

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 276**

51 Int. Cl.:

A61L 15/58 (2006.01)

A61L 31/02 (2006.01)

C08L 71/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2008** **E 12153260 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 2537539**

54 Título: **Sellante polimérico para tejidos**

30 Prioridad:

13.04.2007 US 911737 P

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

28.11.2019

73 Titular/es:

KUROS BIOSURGERY AG (100.0%)

Wagistrasse 25

8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

REHOR, ANNEMIE y

CERRITELLI, SIMONA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 733 276 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

Sellante polimérico para tejidos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con biomateriales, especialmente sellantes poliméricos para tejidos y moléculas precursoras capaces de formar biomateriales, especialmente sellantes poliméricos para tejidos y métodos para preparar y utilizarlos. En particular, la presente invención se relaciona con biomateriales para sellar o bloquear desgarres, cortes o abrasiones.

Antecedentes de la invención

- 10 Durante la ejecución de procedimientos médicos como parte de una intervención quirúrgica o tratamiento de una lesión, un médico frecuentemente tiene que tratar con la extravasación de fluidos corporales, tales como fluidos cerebrospinales durante cirugía de cerebro o de la médula espinal o sangre resultante de una herida, una enfermedad o un trastorno o de un procedimiento quirúrgico. La restauración del tejido y la integridad de la circulación es importante para un resultado positivo de un tratamiento independientemente de si el daño ha sido el resultado de una herida o de un procedimiento quirúrgico.

- 15 El método más antiguo para unir tejidos dañados es el uso de ajustadores mecánicos tales como pinzas, grapas o suturas. Los aseguradores de tejido mecánicos sufren de una variedad de limitaciones. Los aseguradores mecánicos requieren significativa habilidad, consumen tiempo para su aplicación y pueden presentar fugas a lo largo de la línea de la unión, lo que por sí mismo puede causar traumas adicionales a los tejidos circundantes. También, los aseguradores mecánicos pueden ser no efectivos en un cierto número de órganos altamente vascularizados. Estas desventajas hacen más lento adicionalmente el procedimiento quirúrgico y el tiempo de curación.

Los intentos para superar estas desventajas han dado como resultado el desarrollo de adhesivos, gomas o sellantes capaces de unir superficies de tejido entre sí rápidamente, bien sea solos o en combinación con aseguramiento mecánico mientras que promueven, o al menos no inhiben, la curación normal y reducen o evitan la pérdida de fluidos corporales.

- 25 Una clase común de adhesivos para tejidos son los materiales basados en fibrina, que contienen un concentrado de fibrinógeno y trombina. Los adhesivos de fibrina son típicamente adhesivos de dos componentes que cuando se mezclan juntos con una fuente de calcio reaccionan para estimular las últimas etapas de la cascada formadora de coágulos sanguíneos que se presenta de forma natural.

- 30 El coágulo resultante se adhiere al tejido y sirve como puente entre el tejido, las brechas y sella el tejido hasta que pueda ocurrir la curación. Sin embargo, los adhesivos basados en fibrina han encontrado un éxito limitado debido a la baja resistencia de los materiales sellantes y al riesgo de transfección asociado cuando se utilizan productos derivados de la sangre humana.

- 35 Las gomas basadas en gelatina entrecruzada con un aldehído también se han encontrado con un éxito limitado. Representantes de esta clase de goma son gelatina-resorcinol entrecruzadas con formaldehído (GRF) o glutaraldehído (GRFG). Mientras que las gomas con base en gelatina se han estudiado extensamente y han mostrado en general ser efectivas, estas composiciones se han encontrado con éxito limitado debido al uso de soluciones de gelatina caliente, a la irritación de los tejidos asociada con el aldehído y a la naturaleza crítica de los procesos de manipulaciones necesarios para obtener un entrecruzamiento apropiado en el sitio de unión.

- 40 Obedeciendo las limitaciones antes descritas, se ha dirigido un esfuerzo de desarrollo considerable hacia el hallazgo de una composición sintética adecuada que pueda ser utilizada como goma o sellante de tejidos. Con este fin, se han investigado cianoacrilatos, poliuretanos, polimetacrilatos y polietilenglicoles, entre otros polímeros sintéticos, como gomas o sellantes para tejidos con éxito limitado. Hay pocas composiciones de goma o sellantes para tejidos disponibles que satisfacen los requerimientos resistencia mecánica suficiente y biocompatibilidad, además de propiedades de manipulación consistentes con una amplia variedad de escenarios quirúrgicos.

- 45 Sin embargo, estas composiciones muestran desventajas con respecto a la manipulación y propiedades mecánicas tal como hinchamiento del biomaterial. Así, existe una necesidad para un biomaterial que pueda aplicarse como goma o sellante de tejido que no solamente sea biocompatible, sino que también sea una cura bien definida y muestre una combinación de las propiedades mecánicas requeridas.

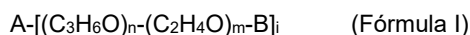
- 50 Las composiciones de la técnica anterior se divulgan en los documentos WO 2006/072623; WO 2006/065221; US 2003/044468; US 2003/220245 y WO 00/44808; WO 2003/052091; US 5,874,500.

Por lo tanto es un objeto de la presente invención proveer composiciones, métodos y kits adecuados para formar biomateriales sintéticos para uso como sellantes de tejidos. Es un objeto adicional de la invención proveer un biomaterial para uso como sellante de tejido que evite un bajo incremento en el volumen obedeciendo a la incorporación de agua. Es un objeto adicional de la invención proveer un biomaterial sintético como sellante para tejido

que sea completamente reabsorbible con el tiempo. Es un objeto adicional de la invención proveer un biomaterial sintético con buena resistencia mecánica para uso como sellante de tejidos. Es un objeto adicional de la invención proveer un material sintético que pueda servir potencialmente como adjunto para reparaciones del tejido dural suturado durante una cirugía de cráneo y reduce o evita la fuga de fluido cerebroespinal hacia el ambiente externo.

5 Resumen de la invención

Se describen aquí composiciones y métodos para hacer biomateriales para uso como sellantes de tejidos, kits que contienen moléculas precursoras para la formación de biomateriales y el uso de biomateriales en escenarios quirúrgicos. Las composiciones, las cuales se utilizan para hacer los biomateriales, comprenden al menos una primera y segunda moléculas precursoras. La primera molécula precursora contiene al menos dos grupos nucleofílicos y la segunda molécula precursora contiene al menos dos grupos electrofílicos. Los grupos nucleofílicos y electrofílicos de la primera y segunda moléculas precursoras son capaces de formar enlaces covalentes una con otra bajo condiciones fisiológicas. El entrecruzamiento ocurre preferiblemente en agua bajo condiciones básicas. Las moléculas precursoras se seleccionan con base en las propiedades deseadas del biomaterial. En una realización, la primera molécula precursora es un polímero basado en poli (etilenglicol) que tiene x grupos nucleofílicos seleccionados del grupo consistente de grupos tiol o amino, donde x es mayor que o igual a 2. Preferiblemente, los grupos x nucleofílicos son grupos tiol. Preferiblemente, la segunda molécula precursora es un copolímero de bloque de brazos múltiples de poli (óxido de etileno-óxido de propileno) (PEO-PPO) funcionalizado en cada uno de sus brazos con grupos insaturados conjugados y la segunda molécula precursora es de la fórmula general I:



20 Donde n y m son enteros de 1 a 200

i es mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8

A es un punto de ramificación

B es un grupo insaturado conjugado, por ejemplo, acrilato.

Tales polímeros son vendidos por BASF bajo la marca comercial Tetronic®.

25 En una realización preferida, la primera molécula precursora es un poli(etilenglicol) de cuatro brazos (PEG) funcionalizado sobre cada uno de sus brazos con un grupo tiol(pentaeritritol), poli(etilenglicol, éter tetra-sulfhidrido "PEG tetratiol"). En una realización más preferida, pentaeritritol poli(etilenglicol)éter tetra-sulfhidrido tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 2 a 20 kD, más preferiblemente en un rango de aproximadamente 3 a 11 kD y aún más preferiblemente en un rango de 5 a 10 kD. En otra realización, los grupos B insaturados conjugados de la segunda molécula precursora están arco con grupos acrilato. Preferiblemente, el punto de ramificación A de la segunda molécula precursora se selecciona del grupo consistente de carbono, glicerol, pentaeritritol, dipentaeritritol y etilendiamina. más preferiblemente, el punto de ramificación A de la segunda molécula precursora es etilendiamina. La segunda molécula precursora de la Fórmula I tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 10 a 25 kD, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 12 a 20 kD y aún más preferiblemente en el rango de aproximadamente 14 a 18 kD. Preferiblemente, cada uno de los brazos de la primera o segunda moléculas precursoras tienen el mismo grado de polimerización. Esto significa que cada brazo de la primera o segunda moléculas precursoras tienen un peso moléculas idéntico.

La selección de las moléculas precursoras donde la suma del número de grupos nucleofílicos y grupos electrofílicos es mayor que o igual a 5 da como resultado la formación de una red tridimensional. Opcionalmente, la composición contiene uno o más aditivos, tales como colorantes, agentes tixotópicos, agentes radioopacos, agentes de relleno, estabilizadores o agentes bioactivos. La composición puede comprender azul de metileno. E acuerdo con la invención, la composición contiene un colorante seleccionado del grupo de azul de metileno, verde de lisamina o verde rápido. Opcionalmente, la composición contiene una base. En una realización la base es carbonato de sodio. En la realización preferida, los biomateriales formados a partir de las composiciones se usan para reducir, inhibir o contener la pérdida de fluidos corporales, tales como pérdida de fluido cerebroespinal después de una cirugía de cerebro y/o médula espinal. En una realización preferida las composiciones se utilizan como sellante médico. En otra realización preferida las composiciones se utilizan para recubrir las superficies de un tejido. En otra realización, las composiciones se usan en la manufactura de un medicamento para efectuar la unión no quirúrgica de una primera superficie y una segunda superficie.

50 Con el fin de preparar los biomateriales de la presente invención un método para hacer el biomaterial comprende las etapas de:

i) Proveer una molécula precursora.

ii) Proveer una segunda molécula precursora.

55 iii) Hacer reaccionar las dos moléculas precursoras en presencia de una solución básica para formar una red tridimensional entrecruzada.

Preferiblemente la solución básica tiene un pH en el rango de entre 9 a 14, más preferiblemente en el rango de entre 10 a 13 y aún más preferiblemente en el rango de entre 10 a 12. El pH de la solución resultante de cada una de las etapas i), ii) o iii) está preferiblemente en un rango entre 9 a 13, más preferiblemente entre 9.5 a 11.5 y aún más preferiblemente entre 9.8 a 11 para permitir una gelificación rápida. Preferiblemente, la solución básica es una solución de carbonato de sodio. Después de poner en contacto las dos moléculas precursoras y la solución básica, el material se forma rápidamente, preferiblemente el biomaterial se forma en menos de 2 minutos, más preferiblemente en menos de 10 segundos y aún más preferiblemente en menos de 5 segundos.

Las moléculas precursoras pueden almacenarse separadamente como polvos secos y/o en soluciones reguladas, que tienen típicamente un pH ácido. En una realización preferida, la primera molécula precursora se almacena como un polvo seco en un primer contenedor y la segunda molécula precursora se almacena en una solución regulada acuosa que tiene un pH ácido en un segundo contenedor. Opcionalmente, la base puede ser almacenada en solución en un tercer contenedor. Las moléculas precursoras pueden estar en contacto por minutos u horas antes del uso. En una realización, la primera molécula precursora y la segunda molécula precursora se mantienen separadas y solamente se mezclan antes de transferir la mezcla resultante en una jeringa de doble compartimiento. Un compartimiento de la jeringa comprende la mezcla de las moléculas precursoras y el otro compartimiento la solución básica. Con el fin de preparar un biomaterial con las características requeridas, el control de la concentración de las moléculas precursoras antes del entrecruzamiento es un parámetro importante. Con el fin de retener este control, la jeringa de doble compartimiento puede comprender dos compartimientos con una relación de volumen predefinida. Preferiblemente la relación de volumen de los compartimientos es 1:5 y más preferiblemente 1:10. El compartimiento más grande contiene la mezcla de las moléculas precursoras y el compartimiento más pequeño de la solución básica. La jeringa de compartimiento doble está equipada con una cabeza de aspersión desprendible y el contenido de los compartimientos se asperja junto para formar el biomaterial con una red tridimensional in situ o en el sitio requerido en el cuerpo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una gráfica lineal de una comparación de porcentaje de hinchamiento versus tiempo de formulaciones representativas de los biomateriales divulgados y un biomaterial disponible comercialmente cuando se almacenan en solución salina regulada de fosfato a 37°C.

La Figura 2 muestra una gráfica lineal de una comparación de porcentaje de hinchamiento versus tiempo de formulaciones representativas de los biomateriales divulgados y un biomaterial disponible comercialmente cuando se almacenan en solución salina regulada de fosfato a 50°C.

La Figura 3 muestra la influencia del regulador sobre el tiempo de gelificación para la composición 10 preparada con regulador TEA a pH 7.4, 8 y 8.5.

La Figura 4 muestra la influencia de un regulador sobre el tiempo de gelificación para la composición 13 preparada con un regulador de borato a pH 9.13, 9.32 y 9.47.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

“Biocompatibilidad” o “Biocompatible” como se usan en general aquí, se refieren a la capacidad de un material para desempeñarse con una respuesta apropiada del huésped en una aplicación específica. En el sentido más amplio, esto significa una carencia de efectos adversos para el cuerpo de tal forma que pueda sobrepasar el beneficio del material y/o tratamiento para el paciente.

“Biomaterial” o “Composición”, tal como se utilizan en general aquí, se refieren a un material para hacer interfaz con sistemas biológicos para evaluar, tratar o sellar preferiblemente, cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Biomaterial se refiere al material completo (moléculas precursoras más todos los aditivos, bases o solventes y agentes bioactivos, si los hay) en y después de haber alcanzado y traspasado su punto de gelificación. Composición se refiere al material completo antes de haber alcanzado su punto de gelificación.

“Concentración de componentes precursores” tal como se utiliza aquí se refiere al porcentaje en peso, definido como el peso del soluto en gramos multiplicado por 100 dividido por el peso de la solución completa en gramos (esto es la suma de solvente y soluto): porcentaje en peso igual peso de soluto (100/peso de solución total).

“Enlace insaturado conjugado” puede referirse tanto a la alternación de enlaces múltiples carbono-carbono, carbono-heteroátomo o heteroátomo-heteroátomo con enlaces sencillos. Los enlaces dobles espaciados por una unidad CH O CH₂ se denominan como “enlaces dobles o homoconjugados”.

“Entrecruzamiento” tal como se utiliza en general aquí significa la formación de enlaces covalentes.

“Densidad de entrecruzamiento” tal como se utiliza aquí significa el peso molecular promedio entre dos entrecruzamientos (M_c) de las moléculas respectivas.

“Grupo electrofílico” tal como se utiliza aquí, se refiere a grupos funcionales que son capaces de aceptar un par de electrones de un nucleófilo en una reacción de formación de un enlace polar. Los términos electrófilo y grupos electrofílicos se utilizan como sinónimos.

5 “Funcionalidad” tal como se utiliza en general aquí significa el número de sitios reactivos sobre una molécula precursora.

“Sitios reactivos” se refiere a grupos nucleofílicos y electrofílicos que son capaces de reacción uno con otro al menos, pero no exclusivamente, bajo condiciones en el cuerpo humano o cuerpo animal.

10 “Gel” se refiere al estado de la materia entre líquido y sólido. Como tal, “un gel” tiene algunas de las propiedades de un líquido (esto es, la forma es resiliente y deformable) y algunas de las propiedades de un sólido (esto es, la forma es discreta lo suficiente para mantener tres dimensiones sobre una superficie bidimensional).

“Punto de gelificación” tal como se utiliza aquí se refiere al punto en el que el módulo viscoso y el módulo elástico se entrecruzan uno con otro y se incrementa la viscosidad. Así, el punto de gelificación es la etapa en la cual líquido comienza a tomar las características semisólidas de un gel.

15 “Formación in situ” tal como se utiliza aquí en general se refiere a la capacidad de las mezclas de moléculas precursoras que están sustancialmente no entrecruzadas antes y en el momento de la inyección para formar covalencia una con a otra a una temperatura fisiológica en el sitio de inyección en el cuerpo.

20 “Peso molecular” tal como se utiliza aquí se refiere al peso molecular promedio de un cierto número de moléculas en una muestra dada tal como se utiliza comúnmente en la técnica. Así, una muestra de PEG 5000 podría contener una mezcla estadística de moléculas de polímero que varían en peso desde, por ejemplo, 4000 a 6000 daltons (D) con una molécula que difiere ligeramente de la siguiente en un rango. La especiación de un rango de pesos moleculares indica que el peso molecular promedio puede ser cualquier valor entre los límites especificados, y puede incluir moléculas individuales por fuera de estos límites. Así, un rango de peso molecular de aproximadamente 2000 D hasta aproximadamente 20000D indica un peso molecular promedio de al menos 2000 D, variando hasta aproximadamente 20 kD.

25 “Multifuncional” tal como se utiliza generalmente aquí significa más de un grupo funcional por molécula precursora.

“Grupo nucleofílicos” tal como se utiliza en general aquí se refiere a grupos funcionales que son capaces de donar un par de electrones a un electrófilo en una reacción de formación de enlace polar. Preferiblemente el nucleófilo es más nucleofílico que H₂O a pH fisiológico. En un ejemplo de un nucleófilo fuerte es un tiol y se refiere a moléculas que contienen estos grupos funcionales. Los términos nucleófilo y grupo nucleofílicos se utilizan como sinónimos.

30 “Oligómeros” y “polímeros” se utilizan en el sentido usual de los términos. Un oligómero es un polímero de bajo peso molecular. Los oligómeros contienen típicamente entre 2 y 10 unidades monoméricas. Tal como se utiliza aquí, los polímeros contienen más de 10 unidades monoméricas.

“Polímero” basado en poli(etilenglicol) se refiere a un polímero donde la cadena o cadenas poliméricas del polímero están predominantemente, de forma preferible constituidas por completo de poli(etilenglicol).

35 “Fisiológico” tal como se utiliza aquí significa condiciones tales como las que se pueden encontrar en los vertebrados vivos. En particular, las condiciones fisiológicas se refieren a las condiciones en el cuerpo humano tales como temperatura, pH, etc. La temperatura fisiológica significa en particular un rango de temperatura entre 35 a 42°C, preferiblemente alrededor de 37°C a presión atmosférica.

40 “Red polimérica” tal como se utiliza aquí se refiere al producto de un proceso en el cual sustancialmente todos los monómeros, oligómeros o polímeros utilizados como moléculas precursoras están enlazados por enlaces intermoleculares, preferiblemente covalentes, a través de sus grupos funcionales disponibles para formar una macromolécula.

45 “Moléculas precursoras” tal como se utiliza aquí se refiere a moléculas que forman la red polimérica del biomaterial. A parte de la red polimérica el biomaterial puede contener aditivos y agentes biológicos activos. Las moléculas precursoras pueden seleccionarse a partir de monómeros, oligómeros y polímeros funcionalizados.

“Contra parte respectiva” tal como se utiliza aquí significa el asociado a reacción de una molécula precursora dada. La contraparte respectiva al grupo electrofílico es el grupo nucleofílicos y viceversa.

50 “Reacción autoselectiva” tal como se utiliza en general aquí significa que la primera molécula precursora de la composición reacciona mucho más rápido con la segunda molécula precursora de la composición y viceversa que con otros compuestos presentes tan como en la composición y/o como en el sitio de la reacción. Tal como se utiliza aquí, el grupo nucleofílico de la primera molécula precursora se enlaza preferiblemente a un grupo electrofílico de la segunda molécula precursora en vez de a otros compuestos biológicos, y un grupo electrofílico de la segunda molécula precursora se enlaza preferiblemente al grupo nucleofílicos de la primera molécula precursora en vez de a otros compuestos biológicos.

"Hinchamiento" tal como se utiliza aquí se refiere al consumo de agua de los biomateriales de la presente invención. Es una función del biomaterial incrementar la masa en el hinchamiento en equilibrio, típicamente después de colocarle el biomaterial en un exceso de regulador de PBS (solución salina regulada de fosfato 10 mM, por ejemplo, polvo P3813 de Sigma produce un regulador de fosfato 0.01 M, cloruro de potasio 0.27 M y cloruro de sodio 0.38 M, pH 7.4).

5 Típicamente el hinchamiento en equilibrio se alcanza al cabo de dos días y se define como el tiempo en el que el biomaterial ha alcanzado su masa máxima antes de que el material se degrade. El hinchamiento se mide dividiendo la masa del biomaterial y el hinchamiento en equilibrio por la masa inicial del biomaterial 10 minutos después de la reacción de entrecruzamiento. Los términos "consumo de agua" y "hinchamiento" se utilizan como sinónimos a lo largo de esta solicitud.

10 "Resistencia cohesiva" se refiere a la capacidad de los biomateriales de la presente invención para permanecer intactos, esto es, sin rupturas, desgarres o fracturas, cuando se someten a tensiones físicas o condiciones ambientales. La "resistencia cohesiva" y "resistencia a la explosión" se utilizan como sinónimos a lo largo de esta solicitud.

15 "Resistencia adhesiva" se refiere a la capacidad de los biomateriales de la presente invención para ser capaces de permanecer unidos a los tejidos en el sitio de administración cuando se someten a tensiones físicas o condiciones ambientales.

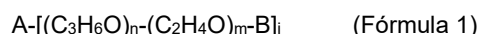
Composiciones

Se provee una composición para la manufactura de un biomaterial entrecruzable in situ que pueda ser utilizado preferiblemente para reducir, prevenir o contener pérdidas de fluido en el cuerpo humano. La composición contiene al menos una primera y una segunda molécula precursora multifuncional. Pueden agregarse opcionalmente aditivos, colorantes y/o agentes biológicamente activos a las moléculas precursoras para formar la composición. La composición comprende moléculas precursoras más cualquier aditivo y/o agente biológicamente activo y las moléculas precursoras pueden polimerizarse in situ en el sitio que así lo requiere en el cuerpo para formar la red polimérica del biomaterial. La estructura de las moléculas precursoras se selecciona con base en el tipo del biomaterial que se desea.

25 A. Precursores

La primera molécula precursora contiene al menos dos grupos nucleofílicos, y la segunda molécula precursora contiene al menos dos grupos electrofílicos. La primera y segunda moléculas precursoras se seleccionan de tal forma que los grupos nucleofílicos y electrofílicos son capaces de formar enlaces covalentes uno con otro bajo condiciones fisiológicas o bajo condiciones básicas. Esto puede alcanzarse mediante diferentes mecanismos de reacción. Un mecanismo de reacción es una reacción de sustitución nucleofílica. En otra realización, las moléculas precursoras forman enlaces covalentes a través de una reacción de adición de Michael entre grupos o unidades estructurales nucleofílicas sobre la primera molécula precursora y grupos o unidades estructurales insaturados conjugados sobre la segunda molécula precursora. La reacción de adición de Michael involucra la reacción de un nucleófilo, tal como un grupo tiol, amina o hidroxilo, con una unidad estructural insaturada conjugada, tal como una unidad estructural α , β -insaturada que contiene carbonilo.

Ejemplos de moléculas precursoras incluyen, pero no se limitan a, derivados de poliéter, tales como polioxialquilenos o derivados de los mismos, péptidos, y polipéptidos, poli(vinilpirrolidina) ("PVP"), y poli(aminoácidos). Derivados de polioxialquilenos preferidos son polietilenglicol ("PEG"), óxido de polipropileno ("PPO"), óxido de polietileno ("PEO"), óxido de polietileno-co-polipropileno ("PEO-PPO"), copolímeros de bloque o aleatorios de óxido de co-polietileno, poloxámeros, merxapoles, poloxaminas y alcohol polivinílico ("PVA"). Copolímeros u homopolímeros de bloque (donde A=B) pueden ser lineales (tipo AB, ABA, ABABA o ABCBA), estrellas (A_nB o BA_nC , donde B es al menos una valencia n, y n es de 3 a 6) o ramificados (As múltiple dependiente de un B). Las moléculas precursoras preferidas se seleccionan de copolímeros de bloque de PEG o PEO-PPO. Los copolímeros de bloque más preferidos PEG y PEO-PPO se aplican en combinación uno con otro. La primera molécula precursora preferida es un polímero basado en poli(etilenglicol) que tenga grupos x nucleofílicos seleccionados del grupo consistente de grupos tiol o amino, donde x es mayor que o igual a dos. Preferiblemente, la segunda molécula precursora es un copolímero de bloque de brazos múltiples de poli(óxido de etileno-óxido de propileno) (PEO-PPO) se la Fórmula general (I):



Donde m y n son enteros de 1 a 200

50 i es mayor de 2, preferiblemente 3,4,5,6,7 u 8

A es un punto de ramificación

B es un grupo insaturado conjugado.

Las moléculas precursoras son monómeros, oligómeros y/o polímeros multifuncionales. Preferiblemente el peso molecular de la primera molécula precursora está en el rango de entre 2 a 20 kD, más preferiblemente de entre 3 y

11 kD, lo más preferiblemente entre 5 y 10 kD. El peso molecular preferido de la segunda molécula precursora está preferiblemente entre 10 y 25 kD, más preferiblemente entre 12 y 20 kD, lo más preferiblemente entre 14 y 18 kD.

Preferiblemente, el punto de ramificación A de la segunda molécula precursora se selecciona del grupo consistente de carbono, glicerol, pentaeritritol, dipentaeritritol y etilendiamina. En una realización, el biomaterial se forma a partir de un copolímero de bloque poli(etileno óxido-polipropileno óxido)(PEO-PPO) de brazo múltiple de Fórmula 1 donde A es una molécula de etilendiamina (esto es, donde i es igual a 4) y B es un grupo acrilato(tetraacrilato Tetronic®). El copolímero de bloque de cuatro brazos de poli(etileno óxido-polipropileno óxido)(PEO-PPO) con una molécula de núcleo de etilendiamina es vendido por BASF bajo el nombre comercial Tetronic®. En una realización adicional, la composición comprende un tetraacrilato Tetronic® que tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kD (Tetronic® 1107) y un PEG tetratiol con un peso molecular de aproximadamente 10 kD. En otra realización, el material está formado a partir de un tetraacrilato Tetronic® que tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kD y un PEG tetratiol que tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kD. En otra realización preferida el biomaterial se forma a partir de un tetraacrilato Tetronic® que tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kD y un PEG-ditiol lineal funcionalizado en el extremo de un peso molecular de aproximadamente de 3.4 kD. En aún otra realización, el tetraacrilato Tetronic® está entrecruzado con ditiotretitol(DTT). Las características mecánicas del biomaterial (esto es, resistencia cohesiva y resistencia adhesiva, tiempo de hinchamiento y de gelificación), están influenciadas por el número de brazos de las moléculas precursoras y por la longitud de estos brazos. Un alto número de brazos de cada molécula precursora da como resultado una red de entrecruzamiento más densa que tiene una resistencia cohesiva más alta. Sin embargo, la resorción del biomaterial resultante será más larga. La longitud de cadena de la primera molécula precursora tiene una influencia sobre el hinchamiento del biomaterial resultante. Cadenas más largas de poli(etilenglicol) preverán un biomaterial más hinchable.

Preferiblemente las moléculas del precursor son simétricas, lo cual significa que las ramas tienen el mismo peso molecular y estructura.

La suma de la funcionalidad de las primera y segunda moléculas precursoras es mayor que o igual a 5. En una realización, la primera molécula precursora tiene una funcionalidad de 4, y la segunda molécula precursora tiene una funcionalidad de 3. En otra realización, la primera molécula precursora tiene una funcionalidad de 2, y la segunda molécula precursora tiene una funcionalidad de 4. En aún otra realización, una de las moléculas precursoras tiene una funcionalidad de 8 y la otra de 4. En aún otra realización, ambas moléculas precursoras tienen una funcionalidad de 4 o más. Una molécula precursora pequeña y compacta formara una red polimérica con resistencia mayor que una molécula precursora extendida, aunque la funcionalidad y el asociado reacción pueden ser los mismos para ambas moléculas.

Como guía general, la relación entre los primero y segundo componentes precursores se selecciona de tal forma que la mayor parte de los grupos funcionales de ambos componentes reaccionen con las contrapartes respectivas. La relación de grupos funcionales de la primera y segunda moléculas precursoras (esto es, la relación de grupos electrofílicos a grupos nucleofílicos en el rango de entre 0.7 a 1.2, más preferiblemente entre 0.8 y 1.1, y lo más preferiblemente 1 (esto es, relación estequiométrica)).

a. Grupos Nucleofílicos

Los grupos nucleofílicos del primer componente precursor son capaces de reaccionar con grupos electrofílicos, tales como grupos insaturados conjugados en una variedad de mecanismos de reacción, preferiblemente autoselectivamente en el cuerpo humano, a través de una sustitución nucleofílica o reacción de adición tipo Michael. Los nucleófilos que son útiles son aquellos que son preferiblemente reactivos hacia grupos insaturados conjugados mediante reacciones de adición, en particular, en una reacción de adición tipo Michael autoselectiva bajo condiciones en el cuerpo humano o cuerpo animal. La reactividad del nucleófilo depende de identidad del grupo insaturado. La identidad del grupo insaturado está limitada primero por su reacción con agua a pH fisiológico. Así, los nucleófilos útiles son generalmente más nucleofílicos que el agua a pH fisiológico. Nucleófilos adecuados incluyen pero no se limitan a, -SH, -NH₂, -OH, -PH₂, y -CO-NH-NH₂.

La utilidad de los nucleófilos en particular depende de la situación prevista y de la cantidad de autoselectividad deseada. En la realización preferida, el nucleófilo es un tiol. Sin embargo, los grupos amina y/o hidroxilo también pueden ser nucleófilos efectivos.

Se da particular atención al pH, en cuanto la amina o tiol desprotonados son nucleófilos mucho más fuertes que la amina o tiol protonados. Como tales, si se da atención particular al pK de una amina o tiol utilizados como nucleófilo fuerte, puede obtenerse una autoselectividad sustancial. Las condiciones de reacción donde el pH de la solución está cercano al pK de las aminas o tioles de las moléculas precursoras favorecen la reacción del grupo insaturado conjugado con la amina o tiol provistos, mejor que con otros nucleófilos presentes en el sistema.

Los grupos nucleofílicos pueden estar contenidos en moléculas con gran flexibilidad en su estructura global. Por ejemplo, un nucleófilo disfuncional puede presentarse en la forma de Nuc-P-Nuc, donde P indica un monómero, oligómero o polímero y Nuc se refiere al nucleófilo. De la misma forma, un polímero ramificado, P, podría ser derivado con un número de nucleófilos para crear P-(Nuc) y, donde I es mayor de 1. El nucleófilo podría ser parte de una

estructura repetitiva, por ejemplo, (P-Nuc)_i. Claramente, no todo el P de los polinucleótidos en tal estructura necesita ser idéntico.

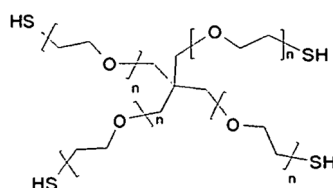
Los polietilenglicoles y derivados de los mismos pueden modificarse químicamente para contener grupos amino o tiol primarios múltiples de acuerdo con métodos establecidos, por ejemplo, en Capítulo 22 de POLI(ETILEN GLICOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, NY (1992). En una realización más preferida el tiol presente en los extremos de la primera molécula precursora se introduce en los polímeros basados en PEG por sustitución de los grupos hidroxilo terminales mediante un grupo tiol (SH). La molécula precursora así obtenida reacciona más rápido con la segunda molécula precursora donde el grupo tiol se introduce a través de un grupo mercaptopropionato.

Diversas formas de multiamino PEG están comercialmente disponibles de Nektar Therapeutics, Inc. de San Carlos, California (a través de su adquisición de Shearwater Polimers de Huntsville, Alabama), y de Texaco Chemical Company de Houston, Texas, bajo el nombre "Jeffamine". Los PEG multiaminicos utilizables en la presente invención incluyen las diaminas Jeffamine de Texaco (serie "D") y triaminas (series "T"), las cuales contienen dos y tres grupos aminos primarios por molécula, respectivamente. Las poliaminas tales como etilendiamina ($H_2N-CH_2CH_2-NH_2$), tetrametilenodiamina ($H_2N-(CH_2)_4-NH_2$), pentametenodiamina (cadaverina) ($H_2N-(CH_2)_5-NH_2$), hexametenodiamina ($H_2N-(CH_2)_6-NH_2$), bis(2-hidroxyethyl) amina ($HN-(CH_2CH_2OH)_2$) bis(2-aminoethyl)amina ($HN-(CH_2CH_2NH_2)_2$), y tris(2-aminoetil)amina ($N-(CH_2CH_2NH_2)_3$) también puede utilizarse como polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleofílicos.

El ditiotreitol ($HS-CH_2-CHOH-CHOH-CH_2-SH$) también puede utilizarse como polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleofílicos.

Primeras moléculas precursoras preferidas

En una realización preferida, la primera molécula precursora es una PEG tetratiol de acuerdo con la Fórmula II:



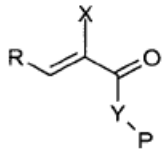
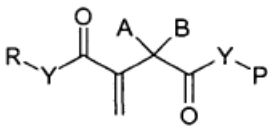
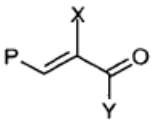
(Formula II)

donde n está en el rango de entre 25 y 60.

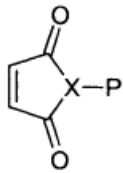
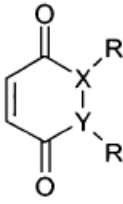
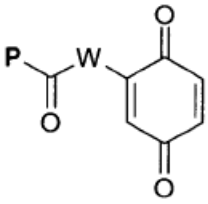
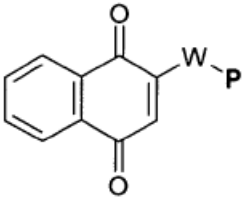
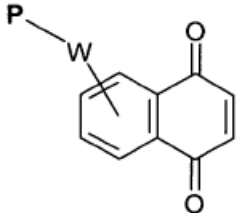
b. Grupos Electrofílicos.

Los grupos electrofílicos de la segunda molécula precursora son preferiblemente grupos insaturados conjugados. Las estructuras de P y los grupos insaturados conjugados pueden ser similar a las descritas anteriormente para lo nucleófilos. Solamente es necesario que un precursor electrofílico contenga un número mayor o igual 2 de tales grupos electrofílicos. En una realización, los grupos electrofílicos son grupos insaturados conjugados.

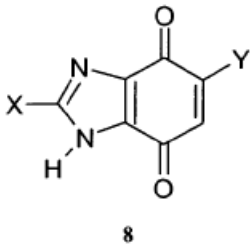
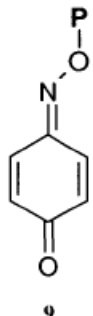
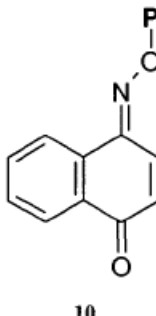
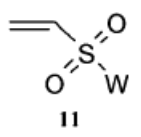
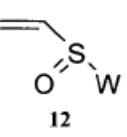
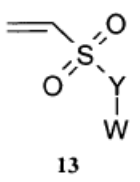
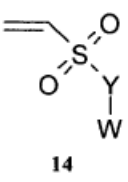
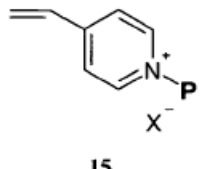
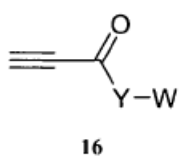
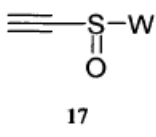
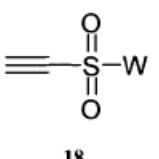
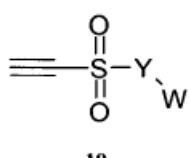
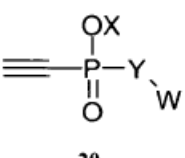
Es posible llevar a cabo reacciones de adición nucleofílica, en particular reacciones de adición de Michael, en una amplia variedad de compuestos insaturados conjugados. En las estructuras mostradas más abajo, una estructura oligomérica o polimérica está indicada como P. Aquí se discuten adicionalmente diversas posibilidades preferidas para la identidad específica de P. P puede acoplarse con grupos insaturados conjugados reactivos, incluyendo pero no limitándose, a las estructuras numeradas 1 a 20 en la Tabla 1.

Tabla 1: Estructuras moleculares que contienen grupos P e insaturados conjugados	
 1a	X = H, CH₃, CN, COOW R = H, W, fenilo- (Ph) Y = NH, O, 1,4-Ph W = Cl - C5 cadena alifática
 1b	A, B = H, alquilo R = H, alquilo Y = O, NH, 1,4-Ph
 2	X = CN, COOW Y = OW, Ph W = Cl - C5 cadena alifática

(continuación)

Tabla 1: Estructuras moleculares que contienen grupos P e insaturados conjugados	
 3	X=N, CH
 4	A: X = CH; Y = CH; R = H, W-P (W = NH, O, nihil) B: X=N; Y=N; R=H,P C: X-Y = C=C; R = W-P (W = NH, O, nihil)
 5	
 6	 7

(continuación)

Tabla 1: Estructuras moleculares que contienen grupos P e insaturados conjugados				
	X, Y =		H, P P, P P, H P, cadena alifática	
8				
				
9				
				
10				
				Y = O, NH X=ión metálico alcalino o alcalino-térreo, P W = P, 1,4- Ph-P
11				
12				
13				
14				
X = halógeno, sulfonato				
				
15				
				
16				
17				
18				
		Y = O, NH X = ión metal alcalino o alcalinotérreo, P W = P, 1,4-Ph-P		
19				
20				

Los dobles enlaces reactivos pueden ser conjugados a uno o más grupos carbonilo en una estructura de cetona, éster o amida lineal (1a, 1b, 2) o a dos en un sistema de anillo, como en los derivados maleicos o paraquinoides (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). En este último caso el anillo puede estar fusionado para dar un naftoquinona (6, 7, 10) o una 4, 7-bencimidazolediona (8) y los grupos carbonilo pueden ser convertidos en una oxima (9,10). El doble enlace puede ser conjugado a un doble enlace heteroátomo-heteroátomo, tal como una sulfona (11), un sulfóxido (12), un sulfonato o una sulfonamida (13), o un fosfonato o fosfonamida (14). Finalmente el doble enlace puede estar conjugado a un sistema aromático pobre en electrones, tal como el ion 4-vinilpiridinio (15). Pueden utilizarse enlaces triples en conjugación con carbonilo o enlaces múltiples basados en heteroátomos (16, 17, 18, 19, 20).

10 Estructuras tales como 1a, 1b y 2 están basadas en la conjugación de un doble enlace carbono-carbono con uno o

dos grupos extractores de electrones. Uno de ellos es siempre un carbonilo, incrementando la reactividad pasando de una amida a éster, y luego a fenona. La adición nucleofílica es más fácil disminuyendo el impedimento estérico, o incrementando la capacidad de extracción de electrones en la posición alfa. Por ejemplo, existe la siguiente relación $\text{CH}_3 < \text{H} < \text{COOW} < \text{CN}$, donde CH_3 tiene el más bajo poder de extracción de electrones y CN tiene el máximo poder de extracción de electrones.

La reactividad más alta obtenida utilizando las dos últimas estructuras puede modularse variando el volumen de los sustituyentes en la posición beta, donde tiene lugar el ataque nucleofílico; la reactividad disminuye en el orden $\text{P} < \text{W} < \text{PH} < \text{H}$. Así, la posición P puede ser utilizada para sintonizar la reactividad hacia los nucleófilos. Esta familia de compuestos incluye algunos compuestos para los cuales se conoce un gran problema acerca de su toxicología y uso en medicina. Por ejemplo, los polímeros solubles en agua con acrilatos y metacrilatos en sus terminales se polimerizan (por mecanismos de radicales libres) in vivo. Así, los polímeros que contienen acrilatos y metacrilatos han sido utilizados en el cuerpo en productos clínicos, pero con un esquema de reacción químico dramáticamente diferente.

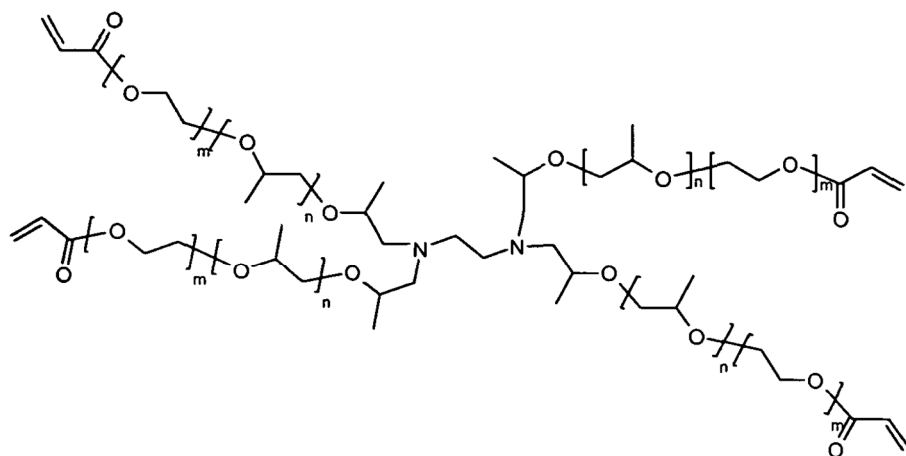
Las estructuras 3-10 exhiben muy alta reactividad hacia los nucleófilos, debido tanto a la configuración *cis* del doble enlace como a la presencia de dos grupos extractores de electrones. Las cetonas insaturadas reaccionan más rápido que las amidas o las imidas, debido a la más fuerte electronegatividad de estos grupos carbonilo. Así, los derivados de ciclopentenediona reaccionan más rápidos que los maleimídicos (3) y las para-quinonas reaccionan más rápido que las hidrazidas maleicas (4) y ciclohexanonas, debido a una conjugación más extendida. La reactividad más alta es mostrada por las naftoquinonas (7). P puede colocarse en posiciones donde no reduce la reactividad del grupo insaturado, que está en la parte opuesta del anillo (3, 5), en otro anillo (7, 8) o enlazado a un O a través de una para-quinona mono-oxima (9, 10). Para disminuir la velocidad de la reacción nucleofílica, P también puede estar enlazado al doble enlace reactivo (6, 8).

La activación de los dobles enlaces a la adición nucleofílica puede obtenerse utilizando grupos extractores de electrones basados en heteroátomos. En efecto, los análogos de cetonas (11, 12), ésteres y amidas (13, 14) que contienen heteroátomos proporcionan un comportamiento extractor similar. La reactividad hacia la adición nucleofílica se incrementa con la electronegatividad del grupo. Así las estructuras tienen la siguiente relación $11 > 12 > 13 > 14$, donde 11 es la más electronegativa y 14 es la menos electronegativa. La reactividad hacia la adición nucleofílica también está potenciada por el enlazamiento con un anillo aromático. También puede obtenerse una fuerte activación de los dobles enlaces, utilizando grupos extractores de electrones con base en anillos aromáticos. Cualquier estructura aromática que contiene un catión similar al piridinio (por ejemplo, derivados de quinolina, imidazol, pirazina, pirimidina, piridazina y compuestos similares que contienen nitrógenos sp^2), polariza fuertemente el doble enlace y hace posible adiciones del tipo Michael.

Los triples enlaces carbono-carbono conjugados con grupos extractores de electrones basados en carbono o heteroátomos, pueden reaccionar fácilmente con nucleófilos azufrados, para dar productos de adición simple y doble. La reactividad está influenciada por los sustituyentes, de manera similar a los compuestos análogos que contienen un doble enlace discutidos anteriormente. En una realización preferida, los grupos electrofílicos son grupos acrilato.

Segundas moléculas precursoras preferidas

En la realización preferida, la segunda molécula precursora es un monómero, oligómero o polímero que contiene acrilatos. En particular, el segundo precursor es un compuesto de acuerdo con la Fórmula Ia, tal como una realización específica de la Fórmula I.



(Formula Ia)

donde n y m son enteros de 1 a 200.

Preferiblemente n está en un rango de entre 18 a 22 y m está en un rango de entre 58 a 62.

El Tetronic® es un compolímero de bloque tetrafuncional basado en óxido de polietileno y óxido de polipropileno disponible en BASF. Los copolímeros de bloque Tetronic® pueden ser funcionalizados con grupos insaturados conjugados, tales como grupos acrilato, haciendo reaccionar los grupos hidroxilo libres del polímero con un exceso de cloruro de acrilato en presencia de una base. De manera similar pueden agregarse otros grupos electrofílicos.

c. Aditivos

La composición puede contener adicionalmente aditivos orgánicos y/o inorgánicos, tales como agentes tixotrópicos, agentes radioopacos y/o agentes fluorescentes con el fin de seguir el rendimiento de la aplicación o para detectar instantáneamente fugas potenciales si no son fácilmente visibles, estabilizadores para la estabilización de las moléculas precursoras con el fin de evitar polimerización prematura y/o agentes de relleno que pueden dar como resultado un incremento en las propiedades mecánicas (por ejemplo, resistencia final a la compresión y módulo E de Young) del biomaterial en comparación con las propiedades mecánicas de la red polimérica. Ejemplos de agentes estabilizantes incluyen consumidores de radicales, tales como hidroxitolueno butilado o ditiotreitol. Dependiendo de la aplicación, la composición (y por lo tanto el biomaterial) pueden contener un colorante, preferiblemente un color orgánico, tal como un pigmento. En una realización se agrega azul de metileno como colorante. El azul de metileno no solamente actúa como colorante sino que también puede actuar como un estabilizador para las moléculas precursoras que contienen acrilato actuando como un agente reductor. También puede actuar como indicador de la formación de disulfuro (puesto que se hace incoloro por reducción). De acuerdo con la invención, se agrega verde rápido o verde de lisamina como colorante. El verde de lisamina y el verde rápido son colorantes que tienen la capacidad de cambiar el color debido al pH de la solución. Son verdes bajo condiciones ácidas y azules en condiciones básicas. Por lo tanto, estos dos colorantes tienen la ventaja adicional de indicar la buena mezcla de las soluciones de la molécula precursora con la solución básica.

d. Bases

El entrecruzamiento in situ de la primera y segunda molécula precursoras tiene lugar bajo condiciones básicas. Una variedad bases, que cumplen con los requerimientos de catalizar la reacción bajo condiciones fisiológicas y de no ser nocivas para el cuerpo del paciente, actuando así como activadores en la formación de bases adecuadas para biomateriales incluyen, pero no se limitan a, alquil-aminas terciarias, tales como tributilamina, trietilamina, etildisopropilamina, o n, N-dimetilbutilamina. Para una composición dada (y principalmente dependiente del tipo de moléculas precursora), el tiempo de gelificación depende el tipo de base y del pH de la solución. Así, el tiempo de gelificación de la composición puede controlarse y ajustarse a la aplicación deseada variando el pH de la solución básica. Al incrementar el pH de la solución básica disminuirá el tiempo de gelificación, pero también se incrementará el tiempo de degradación del biomaterial. Por lo tanto, tiene que obtenerse un compromiso entre el tiempo de gelificación y de degradación. En una realización preferida la base, como activador de la reacción de entrecruzamiento covalente, se selecciona de soluciones reguladas acuosas que tienen su valor de pH y pK en el mismo rango. El rango de pK está preferiblemente entre 9 y 13. Si la base tiene dos valores de pK en el rango básico, el primer está preferiblemente entre 8.5 y 10 y el segundo está entre 10 y 13. Reguladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de sodio, borato de sodio y glicina. En una realización, la base preferida es carbonato de sodio. Preferiblemente, la solución básica tiene un pH en el rango de entre 9 a 14, más preferiblemente en el rango entre 10 y 13 y aún más preferiblemente en el rango de 10 a 12.

e. Agentes bioactivos

El biomaterial también puede contener factores bioactivos, tales como moléculas pequeñas o péptidos de proteínas que pueden difundirse lentamente desde el biomaterial ayudando así a que el tejido se regenere y cure. En tales casos, el biomaterial trabaja tanto como un sellante de tejido con propiedades regenerativas de tejido adicionales y como una matriz para administración de fármacos. Los factores bioactivos y/o pequeñas moléculas pueden simplemente mezclarse en el biomaterial o pueden enlazarse covalentemente al biomaterial incorporando un grupo tiol libre en la molécula y liberarse mediante degradación hidrolítica o enzimática. Los factores bioactivos pueden ser factores de crecimiento, preferiblemente los de la superfamilia de TGF beta y PDGF.

II. Biomateriales

Como se mencionó anteriormente, los requerimientos de biomateriales, y así la escogencia de las moléculas precursoras, dependen del propósito y sitio de la aplicación en el cuerpo. En una realización preferida, el biomaterial forma un recubrimiento, una barrera o sello que evita, reduce o contiene las pérdidas de fluidos. Las pérdidas de fluido se incluyendo, pero no se limitan, a la pérdida de cualquier fluido o gas biológico tal como pérdida de sangre, pérdida de fluido cerebrospinal o pérdida de gases desde los pulmones. El material puede ser aplicado interna o externamente al cuerpo. Para este propósito, el biomaterial debe tener una buena resistencia adhesiva y cohesiva, un tiempo de gelificación rápido adaptable, un bajo incremento en volumen debido a la incorporación de agua, así como

una resorción completa por parte del cuerpo con el transcurso del tiempo. Mientras que la estabilidad mecánica del biomaterial depende esencialmente de la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica, la incorporación de agua por parte del biomaterial está influida por el juego entre la densidad de entrecruzamiento, y la hidrofobicidad de la red polimérica. La densidad de entrecruzamiento y la naturaleza hidrófoba del biomaterial están determinadas en mayor grado por la estructura y proporción de los componentes del precursor. Por lo tanto, la incorporación de agua y el rendimiento mecánico del biomaterial pueden controlarse y ser influenciados por la selección apropiada de los componentes precursores.

Características de los biomateriales

En una realización, el biomaterial se utiliza para sellar la duramadre del cerebro o médula espinal después de que haya sido cortada o lesionada para evitar o reducir la fuga de fluido de cerebro espinal en el ambiente externo después de una intervención quirúrgica. El sellamiento puede hacerse como una sutura adjunta o si el daño de la duramadre no es demasiado grande. El biomaterial puede utilizarse como único medio de cierre para efectuar la unión no quirúrgica de una primera superficie y una segunda superficie. En la aplicación más preferida, la composición se utiliza como una sutura adjunta a la reparación de la duramadre suturada después de una cirugía de cráneo. Un factor que influye en el tiempo de reacción para formar el biomaterial para su uso como sellante de la duramadre (denominado como "sellante") es el pH de la composición y el tiempo de entrecruzamiento. Las moléculas precursoras se disuelven en una solución reguladora acuosa con un pH entre 2 y 7.5, más preferiblemente entre 4 y 5. En una realización preferida se emplean acetato de sodio con un pK de 4.76, fosfato de sodio con un pK 1 de 2.15 y un pK 2 de 7.2 o ácido clorhídrico (HCl) para preparar las soluciones reguladas o para ajustar el pH de las soluciones de moléculas precursoras. Después o durante la mezcla de las moléculas precursoras (y de cualquier aditivo y/o agente biológicamente activo) una base tiene que catalizar la reacción como activador. Preferiblemente se utiliza una solución básica como activador que tiene al menos uno de sus valores de pK en el rango de entre 9 y 13. Las más preferidas son carbonato de sodio con un pK 2 de 10.33 o borato de sodio con un pK 1 de 9.23 y un pK 2 de 12.74. Adicionalmente, el borato de sodio tiene propiedades antisépticas y también por esta razón se utiliza ventajosamente para aplicaciones en heridas. En otra realización puede utilizarse glicina como activador con un pK 2 de 9.78. Preferiblemente, la composición en el momento del entrecruzamiento tiene un pH en un rango de entre 9 a 13, más preferiblemente en un rango de entre 9.5 a 11.5, aún más preferiblemente en un rango de entre 9.8 a 13, más preferiblemente en un rango de entre 9.5 a 11.5, aún más preferiblemente en un rango de entre 9.8 a 11, y aún más preferiblemente en un rango de entre 10.3 a 10.6.

La composición utilizada como un sellante para la duramadre tiene que tener un tiempo de entrecruzamiento muy rápido con el fin de que permanezca en su lugar e inmediatamente evite las fugas. Preferiblemente, la composición se entrecruza en menos de dos minutos, aún más preferiblemente en menos de un minuto y los más preferiblemente entre 5 a 20 segundos y aún más preferiblemente entre 1 a 5 segundos.

El hinchamiento del biomaterial debe ser limitado puesto que el hinchamiento podría dar como resultado una presión sobre los tejidos que da como resultado una compresión de los nervios o isquemia. Tal como se define aquí anteriormente, el hinchamiento del sellante no debería exceder 1.5 y preferiblemente es menor de 1, más preferiblemente menor de 0.5. El más preferido es el hinchamiento que da como resultado un valor en un rango de entre 0.1 a 1.5, más preferiblemente en un rango de 0.1 a 1 y aún más preferiblemente de 0.1 a 0.8. En una realización preferida al menos una de las moléculas precursoras tiene como esqueleto una molécula más hidrófoba que el polietilenglicol. Por ejemplo, en una realización, la primera molécula precursora tiene un esqueleto de PEG en combinación con un copolímero de bloque PEO-PPO como esqueleto de la segunda molécula precursora. Preferiblemente ambas moléculas precursoras tienen un número de brazo funcionalizados en sus extremos de 3 o más. Los más preferiblemente ambas moléculas precursoras contienen 4 brazos funcionalizados en sus extremos. Preferiblemente la primera molécula precursora es una PEG tetratiol (Fórmula II) que tiene un peso molecular entre 4 kD 11 kD más preferiblemente entre 5 kD y 10 kD. El segundo componente precursor es preferiblemente un tetraacrilato Tetronic® (Fórmula I) que tiene un peso molecular entre 10 kD y 20 kD, más preferiblemente de aproximadamente 15 kD. En particular las buenas propiedades de un material sellante podrían alcanzarse combinando un PEG tetratiol de 5 kD o 10 kD con un tetraacrilato Tetronic®. La concentración de la segunda molécula precursora (el precursor electrofílico) que forma el biomaterial está en un rango de entre 8% a 18% p/p, más preferiblemente entre 10% a 16% p/p y lo más preferiblemente entre 12% y 14% p/p. La concentración de la primera molécula precursora (molécula precursora nucleofílica) se calcula y ajusta de acuerdo con la proporción deseada de grupos funcionales entre la primera y segunda moléculas precursoras. Los rangos de concentración de las moléculas precursoras tienen también un impacto significativo sobre el tiempo de hinchamiento, gelificación y resorción del biomaterial y por esta razón el rango óptimo es de importancia para las propiedades finales como sellante. Comenzando con una concentración baja de las moléculas precursoras se incrementará el tiempo de gelificación pero dará como resultado un biomaterial que se hinche hasta un grado más bajo. En una realización adicional, el biomaterial se degrada in vivo en menos de 12 semanas.

III. Métodos para la formación de biomateriales.

A. Almacenamiento

La primera y segunda moléculas precursoras se almacenan preferiblemente en solución bajo exclusión de oxígeno y

a temperaturas bajas, por ejemplo, alrededor de +4°C, para evitar la descomposición de los grupos funcionales antes del uso. Las moléculas precursoras pueden almacenarse en forma de polvo seco o como una solución en un regulador. En una realización, las dos moléculas precursoras se almacenan como una solución en un regulador ácido de acetato de sodio. En otra realización la primera molécula precursora se almacena como un polvo seco y la segunda molécula se almacena en una solución que tiene un pH ácido.

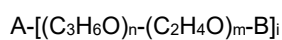
B. Preparación de la composición para sellamiento de tejidos

Una composición que forma un biomaterial, en particular un sellante de tejidos puede prepararse mediante el siguiente método general:

- a) proveer al menos una primera molécula precursora multifuncional que comprende al menos dos grupos nucleofílicos, preferiblemente cuatro grupos nucleofílicos, la cual comprenden opcionalmente aditivos y/o agentes activos biológicamente;
- b) proveer al menos una segunda molécula precursora multifuncional que comprende al menos dos grupos electrofílicos, preferiblemente cuatro grupos electrofílicos capaces de formar enlaces covalentes con los grupos nucleofílicos de la etapa a) bajo condiciones fisiológicas, lo cual opcionalmente comprende aditivos y/o agentes biológicamente activos;
- c) disolver las moléculas de precursor de la etapa a) y b) en una solución reguladora, preferiblemente con un pH ácido;
- d) mezclar las soluciones de moléculas precursoras obtenidas en la etapa c);y
- e) agregar una solución básica durante la etapa d) o después de la misma preferiblemente una solución regulada acuosa con un valor de pH entre 9 y 13 para iniciar la reacción de entrecruzamiento entre las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras.

En una realización preferida un método para fabricar un biomaterial comprende las etapas de:

- i) proveer una molécula precursora que es un polímero basado en poli (etilenglicol) que tiene x grupos tiol terminales, donde x es igual a 2 o mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8;
- ii) proveer una segunda molécula precursora de la fórmula general:



donde m y n son enteros de 1 a 200;

i es mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 6, 7 u 8;

A se selecciona del grupo consistente de carbono, glicerol, pentaeritritol, dipentaeritritol y etilendiamina;

B es un grupo insaturado conjugado

iii) hacer reaccionar las moléculas precursoras de las etapas i) y ii) en presencia de una base para formar una red tridimensional entrecruzada.

Cuando las primera y segunda moléculas precursoras se mezclan ocurre el entrecruzamiento con una velocidad baja (de 10 minutos a horas) si el pH de la solución es ácido. Con el fin de evitar que la mezcla alcance el punto de gelificación antes de la administración y para formar el biomaterial en un tiempo predefinido rápido, se requiere por lo tanto almacenar las moléculas precursoras en solución con un pH ácido. Preferiblemente, el pH de la solución está en un rango de 2 a 6 y más preferiblemente en un rango entre 2.5 a 5.5. Se obtiene una solución ácida preferida con un regulador de acetato o una solución ácida hidroclicla.

En una realización preferida la primera y segunda moléculas precursoras se disuelven en una solución reguladora que tiene un pH ácido. En otra realización, la primera molécula precursora es un polvo seco, la segunda molécula precursora está disuelta en una solución reguladora que tiene un pH ácido y las dos moléculas precursoras se mezclan antes de estar en contacto con la base. La primera y segunda moléculas precursoras y cualquier aditivo y/o agente biológicamente activo, si están presentes, pueden esterilizarse opcionalmente antes de la mezcla. Esto se hace preferiblemente por filtración estéril de los componentes precursores y cualquier otro componente soluble y redición gamma de componentes insolubles en agua. Las moléculas precursoras obtenidas en las etapas a), b) y/o la mezcla obtenida en la etapa d) pueden almacenarse durante un tiempo prolongado, preferiblemente a temperaturas bajas. Antes de la aplicación, las moléculas precursoras (y otros componentes si están presentes) se mezclan una con otra y en segundo lugar con una solución básica como activadora. Al introducir la solución básica, la composición se gelifica rápidamente. Preferiblemente, la composición, incluyendo la solución básica, tiene un pH en el rango de entre 9 a 13, más preferiblemente en el rango entre 9.5 a 11.5, aún más preferiblemente en un rango entre 9.8 a 11 y aún más preferiblemente en un rango entre 10.3 a 10.6 para permitir que la gelificación ocurra en menos de dos minutos, preferiblemente en menos de 10 segundos y más preferiblemente en menos de 5 segundos. Hay diferentes modos de mezclado. En una realización, pueden interconectarse tres jeringas, una que contiene el precursor nucleofílicos, otra que contiene le precursor electrofílico y la tercera que contiene la solución básica, utilizando un dispositivo conector de tres vías. Los contenidos de las jeringas se mezclan siendo oprimidas a través de una mezcla estática a la salida del dispositivo conector de tres vías. La composición se inyecta directamente en el sitio que requiere el tratamiento en el cuerpo conectando el mezclador estático a una aguja de inyección. En una segunda realización, una de las soluciones de molécula precursora se mezcla con la solución básica. Esto se hace preferiblemente conectando la

jeringa que contiene la solución básica a la jeringa que contiene preferiblemente el precursor electrofílico (opcionalmente también que contiene aditivos y/o agentes biológicamente activos) a través de un dispositivo conector, que permite la mezcla jeringa a jeringa de los contenidos respectivos. Un mezclador estático puede ser parte del dispositivo conector. La mezcla se completa cuando se alcanza una mezcla homogénea. Después de mezclar, una jeringa contiene una mezcla de la base/molécula precursora y la otra jeringa está vacía. Entonces, la jeringa vacía se retira del dispositivo conector y se reemplaza por la jeringa que contiene la otra molécula precursora que contiene opcionalmente también aditivos y/o agentes biológicamente activos. De nuevo, el mezclado jeringa a jeringa va en una vía para alcanzar un mezclado homogéneo de ambos contenidos. Subsecuentemente la jeringa que contiene la mezcla es conectada a la aguja de inyección y la composición se inyecta en el sitio que así lo requiere en el cuerpo.

Alternativamente, la jeringa que contiene la mezcla base/precursor y la jeringa que contiene el otro precursor se interconectan a través de un dispositivo conector de dos vías que comprende un mezclador estático a su salida. El dispositivo conector de dos vías puede ser una jeringa de doble compartimiento. Los contenidos se mezclan impulsando el contenido de las jeringas a través del mezclador estático. El mezclador está directamente conectado a la aguja de inyección o la mezcla es obtenida en una jeringa adicional, la cual luego es conectada a la aguja de inyección.

En una realización preferida, las primera y segunda moléculas precursoras, preferiblemente las primera y segunda moléculas precursoras disueltas en un regulador de acetato de sodio, se mezclan (junto con cualquier aditivo, o agentes biológicamente activos, si es necesario) y luego se asperja junto con un activador, una solución básica sobre el tejido.

IV. Kits para formar composiciones entrecruzables in situ

Los kits de la presente invención son conjuntos de partes utilizados para formar los biomateriales de la presente invención. El kit contiene al menos un primero y un segundo componente precursor. El kit puede contener también uno o más dispositivos, tales como jeringas o jeringas de compartimiento doble, para administrar la primera y segunda moléculas precursoras más cualquier aditivo y/o agentes biológicamente activos. El kit puede contener también contenedores para almacenar las moléculas precursoras y la solución básica. Los kits también contienen dispositivos libres de agujas para transferir el contenido de los contenedores uno a otro o para transferir el contenido de los contenedores a una jeringa de compartimiento doble. Opcionalmente, el kit también contiene una solución básica. Preferiblemente, la base se almacena en un tercer contenedor. Opcionalmente, la primera y segundas moléculas precursoras contienen uno o más aditivos y/o agentes biológicamente activos. Las moléculas precursoras pueden colocarse en el uno o más dispositivos antes de la administración a un paciente. El kit puede comprender azul de metileno, de acuerdo con la invención, el kit también incluye un colorante, es decir verde de lisamina o verde rápido, que pueden agregarse al biomaterial para facilitar la visualización del biomaterial. En una realización preferida en particular adecuada para la aplicación de biomateriales, las soluciones de moléculas precursoras se almacenan en uno de los compartimientos del dispositivo de compartimiento doble y la solución básica se almacena en el segundo compartimiento del mismo dispositivo. La salida del dispositivo contiene una boquilla de aspersión que puede ser combinada opcionalmente con un mezclador estático para optimizar la mezcla de la solución básica con las soluciones de las moléculas precursoras. Las soluciones de las moléculas precursoras (más cualquier aditivo o agentes biológicos activos si es necesario) pueden estar contenidas en el compartimiento premezclado o las moléculas precursoras pueden estar separadas en el compartimiento mediante una membrana que permite mezclar las moléculas por eliminación o destrucción.

En otra realización, el kit comprende un primer contenedor (bajo vacío), el cual puede ser un vial de vidrio, que comprende la primera molécula precursora como un polvo seco y el segundo contenedor, que puede ser un vial de vidrio, que comprende la segunda molécula precursora disuelta en una solución reguladora acuosa que tiene un pH ácido. Opcionalmente, el primero o segundo contenedor pueden comprender uno o más aditivos seleccionados del grupo consistente de agentes tixotrópicos y agente radioopacos o colorantes. El contenido del segundo contenedor es transferido al primer contenedor a través de un dispositivo de transferencia libre de agujas (Mix2Vial® 20/20, West). Después de lo anterior la primera y segunda moléculas precursoras se mezclan y disuelven en una solución acuosa regulada que tiene un pH ácido. Un tercer contenedor que puede ser un vial de vidrio, comprende la solución básica. Preferiblemente, una jeringa de compartimiento doble está equipada con un adaptador de llenado doble. Los dos compartimientos de la jeringa doble pueden tener un volumen diferente. Preferiblemente, el volumen del compartimiento que recibe la mezcla de las moléculas precursoras es diez veces más grande que el volumen del compartimiento que recibe la solución básica. El contenedor que comprende las moléculas precursoras y el contenedor que comprende la base están conectados a medios de conexión y sus contenidos son transferidos simultáneamente en los dos compartimientos de la jeringa halando los pistones de la jeringa. Los medios de conexión y los dos contenedores se retiran de la jeringa y la jeringa está equipada con una boquilla de aspersión desprendible. La mezcla de la solución de moléculas precursoras y la solución básica ocurre en la boquilla de aspersión y la mezcla íntima resultante es asperjada en el sitio deseado.

V. Usos para las composiciones

Los componentes precursores multifuncionales se seleccionan y calculan para producir biomateriales con las propiedades deseadas. Las moléculas precursoras son capaces de entrecruzamiento in situ a temperatura fisiológica,

de acuerdo con requerimientos de sellamiento específicos. En la realización preferida, las composiciones y biomateriales de la presente invención se utilizan para evitar, reducir, inhibir o contener la pérdida de fluidos biológicos. En otra realización, las composiciones y biomateriales de la presente invención se utilizan para recubrir la superficie de un tejido.

5 A. Sellante de tejido

En una realización, las composiciones y biomateriales de la presente invención se utilizan como sellantes de tejido. En la realización preferida, la composición entrecruzables in situ forma un biomaterial que forma un recubrimiento, una barrera o un sellante para reducir, inhibir o contener las pérdidas de fluidos. En particular, el biomaterial puede ser utilizado para inhibir, reducir o contener pérdidas de fluido después de un procedimiento médico. Un procedimiento

10 médico preferido incluye, pero no se limita a cirugía de cerebro o neurocirugía.

B. Indicaciones médicas diferentes al sellamiento de tejido

Los biomateriales descritos no están limitados para uso en procedimientos quirúrgicos. El biomaterial puede ser utilizado como protector de heridas para heridas en cualquier parte del cuerpo. En una realización, el biomaterial puede ser utilizado como un protector de campo para evitar o reducir la pérdida de sangre resultante de traumas. En otra

15 realización el biomaterial puede ser utilizado para reducir o evitar la antiadhesión postquirúrgica.

Ejemplos

Materiales

Copolímeros de bloque de etilendiamina (poli(etileno óxido-propileno óxido)) (Tetronic® 1107 mol. Peso 15 kD, BASF) fue funcionalizado en su extremo con grupos acrilato para llevar a tetrakis((poli(etileno óxido-propileno óxido) copolímeros de bloque-acrilato) (tetraacrilato Tetronic peso molecular 15 kD) de acuerdo con el método descrito en biomateriales 25 (2004) 5115-5124.

20

Preparación del regulador

Se preparó trietanolamina 0.3 M (TEA) disolviendo 1.11 g en 25 ml de agua mili-Q y ajustando el pH mediante la adición de ácido clorhídrico 5 M.

25 Se preparó TBS disolviendo 8 g de NaCl, 0.2 g de KCL Y 3 g de base Tris en 11 ml de agua mili-Q. El pH fue ajustado con NaOH 5 M.

Regulador de glicina: se disolvieron 7.5 g de glicina y 5.85 de NaCl en 11 ml de agua miliQ. El pH fue ajustado con NaOH 5 M.

30 Regulador de acetato: se prepararon en una solución ácida 10 mM y una solución reguladora de acetato de sodio 10 mM con agua miliQ. Los dos reguladores se mezclaron en una proporción para obtener el pH deseado.

Regulador de borato: Se prepararon en un regulador de ácido bórico 100 mM y un regulador de decahidrato de tetraborato de sodio 50 mM. Los dos reguladores fueron mezclados en una proporción para obtener un pH deseado.

Regulador de carbonato: Se prepararon en un regulador de carbonato de sodio 100 mM y un regulador de bicarbonato de sodio 100 mM en agua miliQ. Las dos soluciones fueron mezcladas en una proporción para obtener un pH deseado.

35 Prueba de gelificación

Para establecer el tiempo de gelificación, 50-100 µl de las cantidades especificadas de la solución de la primera molécula precursora y la solución de la segunda molécula precursora de la Tabla 2 se transfirieron mediante una pipeta en un tubo Eppendorf. Para los materiales de gelificación rápida, las gotas (de igual volumen) de la respectiva solución de la primera molécula precursora fueron colocadas en la pared interna para evitar un contacto prematuro con la segunda solución precursora. Se inició un temporizador simultáneamente colocando el Eppendorf en un vórtex, donde las soluciones fueron mezcladas entonces durante exactamente 5 segundos. Inmediatamente después de la mezcla, las soluciones combinadas fueron probadas con una aguja y el "punto de gelificación" (cuando las hebras finas permanecían unidas a la aguja después de retirarlas) con su tiempo registrado en el cual las hebras delgadas comenzaron a mantenerse unidas a la aguja cuando era retirada de la solución lo que fue registrado como "punto de gelificación". Para las formulaciones de gelificación rápida el estatus después de probar a 5 segundos fue registrado (por ejemplo, hebras delgadas, hebras gruesas y/o gel duro). Alternativamente, se llevó a cabo la mezcla por mezclado jeringa a jeringa. Para esto, la solución de primera molécula precursora y la solución de segunda molécula precursora fueron puestas en jeringas, se conectaron las jeringas con un acoplador y la solución fue empujada hacia atrás y hacia delante diez veces. La mezcla fue transferida a un plato de pesado y el punto de gelificación fue determinado como se describe anteriormente mediante "la prueba con agujas". Después de una gelificación inicial, el hidrogel permanece típicamente pegajoso hasta que se alcanza un grado mayor de entrecruzamiento. En tiempo que el material necesito para entrecruzarse suficientemente (pérdida del carácter pegajoso) fue registrado como "tiempo de deposición" el cual refleja el tiempo después del cual el material puede ser tocado sin daño.

50

Ejemplo 1: Composiciones sellantes para tejidos

1a: Composición 1: Tetraacrilato tetronic y PEG-SH-10

Solución de primera molécula precursora

5 235 mg de poli(etilenglicol) tetrasulfhidrido ("PEG-SH-10") (peso molecular 10kD) y 0.1 mg de verde de lisamina se disuelven en 1 mL de regulador de acetato 10 mM pH 5.

Solución de segunda molécula precursora

315 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelven en 1 mL de un regulador de acetato 10 mM pH 5.

Solución básica

0.22 mL de un regulador de borato 50 mM pH 9.8

10 **1b: Composición 2: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-5**

Solución de primera molécula precursora

112 mg de poli(etilenglicol) tetrasulfhidrido ("PEG-SH-5") (peso molecular 5 kD) y 0.1 mg de verde de lisamina se disuelven en 1 mL de regulador de acetato 10 mM pH 5.

Solución de segunda molécula precursora

15 315 mg de tetronic -tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelven en 1 mL de un regulador de acetato 10 mM pH 5.

Solución básica

0.22 mL de un regulador de borato 50 mM pH 10.4

1c: Composición 3: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-5 (Ejemplo de referencia)

20 Solución de primera molécula precursora

168 mg de poli(etilenglicol) tetrasulfhidrido ("PEG-SH-5") (peso molecular 5 kD) se disuelven en 1 mL de regulador de acetato 10 mM pH 4.9.

Solución de segunda molécula precursora

25 472 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelven en 2 mL de un regulador de acetato 20 mM pH 4.9.

Solución básica

0.3 mL de un regulador de carbonato 250 mM pH 11.0

1d: Composición 4: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-5 (Ejemplo de referencia)

Solución de primera molécula precursora

30 192 mg de poli(etilenglicol) tetrasulfhidrido ("PEG-SH-5") (peso molecular 5 kD) se disuelven en 1 mL de regulador de acetato 5 mM pH 4.9.

Solución de segunda molécula precursora

472 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelven en 1 mL de un regulador de acetato 5 mM pH 4.9.

Solución básica

35 0.3 mL de un regulador de carbonato 250 mM pH 11.0

1e: Composición 5: Tetronic-tetraacrilato y DTT (Ejemplo de referencia)

Solución de primera molécula precursora

2.5 mg de ditiotreitól (DTT, peso molecular 154 g/mol) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

40 Solución de segunda molécula precursora

120 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5. o

Solución de primera molécula precursora

3.15 mg de ditioneitol se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

5 Solución de segunda molécula precursora

150 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

1f: Composición 6: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-3.4 de dos brazos (Ejemplo de referencia)

Solución de primera molécula precursora

10 156 mg de poli(etilenglicol) disulfidrilato ("PEG-SH-3.4") (peso molecular 3.4 kD) se disuelve en 1 mL de regulador de acetato 10 mM pH 5.5.

Solución de segunda molécula precursora

315 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelve en 1 mL de un regulador de acetato 10 mM pH 5.5.

Solución básica

15 0.3 mL de un regulador de carbonato 250 mM pH 10.0

1g. Composición 7: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-10 de 8 brazos (Ejemplo de referencia)

Solución de primera molécula precursora

161 mg de 8 arm poli(etilen glicol) octasulfhidrilato ("PEG-SH-10 de 8 brazos") (peso molecular 5 kD) se disuelve en 1 ml de 10 mM acetate de pH 4.9 .

20 Segunda molécula precursora

472 mg tetronic-tetraacrilato (15 kD) se disuelve en 2 ml de acetato 20 mM de pH 4.9.

Solución básica

0.3 mL de regulador de carbonato de sodio 0.25 M a pH 11.0

1h: Composición 8: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-5 de 4 brazos (Ejemplo de referencia)

25 472 mg de tetronic tetraacrilato, 15 kD

192 mg PEG-tetratiol, 5kD

0.55 mg ácido clorhídrico

9.5 mg de carbonato de sodio

0.15 mg de hidrato de azul de metileno

30 3.3 g agua para inyección

Preparación del kit

Se preparó una solución madre 5 mM de HCl, diluyendo 5 ml de solución HCl 100 mM en 95 ml de agua miliQ. Se preparó una solución madre de azul de metileno, de 1 mg/ml en HCl 5 mM disolviendo 20 mg de azul de metileno en 20 ml de solución madre de HCl. El regulador para la reconstrucción del tetraacrilato tetronic fue preparado a partir de HCl 5 mM con 0.05 mg/ml de azul de metileno. Se diluyó con la solución madre de HCl a una proporción de 1:20, el pH se ajustó para estar dentro del rango de 2.3-2.6. El pH de la solución básica (regulador de carbonatos) se ajustó para que estuviera en el rango de 11.35-11.45. Se disolvieron 45.472 mg de tetraacrilato tetronic en 3 ml de regulador para tetraacrilato tetronic frío y se mantuvo en hielo durante 5 minutos para facilitar la solubilización. La solución fue centrifugada durante 1 minuto a 3000 rpm para eliminar las burbujas de aire y se transfirió mediante pipeta hacia un vial que contenía 192 mg de PEG-tetratiol el cual fue disuelto por agitación suave. Después de la reconstitución del polímero, se transfirieron 3 ml de mezcla en el compartimiento más grande de una jeringa doble 1:10. El compartimiento más pequeño fue llenado con 0.4 ml de solución 300 mM de carbonato de sodio. El pistón fue insertado, se eliminó cuidadosamente el aire de la jeringa y se conectó la boquilla de aspersión.

1.i Preparación de DuraSeal®

DuraSeal® (Confluent Surgical Inc.) se preparó de acuerdo con las instrucciones de uso.

1j: Composición 10 Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-3.4 de 2 brazos

133 mg de poli(etilenglicol) disulfidrilato ("PEG-SH-3.4") (peso molecular 3.4 kD) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

Solución de segunda molécula precursora

220 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

1k: Composición 11: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-3.4 de 2 brazos

107 mg de poli(etilenglicol) disulfidrilato ("PEG-SH-3.4") (peso molecular 3.4 kD) se disuelve en 1.5 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

Solución de segunda molécula precursora

220 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

11: Composición 12: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-3.4 de 2 brazos

354 mg de poli(etilenglicol) disulfidrilato ("PEG-SH-3.4") (peso molecular 3.4 kD) se disuelve en 1.5 mL de a 0.3 M trietanolamina buffer at pH 8.5.

Solución de segunda molécula precursora

240 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelve en 500 mL de un regulador de trietanolamina 0.3 M a pH 8.5.

1m: Composición 13: Tetronic-tetraacrilato y PEG-SH-3.4 de 2 brazos

140.7 mg de poli(etilenglicol) disulfidrilato ("PEG-SH-3.4") (peso molecular 3.4 kD) se disuelve en 50 mL de un regulador de borato 100mM a pH 10.1, 9.8 y 9.6.

Solución de segunda molécula precursora

286 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) es 50 mL de un regulador de borato de 100mM a pH 8.5.

Ejemplo 2a: Estabilidad de la mezcla de la primera y segunda moléculas precursoras

Solución de primera molécula precursora

194 mg de poli(etilenglicol) tetrasulfhidrilato ("PEG-SH-5") (peso molecular 5 kD) se disuelven en 1 mL de regulador de acetato 10 mM pH 4.9. El regulador se prepara mezclando un regulador de ácido acético 100 mM y un regulador de acetato de sodio 100 mM para alcanzar un pH de 4.90 y diluyendo el regulador 1:10 v/v con agua.

Solución de segunda molécula precursora

545 mg de tetronic tetraacrilato (peso molecular 15 kD) se disuelven en 2 mL de un regulador de acetato 20 mM pH 4.9. El regulador se prepara mezclando un regulador de ácido acético 100 mM y un regulador de acetato de sodio 100 mM para alcanzar un pH de 4.90 y diluyendo el regulador 1:5 v/v con agua.

Solución básica

0.3 ml de regulador de carbonato 250 mM pH 11.0

Cuando solamente la primera y segunda moléculas precursoras se mezclan sometiendo a vórtex durante 30 s, se presenta la gelificación al cabo de 30 minutos. El tiempo de gelificación se midió introduciendo y sacando una aguja en la solución, el tiempo se midió hasta que se formaron hebras indicando un grado avanzado de entrecruzamiento del material. A una concentración más baja de moléculas precursoras, esto es, para soluciones de moléculas precursoras preparadas como se describe en el ejemplo 1c y 1d (composición 3 y composición 4), la gelificación se presenta solamente después de una hora. Cuando la solución básica se aplica a la mezcla de moléculas precursoras, ambas composiciones gelifican en segundos (en menos de 10 segundos).

Ejemplo 2b: Efecto de la proporción entre el número de grupos funcionales acrilatos y tiol presentes en los

polímeros correspondientes

- La solución de la primera molécula precursora y la solución de la segunda molécula precursora tal como se definen en el ejemplo 1.c se mezclan en diferentes proporciones de volumen (0.25:1, 0.375:1, 0.5:1, 0.675:1 y 0.75:1). Estas proporciones corresponden a las proporciones molares de tiol frente a proporciones molares de acrilato de 1:0.5, 1:0.75, 1:1, 1: 1.25 y 1: 1.5. La solución de la primera molécula precursora y la solución de la segunda molécula precursora se mezclaron durante 30 segundos sometiéndolas a vórtex. Se agregaron entonces 0.2 ml de una solución reguladora de borato 50 mM de pH 9.3 en un volumen correspondiente a un décimo del volumen total de las soluciones de las moléculas precursoras. La mezcla fue mezclada sometiéndola a vórtex durante exactamente 5 segundos. Sumergiendo y retirando una aguja de la solución, se midió el tiempo hasta que se formaron hebras que indicaban un grado avanzado de entrecruzamiento del material. Se obtuvo un tiempo mínimo de gelificación de 10-11 segundos para las muestras con una proporción molar de acrilato a tiol de 1:1 y 1:0.75. El tiempo de gelificación se incrementó hasta el 13-15 segundos para las otras proporciones.

Ejemplo 3: Preparación del biomaterial**3a: Preparación del biomaterial a partir de la composición 1, 2, 3, 4 y 6**

- Antes de la aplicación de la composición farmacéutica en el sitio deseado, las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras se llenan en dos jeringas distintas que están conectadas con un acoplamiento. Las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras se mezclan transfiriendo el material contenido en una jeringa a la otra jeringa (típicamente, las soluciones se empujan hacia atrás y hacia delante 10 veces. Aunque la mezcla permanece estable de 10 a 20 minutos después de su preparación, idealmente la composición farmacéutica debería ser usada antes de los 5 minutos después de su preparación. El biomaterial se forma in situ en el sitio deseado, suministrando al sitio defectuoso la mezcla que comprende la primera y segunda moléculas precursoras y el activador utilizando un dispositivo de dos componentes equipado bien sea con una punta de dispersión o una punta aspersora. El biomaterial se forma en menos de un minuto después de la administración del contenido del dispositivo de dos componentes.

3b. Preparación del biomaterial a partir de la composición 5, 10, 11, 12 y 13

- Las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras señalan en dos jeringas distintas que están conectadas con un acoplamiento. Las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras se mezclan transfiriendo el material contenido en una jeringa a la otra jeringa. El punto de gelificación se alcanza en la jeringa y el biomaterial es extrudido de la jeringa y suministrado a un molde.

3c. Preparación del biomaterial a partir de la composición 7

- Las dos moléculas precursoras se mezclan mezclando jeringa a jeringa. Sin adición de una solución básica, las moléculas precursoras gelifican al cabo de 30 minutos. Esto significa que la mezcla de las moléculas precursoras puede almacenarse durante 30 minutos antes del uso. Cuando se agregan 300 μ l de solución reguladora de carbonato de sodio 0.25 M a pH 11.0, la gelificación ocurre en pocos segundos (menos de 5 segundos).

Ejemplo 4: Hinchamiento/degradación del biomaterial

- Para establecer el hinchamiento y degradación del biomaterial, se prepararon biomateriales a partir de composiciones como las descritas en los Ejemplos 1.a y 1b.

- Antes de la aplicación de las composiciones en el sitio deseado, las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras se llenan en dos jeringas distintas que están conectadas con un acoplador. Las soluciones de la primera y segunda moléculas precursoras se mezclan transfiriendo el material contenido en una jeringa a la otra jeringa (típicamente, las soluciones se empujan hacia atrás y adelante 10 veces). Aunque la mezcla permanece estable durante 10 a 20 minutos después de su preparación (significando que las mezclas no han alcanzado el punto de gelificación antes de 10 a 20 minutos), idealmente las composiciones deberían ser utilizadas al cabo máximo de 5 minutos después de su preparación. Los biomateriales se forman in situ en el sitio deseado, administrando en el sitio deseado las mezclas que comprenden las primera y segunda moléculas precursoras y la solución básica utilizando un dispositivo de dos compartimientos equipado bien sea con una punta distribuidora o una punta aspersora. Los biomateriales se forman en menos de 5 segundos después de administrar el contenido del dispositivo de dos compartimientos. Las composiciones se distribuyen sobre una placa de pesaje de tal forma que se forme una capa de 1 mM de los biomateriales. El disco de pesaje que contiene las soluciones en reacción se coloca entonces a 37°C en una atmósfera humidificada y se cura durante 10 minutos. De cada película se cortan discos con un diámetro de 1.2 cm. Los especímenes se colocan en tubos que contienen solución regulada de fosfato (PBS) y se colocan en una incubadora a 37°C. Los biomateriales se retiran de los tubos con la ayuda de una espátula en diferentes puntos del tiempo. Los biomateriales se secan cuidadosamente utilizando papel de tejido para retirar cualquier exceso de agua y luego se pesan. Los biomateriales se colocan entonces devuelta en sus tubos respectivos y se colocan de nuevo en la incubadora. El hinchamiento alcanza un valor de 0.87 ± 0.11 para el biomaterial formado a partir de la composición del Ejemplo 1a y 0.32 ± 0.06 del biomaterial formado a partir de la composición del ejemplo 1b después de dos días en PBS a 37°C. Ambos biomateriales se disuelven completamente al cabo de 28 a 35 días (Figuras 1 y 2).

Ejemplo 5: Prueba de compresión

Se describen 8 especímenes de biomateriales formados a partir de la composición 1 en el ejemplo 1a y 8 especímenes de biomateriales formados a partir de la composición 2 como se describe en el ejemplo 1b se prepararon llenando 100 µl de composiciones 1 y 2 en una jeringa de corte de 1 ml. Los biomateriales fueron curados durante 5-10 minutos y luego retirados de su molde. Se obtuvieron cilindros con un diámetro de 5 mm y una altura de 11.5 mm. Se colocaron 4 biomateriales en PBS 10 mM a pH 7.4 y se colocaron 4 biomateriales en un tubo seco. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Puesto que el tiempo de gelificación con una solución básica con un pH de 9.8 y 10.4 respectivamente, fue demasiado rápido para la formación de especímenes homogéneos, el pH de la solución básica se disminuyó a 9.6. Las muestras fueron medidas con un instrumento "Zwick Materialprüfung 1456". El módulo de Young (módulo elástico) se determinó con una celda de carga de 50 N, con resistencia final con una celda de carga de 20 kN. La velocidad de precarga fue incrementada de 0.05 a 0.1 mm/s y el tiempo de espera fue reducido 3 s. El módulo de Young fue medido a una compresión del 3% pero a una velocidad de 0.08 mm/s. La misma velocidad fue aplicada con la celda de carga de 20 kN para el registro de la presión hasta que el material se fracturo. Se comprimieron especímenes de cada uno de los biomateriales en estado seco y después de 24 horas de incubación en PBS. Ninguno de los biomateriales fue destruido en su estado seco (almacenado en aire a 37°C durante 24 horas) cuando se sometió a compresión hasta 99%. En estado húmedo, la presión en el fallo fue 3.8 ± 2.5 N/mm² para el biomaterial formado a partir de la composición 1 y 1.51 ± 0.17 N/mm² para el material formado a partir de la composición 2. El porcentaje de compresión en el fallo fue de $91 \pm 3\%$ para el biomaterial formado a partir de la composición 1 y $88 \pm 2\%$ para el biomaterial formado a partir de la composición 2. El módulo de Young fue 0.125 ± 0.005 para el biomaterial formado a partir de la composición 1 y 0.10 ± 0.00 N/mm² para el biomaterial formado a partir de la composición 2 en el estado húmedo. En el estado seco, el módulo de Young del biomaterial formado a partir de la composición 2 tuvo un valor de 0.561 ± 0.152 N/mm² superior la del biomaterial formado a partir de la composición 1 el cual exhibía un módulo de Young de 0.152 ± 0.024 N/mm².

Ejemplo 6: Resistencia adhesiva y cohesiva de los biomateriales

La resistencia adhesiva y cohesiva de los biomateriales se examina en una prueba de explosión. Las mediciones de la Prueba de Explosión se llevaron a cabo de acuerdo con ASTM F-2329-04 (prueba estándar para resistencia a la explosión de sellantes quirúrgicos. Se utilizó un sensor de presión relativa (DeltaOhm TP704-2BG1) con un rango de medición de 0-2 bar (sobre presión máxima 4 bar) y una resolución de 0.1 mbar. Se utilizó una bomba de jeringa con un flujo constante como bomba de fluido (Alaris, Asena, GH). Para la prueba de explosión por presión, se aplican la composición 8 y Duraseal® preparados como se describe en el Ejemplo 1h y 1j a una membrana de colágeno húmeda. Con el fin de garantizar una forma de muestra igual, la membrana de colágeno se coloca bajo una máscara, a través de la cual se aplica el sellante. Las muestras se dejan curar entonces antes de que sean retiradas cuidadosamente de la máscara. Después de medir el espesor y peso de la muestra las muestras se aseguran en el dispositivo de prueba y se prueban separadamente. La presión en incremento, que actúa directamente sobre el sellante a través de un agujero prefabricado en el colágeno se mide de forma constante. Después de que el sellante explota, la bomba puede ser apagada y puede lograrse la evaluación de los datos recolectados. Para permitir una comparación de las resistencias particulares a la explosión de diferentes muestras, se midieron sus espesores antes de probar y se normalizaron a 1 mm. La prueba de expresión de explosión de los lados sellantes sintéticos quirúrgicos demostró claras diferencias en su resistencia al fallo. Mientras que el biomaterial formado a partir de la composición 8 explotaba a una presión promedio de 240 mmg, el Durascal® explota a una presión promedio de 74 mmg. La rata de fallo cohesivo en ambos sellantes fue del 90%, lo que demuestra una buena adherencia a la membrana de colágeno utilizada en la prueba.

Ejemplo 7: Sellamiento quirúrgico de Duramadre de Oveja

La duramadre de una oveja que había sido sacrificada 3 horas antes fue diseccionada. La piel fue retirada utilizando un escalpelo y se cortó una forma rectangular en el cráneo utilizando una cuchilla para hueso. El cráneo fue levantado y puesto que la duramadre estaba aun parcialmente unida al cráneo, la duramadre fue seccionada cuidadosamente del cráneo y colocada de vuelta sobre el cerebro. Se asperjaron las composiciones 1 y 2 (tal como se describen en el Ejemplo 1a y 1b) en forma de una película delgada sobre la duramadre y se dejaron curar durante 1 minuto. No se observó fuga de fluidos. Se utilizó una espátula redonda plana para tratar y retirar/pelar el material curado de la duramadre. La apariencia de gel, el tiempo de gelificación y la adhesividad se establecieron cuantitativamente en una escala de 1-5. Para la apariencia del gel, el grado 1 corresponde a un gel no homogéneo. El grado 2 corresponde a un gel que es principalmente áspero, el grado 3 a un gel que tiene algunas partes ásperas, y el grado 5 a un gel suave homogéneo. En cuanto al tiempo de gelificación, el grado 1 corresponde a aproximadamente 50-100% de la composición deslizándose. El grado 2 corresponde a un deslizamiento de aproximadamente 25-50 de la composición, el grado 3 al deslizamiento de aproximadamente 5-10% de la composición y el grado 5 corresponde a un deslizamiento de aproximadamente 0-5% de la composición. En cuanto a adhesividad grado 1 significa que el gel se desprende sin esfuerzo, el grado 2 que el gel se desprende con una fuerza baja, el grado 3 significa que se necesita aplicar una fuerza mediana para retirar el gel, el grado 4 significa que muy poco gel se desprende y el grado 5 significa que no se retira nada del gel. Para la composición 2 el pH se incrementó a 10.4 con el fin de disminuir el tiempo de gelificación. Para propósitos de comparación, las composiciones se aplicaron también a membranas de colágeno húmedas así como directamente al cerebro. Ambos biomateriales formados a partir de las composiciones demostraron una

adherencia muy buena a la duramadre (biomaterial formado a partir de la composición 1-grado 4, biomaterial formado a partir de la composición 2-grado 3). La adhesividad del biomaterial a la duramadre se encontró mucho mejor que la adhesividad a las membranas de colágeno. Por el contrario, cuando se aplica el biomaterial a un cerebro de ovino (recubierto con piamadre y capa aracnoidea) podría ser desprendido más fácilmente. La composición 1 gelifico rápidamente (grado 4) y por lo tanto al final de la aplicación se crearon algunas partes ásperas debido a un material semigelificado en contacto con el aspersor (grado 4 en cuanto a la apariencia del gel). Por otro lado la composición 2 gelifico de manera más bien lenta (grado 2), aun cuando el pH de la solución básica fue incrementado a 10.4 y no todo el producto estaba localizado en el sitio de aplicación sino que fluyo hacia los lados, especialmente si la duramadre no estaba horizontal. No obstante, cuando el material fue aplicado, permaneció una capa delgada de material. Al cabo de 30 segundos el material formo un hidrogel áspero y no pegajoso (grado 5 de apariencia de gel).

Ejemplo 8: Modelo de durotomía de oveja

Se expuso la duramadre de una oveja anestesiada y se hizo una incisión de 2 cm en la duramadre y en el aracnoide de tal manera que ocurriese fuga del fluido cerebroespinal. Este defecto fue reparado medianamente utilizando sutura de polipropileno 4/0 pero dejando una brecha de 1 mm. La composición 8 tal como se describió en el Ejemplo 1h fue utilizada con el método siguiente.

Esterilización de componentes

Todos los componentes del aplicador, bolsas, viales de vidrio y cierres fueron esterilizados por irradiación gamma a una dosis de 21.8 kGy. Después de esto cualquier manejo de materiales se llevó a cabo en una cabina estéril. Los reguladores y la solución de tetraacrilato tetronic se esterilizaron filtrando a través de filtros de jeringa de 0.22 μ m de PES. El PEG-SH-5 fue suministrado no estéril en el kit y filtrado a través de un filtro de jeringa de 0.22 μ m de PES después de la reconstrucción con tetraacrilato tetronic durante la preparación del kit.

Preparación de reguladores

La solución básica fue preparada disolviendo 1.59 g de carbonato de sodio y 50 ml de agua grado inyectable. El pH registrado fue 11.38.

La solución de acrilato tetronic fue preparada disolviendo 471 mg de tetraacrilato tetronic en 3 ml de HCl 5 mM que contenían 0.05 mg/ml de azul de metileno. La reconstitución se logró sometiendo a vórtex 10-20 segundos, almacenando la solución a 4°C durante 10 minutos y centrifugándola durante 5 minutos a 2500 rpm. La solución 5 mM de HCl fue preparada a partir de una solución 100 mM de HCl por dilución con agua grado inyectable. El azul de metileno fue preparado utilizando un azul de metileno de 10 mg/ml en solución de HCl 5 mM y luego diluyendo con HCl 5 mM.

Llenado y empaque aséptico del kit

La doble jeringa fue ensamblada con pistones antes de su esterilización. Se llenó el compartimiento pequeño con 400 μ l de carbonato de sodio en una jeringa y se empaço junto con 4 cabezas de aspersión y 1 pistón en la bolsa 1. El componente PEG-SH-5 fue preparado pesando 192 mg de polímero en viales de vidrio. El vial de vidrio fue limpiado con etanol y el polvo fue vertido sobre un vial de vidrio estéril sin tocar el exterior. El vial fue cerrado con una tapa de pinza. La solución de tetraacrilato tetronic fue tomada en una jeringa de 20 ml y se transfirieron 3.3 ml a una jeringa de 5 ml a través de un acoplamiento jeringa a jeringa. La jeringa fue cerrada con un tapón combi. El vial, la jeringa de 5 ml, una aguja azul y otra rosa y un filtro de jeringas fueron empacados en una bolsa 2 y sellados por calor. La bolsa 1 y la bolsa 2 fueron colocadas en una bolsa más grande y selladas por calor. Los kits fueron almacenados a menos de -15°C hasta -25°C y embarcados sobre hielo seco. En el día del experimento, el kit fue retirado del almacenamiento y colocado a temperatura ambiente hasta que se descongeló por completo. En el momento del uso, el kit fue abierto en el campo estéril. La solución de tetraacrilato tetronic fue transferida al vial que contenía el polvo de PEG-SH-5. El polvo fue reconstituido agitando suavemente el vial durante 1-2 minutos. La mezcla fue tomada con la jeringa de nuevo y la jeringa fue conectada a un filtro estéril y una aguja azul, y transferida en el compartimiento más grande de la jeringa doble. El dispensador fue conectado a la jeringa doble y el aire remanente fue expelido desde la jeringa doble. La boquilla de aspersión fue colocada sobre la jeringa doble y el aplicador estaba listo ahora para el uso. La composición fue asperjada sobre el defecto de la duramadre y el biomaterial solidifico en menos de 5 segundos. El efecto dural fue revisado cuidadosamente en cuanto a la reaparición de escapes de CSF. El sellante fue capaz de detener de forma intraoperativa la fuga de fluidos. El material estaba aún presente después de una semana y fue reabsorbido completamente después de dos semanas.

Ejemplo 9: Prueba de las propiedades de termogelificación de acrilato tetronic en altas concentraciones

Las propiedades de gelificación de la composición 11 (tal como se describe en el Ejemplo 1k) la composición 12 (tal como se describe en el ejemplo 11) se compararon juntas en conjunción con PEG-SH-3.4 kDa lineal. Se esperaba que la formación de gel ocurriera a través de entrecruzamiento químico en la composición 11 y a través de medios físicos (termogelificación) seguidos por entrecruzamiento químico en la composición 12. La composición 11 gelifico en 1.5 minutos después de un mezclado de 30 segundos jeringa a jeringa y tuvo un tiempo de deposición de 2-3.5 minutos después de aplicar la solución a una placa de pesado a través de una aguja. En el caso de la composición 12, se

formó un gel cuando la composición fue aplicada a un disco de pesaje calentado mediante un baño de agua circundante a 37°C y se evitó el derramamiento de material. Sin embargo, el tiempo de definición fue incrementado 4-55 minutos y por lo tanto la gelificación fue más larga para la composición 11.

Ejemplo 10: Influencia del pH sobre la cinética de reacción

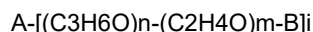
- 5 El tiempo de gelificación de una composición 10 (tal como se prepara en el Ejemplo 1j) versus el pH de la solución regulada se representa en la Figura 3. Esto muestra que el tiempo de gelificación disminuye con el incremento del pH. Se observa un comportamiento similar para la composición 13 (preparada como se describe en el Ejemplo 1m).

En resumen, ciertos aspectos descritos aquí se refieren a lo siguiente:

a) Una composición que comprende al menos una primera y segunda moléculas precursoras donde:

- 10 i) la primera molécula precursora es un polímero basado en poli (etilenglicol) que tiene x grupos nucleofílicos seleccionados del grupo consistente de grupos tiol o amino, donde x es igual a 2 o mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8

ii) la segunda molécula precursora es de la fórmula general:



15 Donde

m y n son enteros de 1 a 200

i es mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8

A es un punto o unidad estructural de ramificación

B es un grupo insaturado conjugado

20 b) La composición del aspecto a) donde x es igual a 4.

c) La composición de cualquiera de los aspectos a) a b) donde la primera molécula precursora es pentaeritritol poli(etilenglicol)éter tetra-sulfhidrido.

d) La composición del aspecto c) donde pentaeritritol poli(etilenglicol)éter tetra-sulfhidrido tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 2 a 20 kD.

25 e). La composición del aspecto d) donde pentaeritritol poli(etilenglicol)éter tetra-sulfhidrido tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 3 a 11 kD.

f) La composición de cualquiera de los aspectos a) a e) donde B de la segunda molécula precursora es un grupo acrilato.

30 g) La composición de cualquiera de los aspectos a) a f) donde el punto o unidad estructural A de ramificación de la segunda molécula precursora se selecciona del grupo consistente de carbono, glicerol, pentaeritritol, dipentaeritritol y etilendiamina.

h. La composición de cualquiera de los aspectos a) a g) donde la segunda molécula precursora tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 10 a 25 kD.

i) La composición de cualquiera de los aspectos a) a h), que comprende adicionalmente una base.

35 j) La composición del aspecto i) donde la base es carbonato de sodio.

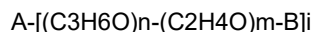
k) La composición de cualquiera de los aspectos a) a j) donde la composición comprende adicionalmente un colorante.

l) La composición del aspecto k) donde el colorante es seleccionado del grupo consistente de azul de metileno, verde de lisamina y verde rápido.

40 m) Un método para hacer un biomaterial que comprende las etapas de:

i) proveer una primera molécula precursora que es un polímero basado en poli (etilenglicol) que tiene x grupos nucleofílicos seleccionados del grupo consistente de grupos tiol o amino, donde x es igual a 2 o mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5 o 6

ii) provee una segunda molécula precursora la cual es de la fórmula general:



donde

m y n son enteros de 1 a 200

i es mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5 o 6

5 A es un punto o unidad estructural de ramificación

B es un grupo insaturado conjugado

iii) hacer reaccionar las moléculas precursoras de las etapas i) y ii) en presencia de una solución básica para formar una red tridimensional entrecruzada.

10 n) El método del aspecto m) donde la primera molécula precursora y la segunda molécula precursora están disueltas antes de la etapa iii) en solución regulada acuosa que tiene un pH ácido.

o) El método de una cualquiera de los aspectos m) y n) donde el biomaterial se forma en menos de 2 minutos.

p) El método de cualquiera de los aspectos n) y o) donde el biomaterial se forma en menos de 10 segundos.

q. El método del aspecto m) donde la composición de la etapa iii) tiene un pH en el rango de entre 9 a 13.

r) Un biomaterial sintético formado a partir de la composición de cualquiera de los aspectos a) a 1.

15 s) Una composición de uno cualquiera de los aspectos a) a 1) para uso como un sellante de tejidos.

t) Una composición de uno cualquiera de los aspectos a) a 1) para recubrir la superficie de un tejido.

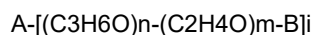
u) Una composición de uno cualquiera de los aspectos a) a 1) para reducir, inhibir o contener la pérdida de un fluido o gas biológico.

20 v) Uso de la composición de cualquiera de los aspectos a) a 1 para la manufactura de un medicamento para efectuar la unión no quirúrgica de una primera superficie y una segunda superficie.

w) Un kit para formar un biomaterial que comprende:

i) un primer contenedor que comprende una molécula precursora que es un polímero basado en poli (etilenglicol) que tiene x grupos nucleofílicos seleccionados del grupo consistente de grupos tiol o amino, donde x es igual a 2 o mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

25 ii) un segundo contenedor que comprende una segunda molécula precursora de la fórmula general:



donde

m y n son enteros de 1 a 200

i es mayor de 2, preferiblemente 3, 4, 5, 6, 7 u 8

30 A es un punto o unidad estructural de ramificación

B es un grupo insaturado conjugado.

x) El kit del aspecto w que comprende adicionalmente un tercer contenedor que comprende una solución básica.

y) El kit de cualquiera de los aspectos w) a x) que comprende adicionalmente una jeringa de compartimiento doble.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos una primera y una segunda molécula precursora multifuncional, en donde
- 5 (i) la primera molécula precursora es un polímero a base de poli(etilenglicol) que tiene al menos dos grupos nucleófilos seleccionados de tioles y aminas,
- (ii) la segunda molécula precursora contiene al menos dos grupos electrófilos, en donde los grupos nucleófilos y electrófilos de las primera y segunda moléculas precursoras son capaces de formar enlaces covalentes entre sí bajo condiciones fisiológicas,
- 10 comprendiendo además la composición un colorante seleccionado del grupo que consiste en verde de lisamina y verde rápido.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la segunda molécula precursora tiene al menos dos grupos electrófilos seleccionados de grupos insaturados conjugados, preferiblemente acrilatos.
3. Un kit para formar un biomaterial que comprende
- 15 a. un primer contenedor que comprende una primera molécula precursora como un polvo seco que es un polímero a base de poli(etilenglicol) que tiene al menos dos grupos nucleófilos seleccionados de tioles y aminas y
- b) un segundo contenedor que comprende una segunda molécula precursora disuelta en una solución acuosa regulada que tiene un pH ácido, que contiene al menos dos grupos electrófilos, en donde los grupos nucleófilos y electrófilos de la primera y segunda moléculas precursoras son capaces de formar enlaces covalentes entre sí bajo condiciones fisiológicas,
- 20 comprendiendo el kit además un colorante en el primer contenedor o el segundo contenedor, seleccionado del grupo que consiste en verde de lisamina y verde rápido.
4. El kit de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los grupos electrofílicos de la segunda molécula precursora se seleccionan de grupos insaturados conjugados, preferiblemente acrilatos.
5. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, que comprende además un tercer contenedor que comprende una solución básica.
- 25 6. Un biomaterial entrecruzado in situ a partir de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
7. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 como un biomaterial entrecruzable in situ.
8. Uso de una composición de la reivindicación 7 para efectuar una unión no quirúrgica de al menos una primera superficie y una segunda superficie o para prevenir o reducir la pérdida de fluidos biológicos.
- 30 9. Un método para hacer un biomaterial que comprende las etapas de:
- a. proveer una primera molécula precursora que es un polímero a base de poli(etilenglicol) que tiene al menos dos grupos nucleófilos seleccionados de tioles y aminas;
- b. proveer una segunda molécula precursora que contiene al menos dos grupos electrófilos, en donde los grupos nucleófilos y electrófilos de la primera y segunda moléculas precursoras son capaces de formar enlaces covalentes entre sí bajo condiciones fisiológicas;
- 35 c. disolver las moléculas precursoras de las etapas a) y b) en una solución reguladora;
- d. mezclar las soluciones de la molécula precursora obtenidas en la etapa c);
- e. agregar una solución básica durante la etapa d) o posteriormente;
- f. agregar un colorante antes de la etapa e), colorante que se selecciona del grupo que consiste en verde de lisamina y verde rápido.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en donde la primera molécula precursora y la segunda molécula precursora se disuelven antes de la etapa c) en una solución acuosa regulada que tiene un pH ácido.

FIGURA 1:

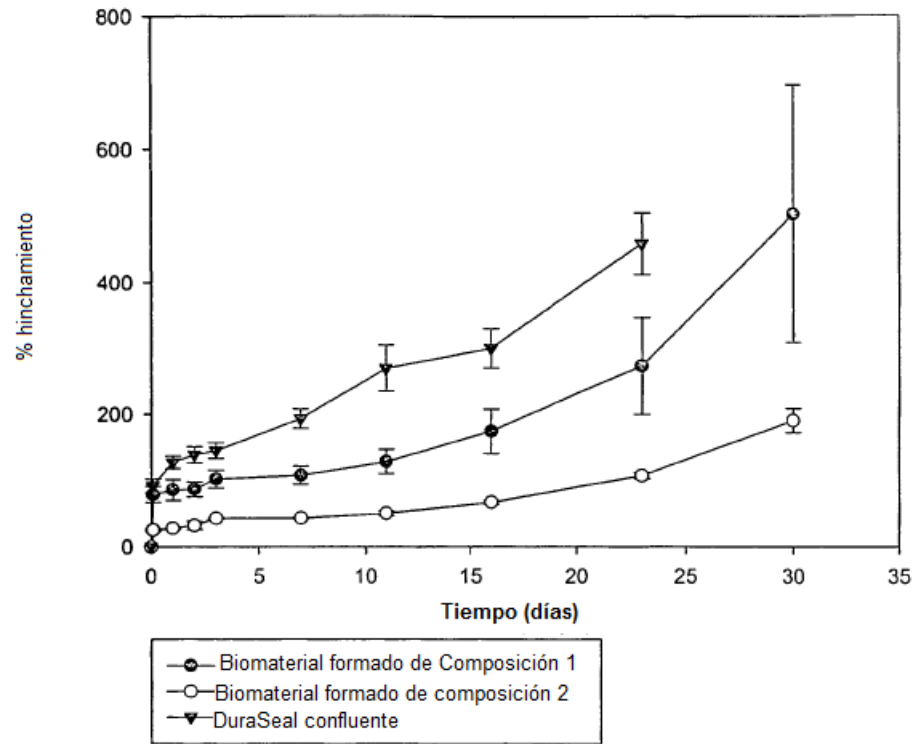


FIGURA 2:

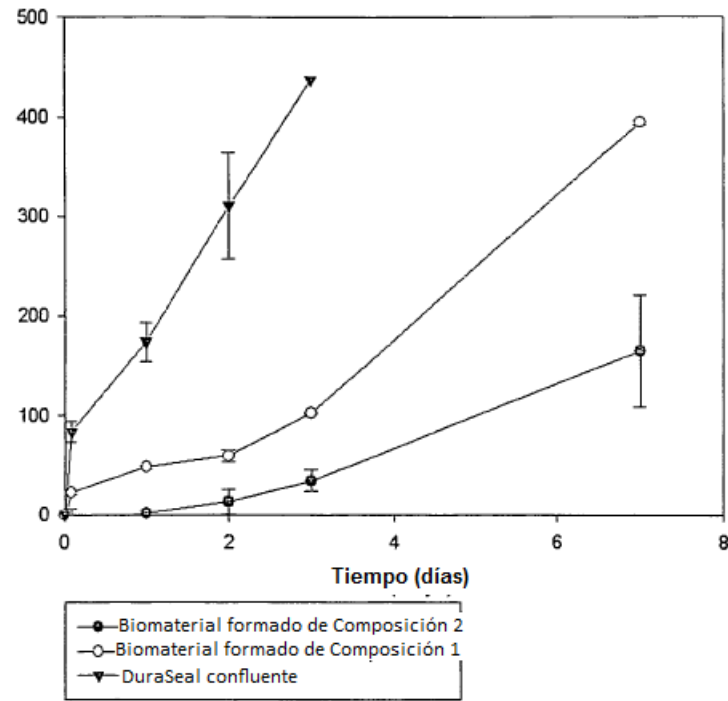


FIGURA 3:

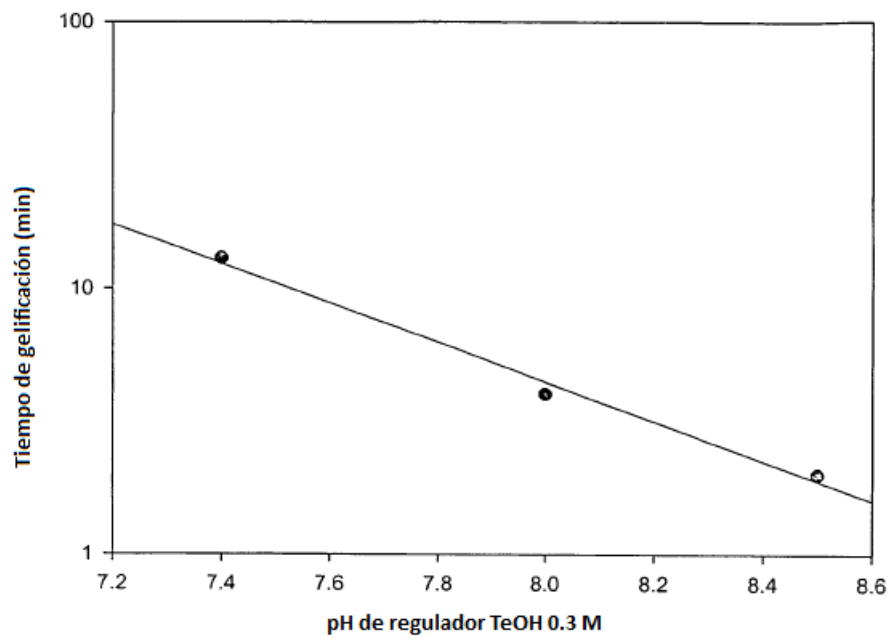


FIGURA 4:

