

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 191**

51 Int. Cl.:

A61L 15/22 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)
A61L 15/64 (2006.01)
A61L 24/00 (2006.01)
A61L 24/04 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2020** **E 23169050 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 4218839**

54 Título: **Lámina hemostática**

30 Prioridad:

12.07.2019 EP 19186028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2025

73 Titular/es:

CILAG GMBH (100.00%)
Gubelstrasse 34
6300 Zug, CH

72 Inventor/es:

KEEREWEER, ABRAHAM REINIER;
LANAO, ROSA PILAR FÉLIX;
OPSTEEN, JOOST y
BENDER, JOHANNES CASPAR MATHIAS
ELIZABETH

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 994 191 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

Lámina hemostática

5 **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a una lámina hemostática flexible y biocompatible que comprende una estructura portadora fibrosa cohesiva que comprende un espacio intersticial interconectado tridimensional; y, distribuido dentro del espacio intersticial, un polvo hemostático que comprende al menos un 10 % en peso de aglomerados de partículas que comprenden:

- partículas electrófilas de polioxazolina que contienen polioxazolina electrófila que lleva al menos 3 grupos electrófilos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina de la sangre mediante la formación de un enlace covalente; y
- partículas poliméricas nucleófilas que contienen un polímero nucleófilo que lleva al menos 3 grupos nucleófilos reactivos que, en presencia de agua, son capaces de reaccionar con los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila mediante la formación de un enlace covalente entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo.

[0002] Cuando el polvo hemostático se aplica al sitio de una hemorragia, las partículas se aglomeran rápidamente formando un gel, mientras que, al mismo tiempo, se unen a proteínas presentes en la sangre y en el tejido circundante, acelerando de este modo la hemostasia.

25 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] La hemostasia es un proceso muy regulado que mantiene el flujo sanguíneo a través de la vasculatura simultáneamente mientras se produce una respuesta trombótica al daño tisular. Mantener la hemostasia requiere una interacción compleja de la pared del vaso, las plaquetas y los sistemas de coagulación y fibrinolítico. Hay dos fases principales de la hemostasia: primaria (es decir, la fase celular) y secundaria (es decir, la fase humoral).

[0004] La hemostasia primaria comienza inmediatamente después de la disrupción endotelial y se caracteriza por vasoconstricción, adhesión plaquetaria y formación de un tapón de agregado blando. Después de que se produzca la lesión, hay una contracción local temporal del músculo liso vascular y el flujo sanguíneo se ralentiza, lo que favorece la adhesión y activación plaquetarias. En el plazo de 20 segundos desde la lesión, el factor de von Willebrand circulante se une al subendotelio en el sitio de la lesión y se adhiere a las glucoproteínas de la superficie de las plaquetas. A medida que las plaquetas se adhieren a la superficie lesionada, estas se activan por contacto con receptores de exposición al colágeno que se unen al fibrinógeno circulante. Se forma un tapón blando de plaquetas agregadas y fibrinógeno. Esta fase de hemostasia es de corta duración, y el tapón blando puede cortarse fácilmente de la superficie dañada.

[0005] El tapón de plaquetas blando se estabiliza durante la hemostasia secundaria para formar un coágulo. La vasoconstricción y la reducción resultante en el flujo sanguíneo se mantienen mediante la secreción plaquetaria de serotonina, prostaglandina y tromboxano mientras se inicia la cascada de coagulación. La cascada de coagulación es una serie de reacciones dependientes en las que están implicadas varias proteínas plasmáticas, iones de calcio y plaquetas sanguíneas que conducen a la conversión del fibrinógeno en fibrina. Los factores de coagulación son producidos por el hígado y circulan en forma inactiva hasta que se inicia la cascada de coagulación. A continuación, cada etapa de la cascada se inicia y se completa a través de una serie de reacciones de activación de factores de coagulación secuenciales y dependientes. En las etapas finales, la trombina convierte el fibrinógeno, una proteína plasmática soluble, en fibrina, una proteína insoluble, mientras que, simultáneamente, convierte el factor XIII en factor XIIIa. Esta conversión de factores estabiliza la fibrina y da como resultado la reticulación de los monómeros de fibrina, con lo que se produce un coágulo estable.

[0006] Durante la cirugía, es importante mantener un delicado equilibrio entre hemorragia y coagulación, de manera que la sangre continúe fluyendo a los tejidos en el sitio quirúrgico sin que haya una pérdida excesiva de sangre, para optimizar el éxito quirúrgico y el resultado del paciente. La hemorragia continua de capilares menores difusos o vénulas pequeñas durante la cirugía puede oscurecer el campo quirúrgico, prolongar el tiempo de la operación, aumentar el riesgo de complicaciones fisiológicas y exponer al paciente a riesgos asociados con la transfusión de sangre.

[0007] Los cirujanos tienen una serie de opciones para controlar la hemorragia, incluyendo técnicas y dispositivos mecánicos y térmicos, así como farmacoterapias y agentes tópicos.

[0008] Uno de los agentes hemostáticos tópicos más tempranos fue el algodón, en forma de esponjas de gasa. Aunque tales materiales concentran la sangre y los productos de coagulación mediante adsorción física, no son absorbidos por el cuerpo y, al retirarlos, el coágulo puede desalojarse, provocando una hemorragia adicional.

Desde entonces se han desarrollado agentes hemostáticos tópicos absorbibles que proporcionan una terapia auxiliar útil cuando los métodos convencionales de hemostasia son ineficaces o poco prácticos. Los agentes hemostáticos tópicos pueden aplicarse directamente al sitio de la hemorragia y pueden evitar una hemorragia continua y constante. La hemostasia usando agentes tópicos también puede evitar los efectos adversos de los medicamentos hemostáticos sistémicos, tales como coágulos de sangre "no deseados". Además, en procedimientos quirúrgicos en los que la cantidad de pérdida de sangre es impredecible, los hemostáticos tópicos pueden usarse con moderación cuando la pérdida de sangre es mínima y más libremente en caso de hemorragia grave.

[0009] En la actualidad se dispone de varios agentes hemostáticos tópicos para su uso en cirugía. Pueden dividirse en dos categorías: los que proporcionan su mecanismo de acción sobre la cascada de coagulación de una manera biológicamente activa y los que actúan de manera pasiva a través de la activación por contacto y la estimulación de la agregación plaquetaria. Los agentes hemostáticos tópicos pasivos incluyen colágenos, celulosa y gelatinas, mientras que los agentes activos incluyen trombina y productos en los que la trombina se combina con un agente pasivo para proporcionar un producto global activo.

[0010] En el documento US 2003/0064109 se describe un polvo hemostático seco que se prepara mediante un método que comprende: proporcionar una solución acuosa que comprende gelatina combinada con al menos un adyuvante de rehidratación; secar la solución para producir sólidos; moler los sólidos para producir un polvo; reticular el polvo; retirar al menos el 50 % (p/p) del adyuvante de rehidratación; y secar la gelatina reticulada para producir un polvo. El coadyuvante de rehidratación puede comprender al menos un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y dextrano.

[0011] En el documento WO 2010/059280 se describe una lámina fibrosa anhidra que comprende un primer componente de polímero fibroso, donde dicho polímero contiene grupos electrófilos o grupos nucleófilos, y un segundo componente capaz de reticular el primer componente cuando dicha lámina se expone a un medio acuoso en contacto con tejido biológico para formar un hidrogel reticulado que es adhesivo al tejido biológico; donde:

- a) donde el segundo componente es un polímero fibroso que tiene una estructura de cadena principal igual o diferente del polímero fibroso del primer componente y que contiene grupos electrófilos si el primer componente contiene grupos nucleófilos o que contiene grupos nucleófilos si el primer componente contiene grupos electrófilos;
- b) el segundo componente es un revestimiento sobre el polímero fibroso del primer componente y donde dicho revestimiento contiene grupos electrófilos si el primer componente contiene grupos nucleófilos o grupos nucleófilos si el primer componente contiene grupos electrófilos; o
- c) el segundo componente es un polvo seco disperso y atrapado dentro de los intersticios del polímero fibroso del primer componente, donde dicho polvo contiene grupos electrófilos si el primer componente contiene grupos nucleófilos o grupos nucleófilos si el primer componente contiene grupos electrófilos.

[0012] En el documento US 2012/0021058 se describe un proceso para fabricar una composición hemostática, donde dicho proceso comprende: a) proporcionar una preparación granular seca de un polímero biocompatible; y b) recubrir los gránulos de dicha preparación granular seca con una preparación de un agente inductor de la coagulación, tal como una solución de trombina. El polímero biocompatible puede seleccionarse de entre gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, fibrinógeno, fibrina, caseína, fibronectina, elastina, queratina, laminina y derivados o combinaciones de estos.

[0013] En el documento US 2013/0316974 se describe un material hemostático que comprende un polvo de ORC compactado que comprende partículas que tienen una relación de aspecto promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 18. El material hemostático puede comprender además un aditivo seleccionado de entre polisacáridos, sal de calcio, agente antiinfeccioso, agente promotor de la hemostasia, gelatina, colágeno,

[0014] En el documento US 2016/0271228 se describe un compuesto hemostático que comprende:

- un polímero hemostático biocompatible en forma particulada seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un polisacárido, un polímero biológico, un polímero no biológico, y derivados y combinaciones de estos, donde el polímero hemostático biocompatible en forma particulada está presente como partículas granulares que tienen un rango de diámetro mediano de 50-700 µm;
- un reticulador hidrófilo que comprende grupos reactivos electrófilos, donde los grupos reactivos electrófilos conservan su reactividad hasta que la composición se expone a la sangre del paciente, donde los grupos reactivos electrófilos están configurados para reticularse con proteínas sanguíneas del paciente para formar un gel con propiedades sellantes y hemostáticas; y
- un aglutinante que no reacciona con los grupos reactivos electrófilos del un reticulador hidrófilo;

donde la composición hemostática está en forma de pasta.

[0015] En el documento WO 2012/057628 se describe un kit para producir un polímero reticulado biocompatible, donde dicho kit comprende una polioxazolina activada electrófilamente (EL-POx), donde dicha EL-POx comprende m grupos electrófilos; y dicho agente de reticulación nucleófilo comprende n grupos nucleófilos, donde los m grupos electrófilos son capaces de reaccionar con los n grupos nucleófilos para formar enlaces covalentes; donde $m > 2$, $n > 2$ y $m + n > 5$; donde al menos uno de los m grupos electrófilos es un grupo electrófilo lateral.

[0016] En el documento WO 2016/056901 se describe un producto hemostático adhesivo seleccionado de entre una malla recubierta, una espuma recubierta o un polvo recubierto, donde dicho producto hemostático comprende:

- un sustrato sólido poroso que tiene una porosidad de al menos el 5 % en volumen y que comprende una superficie externa que comprende un polímero nucleófilo que contiene grupos nucleófilos reactivos;
- un revestimiento adhesivo que cubre al menos una parte del sustrato sólido, donde dicho revestimiento comprende una polioxazolina activada electrófilamente (EL-POX), donde dicha EL-POX contiene de media al menos 1 grupo electrófilo reactivo.

[0017] **RESUMEN DE LA INVENCION** El alcance de esta invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los productos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento.

[0018] Los inventores han desarrollado una lámina hemostática que puede usarse convenientemente para controlar la hemorragia durante la cirugía, incluso para sangre anticoagulada.

[0019] La lámina hemostática flexible y biocompatible de la invención comprende - una estructura portadora fibrosa cohesiva que comprende un espacio intersticial interconectado tridimensional; y - distribuido dentro del espacio intersticial, un polvo hemostático que comprende al menos un 10 % en peso de aglomerados de partículas, donde dichos aglomerados de partículas tienen un diámetro en el intervalo de 1-500 μm y que comprenden: (a) partículas de polioxazolina electrófila que contienen polioxazolina electrófila que lleva al menos 3 grupos electrófilos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina de la sangre mediante la formación de un enlace covalente; y (b) partículas de polímero nucleófilo que contienen un polímero nucleófilo soluble en agua que lleva al menos 3 grupos nucleófilos reactivos que, en presencia de agua, son capaces de reaccionar con los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila mediante la formación de un enlace covalente entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo.

[0020] Cuando se aplica al sitio de una hemorragia, el polvo hemostático se convierte en un gel, mientras que, al mismo tiempo, se une a proteínas presentes en la sangre y en el tejido circundante. La excelente capacidad del polvo hemostático para detener la hemorragia se debe a la inducción de la coagulación de la sangre muy activa y a la formación de un coágulo de sangre gelificado fuerte que se adhiere al tejido. El polvo hemostático puede distribuirse fácilmente sobre el sitio de una hemorragia. Si es necesario, se puede añadir polvo adicional, ya que esto formará una nueva capa de coágulo de sangre gelificado que se pegará a la capa subyacente de coágulos de sangre gelificados.

[0021] Aunque los inventores no desean verse limitados por la teoría, se cree que, cuando el polvo hemostático entra en contacto con la sangre, las partículas de polioxazolina electrófila que contienen polioxazolina electrófila se disuelven rápidamente y reaccionan simultáneamente con las proteínas de la sangre y grupos nucleófilos reactivos del polímero nucleófilo soluble en agua en las partículas de polímero nucleófilo. Como resultado, se forma una capa de coágulo de sangre gelificado. La polioxazolina electrófila disuelta también reaccionará con proteínas del tejido circundante en el sitio de la hemorragia, fijando de ese modo la capa de coágulo de sangre gelificado al tejido y sellando el área de hemorragia.

[0022] En comparación con las partículas que comprenden una mezcla molecular de la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo soluble en agua, los aglomerados de partículas ofrecen la ventaja de que proporcionan mejores propiedades de sellado. Se cree que esto se debe al hecho de que, cuando los aglomerados de partículas entran en contacto con la sangre, la polioxazolina electrófila reacciona con el polímero nucleófilo soluble en agua a una velocidad relativamente lenta, permitiendo de ese modo que la polioxazolina electrófila no solo reaccione con el polímero nucleófilo soluble en agua, sino también con las proteínas de la sangre y el tejido en el sitio de la hemorragia. Los aglomerados de partículas ofrecen la ventaja de que se forma un gel fuerte más homogéneo en comparación con una mezcla de polvo compuesta por partículas de polioxazolina electrófila y partículas de polímero nucleófilo soluble en agua. Se cree que se forma una dispersión muy homogénea de polioxazolina electrófila y polímero nucleófilo soluble en agua cuando los aglomerados de partículas entran en contacto en la sangre, y que se forma un gel fuerte homogéneo cuando los componentes poliméricos se disuelven en esta y comienzan a reaccionar.

[0023] También se describe (no forma parte de la invención reivindicada) un método para preparar aglomerados de partículas hemostáticas de:

(a) partículas electrófilas de polioxazolina que contienen una polioxazolina electrófila que lleva al menos 3 grupos electrófilos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina en la sangre mediante la formación de un enlace covalente; y

(b) partículas poliméricas nucleófilas que contienen un polímero nucleófilo soluble en agua que lleva al menos 3 grupos nucleófilos reactivos que son capaces de reaccionar con los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila mediante la formación de un enlace covalente entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo;

donde dicho método comprende la etapa de combinar 100 partes en peso de las partículas de polioxazolina electrófilas con 10 a 1000 partes en peso de las partículas de polímero nucleófilas en presencia de líquido de granulación no acuoso.

[0024] Los inventores han descubierto de manera inesperada que es posible combinar la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo soluble en agua en una única partícula con reacciones de reticulación mínimas entre ellos, y con una degradación mínima de la polioxazolina electrófila, usando un líquido de granulación no acuoso en el que la polioxazolina electrófila es insoluble y en el que el polímero nucleófilo es algo soluble. Aunque los inventores no desean estar limitados por la teoría, se cree que el uso de un líquido de granulación no acuoso en el que la polioxazolina electrófila es insoluble asegura que no se produzcan reacciones de reticulación entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo durante la granulación. También se minimiza de esta manera la degradación (hidrólisis) de la polioxazolina electrófila. Al contrario que la polioxazolina electrófila, parte del polímero nucleófilo se disolverá en el líquido de granulación no acuoso, formando de ese modo una masa pegajosa que es capaz de pegar entre sí las partículas de polioxazolina electrófila y las partículas de polímero nucleófilo.

[0025] Se proporciona una lámina hemostática flexible y biocompatible que comprende:

- una estructura portadora fibrosa cohesiva que comprende un espacio intersticial interconectado tridimensional; y
- distribuido en el espacio intersticial, el polvo hemostático mencionado anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0026] Por consiguiente, la invención se refiere a una lámina hemostática flexible y biocompatible que comprende: - una estructura portadora fibrosa cohesiva que comprende un espacio intersticial interconectado tridimensional; y - distribuido dentro del espacio intersticial, un polvo hemostático que comprende al menos un 10 % en peso de aglomerados de partículas, donde dichos aglomerados de partículas tienen un diámetro en el intervalo de 1-500 μm y que comprende: (a) partículas de polioxazolina electrófila que contienen polioxazolina electrófila que lleva al menos 3 grupos electrófilos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina de la sangre mediante la formación de un enlace covalente; y (b) partículas de polímero nucleófilo que contienen un polímero nucleófilo soluble en agua que lleva al menos 3 grupos nucleófilos reactivos que, en presencia de agua, son capaces de reaccionar con los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila mediante la formación de un enlace covalente entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo.

[0027] El término "aglomerado de partículas", como se usa en el presente documento, se refiere a un gránulo que comprende dos o más partículas que están unidas entre sí.

[0028] El término "polioxazolina", como se usa en el presente documento, se refiere a una poli(N-acilalquilquinimina) o una poli(aroilalquilquinimina) y también se denomina POx. Un ejemplo de POx es la poli(2-etil-2-oxazolina). El término "polioxazolina" también abarca copolímeros de POx.

[0029] El término "polímero nucleófilo soluble en agua", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero nucleófilo que tiene una solubilidad en agua en agua desmineralizada a 20 °C, a un pH en el intervalo de 3 a 7, de al menos 50 g/l. El quitosano es un ejemplo de un polímero nucleófilo soluble en agua. El quitosano es soluble en agua a pH < 6. Para determinar la solubilidad en agua de un polímero nucleófilo a diferentes pH, se ajusta el pH del agua desmineralizada usando ácido clorhídrico.

[0030] El término "colágeno", como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína estructural principal en el espacio extracelular de diversos tejidos conectivos en los cuerpos de los animales. El colágeno forma una triple hélice característica de tres cadenas polipeptídicas. Dependiendo del grado de mineralización, los tejidos de colágeno pueden ser rígidos (hueso) o distensibles (tendón) o tener un gradiente de rígido a distensible (cartílago). A menos que se indique lo contrario, el término "colágeno" también abarca colágenos modificados distintos de la gelatina (por ejemplo, colágeno reticulado).

[0031] El término "gelatina", como se usa en el presente documento, se refiere a una mezcla de péptidos y proteínas producidos por la hidrólisis parcial de colágeno extraído de la piel, huesos y tejidos conectivos de animales tales como ganado domesticado, pollos, cerdos y peces. Durante la hidrólisis, los enlaces moleculares

naturales entre las cadenas de colágeno individuales se descomponen en una forma que se reorganiza más fácilmente. El término "gelatina", como se usa en el presente documento, también abarca gelatinas modificadas, tales como gelatinas reticuladas y gelatinas reticuladas reducidas.

5 [0032] El término "gelatinas reticuladas reducidas", como se usa en el presente documento, se refiere a una gelatina reticulada que se ha hidrolizado parcialmente. La hidrólisis parcial de los enlaces peptídicos de la gelatina reticulada puede lograrse mediante, por ejemplo, tratamiento alcalino. La hidrólisis de la gelatina reticulada da como resultado una densidad aumentada de grupos carboxilo libres y amina libres y una solubilidad en agua aumentada.

10 [0033] El término "lámina hemostática", como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a una lámina que tiene la capacidad de detener la hemorragia del tejido dañado. La lámina hemostática de la presente invención puede conseguir la hemostasia al convertir la sangre en un gel y/o formar un sello que cierra el sitio de la herida.

15 [0034] El término "resistente al agua", como se usa en el presente documento, en relación con la estructura portadora fibrosa significa que esta estructura no es soluble en agua y no se desintegra en agua para formar una dispersión coloidal, en condiciones de pH neutro (pH 7) y una temperatura de 37 °C.

20 [0035] El término "espacio intersticial", como se usa en la presente memoria, se refiere al espacio vacío ("hueco") dentro de la estructura portadora fibrosa. El espacio intersticial dentro de la estructura portadora fibrosa permite la introducción de polvo hemostático en la estructura. También la sangre y otros fluidos corporales pueden entrar en el espacio intersticial, permitiendo de este modo que el polvo hemostático ejerza su efecto hemostático y/o proporcione adhesividad tisular a la lámina hemostática.

25 [0036] El término "proteína", como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, también abarca proteínas reticuladas e hidrolizadas. Asimismo, a menos que se indique lo contrario, siempre que se haga referencia a una especie particular de proteínas, como gelatina o colágeno, también se incluyen versiones hidrolizadas y reticuladas de esa especie de proteínas.

30 [0037] La distribución del diámetro del polvo hemostático, de los aglomerados de partículas, de las partículas de polioxazolina electrófilas y de las partículas de polímero nucleófilas puede determinarse de manera adecuada por medio de difracción láser usando un Malvern Mastersizer 2000 en combinación con la Unidad de Dispersión de Muestras de Acero Inoxidable. La unidad de dispersión de muestras se llena con aproximadamente 120 ml de ciclohexano, que se estabiliza durante 5 a 10 minutos a una velocidad de agitación de 1800 r.p.m., seguido de una medición de fondo (medición de blanco). El tubo de muestra se agita y se gira horizontalmente 20 veces. A continuación, se dispersan aproximadamente 50 mg en la unidad de dispersión de muestras que contiene el ciclohexano. Después de introducir la muestra en la unidad de dispersión, la muestra se agita durante un minuto y medio a 1800 r.p.m. para asegurar que todas las partículas se dispersan adecuadamente, antes de llevar a cabo la medición. No se realiza ningún tratamiento ultrasónico sobre las partículas dispersadas. El tamaño medio de partícula se expresa como $D[4,3]$, el diámetro medio ponderado en volumen $(\sum n_i D_i^4) / (\sum n_i D_i^3)$.

35 [0038] Además de los aglomerados de partículas que comprenden las partículas de polioxazolina electrófilas y las partículas de polímero nucleófilas, el polvo hemostático de la presente invención puede contener otros componentes en partículas, por ejemplo, (bio)polímeros biocompatibles como esponja de gelatina o almidón. Preferiblemente, el polvo hemostático contiene al menos un 30 % en peso, más preferiblemente al menos un 60 % en peso y, de la manera más preferible, al menos un 80 % en peso de los aglomerados de partículas.

40 [0039] Los aglomerados de partículas en el polvo hemostático contienen preferiblemente al menos un 10 % en peso, más preferiblemente al menos un 25 % en peso y, de la manera más preferible, al menos un 40 % en peso de la polioxazolina electrófila.

45 [0040] El polímero nucleófilo está contenido preferiblemente en los aglomerados de partículas en una concentración de al menos un 10 % en peso, más preferiblemente de al menos un 12 % en peso y, de la manera más preferible, de al menos un 30 % en peso.

50 [0041] La combinación de la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo constituye típicamente al menos un 10 % en peso de los aglomerados de partículas. Más preferiblemente, la combinación de estos dos polímeros constituye al menos un 50 % en peso, de la manera más preferible, al menos un 75 % en peso de los aglomerados de partículas.

55 [0042] Además de la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo, los aglomerados de partículas pueden contener uno o más componentes distintos, por ejemplo, polisacáridos. Los ejemplos de polisacáridos que pueden emplearse incluyen amilosa, maltodextrina, amilopectina, almidón, dextrano, ácido hialurónico, heparina, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato, dextrán sulfato, pentosano polisulfato, alginato y combinaciones de estos. Típicamente, la cantidad de polisacárido en los aglomerados de partículas no

supera el 50 % en peso. Si el polisacárido está contenido en los aglomerados de partículas, la combinación de la polioxazolina electrófila, el polímero nucleófilo y el polisacárido constituye preferiblemente al menos un 60 % en peso, más preferiblemente al menos un 80 % en peso y, de la manera más preferible, al menos un 90 % en peso de los aglomerados de partículas.

5

[0043] Según otra forma de realización ventajosa, los aglomerados de partículas contienen un sistema regulador del pH seco. Preferiblemente, el sistema regulador del pH tiene un pH de regulación en el intervalo de 7 a 11, más preferiblemente en el intervalo de 8 a 10. Preferiblemente, el sistema regulador del pH tiene una capacidad de regulación del pH de al menos 10 mmol.l⁻¹.pH⁻¹. Más preferiblemente, la capacidad de regulación del pH es de al menos 25 mmol.l⁻¹.pH⁻¹, de la manera más preferible, la capacidad de regulación del pH es al menos 50 mmol.l⁻¹.pH⁻¹. Los ejemplos de sistemas de regulación del pH biocompatibles que pueden emplearse en los aglomerados de partículas incluyen regulador del pH de fosfato sódico/carbonato sódico; regulador del pH de decahidrato de borato sódico; proteína con pH regulado con tris; solución salina con pH regulado con HEPES y regulador del pH de bicarbonato sódico/carbonato.

10

15

[0044] Como se explicará a continuación, los aglomerados de partículas de la presente invención se pueden preparar sin el uso de un aglutinante de granulación, es decir, un componente que se emplea durante la granulación para proporcionar adhesión entre las partículas de polioxazolina electrófilas y las partículas de polímero nucleófilas. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, los aglomerados de partículas no contienen un aglutinante de granulación.

20

[0045] El polvo hemostático de la presente invención contiene preferiblemente al menos un 10 % en peso de los aglomerados de partículas que tienen un diámetro en el intervalo de 1-200 µm, más preferiblemente al menos un 10 % en peso de los aglomerados de partículas que tienen un diámetro en el intervalo de 1-100 µm, y, de la manera más preferible, al menos un 10 % en peso de los aglomerados de partículas que tienen un diámetro en el intervalo de 1-75 µm

25

[0046] El polvo hemostático tiene preferiblemente un diámetro medio ponderado en volumen (D [4,3], $(\sum niD^4)/(\sum niD^3)$) en el intervalo de 10-1000 µm, más preferiblemente en el intervalo de 15-500 µm, de la manera más preferible, en el intervalo de 30-300 µm.

30

[0047] Los aglomerados de partículas en el polvo hemostático tienen preferiblemente un D [4,3] en el intervalo de 10-200 µm, más preferiblemente en el intervalo de 15-100 µm, de la manera más preferible, en el intervalo de 30-60 µm.

35

[0048] Las partículas de polioxazolina electrófilas en los aglomerados de partículas tienen preferiblemente un diámetro medio ponderado en volumen (D [4,3]) en el intervalo de 1-100 µm, más preferiblemente en el intervalo de 50-50 µm, de la manera más preferible, en el intervalo de 10-40 µm.

40

[0049] Las partículas poliméricas nucleófilas en los aglomerados de partículas tienen preferiblemente un diámetro medio ponderado en volumen (D [4,3]) en el intervalo de 10-300 µm, más preferiblemente en el intervalo de 15-200 µm, de la manera más preferible, en el intervalo de 20-100 µm.

45

[0050] Las partículas de polioxazolina electrófila contienen preferiblemente al menos un 30 % en peso, más preferiblemente al menos un 50 % en peso y, de la manera más preferible, al menos un 80 % en peso de la polioxazolina electrófila.

50

[0051] La polioxazolina electrófila tiene preferiblemente una solubilidad en agua destilada a 20 °C de al menos 100 g/l, más preferiblemente de al menos 300 g/l.

55

[0052] La polioxazolina electrófila tiene preferiblemente una solubilidad en alcohol isopropílico a 20 °C de menos de 10 mg/l, más preferiblemente de menos de 5 mg/l y, de la manera más preferible, de menos de 1 mg/l.

60

[0053] La polioxazolina electrófila tiene preferiblemente un peso molecular de al menos 2 kDa. Más preferiblemente, la polioxazolina electrófila tiene un peso molecular de 5 a 200 kDa, de la manera más preferible, de 10 a 100 kDa.

65

[0054] Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, los inventores han encontrado una manera de combinar la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo soluble en agua en una única partícula con reacciones de reticulación mínimas entre estos, y con una degradación mínima de la polioxazolina electrófila. Por consiguiente, en una forma de realización muy preferida de la invención, la polioxazolina electrófila de los aglomerados de partículas tiene un índice de polidispersidad (PDI) de menos de 2,0, más preferiblemente de menos de 1,8 y, de la manera más preferible, de menos de 1,5.

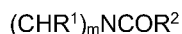
60

[0055] La polioxazolina electrófila contiene preferiblemente al menos 4 grupos electrófilos reactivos, más preferiblemente al menos 8 grupos electrófilos reactivos, incluso más preferiblemente al menos 16 grupos electrófilos reactivos y, de la manera más preferible, al menos 32 grupos electrófilos reactivos.

5 [0056] La polioxazolina electrófila lleva típicamente de media al menos 10, más preferiblemente al menos 20 grupos electrófilos reactivos.

[0057] La polioxazolina electrófila se deriva preferiblemente de una polioxazolina cuyas unidades repetitivas están representadas por la siguiente fórmula (I):

10



donde R² y cada uno de R¹ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₂₂ opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido; y m es 2 o 3.

15

[0058] Preferiblemente, R¹ y R² en la fórmula (I) se seleccionan entre H y alquilo C₁₋₈, incluso más preferiblemente de H y alquilo C₁₋₄. R¹, de la manera más preferible, es H. El número entero m en la fórmula (I) preferiblemente es igual a 2.

20

[0059] Según una forma de realización preferida, la polioxazolina es un polímero, incluso más preferiblemente un homopolímero de 2-alquil-2-oxazolina, donde dicha 2-alquil-2-oxazolina se selecciona de entre 2-metil-2-oxazolina, 2-etil-2-oxazolina, 2-propil-2-oxazolina, 2-butil-2-oxazolina y combinaciones de estas. Preferiblemente, la polioxazolina es un homopolímero de 2-propil-2-oxazolina o 2-etil-oxazolina. De la manera más preferible, la polioxazolina es un homopolímero de 2-etiloxazolina.

25

[0060] Según una forma de realización particularmente preferida, la polioxazolina electrófila comprende al menos 20 unidades oxazolina, más preferiblemente al menos 30 unidades oxazolina y, de la manera más preferible, al menos 80 unidades oxazolina. La polioxazolina electrófila comprende preferiblemente de media al menos 0,05 grupos electrófilos reactivos por residuo de oxazolina. Incluso más preferiblemente, la polioxazolina electrófila comprende de media al menos 0,1 grupos electrófilos reactivos por residuo de oxazolina. De la manera más preferible, la polioxazolina electrófila comprende de media 0,12-0,5 grupos electrófilos reactivos por residuo de oxazolina.

30

[0061] La polioxazolina puede llevar grupos electrófilos reactivos en sus cadenas laterales (grupos electrófilos reactivos laterales), en sus extremos terminales, o ambos. La polioxazolina electrófila que se emplea según la presente invención contiene ventajosamente uno o más grupos electrófilos reactivos laterales. Típicamente, la polioxazolina electrófila contiene 0,03-0,5 grupos electrófilos reactivos laterales por monómero, más preferiblemente 0,04-0,35 grupos electrófilos reactivos laterales por monómero, incluso más preferiblemente 0,05-0,25 grupos electrófilos reactivos laterales por monómero.

35

40

[0062] Según una forma de realización preferida, los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila se seleccionan de entre ésteres del ácido carboxílico, ésteres de sulfonato, ésteres de fosfonato, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de p-nitrotiofenilo, grupos haluro de ácido, anhídridos, cetonas, aldehídos, isocianato, tioisocianato, isociano, epóxidos, grupos hidroxilo activados, olefinas, éteres glicidílicos, carboxilo, ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo, maleimido (maleimidilo), etenosulfonilo, imido ésteres, acetoacetato, haloacetal, disulfuro de ortopiridilo, derivados de dihidroxifenilo, vinilo, acrilato, acrilamida, yodoacetamida y combinaciones de estos. Más preferiblemente, los grupos electrófilos reactivos se seleccionan de entre ésteres del ácido carboxílico, ésteres de sulfonato, ésteres de fosfonato, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de p-nitrotiofenilo, grupos haluro de ácido, anhídridos, cetonas, aldehídos, isocianato, tioisocianato, isociano, epóxidos, grupos hidroxilo activados, glicidílicos, carboxilo, ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo, imido ésteres, derivados de dihidroxifenilo y combinaciones de estos. Incluso más preferiblemente, los grupos electrófilos reactivos se seleccionan de entre halo acetales, disulfuro de ortopiridilo, maleimidias, vinil sulfona, derivados de dihidroxifenilo, vinilo, acrilato, acrilamida, yodoacetamida, ésteres de succinimidilo y combinaciones de estos. De la manera más preferible, los grupos electrófilos reactivos se seleccionan de entre maleimidias, vinilo, acrilato, acrilamida, ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo y combinaciones de estos.

45

50

55

[0063] Los ejemplos de ésteres de succinimidilo que pueden emplearse incluyen succinimidil glutarato, succinimidil propionato, succinimidil carbonato, disuccinimidil suberato, bis(sulfosuccinimidil) suberato, ditiobis(succinimidilpropionato), bis(2-succinimidooxicarbonilo) etil sulfona, 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato), succinimidil carbamato, sulfosuccinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, bis(sulfosuccinimidil) suberato, sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, ditiobis-sulfosuccinimidil propionato, disulfosuccinimidil tartrato; bis[2-(sulfosuccinimidiloxicarboniloxietilsulfona)], etilenglicol bis(sulfosuccinimidilsuccinato), ditiobis-(succinimidil propionato).

60

65

[0064] Los ejemplos de derivados de dihidroxifenilo que pueden emplearse incluyen dihidroxifenilalanina, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), dopamina, ácido 3,4-dihidroxihipocinámico (DOHA), norepinefrina, epinefrina y catecol.

5 [0065] El polímero nucleófilo soluble en agua que está contenido en las partículas de polímero nucleófilo tiene preferiblemente una solubilidad en agua desmineralizada a 20 °C, a un pH en el intervalo de 3 a 7, de al menos 100 g/l, más preferiblemente de al menos 150 g/l y, de la manera más preferible, de al menos 200 g/l. La presente invención puede emplear adecuadamente un polímero nucleófilo que es soluble a pH ácido si la polioxazolina electrófila libera sustancias ácidas cuando reacciona con componentes sanguíneos, tejido y/o el polímero nucleófilo. Este es el caso, por ejemplo, cuando la polioxazolina electrófila contiene grupos N-hidroxisuccinimida.

10 [0066] Las partículas de polímero nucleófilo contienen preferiblemente al menos un 30 % en peso, más preferiblemente al menos un 50 % en peso y, de la manera más preferible, al menos un 80 % en peso del polímero nucleófilo.

[0067] Según una forma de realización especialmente preferida, el polímero nucleófilo soluble en agua que se emplea en las partículas de aglomerado se disuelve de manera relativamente lenta en agua. Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, se cree que, cuando la polioxazolina electrófila reacciona con el polímero nucleófilo soluble en agua a una velocidad relativamente lenta, la polioxazolina electrófila también puede reaccionar con las proteínas de la sangre y el tejido en el sitio de la hemorragia. Al emplear un polímero nucleófilo soluble en agua que se disuelve de manera relativamente lenta, la polioxazolina electrófila disuelta tiene la oportunidad de reaccionar con las proteínas de la sangre y el tejido, así como con el polímero nucleófilo soluble en agua (lento), creando de este modo un gel de sellado homogéneo fuerte.

20 [0068] Los polímeros nucleófilos solubles en agua que tienen un alto peso molecular tienden a disolverse de forma relativamente lenta en agua. Por consiguiente, en una forma de realización muy preferida, el polímero nucleófilo soluble en agua que está contenido en las partículas de polímero nucleófilo tiene un peso molecular de al menos 3 kDa, más preferiblemente de al menos 10 kDa y, de la manera más preferible, de 20 a 3000 kDa.

30 [0069] El polímero nucleófilo contiene preferiblemente al menos 4 grupos nucleófilos reactivos, más preferiblemente al menos 8 grupos nucleófilos reactivos y, de la manera más preferible, al menos 10 grupos nucleófilos reactivos. De la manera más preferible, estos grupos nucleófilos reactivos son grupos amina, de la manera más preferible, grupos amina primaria.

35 [0070] Los ejemplos de polímeros nucleófilos solubles en agua que pueden usarse adecuadamente en las partículas poliméricas nucleófilas incluyen proteína, quitosano, polioxazolina nucleófila, polietilenglicol nucleófilo, polietilenimina y combinaciones de estos. Más preferiblemente, el polímero nucleófilo se selecciona de entre gelatina, colágeno, quitosano, polioxazolina nucleófila y combinaciones de estos.

40 [0071] Según una forma de realización especialmente ventajosa, las partículas poliméricas nucleófilas empleadas según la invención proporcionan hemostasia al acelerar el proceso de coagulación. El colágeno es capaz de activar la ruta intrínseca de la cascada de coagulación. El colágeno tiene una gran área de superficie, que actúa como matriz para la activación, agregación y formación de trombos plaquetarios. Las partículas de gelatina tienen la capacidad de restringir el flujo sanguíneo y proporcionar una matriz para la formación de coágulos. Por consiguiente, en una forma de realización muy preferida, el polímero nucleófilo se selecciona de entre gelatina, colágeno y combinaciones de estos. De la manera más preferible, el polímero nucleófilo es gelatina, incluso más preferiblemente, gelatina reticulada.

45 [0072] La gelatina reticulada tiene preferiblemente un peso molecular en el intervalo de 30-3000 kDa, más preferiblemente en el intervalo de 400 a 2000 kDa, de la manera más preferible, en el intervalo de 500 a 1500 kDa.

50 [0073] El contenido medio de amina primaria de la gelatina reticulada está en el intervalo de 5×10^{-4} a 2×10^{-2} μmol , más preferiblemente de $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ μmol de amina primaria por μg de gelatina reticulada reducida.

55 [0074] Según otra forma de realización ventajosa, el polímero nucleófilo es polietilenglicol (PEG) nucleófilo. Preferiblemente, el PEG nucleófilo contiene al menos 3 grupos nucleófilos reactivos, más preferiblemente al menos 5 y, de la manera más preferible, 8

60 [0075] Según una forma de realización preferida adicional, el polímero nucleófilo es quitosano. El quitosano es un derivado de carbohidrato complejo biodegradable y no tóxico de la quitina (poli-N-acetil-D-glucosamina), una sustancia de origen natural. El quitosano es la forma desacetilada de la quitina. El quitosano aplicado según la presente invención tiene preferiblemente un grado de desacetilación de más del 70 %. El quitosano empleado

según la presente invención tiene preferiblemente un peso molecular de al menos 5 kDa, más preferiblemente de 10-10 000 kDa.

[0076] Según otra forma de realización muy ventajosa, el polímero nucleófilo es polioxazolina nucleófila. Preferiblemente, la polioxazolina nucleófila contiene al menos 3 grupos nucleófilos reactivos, más preferiblemente al menos 5 y, de la manera más preferible, 8 a 20.

[0077] En comparación con los biopolímeros nucleófilos de origen natural tales como la gelatina, el colágeno y el quitosano, el uso de polímeros nucleófilos sintéticos, tales como la polioxazolina nucleófila y el PEG nucleófilo, ofrece la ventaja de que los aglomerados de partículas que contienen estos polímeros nucleófilos sintéticos presentan propiedades hemostáticas más predecibles (reproducibles).

[0078] Los grupos nucleófilos reactivos del polímero nucleófilo soluble en agua se seleccionan preferiblemente de entre grupos amina, grupos tiol y combinaciones de estos.

[0079] Según una forma de realización preferida, el polímero nucleófilo soluble en agua contiene dos o más grupos amina y los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila se seleccionan de entre ésteres del ácido carboxílico, ésteres de sulfonato, ésteres de fosfonato, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de p-nitrotiofenilo, grupos haluro de ácido, anhídridos, cetonas, aldehídos, isocianato, tioisocianato, isociano, epóxidos, grupos hidroxilo activados, glicídilicos, carboxilo, ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo, imido ésteres, derivados de dihidroxifenilo y combinaciones de estos.

[0080] Según otra forma de realización preferida, el polímero nucleófilo soluble en agua contiene dos o más grupos tiol y los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila se seleccionan de entre halo acetales, disulfuro de ortopiridilo, maleimidias, vinil sulfona, derivados de dihidroxifenilo, vinilo, acrilato, acrilamida, yodoacetamida, ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo y combinaciones de estos. Más preferiblemente, los grupos electrófilos reactivos se seleccionan de entre ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo, halo acetales, maleimidias o derivados de dihidroxifenilo y combinaciones de estos. De la manera más preferible, los grupos electrófilos reactivos se seleccionan de entre maleimidias o derivados de dihidroxifenilo y combinaciones de estos.

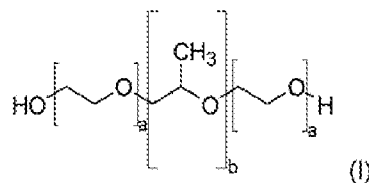
[0081] Según una forma de realización particularmente preferida, la relación entre el número total de grupos electrófilos reactivos proporcionados por la polioxazolina electrófila y el número total de grupos nucleófilos reactivos proporcionados por el polímero nucleófilo se encuentra en el intervalo de 1:1,5 a 1,5:1, más preferiblemente en el intervalo de 1:1,2 a 1,2:1 y, de la manera más preferible, en el intervalo de 1:1,1 a 1,1:1.

[0082] Los inventores han descubierto inesperadamente que se pueden obtener aglomerados de partículas que muestran una excelente adhesión a órganos tales como el bazo y el riñón si los aglomerados de partículas contienen un 1-20 % en peso, más preferiblemente un 2,5-15 % en peso y, de la manera más preferible, un 5-10 % en peso de un polímero no iónico no reactivo. Este polímero no iónico no reactivo no contiene grupos electrófilos reactivos o grupos nucleófilos reactivos.

[0083] En una forma de realización muy preferida, las partículas aglomeradas se recubren con el polímero no iónico no reactivo.

[0084] El polímero no iónico no reactivo tiene preferiblemente un punto de fusión en el intervalo de 40-70 °C, más preferiblemente en el intervalo de 45-65 °C y, de la manera más preferible, en el intervalo de 50-60 °C. En este caso, el punto de fusión se refiere a la temperatura a la que el polímero se funde completamente.

[0085] Los ejemplos de polímeros no iónicos no reactivos que pueden aplicarse adecuadamente en las partículas de aglomerado de la presente invención incluyen poloxámeros, polietilenglicoles y combinaciones de estos. El poloxámero es un copolímero tribloque no iónico compuesto por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (óxido de polipropileno) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (óxido de poli(etileno)) y está representado por la fórmula (I)



donde a es un número entero de 10 a 110 y b es un número entero de 20 a 60. Cuando a es 80 y b es 27, este polímero se conoce como poloxámero 188. Otros poloxámeros conocidos útiles en la presente invención son el poloxámero 237 (a = 64; y b = 37), el poloxámero 338 (a = 141; y b = 44) y el poloxámero 407 (a = 101; y b = 56).

Otros poloxámeros que son conocidos y pueden ser útiles en la presente invención incluyen el poloxámero 108, el poloxámero 182, el poloxámero 183, el poloxámero 212, el poloxámero 217, el poloxámero 238, el poloxámero 288, el poloxámero 331, el poloxámero 338 y el poloxámero 335.

5 [0086] Según una forma de realización particularmente preferida, el polímero no iónico no reactivo es un poloxámero, incluso más preferiblemente un poloxámero con una masa molecular media de 2 000-18 000, de la manera más preferible, un poloxámero con una masa molecular media de 7 000-10 000. El poloxámero aplicado en los aglomerados de partículas preferiblemente es sólido a temperatura ambiente.

10 [0087] En otra forma de realización ventajosa, el polvo hemostático es biorreabsorbible, lo que permite que el polvo se use en cirugía abdominal.

[0088] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar aglomerados de partículas hemostáticas de:

15 (a) partículas electrófilas de polioxazolina que contienen una polioxazolina electrófila que lleva al menos 3 grupos electrófilos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina de la sangre mediante la formación de un enlace covalente; y

20 (b) partículas poliméricas nucleófilas que contienen un polímero nucleófilo soluble en agua que lleva al menos 3 grupos nucleófilos reactivos que son capaces de reaccionar con los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila mediante la formación de un enlace covalente entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo;

25 donde dicho método comprende combinar 100 partes en peso de las partículas de polioxazolina electrófilas con 10 a 1000 partes en peso de las partículas poliméricas nucleófilas en presencia de líquido de granulación no acuoso.

30 [0089] Las partículas de polioxazolina electrófilas que se emplean en el presente método son preferiblemente idénticas a las partículas de polímero electrófilas descritas anteriormente en el presente documento. Asimismo, las partículas poliméricas nucleófilas que se emplean son preferiblemente idénticas a las partículas poliméricas nucleófilas descritas anteriormente en el presente documento.

35 [0090] Según una forma de realización preferida, tanto las partículas de polioxazolina electrófilas como las partículas de polímero nucleófilas que se emplean en el presente método tienen un contenido de agua de menos del 2 % en peso, más preferiblemente de menos del 1 % en peso. Para conseguir un contenido de agua tan bajo, puede ser necesario secar las partículas de polímero antes de la granulación.

40 [0091] La polioxazolina electrófila tiene preferiblemente una solubilidad en el líquido de granulación no acuoso a 20 °C de menos de 1 mg/l, más preferiblemente de menos de 0,5 mg/l, incluso más preferiblemente de menos de 0,2 mg/l y, de la manera más preferible, de menos de 0,1 mg/l.

45 [0092] El polímero nucleófilo tiene preferiblemente una solubilidad en el líquido de granulación no acuoso a 20 °C de al menos 5 mg/l, más preferiblemente de al menos 10 mg/l, incluso más preferiblemente de 20-200 mg/l y, de la manera más preferible, de 40-150 mg/l.

[0093] En una forma de realización preferida, el método comprende combinar 100 partes en peso de las partículas de polioxazolina electrófilas con 20 a 400 partes en peso, más preferiblemente 50 a 200 partes en peso de las partículas poliméricas nucleófilas, en presencia del líquido de granulación no acuoso.

50 [0094] La cantidad de líquido de granulación no acuoso empleada en el presente método está preferiblemente en el intervalo del 0,5-5 % en peso de la cantidad combinada de partículas de polioxazolina electrófilas y partículas de polímero nucleófilas que se usa en el método. Más preferiblemente, la cantidad de líquido de granulación no acuoso empleada está en el intervalo del 1-4 %, de la manera más preferible, del 1,5-3 % en peso de la cantidad combinada de partículas de polioxazolina electrófilas y partículas de polímero nucleófilas.

55 [0095] Según una forma de realización particularmente preferida, el método comprende la etapa de humedecer las partículas de polioxazolina electrófilas con el líquido de granulación no acuoso, seguido de la etapa de combinar las partículas de polioxazolina humedecidas con las partículas de polímero nucleófilas. Esta forma de realización particular ofrece la ventaja de que produce un granulado que es muy homogéneo en términos de tamaño de partícula y composición.

60 [0096] Las partículas de polioxazolina electrófilas usadas en la preparación de la mezcla en polvo tienen preferiblemente un diámetro medio ponderado en volumen (D [4,3]) en el intervalo de 1-100 µm, más preferiblemente en el intervalo de 50-50 µm, de la manera más preferible, en el intervalo de 10-40 µm.

65

[0097] El diámetro medio ponderado en volumen (D [4,3]) de las partículas poliméricas nucleófilas usadas en la preparación de la mezcla en polvo está preferiblemente en el intervalo de 10-300 μm , más preferiblemente en el intervalo de 15-200 μm , de la manera más preferible, en el intervalo de 20-100 μm .

5 [0098] El polvo aglomerado que se obtiene mediante el presente método tiene preferiblemente un diámetro medio ponderado en volumen (D [4,3]) en el intervalo de 12-1000 μm , más preferiblemente en el intervalo de 20-500 μm , de la manera más preferible, en el intervalo de 30-300 μm .

10 [0099] El líquido de granulación no acuoso empleado en la granulación húmeda contiene preferiblemente al menos un 60 % en peso de un disolvente orgánico seleccionado de entre alcohol isopropílico, etanol, metanol, éter dietílico, heptano, hexano, pentano, ciclohexano, diclorometano, acetona y mezclas de estos. Más preferiblemente, el líquido de granulación no acuoso contiene al menos un 60 % en peso, de la manera más preferible, al menos un 85 % en peso de un disolvente orgánico seleccionado de alcohol isopropílico, etanol y mezclas de estos. Incluso más preferiblemente, el líquido de granulación no acuoso contiene al menos un 60 % en peso, de la manera más preferible, al menos un 85 % en peso de alcohol isopropílico.

[0100] El líquido de granulación no acuoso contiene preferiblemente no más del 1 % en peso de agua, más preferiblemente no más del 0,1 % en peso de agua.

20 [0101] El presente método ofrece la ventaja de que no requiere el uso de aglutinante de granulación. Por consiguiente, en una forma de realización preferida del método, no se usa aglutinante de granulación. Según una forma de realización particularmente preferida, los únicos materiales usados en el método de preparación son las partículas de polioxazolina electrófilas, las partículas de polímero nucleófilas y el líquido de granulación no acuoso.

25 [0102] Los aglomerados de partículas de la presente invención se aplican en láminas hemostáticas para mejorar sus propiedades hemostáticas. Por consiguiente, la invención se refiere a una lámina hemostática flexible y biocompatible que comprende:

- 30
- una estructura portadora fibrosa cohesiva que comprende un espacio intersticial interconectado tridimensional; y
 - distribuido dentro del espacio intersticial, un polvo hemostático como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

35 [0103] Según una forma de realización particularmente preferida, la estructura portadora fibrosa cohesiva es resistente al agua.

40 [0104] La polioxazolina electrófila en el polvo hemostático que se distribuye por toda la estructura portadora fibrosa se disuelve rápidamente cuando la lámina entra en contacto con la sangre u otros fluidos corporales acuosos que pueden penetrar en el espacio intersticial. Por lo tanto, tras la aplicación de la lámina sobre el sitio de una herida, se produce una reticulación covalente rápida entre, por un lado, la polioxazolina electrófila y, por otro lado, el polímero nucleófilo de las partículas de polímero nucleófilo, proteínas sanguíneas y tejido, lo que conduce a la formación de un gel que sella la superficie de la herida y detiene la hemorragia y que conduce además a una fuerte adhesión de la lámina hemostática al tejido. La estructura portadora fibrosa resistente al agua proporciona resistencia mecánica durante y después de la aplicación, y evita un hinchamiento excesivo.

45 [0105] Como la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo están contenidos en una única partícula, se asegura que estos dos componentes reactivos puedan distribuirse homogéneamente a través de la lámina hemostática, que no se produzca segregación durante el transporte y la manipulación y que estos componentes puedan reaccionar inmediatamente entre sí cuando los aglomerados de partículas entran en contacto con la sangre.

50 [0106] Según una forma de realización particularmente preferida, la lámina hemostática de la presente invención es bioabsorbible, lo que significa que la estructura portadora, los aglomerados de partículas y cualquier otro componente de la lámina hemostática se acaban absorbiendo en el cuerpo. La absorción de la estructura portadora y los aglomerados de partículas requiere típicamente una descomposición química (por ejemplo, hidrólisis) de los polímeros contenidos en ella. La bioabsorción completa de la lámina hemostática por el cuerpo humano se logra típicamente en 1 a 10 semanas, preferiblemente en 2 a 8 semanas.

55 [0107] La lámina hemostática de la presente invención tiene típicamente un grosor medio no comprimido de 0,5-25 mm. Más preferiblemente, el grosor medio no comprimido está en el intervalo de 1-10 mm, de la manera más preferible, en el intervalo de 1,5-5 mm.

60 [0108] Las dimensiones de la lámina hemostática son preferiblemente tales que la parte superior e inferior de la lámina tienen cada una un área superficial de al menos 2 cm^2 , más preferiblemente de al menos 10 cm^2 y, de la

manera más preferible, 25-50 cm². Típicamente, la lámina es de forma rectangular y tiene una longitud de 25-200 mm, y una anchura de 25-200 mm.

5 [0109] La lámina hemostática tiene preferiblemente una densidad no comprimida de menos de 200 mg/cm³, más preferiblemente inferior a 150 mg/cm³ y, de la manera más preferible, de 10-100 mg/cm³.

10 [0110] Preferiblemente, la lámina hemostática de la presente invención es esencialmente anhidra. Típicamente, la lámina hemostática tiene un contenido de agua de no más del 5 % en peso, más preferiblemente de no más del 2 % en peso y, de la manera más preferible, de no más del 1 % en peso.

[0111] La capacidad de absorción de agua de la lámina hemostática preferiblemente es de al menos 50 %, más preferiblemente está en el intervalo de 100 % a 800 %, de la manera más preferible, en el intervalo de 200 % a 500 %.

15 [0112] La lámina hemostática de la presente invención preferiblemente es estéril.

[0113] El uso de una estructura portadora fibrosa en la lámina hemostática de la presente invención ofrece la ventaja de que el polvo hemostático puede distribuirse homogéneamente a través de esta estructura portadora sin dificultad. Tal distribución homogénea es mucho más difícil de conseguir, por ejemplo, en estructuras portadoras de tipo alveolar.

20 [0114] Las fibras de la estructura portadora fibrosa tienen preferiblemente un diámetro medio de 1-500 μm, más preferiblemente de 2-300 μm y, de la manera más preferible, de 5-200 μm. El diámetro medio de las fibras se puede determinar adecuadamente usando un microscopio.

25 [0115] Típicamente, al menos el 50 % en peso, más preferiblemente al menos el 80 % en peso de las fibras de la estructura portadora fibrosa tienen un diámetro de 1-300 μm y una longitud de al menos 1 mm.

30 [0116] Preferiblemente, al menos el 50 % en peso, más preferiblemente al menos el 80 % en peso de las fibras de la estructura portadora fibrosa tienen una relación de aspecto (relación de longitud a diámetro) de al menos 1000.

[0117] La estructura portadora fibrosa que se emplea según la presente invención preferiblemente es una estructura de fieltro, una estructura de tejido plano o una estructura de punto. De la manera más preferible, la estructura portadora fibrosa es una estructura de fieltro. En este caso, el término "estructura de fieltro" se refiere a una estructura que se produce mediante la compactación y el prensado de fibras entre sí para formar un material cohesivo.

35 [0118] La estructura portadora fibrosa comprende preferiblemente al menos un 50 % en peso, más preferiblemente al menos un 80 % en peso y, de la manera más preferible, al menos un 90 % en peso de fibras que contienen gelatina, colágeno, celulosa, celulosa modificada, carboximetildextrano, PLGA, hialuronato de sodio/carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, quitosano o una combinación de estos.

40 [0119] En una forma de realización de la invención, la estructura portadora fibrosa no comprende celulosa regenerada oxidada.

45 [0120] Las estructuras portadoras fibrosas preferidas tienen una estructura de poros abiertos con una permeabilidad al aire de al menos 0,1 l/min × cm², más preferiblemente de al menos 0,5 l/min × cm². La permeabilidad al aire se determina según la norma EN ISO 9237:1995 (Textiles - Determination of the permeability of fabrics to air).

50 [0121] Las fibras de la estructura portadora fibrosa pueden fabricarse por medio de métodos conocidos en la técnica, tales como electrohilado, electrohilado por soplado e hilado por pulverizador rotatorio de alta velocidad. La producción de una estructura portadora fibrosa por medio de hilado por pulverizador rotatorio de alta velocidad se describe en la patente US 2015/0010612. También es posible usar láminas fibrosas hemostáticas disponibles en el mercado como la estructura portadora fibrosa.

55 [0122] El polvo hemostático está presente preferiblemente en la lámina hemostática de la presente invención en una cantidad del 5-90 %, más preferiblemente 10-80 %, incluso más preferiblemente 20-75 % y, de la manera más preferible, 50-70 %, en peso de la estructura portadora fibrosa.

60 [0123] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

65

[0124] En general: siempre que no se mencione explícitamente la humedad residual (es decir, el agua residual en el polvo seco, granulado y/o estructuras portadoras fibrosas cohesivas) después del secado, los niveles están por debajo del 2,0 % p/p.

5 [0125] Los polvos hemostáticos sin estructura portadora fibrosa no son según la invención reivindicada.

Preparación de NHS-POx

10 [0126] Se sintetizó terpolímero de poli[2-(etil/hidroxi-etil-amida-etil/NHS-éster-etil-éster-etil-amida-etil)-2-oxazolina] activado por la cadena lateral de NHS que contenía un 20 % de grupos NHS-éster (= EL-POx, 20 % de NHS) como sigue:

15 Se sintetizó copolímero de poli[2-(etil/metoxi-carbonil-etil)-2-oxazolina] (GP = +/-100) por medio de CROP usando un 60 % de 2-etil-2-oxazolina (EtOx) y un 40 % de 2-metoxicarbonil-etil-2-oxazolina (MestOx). Se obtuvo un copolímero estadístico que contiene un 40 % de grupos 2-metoxicarbonil-etilo (RMN de ¹H). En segundo lugar, el polímero que contenía un 40 % de grupos 2-metoxicarbonil-etilo se hizo reaccionar con etanolamina produciendo un copolímero con un 40 % de grupos 2-hidroxietil-amida-etilo (RMN de ¹H). Después de eso, la mitad de los grupos 2-hidroxi-etil-amida-etilo se hizo reaccionar con anhídrido succínico produciendo un terpolímero con un 60 % de grupos 2-etilo, un 20 % de grupos 2-hidroxi-etil-amida-etilo y un 20 % de grupos 2-carboxi-etil-éster-etil-amida-etilo según RMN de ¹H. Finalmente, los grupos 2-carboxi-etil-éster-etil-amida-etilo se activaron mediante N-hidroxisuccinimida (NHS) y diisopropilcarbodiimida (DIC), produciendo EL-POx, 20 % de NHS. La NHS-POx contenía un 20 % de grupos éster de NHS según RMN de ¹H.

20 Se disolvió NHS-POx a entre 2-8 °C en agua (60 g en 300 ml), se enfrió a menos 80 °C durante media hora y se liofilizó. El polvo liofilizado obtenido de este modo se secó en un Rotavap a 40 °C hasta que el contenido de agua estuvo por debajo del 0,8 % p/p según se determinó mediante valoración de Karl Fischer.

25 Este polvo seco (blanco) se trituró usando un molino de bolas (Retch MM400) hasta que el tamaño de partícula medio fue de no más de 40 µm (D [4,3]) y se selló al vacío en bolsas de aluminio.

Tinción de polvo de NHS-POx

30 [0127] Se disolvieron 20 g de polvo de NHS-POx en agua y se mezclaron con 50 mg de Brilliant Blue FCF (Sigma Aldrich) usando un instrumento de dispersión de alto rendimiento (Ultra-Turrax, IKA). Directamente después de la mezcla (2 minutos), la solución se congeló a -78 °C y posteriormente se liofilizó durante la noche. El polvo liofilizado obtenido de este modo se secó en un Rotavap a 40 °C hasta que el contenido de agua residual estuvo por debajo del 0,8 % p/p, determinado mediante valoración de Karl Fischer. A continuación, el polvo seco (azul) se trituró usando un molino de bolas (Retch MM400) hasta obtener un polvo de NHS-POx teñido de azul que tenía un tamaño de partícula medio de no más de 40 µm (D [4,3]) y se selló al vacío en bolsas de aluminio.

40

Efecto de la reticulación de NHS-POx sobre el PDI (índice de polidispersidad)

45 [0128] Se preparó una solución de 80 µg/ml de 2,2'-(etilendioxi)-bis-(etilamina) (EDEA, Aldrich, Mw 148,2) en una mezcla de diclorometano (DCM) e isopropanol (IPA) disolviendo 80 mg de EDEA en 10 ml de DCM/IPA 95:5 (v/v). Esta solución se diluyó 10 veces con DCM/IPA 95:5 (v/v) y se añadieron 26,8 µl de la solución de EDEA a 100 µl de una solución de 0,5 g/ml de NHS-POx en DCM/IPA 95:5 (v/v) correspondiente con grupos amina al 0,05 % en moles con respecto a grupos NHS. Directamente después de la adición de la solución de EDEA, la mezcla de reacción se mezcló completamente usando un mezclador de vórtice. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 3 horas y todos los volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida.

50

[0129] La muestra seca se reconstituyó en la fase móvil de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM. Se midió la SEC tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo). A partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue superior a 2,5.

55

[0130] Una solución de 0,5 g/ml de NHS-POx en DCM/IPA 95:5 (v/v), sin la adición de EDEA, siguiendo el mismo procedimiento de SEC, dio como resultado un PDI de 1,5, lo que indica que solo el 0,05 % en moles de reticulación de grupos NHS ya da como resultado un aumento significativo en el PDI del polímero.

Preparación de NU-POx

60 [0131] Se sintetizó polioxazolina que contenía grupos etilo y amina en la cadena lateral de alquilo mediante CROP de EtOx y MestOx y la posterior amidación de las cadenas laterales de éster metílico con etilendiamina para producir un copolímero de poli(2-etil/aminoetilamidoetil-2-oxazolina) (NU-POx). NU-POx contenía NH₂ al 10 %, según RMN de ¹H. Se disolvió NU-POx a entre 2-8 °C en agua (60 g en 300 ml), se enfrió a menos 80 °C durante media hora y se liofilizó. El polvo liofilizado obtenido de este modo se secó en un Rotavap a 40 °C hasta

65

que el contenido de agua estuvo por debajo del 0,8 % p/p según se determinó mediante valoración de Karl Fischer. Este polvo seco se molió en una máquina de molienda de banco hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 100 μm (D [4,3]) y se selló al vacío en bolsas de aluminio.

5 **Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx de NU-POx**

[0132] Se humedeció polvo de NHS-POx (sin teñir) azul o blanco con alcohol isopropílico (IPA) en un mezclador de alto cizallamiento hasta que se obtuvo un polvo similar a la nieve homogéneo que contenía aproximadamente un 1-2 % p/p de IPA. Después de esto, se añadió polvo de NU-POx y se mezcló. El polvo de NHS-POx azul humedecido se mezcló con polvo de NU-POx en una relación molar de 1:0,6, refiriéndose dicha relación molar a la relación del número de grupos NHS proporcionados por NHS-POx al número de grupos amina proporcionados por NU-POx. El polvo de NHS-POx sin teñir húmedo también se mezcló con polvo de NU-POx en otras relaciones molares (1:0,8; 1:1 y 1:1,2).

[0133] Después de la mezcla, los granulados húmedos se secaron a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p según se determinó a través de RMN de ^1H . Los granulados secados se trituraron usando un molino de bolas (Retch MM400) hasta que el tamaño de partícula medio fue de no más de 50 μm (D [4,3]) y se sellaron al vacío en bolsas de aluminio.

[0134] La distribución de tamaño de partícula de los granulados así obtenidos fue aproximadamente: 90 % en volumen < 90 μm , 50 % en volumen < 45 μm y 10 % en volumen < 15 μm .

[0135] El granulado de NHS-POx/NU-POx (1:1) se analizó usando espectroscopía por RMN de ^1H . Se disolvieron 25 mg de granulado en ácido trifluoroacético (0,20 ml) por sonicación durante 20 minutos. Después de la disolución completa del granulado, la muestra se diluyó con dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) que contenía ácido maleico (2,5 mg/ml) como patrón interno (0,80 ml), se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro adquirido, puede calcularse la cantidad de NHS unida a NHS-POx, junto con la relación molar de NHS y grupos amina presentes en el granulado. La cantidad de NHS unida a NHS-POx en el granulado fue igual a la cantidad de NHS unida al producto de partida de NHS-POx, lo que indica que no hubo descomposición ni reticulación durante la granulación.

[0136] La recuperación total del polímero, es decir, la combinación de NHS-POx y NU-POx en la muestra de RMN, se determinó usando una cantidad conocida de patrón interno (ácido maleico) y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H registrados de NHS-POx y NU-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de polímero fue del 99 por ciento, lo que indica que no se formó material reticulado insoluble.

[0137] El granulado NHS-POx/NU-POx (1:1) se analizó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se trataron 20 mg del granulado con anhídrido acético (1,00 ml) durante 1 hora a 50 °C. Posteriormente, se añadió metanol (2,00 ml) y la mezcla se agitó durante otra hora a 50 °C. Se tomó una alícuota (0,75 ml) y todos los volátiles se eliminaron a presión reducida. La muestra se recogió en *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (2,50 ml), que fue el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se había producido reticulación durante la granulación. La validación analítica de este método cromatográfico de exclusión por tamaño indicó que la reticulación intencionada de NHS-POx con NU-POx a un nivel de 0,05 % en moles aumentó el PDI a más de 2,5.

50 **Preparación de mezclas de NHS-POx / NU-POx mediante co-liofilización**

[0138] Se prepararon polvos de NHS-POx/NU-POx co-liofilizados como sigue: se disolvieron 2,4 g de NU-POx en 40 ml de ácido acético glacial. Después de la disolución completa del polímero, se añadieron 2,0 g de NHS-POx y la muestra se sometió a sonicación durante 30 minutos. La solución se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó. El sólido pegajoso resultante se secó adicionalmente a presión reducida (< 1 kPa) y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

[0139] Las muestras de NHS-POx/NU-POx co-liofilizadas no pudieron analizarse por medio de espectroscopía por RMN de ^1H y cromatografía de exclusión por tamaño porque las muestras no eran solubles en ácido trifluoroacético ni en anhídrido acético debido a un alto grado de reticulación entre NHS-POx y NU-POx.

60 **Preparación de mezclas de NHS-POx / NU-POx mediante mezcla en seco**

[0140] Se prepararon mezclas de NHS-POx/NU-POx de la siguiente manera: se mezclaron en seco 2 g de NHS-POx y 2 g de NU-POx por medio de mezcla en tambor durante 30 minutos. El polvo resultante se secó a presión reducida (< 1 kPa) y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

[0141] El polvo se analizó usando espectroscopía por RMN de ^1H . Se disolvieron 25 mg de polvo en ácido trifluoroacético (0,20 ml) por sonicación durante 20 minutos. Después de la disolución completa del polvo, la muestra se diluyó con dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) que contenía ácido maleico (2,5 mg/ml) como patrón interno (0,80 ml), se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 99 por ciento en comparación con NHS-POx.

[0142] La recuperación total del polímero, es decir, la combinación de NHS-POx y NU-POx en la muestra de RMN, se determinó usando una cantidad conocida de patrón interno (ácido maleico) y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H registrados de NHS-POx y NU-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de polímero era del 101 por ciento, lo que indica que no se formó material reticulado insoluble.

[0143] El polvo se analizó adicionalmente por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Se trataron 20 mg del polvo con anhídrido acético (1,00 ml) durante 1 hora a 50 °C. Posteriormente, se añadió metanol (2,00 ml) y la mezcla se agitó durante otra hora a 50 °C. Se tomó una alícuota (0,75 ml) y todos los volátiles se eliminaron a presión reducida. La muestra se recogió en *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (2,50 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se había producido reticulación durante la mezcla en seco.

Preparación de gránulos de NHS-POx / NU-POx (secuestrados)

[0144] Los siguientes polvos se produjeron mediante liofilización:

Polvo de fosfato

[0145] Se disolvieron 42,66 g de fosfato sódico dibásico dihidrato y 26,56 g de fosfato sódico monobásico monohidrato en 170 mL de agua ultrapura. Tras la disolución completa, se ajustó el pH a 7 añadiendo 62 mL de una solución acuosa de hidróxido sódico 0,1 M. La solución se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

Polvo de carbonato

[0146] Se preparó una mezcla 1:1 mol/mol de carbonato de sodio e hidrogenocarbonato de sodio disolviendo 25,31 g de carbonato de sodio y 20,06 g de hidrogenocarbonato de sodio en 350 ml de agua ultrapura. La solución se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

Polvo de NHS-POx / ácido cítrico

[0147] Se disolvieron 3,08 g de ácido cítrico en 10 ml de agua ultrapura. La solución se enfrió a entre 2-8 °C. Posteriormente, se añadieron 7,00 g de NHS-POx y se disolvieron con la ayuda de un instrumento de dispersión de alto rendimiento (Ultra-Turrax, IKA). Directamente después de la mezcla (2 minutos), la solución se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó durante la noche. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

Polvo de NU-POx / carbonato

[0148] A continuación, se produjo un polvo de NU-POx que contenía carbonato de la siguiente manera: se disolvieron 9,60 g de NU-POx y 0,80 g del polvo de carbonato en 40 ml de agua ultrapura. La solución se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

[0149] El granulado de NHS-POx/NU-POx (secuestrado) se preparó como sigue: se mezclaron 6,50 g de polvo de NHS-POx/ácido cítrico y 5,50 g del polvo de fosfato en un mezclador de alto cizallamiento. Después de obtener una mezcla homogénea, se añadieron lentamente 0,40 ml de IPA, mientras se continuaba la mezcla, hasta que se formó un polvo similar a la nieve homogénea. A continuación, se añadieron 5,41 g del polvo de NU-POx/carbonato y se detuvo la mezcla una vez que se formó un granulado homogéneo. El granulado se secó a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p. El granulado seco se molió en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 100 μm (D [4,3]) y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx / NU-POx / P188

[0150] Los gránulos reactivos de NHS-POx/NU-POx como se ha descrito previamente se recubrieron con Pluronic P188. Se preparó un granulado reactivo de NHS-POx/NU-POx recubierto con P188 al 2,5 % p/p calentando el granulado de NHS-POx/NU-POx junto con polvo de P188 en un mezclador de alta cizalladura a 65 °C durante 10 minutos seguido de enfriamiento hasta condiciones ambiente. El granulado recubierto se trituró usando un molino de bolas (Retch MM400) hasta que el tamaño de partícula medio fue de no más de 40 µm (D [4,3]) y se selló al vacío en bolsas de aluminio.

[0151] La distribución de tamaño de partícula de los granulados así obtenidos fue aproximadamente: 90 % en volumen < 80 µm, 50 % en volumen < 40 µm y 10 % en volumen < 10 µm.

[0152] El granulado de NHS-POx/NU-POx/P188 se analizó usando espectroscopía por RMN de ^1H . Se disolvieron 25 mg de polvo en ácido trifluoroacético (0,20 ml) por sonicación durante 20 minutos. Después de la disolución completa del granulado, la muestra se diluyó con dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) (0,80 ml), se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 98 por ciento en comparación con NHS-POx.

[0153] El granulado NHS-POx/NU-POx/P188 se analizó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se trataron 20 mg del granulado con anhídrido acético (1,00 ml) durante 1 hora a 50 °C. Posteriormente, se añadió metanol (2,00 ml) y la mezcla se agitó durante otra hora a 50 °C. Se tomó una alícuota (0,75 ml) y todos los volátiles se eliminaron a presión reducida. La muestra se recogió en *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (2,50 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, y se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se había producido reticulación durante la granulación.

Preparación de gelatina reticulada reducida (RXL)

[0154] Se preparó gelatina reticulada reducida (RXL) según tres procedimientos:

- Se disolvieron 12 g de polvo de gelatina (Gelita-SPONO, Gelita Medical GmbH) en 350 ml de una solución acuosa 0,1 M de hidróxido de sodio con agitación durante 2 horas a 40 °C. Después de obtener una solución transparente, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y el pH se ajustó a 7 mediante la adición de 32,5 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M. La solución se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó. Posteriormente, el polvo se molió en un molinillo de café, se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio. En lo sucesivo, esta gelatina reticulada reducida se denominará RXL-LS (bajo contenido en sal).
- Se disolvieron 12 g de polvo de gelatina (Gelita-SPONO, Gelita Medical GmbH) en 360 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 1,0 M con agitación durante 10 minutos a 40 °C. La solución transparente obtenida se enfrió a temperatura ambiente y el pH se redujo a 7 mediante la adición de 30 ml de una solución concentrada de ácido clorhídrico (37 % p/p). La solución se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó. Posteriormente, el polvo se molió en un molinillo de café, se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio. En lo sucesivo, esta gelatina reticulada reducida se denominará RXL-HS (alto contenido en sal).
- Se disolvieron 12 g de polvo de gelatina (Gelita-SPONO, Gelita Medical GmbH) en 350 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 M con agitación durante 2 horas a 40 °C. Después de obtener una solución transparente, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y el pH se ajustó a 7 mediante la adición de 32,5 ml de una solución acuosa de ácido clorhídrico 1,0 M. Posteriormente, se añadieron 400 ml de metanol a la solución, que se colocó en un congelador a -20 °C durante 16 horas dando como resultado la precipitación de RXL, que se aisló decantando la fase líquida. La RXL se lavó tres veces con porciones de 100 ml de metanol y después se secó al vacío. El producto bruto se disolvió en 200 ml de agua ultrapura, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo se molió en un molinillo de café, se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio. En lo sucesivo, esta gelatina reticulada reducida se denominará RXL (sin sal).

Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx / RXL (sin sal, con bajo contenido en sal y con alto contenido en sal)

[0155] Los gránulos reactivos NHS-POx/RXL se prepararon como sigue: se humedecieron 5 g de polvo azul de NHS-POx con IPA en un mezclador de alto cizallamiento hasta que se obtuvo un polvo homogéneo similar a la nieve que contenía aproximadamente 1-2 % p/p de IPA. Después de esto, se añadieron 5 g de polvo de RXL, RXL-LS o RXL-HS y se mezclaron. Después de la mezcla, los granulados húmedos se secaron a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p, según se determinó mediante RMN de ^1H . Los granulados secados se molieron en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 90 µm (D [4,3]) y se sellaron al vacío en bolsas de aluminio.

[0156] La distribución de tamaño de partícula de los granulados así obtenidos fue de aproximadamente: 90 % en volumen < 190 μm , 50 % en volumen < 60 μm y 10 % en volumen < 15 μm .

[0157] El granulado que contenía RXL se analizó por medio de análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción era del 98 por ciento en comparación con NHS-POx.

[0158] La recuperación de NHS-POx en la muestra de RMN se determinó usando trimetilsilano como patrón interno y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H de NHS-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de NHS-POx era del 100 por ciento, lo que indica que no se formó material reticulado insoluble.

[0159] El granulado de NHS-POx/RXL se analizó adicionalmente por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se tomó una alícuota (0,15 ml) de la solución usada para el análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Esta solución se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, indicando de nuevo que no se había producido reticulación durante la granulación.

Preparación de mezclas de NHS-POx / RXL mediante co-liofilización

[0160] Se prepararon polvos de NHS-POx/RXL co-liofilizados como sigue: se disolvieron 2,5 g de polvo de RXL en 200 ml de agua ultrapura. El pH se ajustó a 4,5 mediante la adición de ácido acético y la solución se enfrió a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 2,5 g de NHS-POx y se disolvieron con la ayuda de agitación de alto cizallamiento. Directamente después de la disolución completa de NHS-POx, la solución se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

[0161] El polvo de NHS-POx/RXL co-liofilizado se analizó por medio de análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción era del 93 por ciento en comparación con NHS-POx.

[0162] La recuperación de NHS-POx en la muestra de RMN se determinó usando trimetilsilano como patrón interno y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H de NHS-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de NHS-POx fue del 81 por ciento, lo que indica que se formó material reticulado insoluble en cierta medida.

[0163] El polvo de NHS-POx/RXL se analizó adicionalmente por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Se tomó una alícuota (0,15 ml) de la solución usada para el análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Esta solución se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de 3,3, lo que indica que se había producido reticulación durante la liofilización conjunta de ambos componentes.

Preparación de mezclas de NHS-POx / RXL por mezcla en seco

[0164] Se prepararon mezclas de NHS-POx/RXL como sigue: se mezclaron en seco 2 g de polvo de RXL y 2 g de NHS-POx por medio de mezcla en tambor durante 30 minutos. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

[0165] El polvo se analizó por medio de análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 100 por ciento en comparación con NHS-POx.

[0166] La recuperación de NHS-POx en la muestra de RMN se determinó usando trimetilsilano como patrón interno y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H de NHS-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de NHS-POx fue del 104 por ciento, lo que indica que no se formó material reticulado insoluble.

[0167] El polvo de NHS-POX/RXL se analizó adicionalmente por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se tomó una alícuota (0,15 ml) de la solución usada para el análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Esta solución se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se había producido reticulación durante la mezcla en seco.

Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx / RXL que contienen carbonato

[0168] En primer lugar, se preparó una mezcla 1:1 mol/mol de carbonato de sodio e hidrogenocarbonato de sodio disolviendo 25,31 g de carbonato de sodio y 20,06 g de hidrogenocarbonato de sodio en 350 ml de agua ultrapura. La solución se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

[0169] Los granulados de NHS-POx/RXL/carbonato se prepararon como sigue: se mezclaron 5 g de RXL-LS o RXL-HS y 0,178 g del carbonato de sodio/hidrogenocarbonato de sodio usando un mezclador de alto cizallamiento. A continuación, se añadieron 5 g de NHS-POx azul que contenía aproximadamente 1-2 % p/p de IPA y se mezclaron hasta que se obtuvo un polvo homogéneo. Después de la mezcla, los granulados húmedos se secaron a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p según se determinó a través de RMN de ^1H . Los granulados secados se molieron en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 100 μm (D [4,3]) y se sellaron al vacío en bolsas de aluminio.

Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx / NH2-PEG

[0170] Se humedeció NHS-POx (6,9 g) con IPA en un mezclador de alto cizallamiento hasta que se obtuvo un polvo homogéneo similar a la nieve que contenía aproximadamente un 1-2 % p/p de IPA. Posteriormente, se añadieron 8,1 g de amina-PEG-amina, de 2 brazos, MW 2k (de Creative PEGWorks) (relación molar de 1:1,16, refiriéndose dicha relación molar a la relación del número de grupos NHS proporcionados por NHS-POx al número de grupos amina proporcionados por PEG-amina). El granulado formado se secó a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p según se determinó mediante RMN de ^1H . El granulado seco se molió en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 100 μm (D [4,3]) y se selló al vacío en bolsas de aluminio.

[0171] El granulado de NHS-POx/NH2-PEG se analizó usando espectroscopía por RMN de ^1H . Se disolvieron 25 mg de granulado en ácido trifluoroacético (0,20 ml) por sonicación durante 20 minutos. Después de la disolución completa del granulado, la muestra se diluyó con dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) (0,80 ml), se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 97 por ciento en comparación con NHS-POx.

[0172] El granulado de NHS-POx/NH2-PEG se analizó adicionalmente por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Se trataron 20 mg del granulado con anhídrido acético (1,00 ml) durante 1 hora a 50 °C. Posteriormente, se añadió metanol (2,00 ml) y la mezcla se agitó durante otra hora a 50 °C. Se tomó una alícuota (0,75 ml) y todos los volátiles se eliminaron a presión reducida. La muestra se recogió en *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (2,50 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se produjo reticulación durante la granulación.

Preparación de gránulos de almidón / NHS-POx / NU-POx

[0173] Los siguientes polvos de almidón se produjeron mediante liofilización:

Polvo de NHS-POx / almidón

[0174] Se dispersaron 2,79 g de almidón (Arista™ AH, BARD) en 50 ml de agua ultrapura usando un mezclador de alto cizallamiento. La dispersión se enfrió a entre 2-8 °C y se añadieron 0,71 g de NHS-POx y se disolvieron con la ayuda de una mezcla de alto cizallamiento.

[0175] Directamente después de la disolución de NHS-POx, la solución se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

Polvo de NU-POx / almidón

[0176] Se dispersaron 1,45 g de almidón (Arista™ AH, BARD) en 30 ml de agua ultrapura usando un mezclador de alto cizallamiento. Posteriormente, se añadieron 0,36 g de NU-POx y se dejaron disolver. Después de la disolución completa de NU-POx, la dispersión se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

5

Polvo de NU-POx/Almidón/Carbonato de sodio

[0177] Se dispersaron 2,25 g de almidón (Arista™ AH, BARD) en 50 ml de agua ultrapura usando un mezclador de alto cizallamiento. Posteriormente, se añadieron 0,58 g de NU-POx y 0,25 g de carbonato de sodio y se dejaron disolver. Después de la disolución completa de NU-POx, la dispersión se congeló instantáneamente usando nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

10

[0178] Se prepararon dos granulados a partir de estos tres polvos. Los granulados de almidón/NHS-POx/NU-POx se prepararon como sigue:

15

Granulado de almidón 1:

[0179] 1,41 g del polvo de NHS-POx/Almidón, 1,68 g del polvo de NU-POx/Almidón y 0,20 ml de IPA se mezclaron usando un mortero. Después de obtener un granulado homogéneo, se eliminó el IPA residual a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p. El granulado seco se molió en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 100 µm (D [4,3]) y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

20

Granulado de almidón 2:

25

[0180] 1,20 g de NHS-POx/polvo de almidón, 1,45 g del polvo de NU-POx/almidón/carbonato de sodio 3 y 0,15 ml de IPA se mezclaron usando un mortero. Después de que se formara un granulado homogéneo, se eliminó el IPA residual a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p. El granulado seco se molió en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 100 µm (D [4,3]) y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

30

Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx / Gelita Spon

[0181] Se dispersaron 7,01 g de polvo de gelatina presecado (Gelita-SPONO, de Gelita Medical GmbH), con un contenido de agua de menos del 0,2 % p/p, en diclorometano (200 ml) usando un mezclador de alto cizallamiento que funcionaba a 20 000 r.p.m. durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió NHS-POx (7,02 g) y se continuó la agitación durante 5 minutos. La NHS-POx no se disolvió. Todos los volátiles se eliminaron de la suspensión a presión reducida. El polvo obtenido se molió usando un molinillo de café hasta que el tamaño de partícula medio fue de no más de 95 µm (D [4,3]) y se selló al vacío en bolsas de aluminio, se secó adicionalmente a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

35

40

[0182] La distribución de tamaño de partícula de los granulados así obtenidos fue aproximadamente: 90 % en volumen < 190 µm, 50 % en volumen < 80 µm y 10 % en volumen < 15 µm.

45

[0183] El granulado se analizó mediante análisis de espectroscopía por RMN de ¹H. Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl₃) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 µm, se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ¹H. A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 97 por ciento en comparación con NHS-POx.

50

[0184] El granulado se analizó adicionalmente por medio de análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Una alícuota (0,15 ml) del extracto de NHS-POx filtrado descrito anteriormente se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La muestra se analizó mediante SEC tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y el PDI fue de 1,45, lo que indica que no se había producido reticulación.

55

Preparación de gránulos reactivos de NHS-POx / quitosano

[0185] Los gránulos reactivos de NHS-POx/quitosano se prepararon como sigue: se humedecieron 5 g de polvo de NHS-POx con IPA en un mezclador de alto cizallamiento hasta que se obtuvo un polvo homogéneo similar a la nieve que contenía aproximadamente 1-2 % p/p de IPA. Después de esto, se añadieron y mezclaron 5 g de polvo de quitosano (Shanghai Wasteta International, grado de DAC del 85 %). Después de la mezcla, los granulados húmedos se secaron a presión reducida hasta que el contenido de IPA fue inferior al 0,1 % p/p según se determinó a través de RMN de ¹H. Los granulados secados se molieron en un molinillo de café hasta que el tamaño medio de partícula fue de no más de 200 µm (D [4,3]) y se sellaron al vacío en bolsas de aluminio. La

60

65

distribución de tamaño de partícula de los granulados así obtenidos fue aproximadamente: 90 % en volumen <350 μm , 50 % en volumen < 180 μm y 10 % en volumen < 60 μm .

5 [0186] El granulado se analizó mediante análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 95 por ciento en comparación con NHS-POx.

10 [0187] La recuperación de NHS-POx en la muestra de RMN se determinó usando trimetilsilano como patrón interno y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H de NHS-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de NHS-POx fue del 103 por ciento, lo que indica que no se formó material reticulado insoluble.

15 [0188] El granulado de NHS-POx/quitosano se analizó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se tomó una alícuota (0,15 ml) de la solución usada para el análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Esta solución se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se había producido reticulación durante la granulación.

20

Preparación de mezclas de NHS-POx / quitosano mediante co-liofilización

25 [0189] Los polvos de NHS-POx/quitosano co-liofilizados se prepararon como sigue: 2,5 g de polvo de quitosano (Shanghai Wasteta International, 85 % de grado de DAC) se disolvieron en 200 ml de una solución de ácido acético al 0,2 % v/v en agua ultrapura. El pH se ajustó a 4,5 mediante la adición de ácido acético y la solución se enfrió a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 2,5 g de NHS-POx y se disolvieron con la ayuda de agitación de alto cizallamiento. Directamente después de la disolución completa de la NHS-POx, la solución se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

30

[0190] El granulado se analizó mediante análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 12 por ciento en comparación con NHS-POx, lo que implica que se produjo reticulación y/o hidrólisis.

35

[0191] La recuperación de NHS-POx en la muestra de RMN se determinó usando trimetilsilano como patrón interno y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H de NHS-POx en diferentes concentraciones. Se midió que la recuperación total de NHS-POx fue del 11 por ciento (en línea con los resultados de la RMN), lo que indica que se formó material reticulado insoluble.

40

[0192] El granulado de NHS-POx/quitosano se analizó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se tomó una alícuota (0,15 ml) de la solución usada para el análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Esta solución se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. Se determinó que el PDI fue de 5,4, lo que indica que tuvo lugar una reticulación.

45

50

Preparación de mezclas de NHS-POx / quitosano mediante mezcla en seco

[0193] Se prepararon mezclas de NHS-POx/quitosano de la siguiente manera: se mezclaron en seco 2 g de polvo de quitosano (Shanghai Wasetta International, grado DAC del 85 %) y 2 g de NHS-POx mediante mezcla en tambor durante 30 minutos. El polvo resultante se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

55

[0194] El polvo se analizó por medio de análisis de espectroscopía por RMN de ^1H . Para este fin, se añadió cloroformo deuterado (CDCl_3) que contenía ácido acético al 5 % (v/v) (1,0 ml) a 25 mg del granulado. Se extrajo selectivamente NHS-POx sonicando la muestra durante 20 minutos. La dispersión se pasó a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a un tubo de RMN y se registró el espectro de RMN de ^1H . A partir del espectro obtenido, se calculó que la cantidad de NHS sin reacción fue del 99 por ciento en comparación con NHS-POx.

60

[0195] La recuperación de NHS-POx en la muestra de RMN se determinó usando trimetilsilano como patrón interno y una curva de calibración construida a partir de espectros de RMN de ^1H de NHS-POx en diferentes

65

concentraciones. Se midió que la recuperación total de NHS-POx fue del 96 por ciento, lo que indica que no se formó material reticulado insoluble.

[0196] El polvo de NHS-POX/quitosano se analizó adicionalmente por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se tomó una alícuota (0,15 ml) de la solución usada para el análisis de espectroscopía por RMN de ¹H. Esta solución se diluyó con *N,N*-dimetilacetamida que contenía cloruro de litio 50 mM (1,00 ml), que era el eluyente para el análisis por SEC. La SEC se midió tomando como referencia patrones de poli(metacrilato de metilo) y, a partir del cromatograma de exclusión por tamaño obtenido, se determinaron M_n , M_w y PDI. El PDI fue de no más de 1,5, lo que indica que no se había producido una reticulación durante la mezcla en seco.

Estructuras portadoras fibrosas cohesivas

[0197] Se seleccionó el siguiente producto hemostático disponible en el mercado para usarlo como estructuras fibrosas portadoras en la preparación de láminas adhesivas de tejido según la presente invención:

- Mechones de Tuft-It®: Una estructura portadora fibrosa cohesiva que consiste en ocho capas de fibras de esponja de gelatina reticulada reducida. Las ocho capas, de aproximadamente 2 mm de grosor cada una, tienen dimensiones de 50 mm por 75 mm. El contenido de agua de Gelita-It® es como máximo del 15 %. El producto se secó en un horno de vacío durante varias horas a 40 °C para reducir el contenido de agua a no más del 2,0 % p/p (determinado gravimétricamente), antes de impregnarlo con partículas de aglomerado.

Experimentos de hemorragia

[0198] Se usaron modelos porcinos de hemorragia *ex vivo* e *in vivo* estandarizados para evaluar la eficacia hemostática. En todos los modelos se usó heparina para aumentar el tiempo de coagulación de la sangre a aproximadamente 2 a 3 veces el tiempo de coagulación activada (ACT).

[0199] Modelo *ex vivo*: Modelo de cerdo *ex vivo* con hígado recién obtenido, perfundido con sangre fresca heparinizada del matadero para imitar al máximo posible las situaciones reales *in vivo*. Los hígados se montan en una máquina de perfusión mediante la cual la oxigenación, el pH de la sangre, la temperatura y la presión sanguínea se mantienen dentro de los límites reales *in vivo*. Se recogen del matadero dos hígados y 10 litros de sangre heparinizada (5000 unidades/l). Los hígados se transportan en hielo; la sangre, a temperatura ambiente. En el plazo de dos horas tras la recogida, se inspeccionan los hígados para detectar lesiones, que se cierran con guantes y pegamento de cianoacrilato.

- Parámetros de perfusión: flujo 600 ml/min; presión 10-12 mmHg; temperatura 37°C (+/- 1 °C); carbógeno 0,25 litros por minuto
- Con una herramienta de abrasión plana, redonda y giratoria se crea una herida de hemorragia circular (8 mm de diámetro) en la superficie del hígado, con un recubrimiento de caucho de modo que la profundidad de la hemorragia perforada sea siempre de 3 mm
- Después de que el hígado se perfunda adecuadamente (se comprueba el color y la temperatura), las muestras se analizan según el siguiente procedimiento: corte de la muestra al tamaño adecuado (2,7 por 2,7 cm); encendido de la cámara; número de sitio en la cámara; sacabocados de biopsia de 8 mm; corte de la biopsia; retirada de sangre de la hemorragia con gasa (2x); recogida de sangre durante 30 segundos en una gasa previamente pesada; puntuación de la hemorragia (por 2 investigadores); vertido de polvo hemostático en el sitio de la hemorragia y uso de espátula de acero inoxidable para distribuir uniformemente el polvo; observación durante 5 minutos (comprobación y puntuación de adhesión y coagulación) y repetición después de 30 minutos.

[0200] Modelo *in vivo*: Se inflige una rotura de bazo penetrante combinada estandarizada a cerdos anestesiados (cerdo doméstico, macho, intervalo de peso corporal: 40 kg, adulto). Se realiza una laparotomía en la línea media para acceder al bazo y otros órganos. Utilizando un bisturí, n=3 (S1...S3) se realizan lesiones estandarizadas subcapsulares (10 mm x 10 mm). Los productos hemostáticos se aplican con presión suave mediante una gasa prehumedecida (solución salina) y se mantienen durante 1 minuto. Después de la aplicación del producto, se evalúa el tiempo hasta la hemostasia (TTH). Si el TTH es igual a cero, esto significa que después de 1 minuto ya se había logrado la hemostasia por presión.

Sistema de puntuación para granulados: coagulación

[0201]

- | | |
|------|--|
| ++++ | Se logra inmediatamente después de la aplicación |
| +++ | Se logra <10 segundos después de la aplicación |
| ++ | Se logra < 30 segundos después de la aplicación |
| + | Se logra en el plazo de 3 minutos tras la aplicación |

- No se logra (n.l.)

Sistema de puntuación para granulados: Adhesión 10 minutos después de la aplicación

[0202]

5

++++	Adhesión muy fuerte (los granulados coagulados apenas se pueden eliminar)
+++	Adhesión fuerte (los granulados coagulados son difíciles de eliminar)
++	Adhesión fuerte (los granulados coagulados se pueden eliminar)
+	Adhesión moderada (los granulados coagulados se pueden eliminar con facilidad)
+/-	Adhesión leve (los granulados coagulados son eliminados por el flujo sanguíneo)
-	No se logra

Sistema de puntuación para parches: coagulación

[0203]

10

++++	Se logra inmediatamente después del taponamiento
+++	Se logra <10 segundos después del taponamiento
++	Se logra <30 segundos después del taponamiento
+	Se logra en un plazo de 3 minutos después del taponamiento
+/-	Se logra después de 3 minutos, con aplicación de un segundo taponamiento
-	No se logra

Sistema de puntuación para parches: Adhesión 10 minutos después de la aplicación

[0204]

15

++++	Adhesión muy fuerte (el parche se rompe al retirarlo)
+++	Adhesión fuerte (el parche se rompe al retirarlo)
++	Adhesión fuerte (el parche se puede retirar sin romperse)
+	Adhesión moderada (el parche se puede retirar sin romperse)
+/-	Adhesión leve (el parche se puede retirar sin romperse)
-	No se logra

Ejemplo 1 (no según la invención reivindicada)

[0205] Las propiedades hemostáticas de los diferentes granulados reactivos se evaluaron en los ensayos de hemorragia *ex vivo* e *in vivo* descritos anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1

Granulado	Ex vivo		In vivo	
	Coagulación	Adhesión	Coagulación	Adhesión
NHS-POx/NU-POx	+++	+++	+++	+++
NHS-POx/NU-POx/P188 2,5 %	+++	+++	n.l.	n.l.
NHS-POx/Gelita Spon	++++	++	++++	++
NHS-POx/RXL-HS	n.l.	n.l.	+	++++
NHS-POx/quitosano	+++	++	n.l.	n.l.
NHS-POx/RXL-LS	n.l.	n.l.	+	++++
Carbonato de NHS-POx/RXL-HS	n.l.	n.l.	+	++++
Carbonato de NHS-POx/RXL-LS	n.l.	n.l.	+	++++
NHS-POx/NH2-PEG	n.l.	n.l.	++	++
NHS-POx/NU-POx, secuestrado	+++	++	n.l.	n.l.
Granulado de almidón-1	n.l.	n.l.	+++	++
Granulado de almidón-2	n.l.	n.l.	++++	++

Tabla 2

Granulado/Polvo	NHS sin reacción (%)	Recuperación (%)	PDI	Ex vivo	
				Coagulación	Adhesión
Granulado de NHS-POx/NU-POx	98	99	< 1,5	+++	+++
NHS-POx/NU-POx mezclado en seco	99	101	< 1,5	+	+
NHS-POx/NU-POx co-liofilizado	s.d. ^[1]	s.d. ^[1]	s.d. ^[1]	s.d.	s.d.

Granulado de NHS-POx/RXL	98	105	< 1,5	++	+++
NHS-POx/RXL mezclado en seco	100	104	< 1,5	+	+/-
NHS-POx/RXL co-liofilizado	93	81	3,3	-	-
Granulado de NHS-POx/quitosano	93	103	< 1,5	+++	+++
NHS-POx/quitosano mezclado en seco	99	96	< 1,5	+	++
NHS-POx/quitosano co-liofilizado	12	11	5,4	-	+/-
Nota: ^[1] sin determinar (el polvo no era soluble debido al alto grado de reticulación)					

Ejemplo 2

Impregnación de la estructura portadora con los aglomerados de partículas

[0206] Usando agitación mecánica, se impregnaron parches Gelita Tuft-It® (50 x 75 mm, aprox. 0,71 g) con granulado de NHS-POx/NU-POx (1:0,6) teñido de azul. Se usó una máquina de agitación de pintura (VIBA PRO V de Collomix GmbH) para introducir el polvo (aprox. 0,75 g) en el parche. La matriz con el soporte de estructuras portadoras se sujetó en la máquina. La matriz se hizo vibrar en vertical.

[0207] Las muestras impregnadas se pusieron en una placa de PMMA y se colocaron en un horno en el que las muestras se sometieron a diferentes tratamientos térmicos. Para evaluar la fijación del polvo, las muestras se marcaron dos veces sobre la placa de PMMA blanca. Si no se liberaba polvo azul, el resultado se consideraba fijado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Fijación
70	15	sin fijación
70	30	sin fijación
70	60	sin fijación
70	300	sin fijación
75	15	semifijación
75	30	semifijación
80	15	fijación
80	30	fijación
85	15	fijación

[0208] El granulado de NHS-POx/NU-POx es higroscópico. A temperatura ambiente y una humedad relativa (HR) inferior al 40 %, las estructuras portadoras fibrosas se pueden impregnar en media hora de exposición, de manera reproducible. Sin embargo, si la impregnación se realiza, por ejemplo, a una HR del 75 % y a 25 °C, el granulado se vuelve pegajoso en minutos, lo que conduce a características de impregnación no reproducibles y no homogéneas.

Ejemplo 3

[0209] Se impregnaron parches hemostáticos (Gelita Tuft-It®; 50 x 75 mm, aprox. 0,7 g) con el granulado reactivo NHS-POx/NU-POx (1:0,6) previamente descrito. Se distribuyó un gramo del granulado por todos los parches como se describe en el Ejemplo 2. A continuación, los parches hemostáticos se envasaron en bolsas de aluminio que contenían 1 g de sílice y se sellaron al vacío.

[0210] Los parches se cortaron en piezas de 2 cm x 2 cm y se probaron por triplicado en el modelo perfundido de hígado *ex vivo*. El tiempo hasta la hemostasia (TTH) fue de 0 (después de 1 minuto de presión) y no se observó re-hemorragia durante el tiempo de observación de 30 minutos. También se observó que el parche tenía una buena flexibilidad y propiedades de curvado.

[0211] Los parches también se evaluaron en el modelo porcino heparinizado *in vivo*. Se observó que tenían muy buenas propiedades de coagulación y adhesivas. Las hemorragias activas se detuvieron eficazmente en resecciones de diversos órganos: bazo, hígado y riñón. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Órgano	<i>Ex vivo</i>		<i>In vivo</i>	
	Coagulación	Propiedades adhesivas	Coagulación	Propiedades adhesivas
Hígado	++++	+++	++++	+++
Bazo	n.l.	n.l.	++++	+++

Riñón	n.l.	n.l.	++++	+++
-------	------	------	------	-----

Ejemplo 4

[0212] Se impregnaron parches hemostáticos (Gelita Tuft-It®; 50 × 75 mm, aprox. 0,7 g) con NHS-POx/NU-POx/P188 2,5 %. Se distribuyó un gramo del granulado por todos los parches como se describe en el Ejemplo 2. A continuación, los parches hemostáticos se envasaron en bolsas de aluminio que contenían 1 g de sílice y se sellaron al vacío.

[0213] Los parches se evaluaron en el modelo porcino heparinizado *in vivo*. Se observó que tenían muy buenas propiedades de coagulación y suficientes propiedades adhesivas - las propiedades adhesivas reducidas permitieron que el parche se retirara en una pieza en lugar de parches idénticos que no incluían P188. Las hemorragias activas se detuvieron eficazmente en resecciones de diversos órganos: bazo, hígado y riñón. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Órgano	<i>Ex vivo</i>		<i>In vivo</i>	
	Coagulación	Propiedades adhesivas	Coagulación	Propiedades adhesivas
Hígado	n.l.	n.l.	++++	++
Bazo	n.l.	n.l.	++++	++
Riñón	n.l.	n.l.	++++	++

Ejemplo 5

[0214] Se impregnaron mechones de Gelita® (50 × 75 mm, aprox. 0,7 g) con diferentes polvos de polímero reactivo. Las propiedades hemostáticas de los parches así obtenidos se analizaron en los modelos de hemorragia porcinos *ex vivo* e *in vivo* descritos anteriormente en el presente documento.

[0215] Las estructuras portadoras fibrosas se impregnaron con 1,4 g de polvo con ayuda de un dispositivo de agitación neumático. La lámina portadora fibrosa se hizo vibrar en vertical. El motor del tipo de carrera larga (NTK 25 AL L, de Netter Vibration GmbH) se hizo funcionar a 6 bar, 11 Hz y una amplitud de 30 mm. Se usaron cuatro ciclos de 15 segundos para dispersar el polvo en la lámina. Los granulados se distribuyeron a través del grosor completo de las láminas. También la distribución sobre la superficie de las láminas fue homogénea.

[0216] Se pusieron a prueba siete granulados reactivos diferentes. Estos granulados contenían NHS-POx en combinación con un polímero nucleófilo soluble en agua. La preparación de estos granulados se ha descrito anteriormente en el presente documento.

[0217] Los granulados ensayados se enumeran a continuación:

- NHS-POx/Gelita Spon
- NHS-POx/RXL (alto contenido en sal)
- NHS-POx/RXL (alto contenido en sal) que contenía carbonato
- NHS-POx/RXL (bajo contenido en sal)
- NHS-POx/NH₂-PEG

[0218] Las diferentes combinaciones de estructura portadora fibrosa y polvos de polímero reactivo que se analizaron se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Parche	Polímero electrófilo (EP)	Polímero nucleófilo (NP)	Carbonato (C)
1	NHS-POx	Gelita Spon	
2	NHS-POx	NH ₂ -PEG	
3	NHS-POx	RXL-HS	
4	NHS-POx	RXL-LS	
5	NHS-POx	RXL-HS	X

[0219] Los resultados obtenidos con estos parches en los modelos de hemorragia porcinos *ex vivo* e *in vivo* se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

Parche	<i>Ex vivo</i>		<i>In vivo</i>	
	Coagulación	Adhesión	Coagulación	Adhesión
1	++++	++	++++	++
2	n.l.	n.l.	+	+

3	n.l.	n.l.	+	+
4	n.l.	n.l.	+	+
5	n.l.	n.l.	+	+

Ejemplo Comparativo A

5 [0220] Se dispersaron 7,03 g de NHS-POx en 50 mL de diclorometano (DCM). Se formó una mezcla turbia y se añadió lentamente IPA (4 ml) para obtener una solución transparente; se dispersaron 7,00 g de gelatina presecada (Gelita-SPONO, Gelita Medical GmbH) en DCM/IPA (150 ml/12 ml) usando un mezclador de alto cizallamiento que funcionaba a 20 000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió la solución de NHS-POx preparada y la dispersión se agitó a 20 000 r.p.m. durante 5 minutos. Posteriormente, todos los volátiles se eliminaron a presión reducida. El granulado formado se molió usando un molinillo de café, se secó a presión reducida y se selló al vacío en una bolsa de aluminio.

15 [0221] El granulado se analizó usando espectroscopía por RMN de ¹H y cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados obtenidos de este modo mostraron que no estaba presente NHS-POx en el granulado de gelatina/NHS-POx, lo que indica que se había producido la reticulación completa entre NHS-POx y gelatina.

Ejemplo 6

20 [0222] Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto del contenido de NU-POx del granulado reactivo de NHS-POx/NU-POx sobre el rendimiento *in vivo* del parche hemostático.

Método de impregnación

25 [0223] Se impregnaron parches hemostáticos (Gelita Tuft-It®; 50 × 75 mm, aprox. 0,7 g) con gránulos de NHS-POx/NU-POx reactivos preparados mediante granulación con acetona en relaciones molares de 1:0,10, 1:0,20 y 1:0,40, refiriéndose dicha relación molar a la relación del número de grupos NHS proporcionados por NHS-POx al número de grupos amina proporcionados por NU-POx. Los mismos parches hemostáticos también se impregnaron con polvo reactivo de NHS-POx.

30 [0224] Se distribuyó un gramo del granulado/polvo por todos los parches usando la máquina de laboratorio Fibroline SL-Preg. A continuación, los parches hemostáticos se fijaron, secaron y envasaron en bolsas de aluminio que contenían 1 g de sílice y se sellaron al vacío.

Máquina

35 [0225] La máquina de laboratorio Fibroline SL-Preg mueve partículas entre electrodos aplicando voltajes de hasta 40 kV a frecuencias de hasta 200 Hz durante un período de hasta 60 segundos. Las dos placas de electrodo tienen un tamaño de aproximadamente 50x40 cm. La placa superior está conectada a tierra.

40 [0226] Se usaron los siguientes ajustes estándar: 40 kV, 100 Hz, 20 segundos.

Matrices

45 [0227] Los polvos se dosificaron gravimétricamente en una matriz de PMMA impresa en 3D después de que la matriz se hubiera montado en la placa de electrodo inferior. La matriz se llenó con polvos de polímero reactivo usando un cartón de raspado o una espátula de metal. La matriz medía 50 × 75 × 4 mm y contenía 22 x 33 = 726 pocillos cuadrados (dimensiones internas de cada pocillo: 2 × 2 × 2 mm). El volumen combinado de los 726 pocillos era de aproximadamente 5,8 ml.

Separador

50 [0228] Se colocó una máscara separadora encima de la matriz. El separador se usó para permitir que las partículas se movieran hacia arriba y hacia abajo al someterse al campo eléctrico alterno. Si no se usa separador, la penetración y distribución a través del portador es limitada. Para TUFT-IT se trató de una máscara de 3 mm. Esto da como resultado una distancia de 3 + 4 mm = 7 mm de los electrodos.

55 [0229] El rendimiento *in vivo* de los parches hemostáticos que contenían granulado de NHS-POx:NU-POx (0, 10, 20 y 40 por ciento de grupos amina de NU-POx, con el porcentaje calculado en función del número de grupos NHS proporcionados por el polvo de NHS-POx) o NHS-POx se evaluó en un modelo porcino no heparinizado *in vivo*. Los detalles de los parches que se analizaron se muestran en la Tabla 7.

60

Tabla 7

Parche	% molar de amina	NHS-POx: NU-POx (g/g)	Gramos de granulado en el parche
--------	------------------	-----------------------	----------------------------------

1	10	1:0,12	1
2	20	1:0,25	1
3	40	1:0,48	1
4	0	1:0	1

Ensayos *in vivo*

5 [0230] Se llevaron a cabo ensayos en cerdos domésticos hembra adultos (40-50 kg). No se aplicó agente anticoagulante. Se analizó el rendimiento del parche tanto en el bazo como en el hígado. El bazo o el hígado se localizaron y se externalizaron según fuera necesario a medida que progresaba el periodo de ensayo y su humedad natural se mantuvo cubriéndolos con esponjas empapadas en solución salina.

10 [0231] Se crearon diferentes tipos de lesiones:

- Hígado: Abrasiones, biopsias con sacabocados y resecciones
- Bazo: Resecciones

15 [0232] Se sometió a abrasión/biopsia con sacabocados una sección del parénquima hepático de tamaño apropiado para provocar hemorragias moderadas a graves. Las abrasiones hepáticas se crearon mediante bisturí y una plantilla de 1 × 1 cm² y las lesiones circulares usando un sacabocados de biopsia circular de 8 mm. Se crearon resecciones de hígado y bazo usando un bisturí quirúrgico.

20 [0233] El parche se aplicó inmediatamente después de la resección o escarificación del tejido:

- Trozos de 2 × 2 cm para las biopsias con sacabocados y abrasiones
- Parche completo de 7,5 × 5 cm para las resecciones

25 [0234] Los parches analizados se aplicaron sobre el tejido sangrante y se comprimieron suavemente por compresión usando una gasa prehumedecida con solución salina. Se aplicó taponamiento durante un período inicial de 10 segundos seguido de intervalos de 30 segundos posteriores hasta un total de 5 minutos.

[0235] Se usó como referencia un parche de TUFT-IT que no se había impregnado (denominado TUFT-IT).

30 [0236] Los resultados de los ensayos *in vivo* se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8

	Tiempo medio hasta la hemostasia (en segundos)			
	Abrasión del hígado	Biopsia con sacabocados del hígado	Resección del hígado	Resección del bazo
Parche 1	10	10	10	10
Parche 2	10	10	10	10
Parche 3	10	10	10	80
Parche 4	10	80	75	165
TUFT-IT	135	165	210	225

35 [0237] Los parches 1 a 4 mostraron una adhesión al tejido muy fuerte, mientras que solo se observó una adhesión leve para el parche TUFT-IT.

[0238] Los parches 1 y 2 no mostraron más que un hinchamiento muy limitado después de la aplicación. Los parches 3 a 4 mostraron un hinchamiento mayor, pero aceptable.

40 **Ejemplo 7**

[0239] Se impregnaron parches hemostáticos (Gelita Tuft-It®; 50 × 75 mm, aprox. 0,7 g) con una solución de NHS-POx, polvo de NHS-POx o granulado de NHS-POx/NU-POx. El granulado de NHS-POx/NU-POx usado se preparó mediante granulación con acetona en una relación molar de 1:0,20 (véase el Ejemplo 8).

45 [0240] Se preparó una solución para pulverización que contenía NHS-POx disolviendo NHS-POx en una mezcla 1:1 de alcohol isopropílico y diclorometano (200 g/l). Los parches se impregnaron con 5 ml de esta solución de pulverización usando un pulverizador de laboratorio de vidrio y aire presurizado en un único ciclo de pulverización. La cantidad total de NHS-POx suministrada de esta manera fue de 1 gramo por parche. Después de la impregnación, los parches se dejaron secar dentro de un horno a 40 °C durante 2 horas, después de lo cual se almacenaron en un desecador durante 2 días antes de envasarlos en bolsas de aluminio que contenían 1 g de sílice y sellarlos al vacío.

[0241] Además, los parches se impregnaron con 1 gramo de polvo de NHS-POx o 1 gramo del granulado de NHS-POx/NU-POx usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 8.

5 [0242] El rendimiento de los parches preparados de este modo se sometió a prueba por triplicado en el modelo perfundido de hígado *in vivo* en condiciones de hemorragia leve (<20 ml/min) y grave (>50 ml/min). Con una herramienta de abrasión plana, redonda y giratoria se creó una herida de hemorragia circular (8 mm de diámetro) en la superficie del hígado, con un recubrimiento de caucho de modo que la profundidad de la hemorragia perforado fuera siempre de 3 mm. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

10

Tabla 9

Tipo de impregnación	<i>Ex vivo</i>			
	<i>hemorragia leve</i>		<i>Hemorragia grave</i>	
	Capacidad hemostática	Propiedades adhesivas	Capacidad hemostática	Propiedades adhesivas
Granulado de NHS-POx/NU-POx	++++	++++	++++	++++
Polvo de NHS-POx	+++	++++	+	++++
Solución de NHS-POx	-	+/-	sin analizar	sin analizar

Ejemplo 8 (no según la invención reivindicada)

15 [0243] Se prepararon polvos hemostáticos mezclando granulado de NHS-POx/NU-POx con un polvo de almidón hemostático (Arista™ AH, de BARD). El granulado de NHS-POx/NU-POx usado se preparó mediante granulación con acetona en una relación molar de 1:0,20 (véase el Ejemplo 8).

20 [0244] El granulado de NHS-POx/NU-POx se mezcló en un mortero con el polvo de almidón en una proporción de 80/20 y 90/10 p/p.

25 [0245] La capacidad de formación de gel de estas mezclas de polvo, el polvo de almidón puro y el granulado de NHS-POx/NU-POx puro se evaluó de la siguiente manera:

- Se cargaron 20 mg de muestra de polvo en tubos de ensayo
- Se añadieron 250 µl de sangre de oveja heparinizada y la mezcla se agitó inmediatamente durante 10 segundos usando un mezclador de vórtice
- Después de 2 minutos, los tubos de ensayo se colocaron boca abajo para determinar si se había formado un gel
- En caso de que se hubiera formado un gel, se añadió 1 ml de agua al gel y después de 30 minutos se determinó si el gel seguía intacto.

30

[0246] Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Material	Gel (250 µl de sangre)	Estabilidad en agua
almidón (20 mg)	No	s.d.
almidón (200 mg)	Sí	No
NHS-POx/NU-POx (20 mg)	Sí	Sí
NHS-POx/NU-POx (2 mg)	Sí	Sí
almidón + 10 % NHS-POx/NU-POx (20 mg)	Sí	Sí
almidón + 20 % NHS-POx/NU-POx (20 mg)	Sí	Sí

35

REIVINDICACIONES

1. Lámina hemostática flexible biocompatible que comprende:

- 5
- una estructura portadora fibrosa cohesiva que comprende un espacio intersticial interconectado tridimensional; y
 - distribuido dentro del espacio intersticial, un polvo hemostático que comprende al menos un 10 % en peso de aglomerados de partículas, donde dichos aglomerados de partículas tienen un diámetro en el intervalo de 1-500 μm y que comprende:

- 10
- (a) partículas electrófilas de polioxazolina que contienen polioxazolina electrófila que lleva al menos 3 grupos electrófilos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina en la sangre mediante la formación de un enlace covalente; y
 - (b) partículas poliméricas nucleófilas que contienen un polímero nucleófilo soluble en agua que lleva al menos 3 grupos nucleófilos reactivos que, en presencia de agua, son capaces de reaccionar con los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila mediante la formación de un enlace covalente entre la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo.
- 15

20 2. Lámina hemostática según la reivindicación 1, donde la lámina hemostática es bioabsorbible.

3. Lámina hemostática según la reivindicación 1 o 2, donde la lámina hemostática tiene una densidad no comprimida de menos de 200 mg/cm^3 , preferiblemente de menos de 150 mg/cm^3 y, más preferiblemente, de 10-100 mg/cm^3 .

25 4. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la lámina hemostática tiene una capacidad de absorción de agua de al menos el 50 %, preferiblemente del 100 % al 800 %.

30 5. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las fibras de la estructura portadora fibrosa tienen un diámetro medio de 1-500 μm , preferiblemente de 2-300 μm y, de la manera más preferible, de 5-200 μm .

35 6. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la estructura portadora fibrosa comprende al menos un 50 % en peso, preferiblemente al menos un 80 % en peso y, más preferiblemente, al menos un 90 % en peso de fibras que contienen gelatina, colágeno, celulosa, celulosa modificada, carboximetildextrano, PLGA, hialuronato de sodio/carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, quitosano o una combinación de estos.

40 7. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polvo hemostático está presente en la lámina hemostática en una cantidad del 5-90 %, preferiblemente del 10-80 %, más preferiblemente, del 20-75 % en peso de la estructura portadora fibrosa.

45 8. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero nucleófilo se selecciona de entre proteína, quitosano, polioxazolina nucleófila, polietilenglicol nucleófilo, polietilenimina y combinaciones de estos.

9. Lámina hemostática según la reivindicación 8, donde el polímero nucleófilo se selecciona de entre gelatina, colágeno y combinaciones de estos, preferiblemente donde el polímero nucleófilo es gelatina, más preferiblemente donde el polímero nucleófilo es gelatina reticulada.

50 10. Lámina hemostática según la reivindicación 8, donde el polímero nucleófilo es polioxazolina nucleófila.

11. Lámina hemostática según la reivindicación 8, donde el polímero nucleófilo es quitosano.

55 12. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la polioxazolina electrófila contiene al menos 8 grupos electrófilos reactivos.

60 13. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los grupos electrófilos reactivos de la polioxazolina electrófila se seleccionan de entre ésteres del ácido carboxílico, ésteres de sulfonato, ésteres de fosfonato, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de p-nitrotiofenilo, grupos haluro de ácido, anhídridos, cetonas, aldehídos, isocianato, tioisocianato, isociano, epóxidos, grupos hidroxilo activados, olefinas, éteres glicidílicos, carboxilo, ésteres de succinimidilo, ésteres de sulfosuccinimidilo, maleimido (maleimidilo), etenosulfonilo, imido ésteres, acetoacetato, haloacetal, disulfuro de ortopiridilo, derivados de dihidroxifenilo, vinilo, acrilato, acrilamida, yodoacetamida y combinaciones de estos

14. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los aglomerados de partículas contienen al menos un 10 % en peso de la polioxazolina electrófila y al menos un 10 % en peso del polímero nucleófilo.
- 5 15. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la combinación de la polioxazolina electrófila y el polímero nucleófilo constituye al menos el 50 % en peso de los aglomerados de partículas.
- 10 16. Lámina hemostática según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la relación entre el número total de grupos electrófilos reactivos proporcionados por la polioxazolina electrófila y el número total de grupos nucleófilos reactivos proporcionados por el polímero nucleófilo está en el intervalo de 1:1,5 a 1,5:1.