-tiol y el componente formador de hidrogel consistía en un polvo de gelatina reticulada.

Ejemplo 9: Compresa seca sellante de acción rápida

Se preparó una compresa seca sellante de acción rápida combinando un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel. La composición resultante, una composición de matriz sellante en polvo, se dispuso sobre una esponja de colágeno liofilizado y se calentó a 60-70°C durante aproximadamente 1-2 minutos. La matriz de polvo seco se fijó ligeramente a esta temperatura, fijándose a la superficie de la esponja de colágeno, formando así una compresa de matriz sellante. Alternativamente, la composición de matriz sellante se puede fijar al soporte utilizando agentes aglutinantes u otros excipientes conocidos en la técnica farmacéutica. En general, la técnica utilizada para fijar la composición de matriz sellante al soporte puede depender del primer y del segundo componente y del componente formador de hidrogel en la composición de matriz sellante. Algunas realizaciones de la compresa de matriz sellante de la presente invención proporcionan un formato conveniente con el que las composiciones de matriz sellante se pueden manipular y suministrar al sitio quirúrgico con una esponja u otro medio de soporte adecuado.

Ejemplo 10: Polvo sellante para tratar una punción arterial esplénica

Las FIG. 7A-E ilustran la aplicación de una composición de matriz sellante para tratar una punción arterial esplénica de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. El cerdo se heparinizó a aproximadamente 3X la línea base. Tal como se muestra en la FIG. 7A, se realizó una punción arterial esplénica a un cerdo con una aguja 18g 700. Después de la punción se observó una hemorragia excesiva 705 en la arteria 710. Como se muestran en las FIG. 7B y 7C, en el sitio de punción se aplicaron aproximadamente 700 mg de una composición de matriz sellante en polvo 720 con una jeringuilla 730, y se apretó ligeramente o se dispuso contra el sitio durante dos minutos con un dedo protegido con un guante 740. El polvo sellante formó un coágulo 750 que detuvo adecuadamente la hemorragia. Cinco minutos después de la aplicación, el sitio se irrigó con un dispositivo de irrigación 760, tal como ilustra la FIG. 7D, y el exceso de composición en polvo se eliminó por lavado. Al agarrar el coágulo con fórceps, éste parecía adherirse bastante bien al tejido y tener buena integridad. Como muestra la FIG. 7E, el coágulo 750 se retiró 44 minutos después de su aplicación despegándolo con fórceps 770 y se observó una reanudación de la hemorragia 715.

Ejemplo 11: Polvo sellante para tratar una resección hepática

Las FIG. 8A-E ilustran la aplicación de una composición de matriz sellante para tratar una resección hepática de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Un cerdo se heparinizó a aproximadamente 3X la línea base. Como se muestra en la FIG. 8A, se extirpó al cerdo la punta 800 o borde del lóbulo medio del hígado 805 utilizando unas tijeras 810. Después de la resección se observó una hemorragia excesiva 815 en el sitio. Como muestra la FIG. 8B, en el sitio se aplicaron aproximadamente 6 ml (2 g) de una composición de matriz sellante 820, que se mantuvo en el lugar adecuado con la punta de una jeringuilla 825 durante 2 minutos. Como muestra la FIG. 8C, se puede utilizar un dedo protegido con un guante para comprimir o sujetar el polvo contra la lesión. El polvo sellante formó un coágulo 835 que detuvo adecuadamente la hemorragia. El sitio se irrigó con un dispositivo de irrigación 840 ocho minutos después de la aplicación, tal como ilustra la FIG. 8D. Al agarrar el coágulo con fórceps, éste parecía adherirse bastante bien al tejido y tener buena integridad. El coágulo 835 se retiró 28 minutos después de su aplicación despegándolo con fórceps 845 y se observó una reanudación de la hemorragia 850.

Ejemplo 12: Polvo sellante para tratar una lesión esplénica

Se produjo una lesión esplénica a un cerdo con un punzón de biopsia tisular de 6 mm y el núcleo de tejido se retiró con unas tijeras. El cerdo se heparinizó a aproximadamente 2,5X la línea base. Después de la punción de tejido, se observó una hemorragia excesiva en el bazo. En la punción se aplicaron aproximadamente 700 mg (2 ml) de un polvo de composición de matriz sellante utilizando el borde de una jeringuilla de 12 ml. No se utilizó ninguna compresión para mantener el material en el lugar adecuado. El polvo sellante formó un coágulo que detuvo adecuadamente la hemorragia. El sitio se irrigó 4 minutos después de la aplicación. Al agarrar el coágulo con fórceps, éste parecía adherirse bastante bien al tejido y tener buena integridad. El coágulo se retiró despegándolo 25 minutos después de su aplicación y se observó una reanudación de la hemorragia.

Ejemplo 13: Prueba de tensión mecánica

Se preparó una barrera de matriz sellante sometiendo a reacción de 0,60 a 0,65 g de un polvo de composición de matriz sellante con 1 ml de plasma porcino en un molde de plástico. Después se dejó que la mezcla se endureciera a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Sobre los dos extremos de un bloque de gel de 3 x 1 x 0,3 cm se aplicó una cinta con cola de cianoacrilato para crear espacios de agarre a separar (1 x 1 cm). Los extremos de la cinta se agarraron con los agarres previamente montados. Se utilizó un dispositivo de prueba Chatillon TCD2000 para realizar una prueba de tensión estándar al gel rectangular hasta rotura, con el fin de determinar la resistencia a la tracción. Se midieron la fuerza máxima (N) y la desviación a carga máxima (mm) para extender el gel hasta la rotura. El área superficial efectiva del gel era de 1 x 0,3 cm y la longitud efectiva original del gel era de 1 cm. La resistencia a la tracción del gel sellante era de aproximadamente 15,3 N/cm². También se llevó a cabo una prueba similar en una composición de gel que incluía un primer componente reticulable y un segundo componente reticulable y que no comprendía ningún componente formador de hidrogel, y la resistencia a la tracción observada fue de aproximadamente 5,1 N/cm².

Ejemplo 14: Prueba de resistencia al desprendimiento

En algunas realizaciones, un polvo mixto incluye un primer y un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel, y es autopolimérico cuando se disuelve en un líquido fisiológico tal como la sangre u otro fluido corporal. El material se puede adherir firmemente a un tejido u otro sitio de aplicación mediante unión covalente. La resistencia mecánica de la adherencia del tejido se puede examinar utilizando una plantilla mecánica para tirar de una matriz sellante de un tejido tal como piel. En este ejemplo se llevaron a cabo múltiples pruebas de tracción después de la formación de barreras de matriz sellante de la siguiente manera: Se preparó una serie de polvos de tres componentes que contenían un primer componente reticulable (pentaeritritol poli(etilenglicol) éter tetra-succinimidil glutarato), un segundo componente reticulable (pentaeritritol poli(etilenglicol) éter tetra-tiol) y una gelatina reticulada (FloSeal™) mezclando los componentes reticulables y la gelatina reticulada a tres concentraciones diferentes (10%, 20% y 30% del componente reticulable). De 0,40 g a 0,45 g del polvo de tres componentes se añadieron a aproximadamente 0,6 ml de plasma porcino en un molde de plástico de 3 x 1 x 0,3 cm dispuesto sobre una muestra de piel de pollo y se dejaron endurecer a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos. Se formó una barrera de matriz sellante que se adhirió firmemente a la piel. La barrera de matriz sellante formada se pegó a una placa que estaba sujeta a un dispositivo de prueba Chatillon TCD200. Se midió la fuerza máxima al desprender la piel de la barrera de matriz sellante. Se observó un incremento de la fuerza de adherencia en una correlación prácticamente lineal con el aumento de la concentración de la mezcla de PEG (primer y segundo componente reticulable). Los resultados se muestran en la Tabla 4A.

Tabla 4A

Conc. de mezcla PEG	Piel	Velocidad, mm/min	Tiempo de endurecim., min	Lado de tracción, cm	Fuerza N
10%	pollo	12,7	80	1	2,00
10%	pollo	12,7	80	1	2,10
10%	pollo	12,7	80	1	1,70
					1,93 prom.
					0,21 desv. estándar
20%	pollo	12,7	60	1	3,24
20%	pollo	12,7	60	1	2,13
20%	pollo	12,7	60	1	3,41
20%	pollo	12,7	70	1	2,10
					2,72 prom.
					0,71 desv. estándar
30%	pollo	12,7	70	1	3,86
30%	pollo	12,7	70	1	7,86
30%	pollo	12,7	80	1	1,53
30%	pollo	12,7	80	1	2,65
30%	pollo	12,7	80	1	2,59
30%	pollo	12,7	80	1	3,83
30%	pollo	12,7	105	1	3,32
30%	pollo	12,7	107	1	3,00
					3,58 prom.
					1,89 desv. estándar

Ejemplo 15: Preparación de colágeno fibrilar para cocción en esponja de compresa fusionada

Se preparó una primera muestra de colágeno fibrilar de la siguiente manera: 40 g de NaOH se disolvieron en 450 cc de H₂O a una temperatura de 25°C. A esta solución de NaOH se añadieron aproximadamente 50 g de corion bovino en rodajas. El corion se agitó durante 80 minutos. La solución de NaOH se decantó y el corion se lavó con H₂O. El corion se disolvió con HCl 2M para ajustar el pH a un valor entre 2,3 y 2,4. La agitación continuó durante 18 horas. 1.250 ml de colágeno espeso en solución (CIS) se titularon a pH 7,25 con NaOH 1M a 18°C. Se formó fibra de colágeno durante un período de 10 horas y después se filtró. Precipitaron 240 ml a pH 7,4 y se reticularon con 33 µl de una solución de glutaraldehído (GA) al 25% a 8°C durante 23 horas. El colágeno fibrilar se liofilizó utilizando un Virtis Lyophilizer con un ciclo.

Se preparó una segunda muestra de colágeno fibrilar de la siguiente manera: se reticuló colágeno fibrilar utilizando 240 g de una solución viscosa (por ejemplo CIS). La solución se diluyó añadiendo 6 cc de H₂O. El pH se aumentó a 9,2 añadiendo aproximadamente 1,8 cc de NaOH 2M. La temperatura de la solución se ajustó a 8°C y se añadieron 33 µl de

GA al 25%. La solución se agitó durante 23 horas y se obtuvieron aproximadamente 54 g de fibras precipitadas. El colágeno fibrilar se liofilizó utilizando un Virtis Lyophilizer con un ciclo.

Ejemplo 16: Eliminación del tampón del componente formador de hidrogel

5 En algunas realizaciones puede ser deseable retirar la sal fosfato de un componente formador de hidrogel tal como FloSeal™ para que el líquido circundante pueda influir fácilmente en el pH del componente formador de hidrogel. La reticulación *in situ* de los componentes formadores de hidrogel puede ayudar a que un compuesto de matriz sellante se adhiera al tejido después de su aplicación. En algunos casos, la adhesión puede ser más eficaz a determinados valores de pH. Por ejemplo, algunos materiales basados en gelatina se pueden adherir más fácilmente a valores de pH inferiores a 6 o 7. El FloSeal™ se lavó con H₂O en una relación de 1:50, y el pH de la suspensión espesa se ajustó o acidificó con HCl 0,01M o NaOH 0,01M a un valor entre 2 y 7. La torta de gelatina húmeda se filtró y se secó en un horno de ventilación forzada a 32°C durante 12 a 20 horas y se molió ligeramente con un mortero y una mano de mortero. El polvo de gelatina 10 seca se añadió a una solución de PEG mixto para la reticulación *in situ*. Una suspensión espesa se mezcló durante 30 segundos y se aplicó inmediatamente a la superficie de un papel de pesaje completamente saturado con 25 mM de tampón de fosfato a pH 7,4. Se registraron los tiempos de polimerización, los resultados se muestran en la Tabla 5.

15 **Tabla 5**

Muestra	pH de FloSeal™	pH de tampón para PEG (A/B)	Tiempo (min) de gelificación
1	7,6	6	3
2	7,6	6	5
3	6,0	6	30
4	6,5	6	20
5	4,0	6	90

Ejemplo 17: Preparación de una torta de PEG

20 En una realización, 0,8 g de polvo de PEG-succinimida y 0,8 g de polvo de PEG-tiol se mezclaron a fondo por agitación y se dispusieron en un matraz de fondo redondo de 100 ml completamente cargado de N₂. El polvo mixto se fundió en un baño de aceite a 40°C - 50°C con agitación manual suave durante 30 minutos y después se dejó enfriar. Utilizando una espátula se retiró una película sólida del matraz. En otra realización, un polvo mixto de PEG-succinimida y PEG-tiol se disolvió en una solución ácida de colágeno (por ejemplo 0,3%) o gelatina (por ejemplo 2%) y se liofilizó. Se cree que el colágeno fibrilar o la gelatina pueden ayudar a aflojar la matriz y mejorar el manejo de la torta de PEG.

25 En una composición comparativa, 1,2 g de fibra de colágeno se disolvieron en 100 cc de HCl a pH 2, se calentaron en un baño de agua a 35°C durante 1 a 2 horas y se diluyeron con HCl a pH 2 para obtener un producto CIS al 3%. En 2 cc de la CIS al 0,3% se disolvieron 0,2 g de PEG-succinimida y 0,2 g de PEG-tiol. La mezcla resultante se vertió en una bandeja y se liofilizó mediante un ciclo de 22 horas para producir una torta de PEG. En otra realización, 2 g de gelatina se disolvieron en 100 cc de HCl pH 2 en un baño de agua a 35°C. Cuatro gramos de una mezcla de polvo de PEG de dos componentes se disolvieron en 2 cc de solución de gelatina y se liofilizaron para obtener una torta de PEG.

30 En una realización relacionada, las tortas de PEG se prepararon liofilizando soluciones mixtas de PEG-SG, PEG-SH y colágeno a pH 2. Se llevaron a cabo estudios con animales en cápsulas hepáticas escoriadas en un modelo porcino heparinizado. A la superficie del hígado, que estaba sangrando lentamente, se añadieron dos gotas de tampón fosfato 0,2M (pH 9,0). Sobre el lugar se colocó un trozo de torta sin ninguna compresión. Después de transcurrir 5 y 10 minutos se examinó la adhesión de cada una de las tortas de PEG al sitio. Se observó que la actividad de PEG-SG no se reducía 35 durante el proceso de preparación y que las tortas de PEG se adherían al tejido hepático escoriado por unión covalente. En la Tabla 6 se resumen la composición y el rendimiento *in vivo* de las muestras analizadas.

Tabla 6

Muestra	Conc. de PEG-GS (% p/v)	Conc. de PEG-SH (% p/v)	Conc. de gelatina (% p/v)	Conc. de CIS (% p/v)	% en masa de colágeno en PEG tras liofilización	Rendimiento <i>in vivo</i> (adhesión)
1	20	20	2	0	1,0%	Excelente
2	20	20	0	0,29	1,5%	Excelente
3	20	20	0	0,52	2,6%	Bueno

Ejemplo 18: Material de torta de PEG pulverizado

40 400 mg de CoSeal™ premezclado, 1 g de FloSeal™ (por ejemplo pH 7,1 a 9,5; diámetro de partícula de 70 a 400 μm) y 2 a 3 cc de H₂O se combinaron formando una pasta mixta y se liofilizaron bajo un ciclo de 22 horas para formar una torta. Tal como muestra la FIG. 9, la torta 900 se rompió, se machacó y se redujo a un polvo 920, que se dispuso en una jeringuilla 930 (por ejemplo una jeringuilla de 5 cc o 10 cc). La punta 940 de cuerpo de jeringuilla se eliminó con una

cuchilla, la mezcla en polvo 920 se aplicó a una lesión 950 y se observó la actividad de sellado *in situ*. En los Ejemplos 10-12 se ilustran los resultados. En otra realización se preparó una torta a partir de una suspensión espesa de tres componentes tal como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7

Muestra	PEG de dos componentes premezclado	FloSeal™	H ₂ O	% PEG
1	360 mg	500 mg	2,3 cc	42%
2	200 mg	500 mg	1,2 cc	48%

5

Los resultados de ensayo de ejemplos de formulaciones de acuerdo con algunas realizaciones revelaron las siguientes características mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8

Muestra	pH FloSeal™	Peso de (proporción) de FloSeal™	Peso de PEG mixto	Diámetro de partícula FloSeal™
1	9,2	5 g	2,5 g	294 µm
2	7,7	5 g	2,5 g	308 µm

10 **Ejemplo 19: Preparación de compresas fundidas de composición de matriz sellante**

Se prepararon compresas de PEG con mezclas previas de CoSeal™ fundidas. Se prepararon polvos de tres componentes mezclando polvo FloSeal™ a valores pH diferentes y CoSeal™ premezclado (por ejemplo, los dos componentes PEG en forma de polvo) de acuerdo con diferentes relaciones en peso. Como compresa soporte se utilizaron esponjas de colágeno liofilizado para montar la mezcla de tres componentes fundida. En una realización, tal como muestra la FIG. 10, sobre una sección de esponja 1010 de 3 x 3 cm² se dispusieron de 0,5 a 1 g de composición de matriz sellante 1000. La esponja y la matriz sellante se cocieron en un horno a una temperatura de 60 a 70°C durante 1 a 2 minutos y se dejaron enfriar en un desecador para reducir al mínimo o evitar el contacto con el aire. Se observó que el polvo de matriz sellante formaba una película gruesa y se unía a la esponja formando una compresa fundida 1020. En realizaciones relacionadas se prepararon varias esponjas, cada una con unas dimensiones de 3 x 3 x 0,3 cm². Algunas esponjas se revistieron con una mezcla de tres componentes consistente en un primer y un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel. Otras esponjas se revistieron únicamente con una mezcla de dos componentes consistente en un primer y un segundo componente reticulable. Todas las compresas fundidas se ensayaron *in situ* en un sitio de lesión hepática. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

15

20

Tabla 9

Muestra de esponja y torta fusionadas	Formulaciones de tres componentes				Rendimiento <i>in vivo</i>
	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (g)	Peso de CoSeal™ (g)	Peso de tres componentes en esponja (g)	Hemorragia
1	9	0,5	0,2	0,4	Sellado mínimo o ninguno
2	8	0,5	0,2	0,4	Sellado mínimo o ninguno
3	8	0,5	0,2	0,4	Sellado mínimo o ninguno
4	n/a	0	0,5	0,4	Sellado mínimo o ninguno
5	n/a	0	0,5	0,4	Sellado mínimo o ninguno
6	9	1	0,4	0,8	Sellado

25

En realizaciones relacionadas se prepararon varias composiciones en polvo. Algunas composiciones incluían una mezcla de tres componentes consistente en un primer y un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel. Otras incluían únicamente una mezcla de dos componentes consistente en un primer y un segundo componente reticulable. Todas las composiciones se ensayaron *in situ* en un sitio de lesión hepática. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

30

Tabla 10

Muestra	Formulaciones de tres componentes				Rendimiento <i>in vivo</i>
	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (g)	Peso de CoSeal™ (g)	Peso de tres componentes en la lesión (g)	Hemorragia

1	9	0,5	0,2	0,4 a 0,5	Sellado mínimo o ninguno
2	8	0,5	0,2	0,4 a 0,5	Sellado mínimo o ninguno
3	9	0,5	0,2	0,4 a 0,5	Sellado mínimo o ninguno
4	n/a	0	0,5	0,4 a 0,5	Sellado mínimo o ninguno
5	n/a	0,01 lisina	0,5	0,4 a 0,5	Sellado mínimo o ninguno

Ejemplo 20: Efecto de la radiación γ en el rendimiento *in vivo*

5 Se prepararon composiciones de matriz sellante en polvo y montadas sobre esponja y algunas de ellas se sometieron a radiación γ para determinar los efectos de los rayos γ en el rendimiento *in vivo*. No se observó ningún efecto, tal como muestra la Tabla 11.

Tabla 11

Muestra de esponja	Formulaciones de tres componentes				Rendimiento <i>in vivo</i>
	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (g)	Peso de CoSeal™ (g)	Peso de tres componentes en esponja (g)	Hemorragia
1	9	0,5	0,2	0,7	Sellado
2	8	0,5	0,2	0,7	Sellado
3 (γ)	9	0,5	0,2	0,7	Sellado
4 (γ)	8	0,5	0,2	0,7	Sellado
5	9	0,5	0,2	0,7	Sellado
6	8	0,5	0,2	0,65	Sellado
7	8	0,5	0,2	0,6	Sellado
Muestra de polvo	Formulaciones de tres componentes				Rendimiento <i>in vivo</i>
	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (g)	Peso de CoSeal™ (g)	Peso de tres componentes en esponja (g)	Hemorragia
1	9	0,5	0,2	0,5	Sellado
2	8	0,5	0,2	0,5	Sellado
3 (γ)	9	0,5	0,2	0,5	Sellado
4 (γ)	8	0,5	0,2	0,5	Sellado

Ejemplo 21: Efecto del pH en el rendimiento *in vivo*

10 Se realizaron estudios *in vivo* para evaluar el efecto del pH de un componente formador de hidrogel y el efecto de los métodos de aplicación manual en la reticulación *in situ*. Se compararon un FloSeal™ con pH 6,75 en una primera composición sellante y un FloSeal™ con pH 9,5 en una segunda composición sellante. En algunos casos, la composición de matriz sellante se sujetó manualmente contra la lesión y en otros casos se aplicó a la lesión o se dispuso sobre la misma sin ninguna sujeción. La composición que incluía FloSeal™ con pH 6,75 tenía un tiempo de reacción aproximadamente 10 a 30 segundos mayor que la composición que incluía FloSeal™ con pH 9,5. Los resultados del ejemplo de estudio se muestran en la Tabla 12. Se cree que el pH del componente formador de hidrogel puede desempeñar un papel en las primeras etapas de la reacción de reticulación. El pH del componente formador de hidrogel puede influir en la velocidad de formación de gel en un entorno húmedo (por ejemplo, un sitio en el que ya se está produciendo una hemorragia). En algunos casos, si la reticulación no se produce con suficiente rapidez, la composición se puede separar del sitio de lesión.

Tabla 12

Muestra de polvo	Formulaciones de tres componentes					Rendimiento <i>in vivo</i>
	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (g)	Peso de CoSeal™ (g)	Peso de tres componentes a la lesión (g)	Hemorragia	Sitio/método de aplicación
P	7	0,5	0,2	0,5	Ningún sellado	Cuadr.hígado (no sujeto)
P	9	0,5	0,2	0,5	Sellado	Cuadr.hígado (no sujeto)

Muestra de polvo	Formulaciones de tres componentes					Rendimiento <i>in vivo</i>
	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (g)	Peso de CoSeal™ (g)	Peso de tres componentes a la lesión (g)	Hemorragia	Sitio/método de aplicación
P	7	0,5	0,2	0,5	Sellado	Cuadr.hígado (sujeto)
P	9	0,5	0,2	0,5	Sellado	Cuadr.hígado (sujeto)
P	7	0,5	0,2	0,5	Sellado	V. esplénica (sujeto)
P	9	0,5	0,2	0,5	Sellado	V. esplénica (sujeto)

Ejemplo 22: Utilización de SURGIFOAM™ como componente formador de hidrogel

Mezclas de COH102 en polvo (pentaeritritol tetraquis[1-(1'-oxo-5'-succinilpentato)-2-poli(oxietilenglicol)] éter), COH206 en polvo (pentaeritritol tetraquis[mercaptoetil-poli(oxietilenglicol)] éter) y SURGIFOAM™ Absorbable Gelatin Powder (Ethicon, Somerville, NJ) se combinaron en proporciones de 1:1:2, 1:1:4 y 1:1:8 en peso y se rellenaron en jeringuillas de 5 ml modificadas. Las mezclas resultantes consistían en polvos sueltos esencialmente secos. Dos gramos de cada composición se aplicaron con compresión suave a una lesión creada por cirugía (aproximadamente 1 cm x 1 cm x 0,3 cm de profundidad) en el hígado de un cerdo. La compresión de cada una de las composiciones se retiró después de un minuto. El COH102 y el COH206 de cada composición reaccionaron entre sí en el entorno húmedo de la lesión, creando un hidrogel reticulado que incorporaba el polvo SURGIFOAM™ y que selló físicamente el sitio de lesión. No se observó hemorragia en ninguno de los sitios tratados con las composiciones. Después de irrigar las lesiones tratadas con una solución salina 5 minutos después de la aplicación, seguía sin verse ninguna hemorragia. Dos horas después, el examen de los sitios tratados tampoco mostró ninguna hemorragia.

Ejemplo 23: Rendimiento *in vivo* de la composición de matriz sellante con un agente de coagulación

Se preparó una composición de matriz sellante que contenía FloSeal™ y CoSeal™ (premezclados) en una relación en peso 4:1. En algunas realizaciones esta relación proporciona un nivel de reticulación eficaz para lograr los niveles deseados de polimerización química y adherencia de la composición al tejido. A la composición de matriz sellante en polvo se añadió polvo de trombina en diversas concentraciones. La mezcla resultante se ensayó en un estudio con animales que consistía en calificar las hemorragias en cuadrados de hígado y comparar la eficacia hemostática de la mezcla resultante con la de las composiciones de matriz sellante que no contenían trombina.

Los materiales de ensayo incluían 0,1 g de pentaeritritol tetraquis[mercaptoetil-poli(oxietileno)] éter, 0,1 g de pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato)-2-poli(oxietilenglicol)] éter, 0,8 g de partículas de gelatina reticulada (FloSeal™) y diversas concentraciones (5k, 2,5k, 1,25k y 0,625k u/g) de trombina. En un experimento de mezcla, los cuatro componentes de la mezcla resultante se mezclaron en una mezcladora de tambor. En un experimento de reconstitución, cuatro ml de solución de trombina (1.250 u/ml) se mezclaron con 0,8 g de Flo-Seal y después se liofilizaron durante 22 horas. Después, la mezcla seca se mezcló con polvo CoSeal™ utilizando una mezcladora de tambor. Sin optar por ninguna teoría en particular, se cree que la formulación de trombina reconstituida contiene moléculas de trombina que penetran en la matriz de FloSeal™ de modo que la trombina puede permanecer en la barrera de matriz sellante para aumentar la eficacia hemostática. En un experimento con compresa se preparó una compresa montando la mezcla de cuatro componentes resultante (composición de matriz sellante más trombina) sobre una esponja Gelfoam, fundiendo la mezcla y dejando que ésta se enfriara y solidificara. El horno se ajustó a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 65°C durante aproximadamente un minuto.

En un ensayo *in vivo*, un animal fue heparinizado para aumentar el tiempo de coagulación hasta 3,5 veces más que la línea base. Las formulaciones se examinaron sobre el espacio sangrante de un cuadrado de hígado (1 cm x 1 cm x 0,2 cm) que había sido producido por cirugía en un hígado de cerdo. La lesión se irrigó inmediatamente después de la lectura de 5 minutos para eliminar el polvo en exceso. Las áreas de las lesiones tratadas se calificaron después de 1, 5, 10 y 30 minutos. Los materiales se polimerizaron al entrar en contacto con la sangre y después se adhirieron firmemente a la lesión. La barrera de matriz sellante obturó mecánicamente las áreas sangrantes actuando como un material de sellado mecánico al unirse a los tejidos. En un ensayo *in vitro*, la trombina se calentó a aproximadamente 60°C durante 5 minutos y se comprobó que estaba totalmente activa. En una compresa de Gelfoam preparada se comprobó que se había perdido la actividad de trombina.

La Tabla 13 muestra los resultados de una evaluación aguda *in vivo*. La hemorragia de las lesiones se calificó desde un valor "0", cuando no había hemorragia, hasta un valor "4", como hemorragia grave. En base a las calificaciones de la hemorragia observada, ninguna de las muestras ensayadas mostró hemorragia. No se observó ninguna ventaja significativa de la adición de trombina a la composición de matriz sellante. El uso de trombina no proporcionó ningún

beneficio en la hemostasia primaria, aunque puede aumentar la hemostasia secundaria/formación de coágulo y la curación de la herida.

Tabla 13

Lote nº	Composición de matriz sellante	Trombina (unidad/g) mezclada o reconstituida	1'	5'	10'	20'
1	sin trombina	0	0	0	0	
2	con trombina	625, mezclada	0	0	0	0
3	con trombina	2500, mezclada	0	0	0	0
4	con trombina	5000, mezclada	0	0	0	0
5	con trombina	1250, mezclada	0	0	0	0
1	sin trombina	0	0	0	0	0
5	con trombina	1250, mezclada	susp.			
5	con trombina	1250, mezclada	0	0	0	0
4	con trombina	5000, mezclada	0	0	0	0
4	con trombina	5000, mezclada	0	0	0	0
1	sin trombina	0	0	0	0	0
6	con trombina	625, reconstituida	0	0	0	0
7	con trombina	2500, reconstituida	susp.			
7	con trombina	2500, reconstituida	0	0	0	0
7	con trombina	2500, reconstituida	0	0	0	0
8	sin trombina (esponja)	0	0	0	0	0
9	con trombina (esponja)	2500, mezclada	0	0	0	0

5 Ejemplo 24: Efecto de la concentración de PEG en la resistencia del gel

La Tabla 14 y la **FIG. 11** muestran el efecto de la concentración de PEG en la resistencia del gel de acuerdo con una realización de la presente invención. Después de la formación del gel se llevaron a cabo pruebas de tracción. Los geles se prepararon permitiendo la reacción del polvo de tres componentes (por ejemplo, la composición de matriz sellante que incluye un primer y un segundo componente reticulable y un componente formador de hidrogel) en moldes de plástico (3 x 1 x 0,3 cm). A una composición de matriz sellante en polvo (0,60 - 0,65 g) se añadió plasma porcino (1 ml, Baxter animal number S-264) para iniciar la formación de gel y después se dejó que se endureciera a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. En los dos extremos del gel se fijó cinta Scotch utilizando cola de cianoacrilato para crear espacios de agarre a separar (1 x 1 cm). En la prueba de tracción se midieron la fuerza máxima (N) y la desviación a carga máxima (mm) de extensión del gel hasta rotura. El área superficial efectiva del gel era de 1 x 0,3 cm. La longitud efectiva original del gel era de 1,0 cm. La aplicación de una tensión normal a la forma rectangular del gel hasta su rotura mediante un dispositivo de prueba Chatillon TCD200 fue el factor de determinación de la resistencia a la tracción. Los resultados del ensayo mostraron que una mayor concentración de polímero puede aumentar la resistencia del gel de la composición de matriz sellante.

Tabla 14

Muestra número	Material ensayado	Área efect. cm ²	Velocidad mm/min	T endu- recimiento	Fuerza N	F/0,3 cm ² F/0,1 cm ²
334-25-1	10% PEG	1 x 0,3	12,7	60	2,69	8,97
334-25-2	10% PEG	1 x 0,3	12,7	60	2,12	7,07
334-25-3	10% PEG	1 x 0,3	12,7	60	2,11	7,03
Promedio					2,31	7,69
Desv. est.					0,33	1,11
334-25-4	20% PEG	1 x 0,3	12,7	55	3,80	12,67
334-25-5	20% PEG	1 x 0,3	12,7	60	3,93	13,10
334-25-6	20% PEG	1 x 0,3	12,7	55	3,47	11,57
334-25-7	20% PEG	1 x 0,3	12,7	60	2,33	7,76
Promedio					3,38	11,28
Desv. est.					0,78	2,43
316-80-1	30% PEG	1 x 0,3	12,7	70	4,04	13,46
316-80-2	30% PEG	1 x 0,3	12,7	60	4,55	15,17
316-80-3	30% PEG	1 x 0,3	12,7	60	5,12	17,06
316-80-4	30% PEG	1 x 0,3	12,7	60	4,68	15,60
316-80-5	30% PEG	1 x 0,3	12,7	55	4,49	14,97
316-80-6	30% PEG	1 x 0,3	12,7	60	4,52	15,07
Promedio					4,57	15,68
Desv. est.					0,35	0,97

Ejemplo 25: Efecto de la concentración de PEG en la proporción de hinchamiento

Las FIG. 12, 13 y 14 muestran el efecto de la concentración de PEG en la proporción de hinchamiento de acuerdo con una realización de la presente invención. Se llevaron a cabo estudios de hinchamiento para caracterizar los geles de la composición de matriz sellante. Cuando entra en contacto con un entorno acuoso, el polímero hidrófilo se hincha formando un hidrogel. Una vez formado un gel, las moléculas de agua se difunden libremente a través de una red bastante amplia formada por partículas de FloSeal™ hinchadas. Después de añadir más agua, los contactos COH102-COH206 se rompen y las moléculas poliméricas individuales se pueden disolver en agua. Se prepararon geles de la composición de matriz sellante mezclando CoSeal™ y FloSeal™ en cuatro concentraciones diferentes (5%, 10%, 20% y 30% p/p) de polímero y mediante reacciones con la misma cantidad de plasma porcino (1,7 ml/g polvo). El gel se endureció durante 30 minutos y después se dejó que se hinchara en una solución salina a temperatura ambiente. Periódicamente se drenó el tampón y se determinó el peso del gel restante. Se controló el cambio de peso del gel. La proporción de hinchamiento, Q, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Q = W^*/W$$

donde W* es el peso húmedo y W es el peso original. La proporción de hinchamiento era mayor cuanto mayor era la concentración de polímero. Sin optar por ninguna teoría en particular, la disminución aparente de la proporción de hinchamiento se puede interpretar como una pérdida de material de gel a medida que éste se erosiona lentamente. El final del experimento se calificó como el tiempo en el que el gel se desintegraba en varias partes pequeñas o se volvía tan viscoso y débil que era imposible decantar el tampón libre del gel. El agua continúa penetrando hacia el núcleo y finalmente el gel se convierte en una solución viscosa de PEG y partículas de gelatina. Se requirieron aproximadamente 2-3 semanas para que todos los materiales se deshicieran (FIG. 14). Parece que el porcentaje de CoSeal™ en una composición de matriz sellante en polvo puede tener un gran impacto en la estabilidad del gel de la composición de matriz sellante. La tasa de disolución del gel de la composición de matriz sellante varía dependiendo del grado de reticulación de los polímeros. Los resultados mostraron que una mayor concentración de CoSeal™ podía causar una mayor estabilidad del gel y también provocar más hinchamiento. Es de esperar que la persistencia relativa de este gel *in vitro* sea similar a la persistencia *in vivo*.

Los anteriores ejemplos muestran claramente que las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden ser materiales sellantes eficaces. Las composiciones se pueden polimerizar *in situ* con líquido fisiológico o sangre y pueden obturar el tejido o adherirse muy firmemente al mismo.

Ejemplo 26: Valoración de las propiedades hemostáticas de determinadas formulaciones en modelos animales

30 Formulación nº 334-77

Un gramo de polvo de PEG-A (pentaeritritol tetraquis[mercaptoetil-polioxi-etilen] éter, PM 10.000), 1 g de polvo de PEG-B (pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato-2-polioxi-etilenglicol] éter, PM 10.000) y 8 g de FloSeal™ se introdujeron en una botella mezcladora (tamaño 50 ml) y ésta se cargó en la Inversina Tumbler Mixer para la mezcla. Estos tres componentes se mezclaron durante 10 minutos hasta mezcla completa. Seis jeringuillas (tamaño 5 ml) se rellenaron con aproximadamente 1,5 g de la mezcla.

Formulación nº 334-77-1

Una muestra de 1,5 g de la Formulación nº 334-77 se montó sobre una pieza de Gelfoam (3 x 4 cm², Compressed Gelfoam, Upjohn manufactured, NDC 0009-0353-01). El Gelfoam cubierto con la muestra se coció en un horno de vacío a 60-65°C durante 1 minuto hasta que la muestra comenzó a fundirse. Después se dejó que el material se enfriara y solidificara. Dos piezas de la torta resultante sobre Gelfoam se introdujeron en una bolsa con desecante y ésta se cerró herméticamente.

Formulación nº 334-77-4

Una muestra de la Formulación nº 334-77 se montó sobre una pieza de esponja de colágeno y se coció. Las esponjas se prepararon reticulando ligeramente fibras de colágeno con una solución de glutaraldehído (5k ppm) y mediante liofilización de una solución de colágeno (1,0%) utilizando VirTis Genesis Freeze Dryers. Una compresa de colágeno (3 x 4 cm²) se cubrió cuidadosamente con una muestra de 1,5 g de la Formulación nº 334-77 y después se calentó en un horno de vacío a 60-65°C durante 1 minuto hasta que la muestra comenzó a fundirse. Después se dejó que el material se enfriara y solidificara. Cada compresa de colágeno resultante se introdujo en una bolsa con desecante y ésta se cerró herméticamente.

Métodos:

50 Procedimientos quirúrgicos:

Los animales (conejos NZW, hembra, peso aproximado 3 kg) fueron anestesiados y recibieron una heparinización intravenosa a una dosis de 4.000 IU/kg 30 min antes de resección hepática parcial.

Modelo de resección hepática:

- 5 Se llevó a cabo una laparotomía media, se expuso el lóbulo izquierdo del hígado y se sujetó con una pinza. Después se extirpó parte del lóbulo hepático lateral izquierdo. La hemorragia se controló mediante la aplicación del elemento de prueba. El tiempo de aplicación y endurecimiento se normalizó para que no superara los 300 segundos. La pinza hemostática se retiró cinco minutos después, cuando se esperaba haber logrado la hemostasia primaria.

Modelo de abrasión hepática:

- 10 Se llevó a cabo una laparotomía media y se expuso el lóbulo izquierdo del hígado. En la superficie del lóbulo del hígado se raspó una lesión circular superficial con un diámetro de 2 cm y una profundidad de 2 mm. Esto se llevó a cabo utilizando una máquina taladradora con un accesorio de disco de amolado (taladro-pulidora PROXXON FBS 230/E; tamaño de grano P40, velocidad de rotación 5.000/min). La pequeña hemorragia o sangría vascular o capilar resultante así generada se trató con una de las formulaciones.

- 15 Después de un período de observación de 15 minutos, el lóbulo hepático izquierdo se llevó a su posición original en la cavidad abdominal. Si se lograba la hemostasia, se cerraba el abdomen y se extirpaba el mesenterio (Synthofil® 2/0). La incisión muscular y cutánea se suturó por separado utilizando Synthofil® 2/0 como suturas interrumpidas en dos niveles.

- 20 Después de 24 horas, los animales fueron sacrificados anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (aproximadamente 320 mg i.v./animal). Después se llevó a cabo una necropsia. Se inspeccionó visualmente el abdomen en cuanto a la presencia de sangre y/o coágulos sanguíneos resultantes de una nueva hemorragia. En caso afirmativo, la sangre y/o los coágulos sanguíneos se limpiaron utilizando tampones quirúrgicos previamente pesados y se determinó su peso. En caso de no lograrse la hemostasia, los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (aproximadamente 320 mg i.v./animal) y sólo se evaluaron los criterios principales de valoración.

Resultados:

- 25 El presente estudio tenía por objeto evaluar las propiedades hemostáticas de las formulaciones nº 334-88, nº 334-77-1 y nº 334-77-4. Se utilizaron dos modelos de hemostasia muy rigurosos: (1) la resección hepática y (2) el modelo de superficie hepática en conejos altamente heparinizados.

- 30 Después de aplicar la formulación nº 334-77 en polvo sobre la herida sangrante se comprobó que era útil comprimir la formulación sobre la superficie de la herida para lograr la hemostasia. Resultaba difícil lograr esta presión con un guante de látex quirúrgico seco, ya que el polvo tenía más adherencia con el guante que con la herida. Sin embargo, la presión se aplicaba más fácilmente con un guante húmedo. La formulación formó una membrana hermética después de entrar en contacto con la humedad de la sangre. Después de la aplicación, la membrana condujo a una hemostasia en muchos casos, incluso en los modelos rigurosos utilizados en este ejemplo. Si no se lograba una hemostasia completa después de la primera aplicación y la herida seguía sangrando debajo de la capa formada, resultaba difícil detener adecuadamente la hemorragia simplemente mediante la aplicación de más formulación nº 334-77. Puede ser difícil limitar la aplicación de la formulación únicamente al lugar en el que es necesaria para detener la hemorragia, ya que la formulación en polvo puede caer a la cavidad abdominal y adherirse a la misma si no se pone suficiente cuidado. Por ello resulta útil una aplicación apropiada de la formulación nº 334-77.

- 40 En cambio, la formulación nº 334-77-4 se pudo aplicar fácilmente en una capa de espesor constante sobre un área grande del tejido y con suficiente presión para lograr la hemostasia. La formulación nº 334-77-4, con la compresa de colágeno nativo como soporte, permaneció adherida al lóbulo hepático después de su aplicación y actuó como agente hemostático y adhesivo, pegando la compresa a la herida y la cápsula hepática. Este soporte biodegradable puede hacer que el componente en polvo sea más eficaz para lograr la hemostasia. El soporte biodegradable también puede aportar flexibilidad a la formulación, permitiendo que ésta se curve sobre los bordes de una resección durante su aplicación. Esta formulación se utilizó para tratar dos animales, uno en el modelo de superficie y otro en el modelo de resección. En los dos modelos se logró una hemostasia aguda. Únicamente el animal tratado en el modelo de superficie sobrevivió sin ninguna hemorragia post-operatoria durante 24 horas. El vellón de colágeno seguía en el lugar de aplicación después de 24 horas. El animal tratado en el modelo de resección sangró durante la noche hasta fallecer y el vellón estaba despegado. La diferencia entre los dos experimentos era que en el primer el vellón se comprimió en seco sobre la herida y en el segundo la presión se ejerció con un tampón de gasa húmeda. La Tabla 15 muestra los resultados.

50

Tabla 15

Animal	Experimento	
1	1a	Modelo de resección hepática: (n° 334-77-1) Lóbulo hepático izquierdo. Aplicación sin pinza. Durante la aplicación, la compresa de Gelfoam estaba quebradiza y rígida y no se podía doblar en seco alrededor de los bordes de la resección. Se comprimió durante 2 min con un tampón de gasa humedecida (NaCl 0,9%) sobre la superficie de resección y la cápsula hepática intacta alrededor de la resección. El polvo se adhirió firmemente a la superficie de la herida, pero no al soporte Gelfoam. El polvo no adherido se lavó con NaCl 0,9%. La hemorragia se interrumpió, a excepción de un punto en el borde de la resección, donde se observó sangrado por filtración.
	1b	Modelo de superficie: (n° 334-77-1) Lóbulo hepático medio izquierdo. Aplicación sin pinza. La formulación n° 334-77-1 se comprimió durante 2 min con un tampón de gasa humedecida (NaCl 0,9%) sobre la superficie de la herida. Se retiró el soporte de Gelfoam. La formulación estaba adherida a la herida. La hemorragia se había interrumpido.
2	2a	Modelo de resección hepática: (n° 334-77) Lóbulo hepático lateral izquierdo. La Formulación n° 334-77 se aplicó sobre la superficie sangrante y se comprimió con guante de látex seco. El polvo se adhirió con más fuerza al guante que a la superficie de la herida. La capa de la formulación se desprendió con el guante.
	2b	Modelo de resección hepática: (n° 334-77) Mismo lóbulo hepático lateral izquierdo que en 2a. La Formulación n° 334-77 se aplicó con el guante húmedo y se comprimió durante 10 s sobre la superficie de la herida. Se observó un sangrado por filtración por debajo del polvo.
	2c	Modelo de resección hepática: (n° 334-77) Lóbulo hepático medio izquierdo. Aplicación con pinza. La formulación n° 334-77 se aplicó sobre la superficie sangrienta y se comprimió contra la misma con una lámina metálica. La pinza se soltó después de 5 min. Ligero sangrado por filtración en el borde de la resección. Se intentó detener esta hemorragia aplicando más formulación. No fue posible detener la hemorragia por completo. Se retiró la capa de polvo. La capa formó una membrana hermética, pero con poca adherencia con la superficie de la herida.
	2d	Modelo de resección hepática: (n° WR334-77) Mismo lóbulo hepático que en 2c, pero se realizó un nuevo corte para promover la hemorragia. Aplicación después de pinzar el lóbulo hepático. La formulación se comprimió durante 2 mi con el escalpelo sobre la herida. No fue posible detener la hemorragia.
3	3a	Modelo de superficie: n° WR334-77 + compresa de colágeno equino El polvo n° 344-77 se extendió sobre una capa delgada de una compresa de colágeno equino. En la compresa de colágeno se perforaron agujeros con una aguja de inyección desde el lado con la capa de formulación. Parte de la formulación se introdujo a presión en los agujeros. La capa de formulación era más delgada que en el caso de las variantes de formulación. El vellón se aplicó en seco, sin pinzar el lóbulo hepático. El vellón se comprimió con guante durante 2 minutos. No se observó hemorragia. Se retiró la compresa. Se observó una buena adherencia con la cápsula hepática y menos adherencia a la superficie de la herida.
	3b	Modelo de superficie: compresa de formulación de colágeno (n° 334-77-4) Misma herida que en 3a. La compresa se aplicó en seco y se comprimió durante 2 min sobre la superficie de la herida. La compresa era más flexible (deformable) que el vellón con el soporte de Gelfoam. Esto favorecía la facilidad de aplicación. La formulación no se despegó de la compresa de colágeno. Toda la compresa de formulación de colágeno estaba adherida a la herida y la cápsula hepática. No se observó hemorragia. La compresa de colágeno se humedeció con NaCl 0,9% y se cerró la herida del conejo. El animal sobrevivió durante 24 horas y después fue sacrificado. En el examen post mórtem, el vellón se encontraba en su sitio y no se había producido ninguna hemorragia durante las 24 horas.

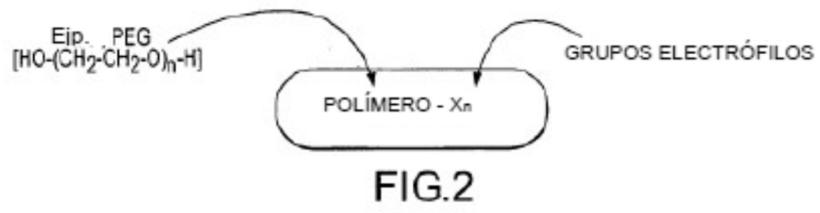
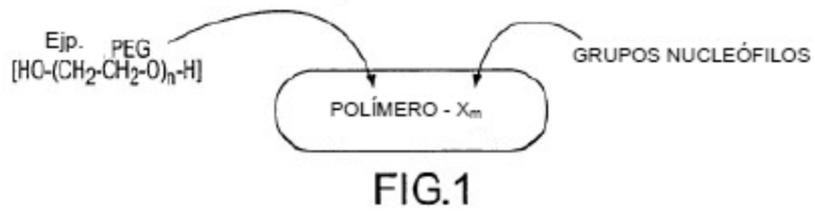
Reivindicaciones

1. Composición seca para conseguir la hemostasis o la contención de otro fluido en un contexto *in vivo* de matriz para aplicar a un vertebrado con el fin de facilitar la contención de fluido, que comprende:
 - 5 un componente formador de hidrogel que actúa como absorbente;
 - un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleófilos y;
 - un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrófilos,
 - donde el primer componente y el segundo componente se reticulan para formar una matriz porosa que presenta intersticios, y el componente formador de hidrogel es capaz de hidratarse para formar un hidrogel que rellena al menos algunos de los intersticios.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, donde el componente formador de hidrogel, el primer componente y el segundo componente están fijados en un soporte.
3. Composición según la reivindicación 2, donde el soporte opcionalmente es poroso y componente comprende un elemento seleccionado del grupo consistente en una compresa, una lámina, una película y una esponja.
- 15 4. Composición según la reivindicación 2, donde el soporte comprende un elemento seleccionado del grupo consistente en una proteína, un carbohidrato y un polímero sintético y preferentemente se selecciona del grupo consistente en colágeno, fibrina, celulosa y quitosano.
5. Composición según la reivindicación 1, donde el componente formador de hidrogel comprende un polímero biológico seleccionado del grupo consistente en gelatina, colágeno, albúmina, hemoglobina, fibrinógeno, fibrina, caseína, fibronectina, elastina, queratina, laminina y derivados y combinaciones de los mismos.
- 20 6. Composición según la reivindicación 1, donde el primer componente comprende un elemento seleccionado del grupo consistente en una dilisina, una trilisina, una tetralisina, una pentalisina, una dicisteína, una tricisteína, una tetracisteína, una pentacisteína y un oligopéptido o polipéptido que comprende dos o más lisinas o cisteínas, y/o el segundo componente comprende dos o más grupos succinimidilo.
- 25 7. Composición según la reivindicación 1, donde el segundo componente comprende un polietilenglicol que contiene un grupo succinimidilo.
8. Composición según la reivindicación 1, donde, bajo condiciones que permiten la reacción, el primer componente se reticula con el segundo componente, preferentemente donde los componentes primero y segundo reaccionan bajo condiciones *in vivo* para formar una matriz reticulada y el componente formador de hidrogel absorbe rápidamente un fluido biológico.
- 30 9. Composición según la reivindicación 1, donde el componente formador de hidrogel que actúa como absorbente proporciona una superficie semi-seca para que los componentes primero y segundo se polimericen, o, bajo condiciones *in vivo*, el componente formador de hidrogel que actúa como absorbente proporciona una superficie semi-seca para que los componentes primero y segundo se reticulen uno con otro y rodeen al tejido.
- 35 10. Composición según la reivindicación 1, donde la composición proporciona un sellante de tejidos para la hemostasis y/o para el sellado de heridas, o la rápida hemostasis en una rotura de tejido húmeda, o la hemostasis rápida en un punto de sutura o una punción de sangrado arterial.
11. Composición según la reivindicación 1, que además comprende un agente activo.
12. Composición según la reivindicación 1, que además comprende un agente hemostático seleccionado del grupo consistente en trombina, fibrinógeno y un agente coagulante.
- 40 13. *Kit* que comprende un recipiente y una composición de polvo mixto dispuesta en el interior del recipiente, comprendiendo dicha composición:
 - 45 un componente formador de hidrogel en forma de polvo;
 - un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleófilos, estando el primer componente reticulable en forma de polvo; y
 - un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrófilos, estando el segundo componente reticulable en forma de polvo;
 - donde, bajo condiciones que posibilitan la reacción, los componentes reticulables primero y segundo son capaces de reticularse de forma esencialmente inmediata.

14. Esponja de colágeno y una composición de polvo mixto fijada en la superficie de la esponja, comprendiendo dicha composición:

5 un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleófilos, estando el primer componente reticulable en forma de polvo;
un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrófilos, estando el segundo componente reticulable en forma de polvo; y
un componente formador de hidrogel en forma de polvo;
10 donde, bajo condiciones que posibilitan la reacción, los componentes reticulables primero y segundo son capaces de reticularse de forma inmediata.

10



SG-PEG: GLUTARATO DE SUCCINIMIDO PEG ACTIVADO DE FORMA TETRAFUNCIONAL

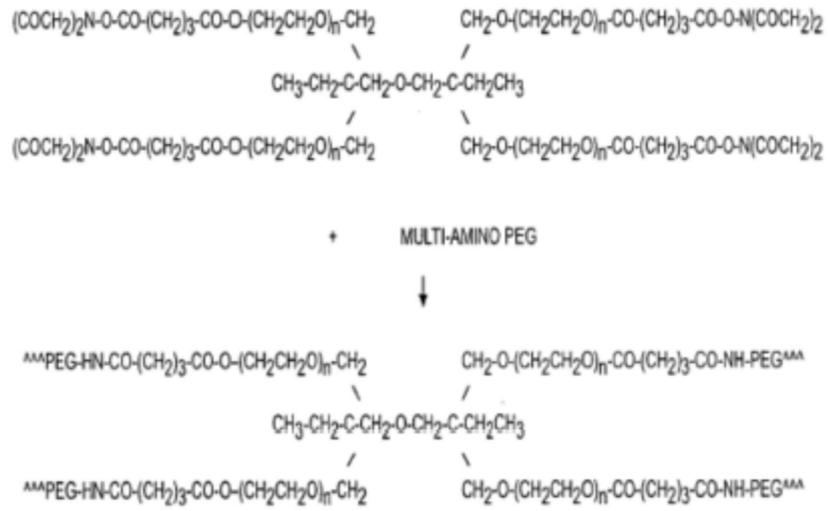


FIG.3

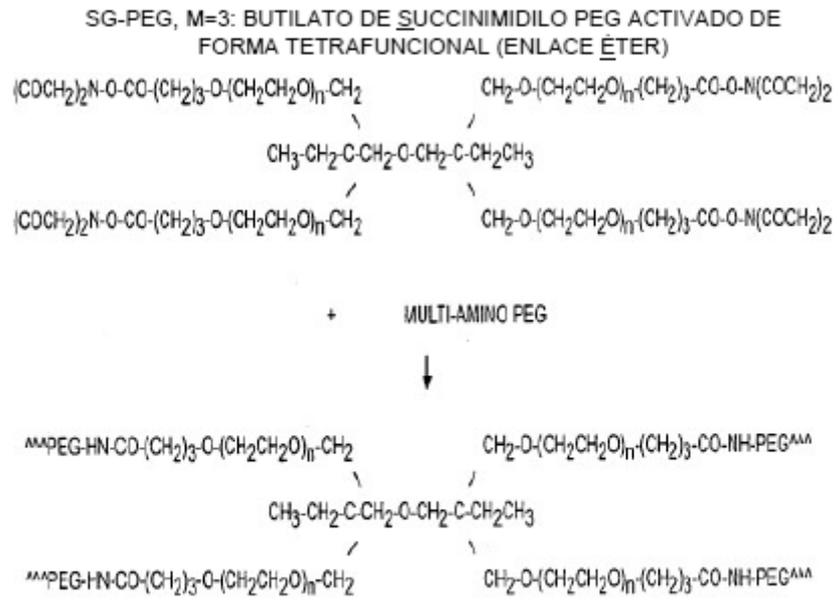


FIG.4

-ALA-GLY-PRO-ARG-GLY-GLU-4HYP-GLY-PRO-

FIG.5

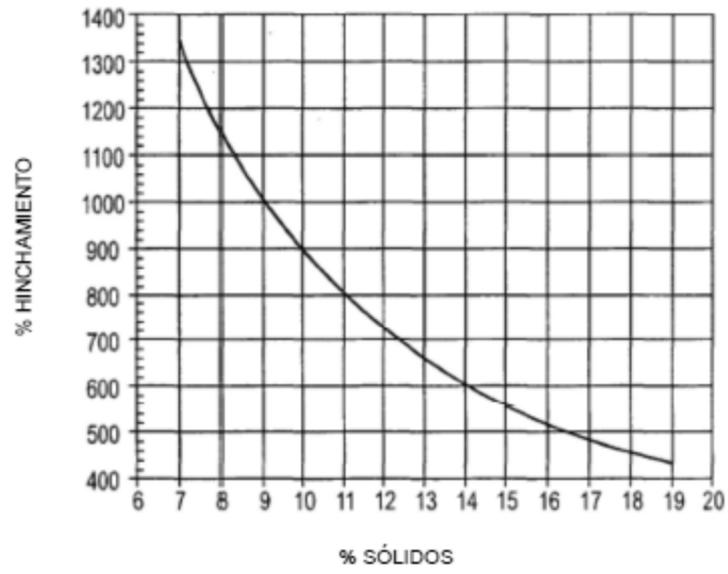
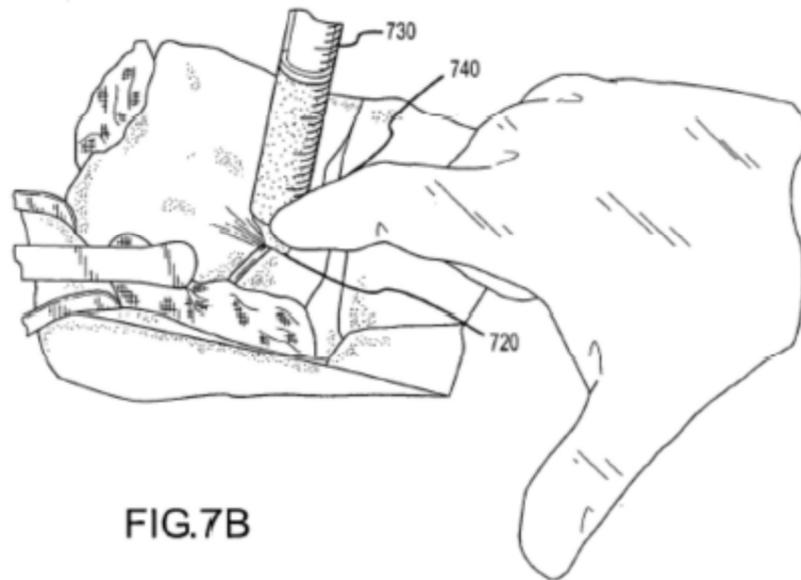
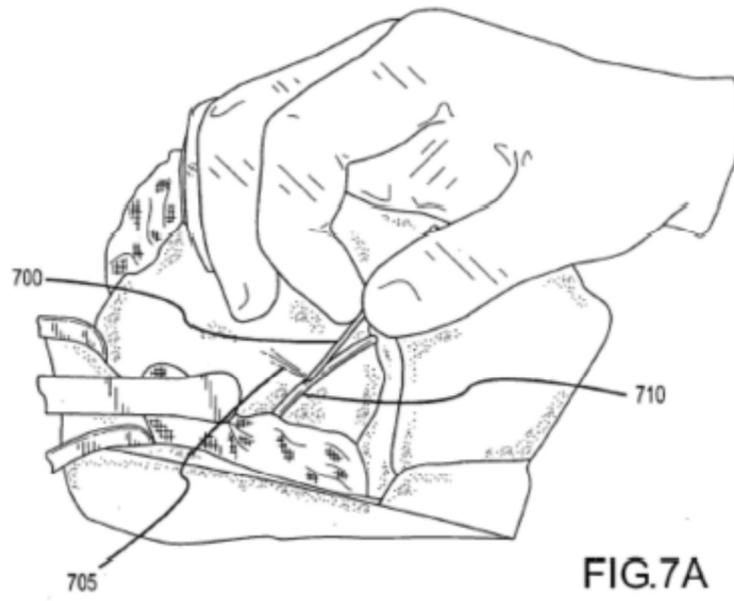


FIG.6



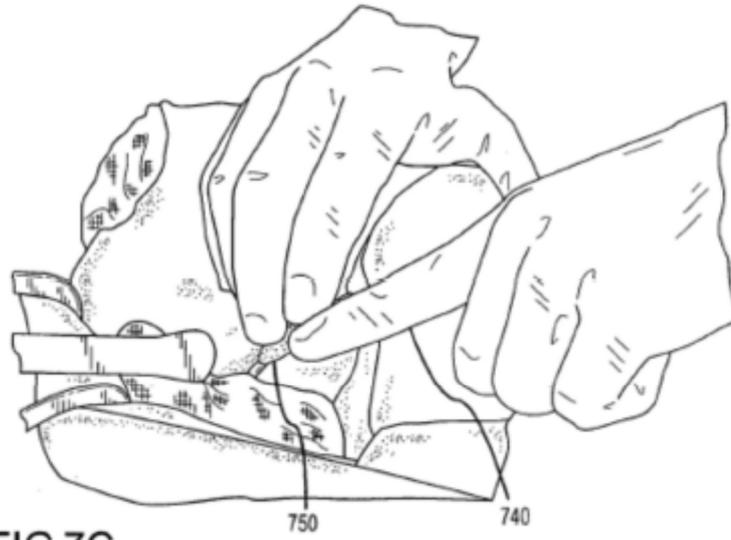


FIG.7C

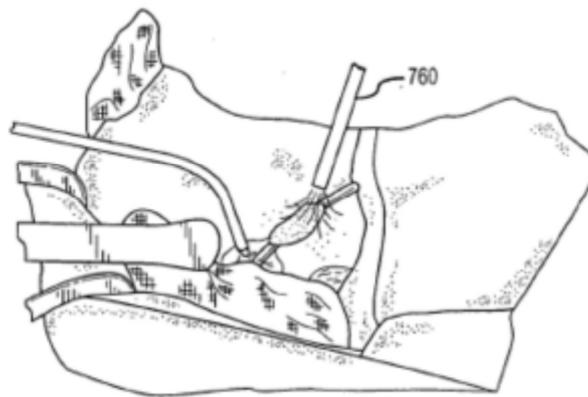


FIG.7D

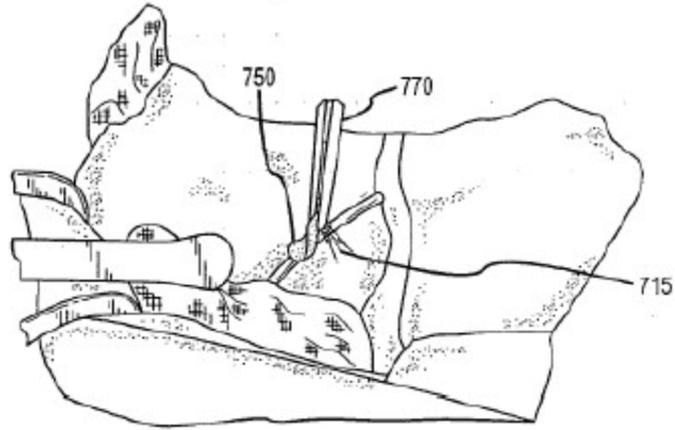


FIG.7E

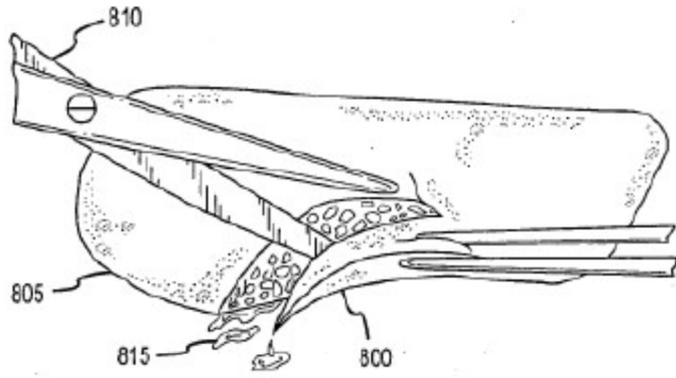


FIG. 8A

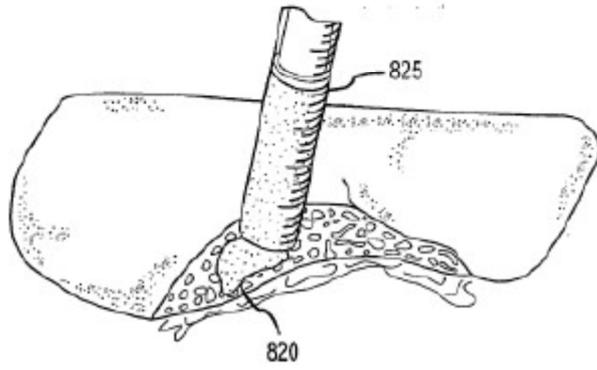


FIG. 8B

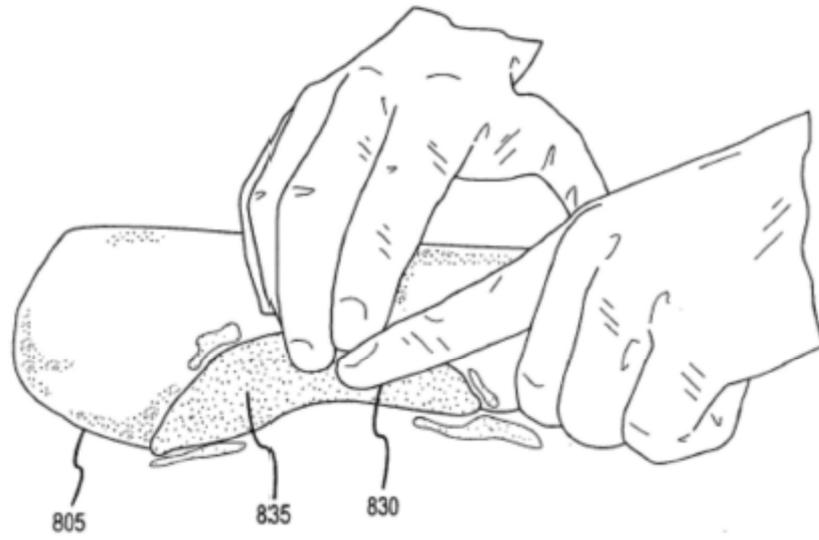


FIG. 8C

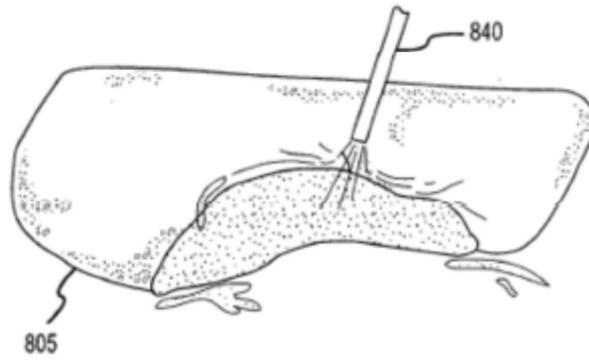


FIG. 8D

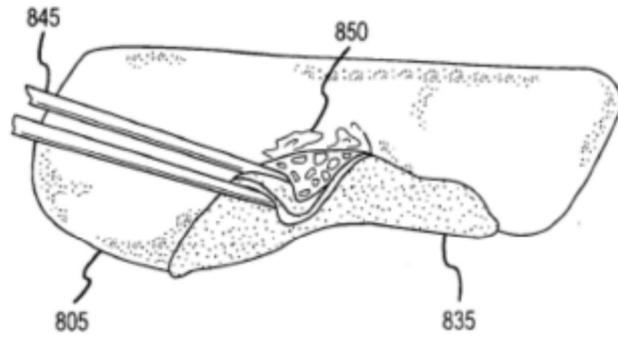


FIG. 8E

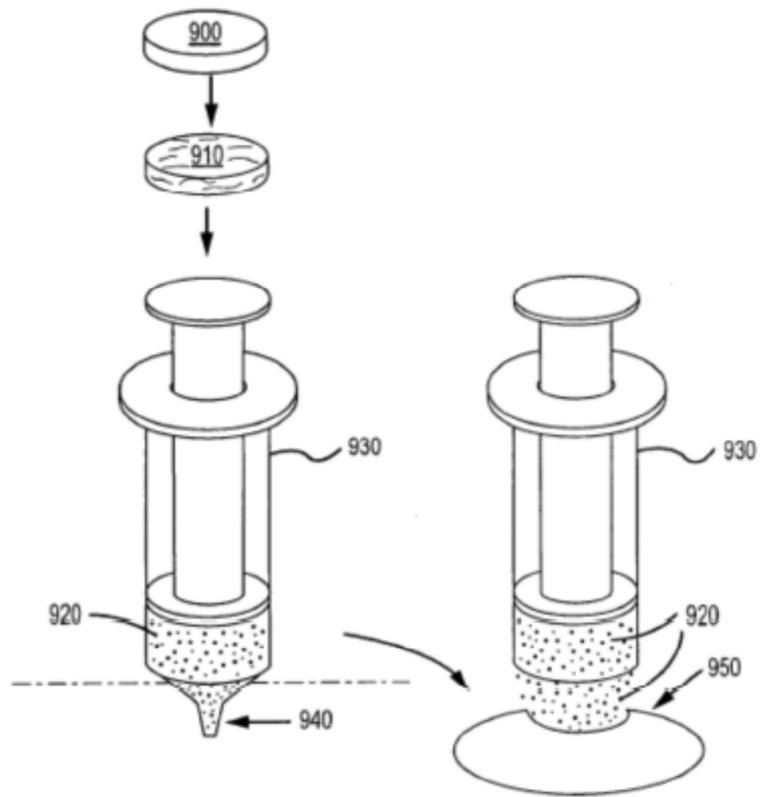


FIG.9

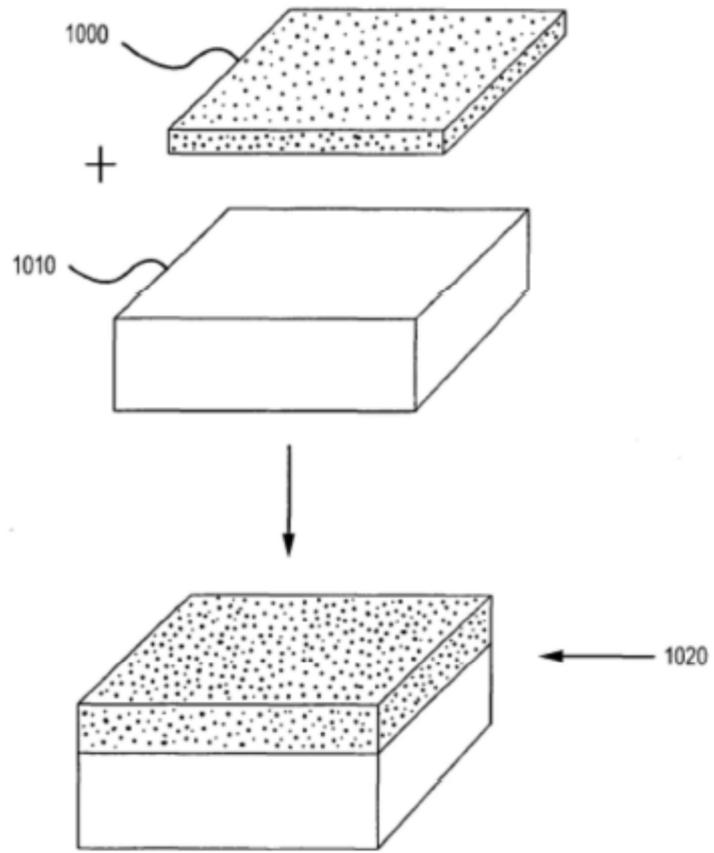


FIG.10

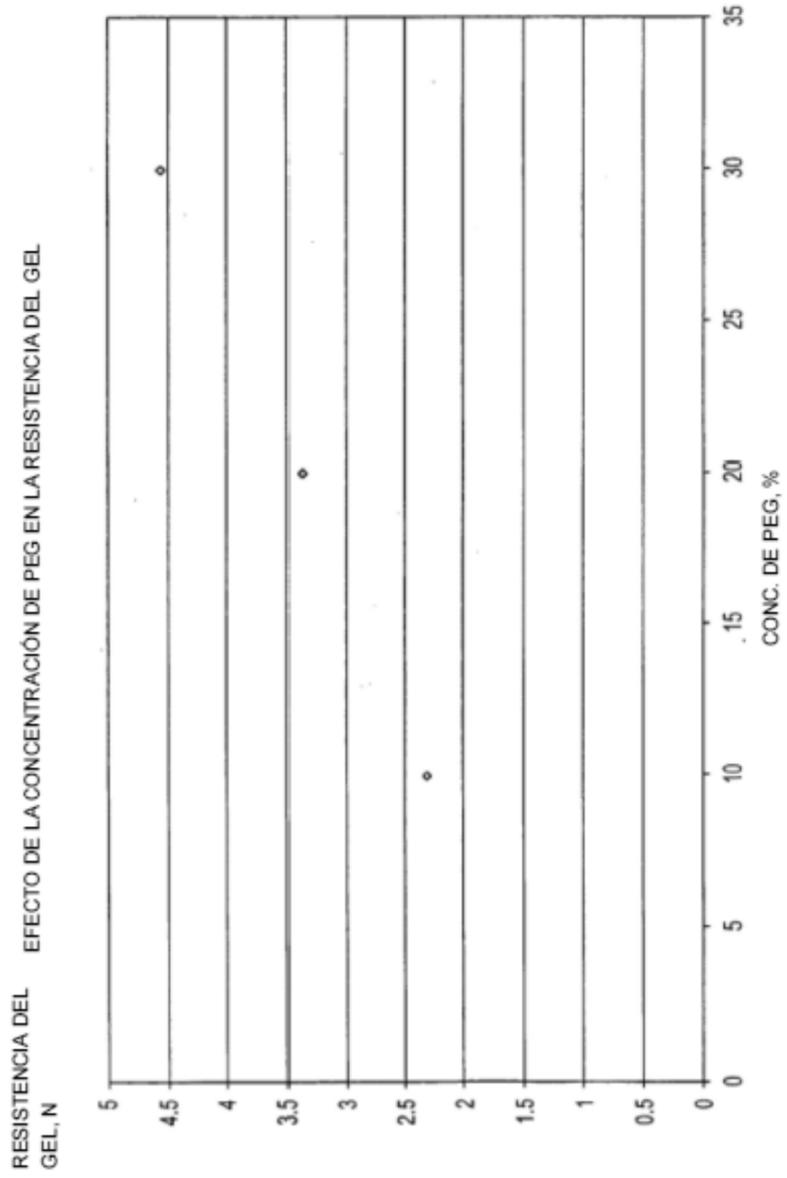


FIG.11

ID	MUESTRA	PAN ID	PESO SECO	30 sec.	0.6 hr 0.025 d	73 min 0.05 d	2 hr 0.08 d	17.4 hr 0.73 d	1 dia	3.8 dias	4.8 dias	5.8 dias	7.8 dias	10.8 dias	11.8 dias	12.8 dias	13.8 dias	17.8 dias
30%		1	1.49	1.59	2.13	2.38	2.70	4.41	4.67	5.63	6.02	6.13	6.53	7.09	7.02	6.61	6.52	5.00
		2	1.51	1.68	2.14	2.36	2.62	4.27	4.53	5.51	5.86	6.03	6.39	6.93	6.98	6.87	6.73	4.91
		3	1.46	1.54	2.00	2.23	2.50	4.08	4.30	5.37	5.72	5.91	6.39	6.92	6.85	6.69	6.54	4.56
		AVG			2.09		2.61	4.25	4.50	5.50	5.86	6.02	6.44	6.98	6.95	6.72	6.60	4.83
		SIDev			0.07		0.10	0.16	0.18	0.13	0.15	0.11	0.08	0.10	0.09	0.13		
		% rsd			3.53		3.96	3.81	4.08	2.39	2.57	1.78						
20%		1	1.48	1.63	2.26	2.54	2.88	4.22	4.33	5.04	5.21	5.08	5.08	5.11	5.32	5.02	5.07	3.76
		2	1.50	1.71	2.36	2.70	3.03	4.38	4.51	5.09	5.24	5.18	5.06	5.10	5.03	4.84	4.75	3.29
		3	1.51	1.59	2.01	2.25	2.48	3.71	3.89	4.57	4.77	4.72	4.77	4.96	4.90	4.88	4.77	2.72
		AVG			2.21		2.80	4.10	4.24	4.90	5.07	4.99	4.97	5.06	5.08	4.92	4.86	3.25
		SIDev			0.18		0.29	0.35	0.32	0.29	0.27	0.24	0.18	0.08	0.22	0.10		
		% rsd			7.94		10.31	8.55	7.48	5.88	5.25	4.82						
10%		1	1.68	1.91	2.73	3.02	3.48	4.54	4.32	4.68	4.80	4.70	4.49	4.52	4.33	4.06	3.93	2.89
		2	1.53	2.01	2.60	2.88	3.22	3.75	3.76	4.11	4.10	3.97	3.38	3.49	3.34	3.24	2.99	2.02
		3	1.54	1.80	2.68	2.97	3.34	4.19	4.28	4.52	4.50	4.46	4.22	4.00	3.76	3.58	3.35	2.48
		AVG			2.67		3.35	4.16	4.12	4.44	4.47	4.37	4.03	4.00	3.81	3.63	3.42	2.46
		SIDev			0.07		0.13	0.39	0.32	0.30	0.35	0.37	0.58	0.51	0.50	0.41		
		% rsd			2.51		3.95	9.45	7.66	6.71	7.77	8.51						
5%		1	1.49	1.83	2.57	2.70	3.05	3.58	3.30	3.71	3.85	3.69	3.30	3.06	2.79	2.70	2.41	1.05
		2	1.44	2.01	2.73	2.93	3.18	3.78	3.68	3.85	3.99	3.83	3.23	3.07	2.66	2.69	2.52	1.14
		3	1.38	1.78	2.60	2.63	3.33	4.09	3.93	4.23	4.32	4.08	3.79	3.23	2.79	2.21	2.07	1.02
		AVG			2.64		3.19	3.81	3.64	3.93	4.05	3.87	3.44	3.12	2.74	2.53	2.33	1.07
		SIDev			0.08		0.14	0.26	0.32	0.27	0.24	0.20	0.30	0.09	0.08	0.28		
		% rsd			3.16		4.31	6.76	8.82	6.93	5.89	5.18						

FIG.12

	36 min	73 min	2 hr	174 hr	1 dia	3,8 dias	4,8 dias	5,8 dias	7,8 dias	10,8 dias	11,8 dias	12,8 dias	13,8 dias	17,8 dias
0,025d			0,06d	0,13 d										
1,338	1,500	1,700	2,772	2,936	3,540	3,786	3,854	4,109	4,462	4,44994	4,154998	4,104045	3,998871	3,145939
1,270	1,402	1,558	2,535	2,695	3,276	3,453	3,582	3,797	4,119	4,149548	4,081253	3,998871	2,919639	
1,306	1,450	1,627	2,561	2,568	3,496	3,724	3,852	4,166	4,506	4,461554	4,360055	4,258865	2,972638	
1,305	1,451	1,629	2,555	2,730	3,437	3,664	3,763	4,024	4,363	4,342032	4,198772	4,120907	3,012739	
0,034	0,049	0,071	0,118	0,191	0,142	0,160	0,157	0,199	0,213	0,168315				
1,387	1,559	1,771	2,590	2,656	3,094	3,169	3,119	3,118	3,119	3,265	3,084	3,110	2,289098	
1,377	1,577	1,774	2,561	2,635	2,977	3,065	3,026	2,951	2,961	2,938	2,830	2,777	1,921773	
1,268	1,418	1,559	2,335	2,449	2,876	3,001	2,971	3,000	3,123	3,083	3,073	3,005	1,714088	
1,344	1,518	1,701	2,495	2,80	2,982	3,088	3,039	3,026	3,061	3,095	2,996	2,964	1,976319	
0,066	0,086	0,123	0,140	0,114	0,109	0,101	0,075	0,082	0,087	0,164	0,143	0,170		
1,426	1,577	1,820	2,370	2,259	2,446	2,506	2,456	2,346	2,360	2,265	2,265	2,119	2,052	1,510321
1,291	1,430	1,601	1,965	1,867	2,041	2,041	1,973	1,682	1,734	1,561	1,611	1,436	1,003033	
1,489	1,650	1,854	2,326	2,376	2,513	2,501	2,475	2,342	2,221	2,090	1,991	1,859	1,376667	
1,402	1,552	1,758	2,187	2,168	2,333	2,349	2,301	2,124	2,105	2,005	1,907	1,799	1,296674	
0,101	0,112	0,137	0,280	0,266	0,255	0,267	0,284	0,382	0,329	0,311	0,365	0,288		
1,406	1,474	1,668	1,953	1,800	2,025	2,104	2,014	1,800	1,672	1,522	1,476	1,316	0,570789	
1,356	1,456	1,580	1,877	1,829	1,909	1,982	1,900	1,604	1,524	1,320	1,336	1,252	0,563527	
1,465	1,480	1,675	2,571	2,214	2,384	2,432	2,300	2,134	1,817	1,571	1,745	1,164	0,57336	
1,409	1,470	1,768	2,133	1,947	2,106	2,173	2,071	1,846	1,671	1,471	1,352	1,244	0,569225	
0,055	0,013	0,151	0,381	0,231	0,248	0,233	0,206	0,288	0,147	0,133	0,116	0,076		

FIG.13

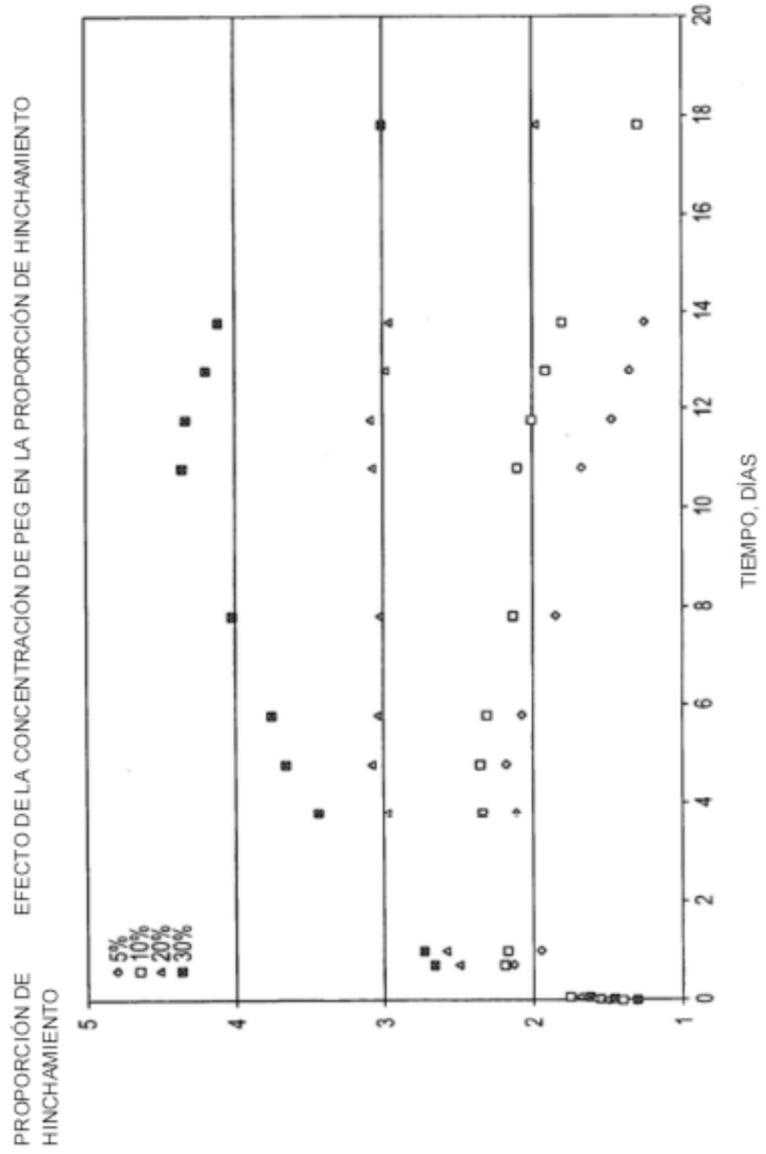


FIG.14