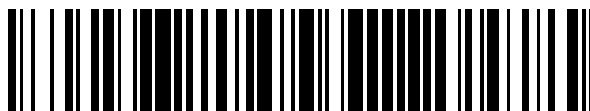


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 977**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)
A61K 31/722 (2006.01)
C08K 11/00 (2006.01)
C08K 3/00 (2008.01)
C08K 3/16 (2006.01)
C08K 5/521 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2010** **PCT/CA2010/001842**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011** **WO11060544**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010** **E 10831000 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2501754**

54 Título: **Formulación novedosa de mezclas de soluciones fisiológicas de quitosano-sal inorgánica/sangre para la reparación de tejidos**

30 Prioridad:

19.11.2009 US 262786 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

ORTHO REGENERATIVE TECHNOLOGIES INC.
(100.0%)
16667 Hymus Boulevard
Kirkland, QC H9H 4R9 , CA

72 Inventor/es:

OUYANG, WEI;
BUSCHMANN, MICHAEL D;
HOEMANN, CAROLINE;
LAVERTU, MARC y
CHEVRIER, ANIK

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 688 977 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

Formulación novedosa de mezclas de soluciones fisiológicas de quitosano-sal inorgánica/sangre para la reparación de tejidos

5

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente descripción se refiere a una composición novedosa que comprende mezclas de sangre/quitosano-sal inorgánica en la que las soluciones fisiológicas de quitosano-sal inorgánica mezcladas con
10 sangre se solidifican más rápidamente que las soluciones de quitosano- β -glicerol fosfato con quitosanos de pesos moleculares específicos.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 [0002] El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por D-glucosamina (unidad desacetilada) ligada a β -(1-4) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), que se produce principalmente a partir de la desacetilación alcalina de quitina. El quitosano puede existir en muchas conformaciones estructurales, dependiendo de una diversidad de factores que incluyen el grado de hidratación, el entorno de electrolitos y la complejidad de la mezcla original de quitina. El quitosano y sus derivados amino sustituidos son polímeros catiónicos bioerosionables, biocompatibles y
20 biodegradables que han sido avanzados para una amplia diversidad de aplicaciones, incluyendo ingeniería tisular, administración de fármacos y genes, formulación farmacéutica, armazones para el crecimiento celular y encapsulación de células, cicatrización de heridas y hemostasia superficial.

[0003] Una propiedad bien conocida de quitosano es su solubilidad a pH ácido (<6) e insolubilidad a pH neutro, lo
25 que hace que su uso en solución con células vivas y tejidos sea problemático. Diversas publicaciones (Chenite, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO99/07416; Chenite y col., 2000, Biomater., 21:2155-2161 ; Chenite y col., 2001, Carbohydr. Polym., 46:39-47) describen que mezclar una sal dibásica de poliol-fosfato, es decir, glicerol fosfato (GP), con una solución acuosa de quitosano puede aumentar el pH de la solución mientras se evita la precipitación del polímero. En presencia de estas sales particulares, las soluciones de quitosano de concentración
30 sustancial (0,5-3 %) y alto peso molecular (> varios cientos de kDa) permanecen líquidas, a temperatura ambiente o baja, durante un largo período de tiempo con una región de pH neutro fisiológicamente aceptable entre 6,8 y 7,2. Estas soluciones de quitosano y glicerol fosfato que pueden gelificar con un calentamiento suave (por ejemplo, de 4 a 37 °C), son biocompatibles, biodegradables y adhesivos para los tejidos humanos, proporcionan nuevas oportunidades en la administración de productos terapéuticos sensibles.

35

[0004] Las composiciones que contienen sangre y quitosano se han descrito anteriormente (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 7.148. 209 cuyo contenido se adjunta a este documento por referencia). El quitosano es conocido por ser un polímero trombogénico (por ejemplo, puede acelerar la coagulación de la sangre). Las soluciones de quitosano-GP se combinaron con sangre completa periférica de oveja para formar una mezcla trombogénica que
40 se solidificó y se adhirió a un defecto de cartílago de espesor completo mediante el uso de un modelo de reparación de ovejas. Los resultados obtenidos mostraron que la solidificación de un implante de quitosano-glicerol fosfato/sangre en defectos de microfractura mejoró la reparación del cartílago en comparación con la microfractura sola al aumentar la cantidad de tejido y mejorar su composición bioquímica y organización celular (Hoemann y col., 2005, J. Bone Joint Surg., 87A:2671-2686). Se desarrolló un modelo de reparación bilateral de cartílago de conejo para estudiar el efecto
45 de los implantes de quitosano-GP/sangre en la reparación del cartílago después de la estimulación medular. Los resultados mostraron que el quitosano-GP estabilizó estructuralmente los coágulos de sangre al inhibir la retracción del coágulo. El tratamiento del defecto perforado con coágulos de quitosano-GP/ sangre condujo a la formación de tejido de reparación hialino más integrado por encima de una placa ósea subcondral más porosa y vascularizada en comparación con la perforación sola (Hoemann y col., 2007, Osteoarthritis & Cartilage, 15:78-89).

50

[0005] Los implantes de quitosano-GP/sangre también aumentan el reclutamiento celular, la vascularización transitoria, la remodelación subcondral y modulan el fenotipo celular inflamatorio y reparador sugiriendo que estos eventos son en parte responsables de aumentar la cantidad y calidad de la zona tisular de reparación (Chevrier y col., 2007, Osteoarthritis & Cartilage, 15:316-327; Hoemann y col., 2010, Am. J. Sports Med., 38, 9:1845-56). La
55 ultraestructura y el detalle composicional de los coágulos de quitosano-GP/sangre, quitosano-GP solo y coágulos que contienen sangre completa solo se investigaron mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA) junto con análisis de rayos X de energía dispersiva (EDS) (Iliescu y col., 2007, Microsc. Res. Tech., 71:236-247). Se mostró que el quitosano formaba una estructura de red tanto en el gel de quitosano-GP como en los coágulos de quitosano-GP/sangre. Sin embargo, esta estructura fue alterada por la fijación de aldehído para producir agregados artificiales
60 de micropartículas de quitosano. El análisis EDS mostró que la mayoría del glicerol fosfato puede difundirse libremente desde el gel de quitosano-GP. También se investigaron los mecanismos de solidificación de los implantes de quitosano-glicerol fosfato/sangre. Los resultados mostraron que los implantes de quitosano-GP/sangre se solidifican

a través de los mecanismos de coagulación que implican la generación de trombina, la activación plaquetaria y la polimerización de fibrina. Los factores de coagulación se pueden usar para acortar el tiempo de solidificación *in situ* de los implantes de quitosano-GP/sangre en los defectos del cartílago microperforado (Marchand y col., 2009, Osteoarthritis & Cartilage, 17:953-960). Sin embargo, para facilitar su uso en la clínica, el tiempo de coagulación de la
5 composición de sangre/quitosano debe acortarse.

- [0006]** Todavía existe la necesidad de un implante mejorado de sangre/quitosano que se solidifique más rápido que las soluciones de implantes conocidas de quitosano-GP/sangre. Sería muy conveniente contar con implantes de sangre/quitosano de coagulación rápida para la reparación de tejidos.
- 10 El documento WO 02/00272 describe una composición y un procedimiento para la reparación y regeneración de cartílago y otros tejidos. El documento WO 2006/015178 describe un sistema de encapsulación del factor de crecimiento para potenciar la formación ósea.
- 15 Chang y col., BioMedical Engineering, vol. 21 (2), abril de 2009, páginas 15-122, describe la evaluación de compuestos de microesferas de plasma rico en plaquetas/quitosano/CaSO₄ como material de osteogénesis de alveolo.
- Chevrier y col., Osteoarthritis and Cartilage, vol. 15 (3), 15 de febrero de 2007, páginas 316-327, informa que los implantes de quitosano-glicerol fosfato/sangre aumentan el reclutamiento celular, la vascularización transitoria y la remodelación del hueso subcondral en los defectos del cartílago perforado.
- 20 Marchand y col., Osteoarthritis and Cartilage, vol. 17 (7), 1 de julio de 2009, páginas 953-960, describe los mecanismos de solidificación de un implante de quitosano-glicerol fosfato/sangre para la reparación del cartílago articular.

[0007] Ahora se proporciona una composición polimérica que comprende un componente sanguíneo, un polímero y un ácido inorgánico. Dicha composición polimérica es útil en la reparación de un tejido en un sujeto.

- 25 **[0008]** Según un primer aspecto, la presente solicitud proporciona una composición polimérica que comprende un componente sanguíneo, un polímero y al menos una sal inorgánica, así como una composición polimérica que consiste esencialmente en un componente sanguíneo, un polímero y al menos una sal inorgánica. En una realización, la composición polimérica comprende además o contiene un ácido mineral o un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico y/o ácido bromhídrico.
- 30 En una realización, el polímero es quitosano, quitina, hialuronano, glicosaminoglicano, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, sulfato de dermatano, heparina y/o sulfato de heparina. En otra realización, la sal inorgánica es sal de sodio, sal de cloruro, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de fosfato, sal de sulfato y/o sal de carboxilato. En otra realización más, la al menos una sal inorgánica es NaCl, KCl, CsCl, CaCl₂, CsF, KClO₄, NaNO₃, y/o CaSO₄.
- 35 En aún otra realización, el componente sanguíneo es sangre completa, sangre procesada, sangre venosa, sangre arterial, sangre de hueso, sangre de médula ósea, médula ósea, sangre de cordón umbilical y/o sangre de placenta. En aún otra realización, la composición es un gel. En otra realización, el componente sanguíneo se coagula. En otra realización, la composición polimérica tiene un pH entre 6,0 y 7,8, entre 6,2 y 6,7 o de 6,6. En otra realización más, la composición polimérica tiene una osmolalidad entre 200 mOsm/kg y 600 mOsm/kg, entre 326 mOsm/kg y 356 mOsm/kg, o de 354 mOsm/kg. En aún otra realización, el polímero es quitosano con un grado de desacetilación (DDA)
- 40 entre 20 % a 100 % o entre 76 % y 98 %. En otra realización, el polímero es quitosano con un peso molecular promedio en número (M_n) entre 1 kDa y 10 MDa o entre 2,7 kDa y 298 kDa. En aún otra realización, la relación componente sanguíneo: polímero es de 3:1 (v/v).

- [0009]** Según un segundo aspecto, la presente solicitud proporciona una composición polimérica que comprende
45 quitosano, ácido clorhídrico, NaCl y un componente sanguíneo y una composición polimérica que consiste esencialmente en quitosano, ácido clorhídrico, NaCl y un componente sanguíneo. En una realización, la composición polimérica se prepara con una solución de quitosano que tiene una concentración de quitosano de aproximadamente 1,62 % p/p. En otra realización, la composición polimérica se prepara con una solución de ácido clorhídrico que tiene una concentración de ácido clorhídrico de aproximadamente 38 mM. En aún otra realización, la composición polimérica
- 50 se prepara con una solución de NaCl que tiene una concentración de NaCl de aproximadamente 160 mM. Se han presentado diversas realizaciones con respecto al pH y osmolalidad de la composición del polímero y se aplican en este documento. Se han presentado diversas realizaciones del grado de quitosano y el peso molecular y se aplican en este documento. Se han presentado diversas realizaciones del componente sanguíneo y se aplican en este documento.

- 55 **[0010]** Según un tercer aspecto, la presente solicitud proporciona un procedimiento para reparar un tejido en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de introducir en dicho tejido una composición polimérica como se define en este documento de modo que la composición polimérica se adhiere al tejido y promueve la proliferación celular para reparar el tejido. En una realización, el tejido se selecciona de entre el grupo que consiste
- 60 en cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, tejidos maxilofaciales, tejidos temporomandibulares, abscesos, tumores resecados y úlceras.

[0011] Según un cuarto aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de una composición polimérica como se define en este documento para reparar un tejido de un sujeto, en el que la composición polimérica se adhiere al tejido y promueve la proliferación celular para reparar el tejido, así como el uso de una composición polimérica como se define en este documento en la fabricación de un medicamento para reparar un tejido de un sujeto, en el que la composición polimérica se adhiere al tejido y promueve la proliferación celular. En una realización, el tejido se selecciona de entre el grupo que consiste en cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, tejidos maxilofaciales, tejidos temporomandibulares, abscesos, tumores resecados y úlceras.

[0012] Según un quinto aspecto, la presente solicitud proporciona una composición polimérica como se define en este documento para reparar un tejido en un sujeto, en el que la composición polimérica se adhiere al tejido y promueve la proliferación celular. En una realización, el tejido se selecciona de entre el grupo que consiste en cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, tejidos maxilofaciales, tejidos temporomandibulares, abscesos, tumores resecados y úlceras.

[0013] Según un sexto aspecto, la presente solicitud proporciona un procedimiento para preparar una composición polimérica para reparar un tejido en un sujeto. En términos generales, el procedimiento comprende (o consiste esencialmente en) la etapa de: disolver el quitosano en HCl para proporcionar una mezcla de quitosano-HCl; añadir una solución de NaCl a la mezcla de quitosano-HCl para proporcionar una mezcla de quitosano-HCl-NaCl; y mezclar al menos un componente sanguíneo con la mezcla de quitosano-HCl-NaCl para proporcionar la composición polimérica. En una realización, el quitosano se disuelve en HCl calentando a una temperatura de 60 °C. En una realización adicional, la concentración de quitosano en la mezcla de quitosano-HCl-NaCl es de aproximadamente 1,62 % p/p de quitosano, la concentración de ácido clorhídrico en la mezcla de quitosano-HCl-NaCl es de aproximadamente 38 mM de ácido clorhídrico y/o la concentración de NaCl en la mezcla de quitosano-HCl-NaCl es de aproximadamente 160 mM. Diversas realizaciones del componente sanguíneo, el pH de la composición polimérica, la osmolalidad de la composición polimérica, el polímero, el quitosano y la sal inorgánica se han descrito y se aplican en este documento.

[0014] En una realización particular, la composición polimérica comprende 1,62 % p/p de quitosano, 38 mM de ácido clorhídrico y 160 mM de NaCl mezclado con sangre.

[0015] También se proporciona en este documento un procedimiento para reparar un tejido de un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de introducir en el tejido una composición de gel polimérico como se define en este documento tal que la composición se adhiere al tejido y promueve el reclutamiento celular y otros eventos para reparar el tejido. La composición se puede colocar o inyectar en un sitio del cuerpo en el que la mezcla ayuda a la reparación, regeneración y reconstrucción del tejido.

[0016] En una realización, el tejido se selecciona de entre el grupo que consiste en cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, tejidos maxilofaciales, tejidos temporomandibulares, abscesos, tumores resecados y úlceras.

[0017] También se proporciona en este documento un procedimiento para preparar una composición polimérica para reparar tejidos en un sujeto, comprendiendo el procedimiento las etapas de disolver el quitosano en HCl; añadir una solución de NaCl a la mezcla de quitosano-HCl; y mezclar al menos un componente sanguíneo con el quitosano-HCl-NaCl.

[0018] En una realización adicional, el quitosano se disuelve en HCl calentando a 60 °C durante aproximadamente 2 horas.

[0019] También se proporciona en este documento el uso de la composición como se define en este documento para reparar un tejido de un paciente y/o en la fabricación de un medicamento para reparar un tejido de un paciente, en el que la composición se adhiere al tejido y promueve la proliferación celular para la reparación del tejido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] Ahora se hará referencia a los dibujos adjuntos.

La Figura 1 es un histograma del tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano, preparado con el peso molecular promedio en número de quitosano (M_n) de 75 kDa; 79 % de DDA, que muestra que todas las mezclas de sangre/quitosano se coagularon en 15 minutos y que las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl se coagularon más rápido que las mezclas de sangre/quitosano-HCl- β GP (β glicerol fosfato) en 3 de 4 conejos.

La Figura 2 es un histograma de la resistencia mecánica de sangre/quitosano-HCl-NaCl y coágulos de sangre/quitosano-HCl-βGP preparados con quitosano M_n 75 kDa; 79 % de DDA con sangre de cuatro conejos diferentes.

La Figura 3 es un histograma del tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano, preparado con quitosano M_n 2,7 kDa; 98 % de DDA, que muestra que todas las mezclas de sangre/quitosano se coagularon en 18 minutos y que las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl se coagularon más rápido que las mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP.

La Figura 4 es un histograma de la resistencia mecánica de sangre/quitosano-HCl-NaCl y coágulos de sangre/quitosano-HCl-βGP preparados con quitosano M_n 2,7 kDa; 98 % de DDA por triplicado.

La Figura 5 es un histograma del tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano, preparado con quitosano M_n 75 kDa; 79 % de DDA, que muestra que todas las mezclas de sangre/quitosano se coagularon en 13 minutos y que las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl se coagularon más rápido que las mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP.

La Figura 6 es un histograma de la resistencia mecánica de sangre/quitosano-HCl-NaCl y coágulos de sangre/quitosano-HCl-βGP preparados con quitosano M_n 75 kDa; 79 % de DDA por triplicado.

La Figura 7 es un histograma del tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano, preparado con quitosano M_n 232 kDa; 81 % de DDA, que muestra que todas las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl y sangre/quitosano-HCl-βGP se coagularon en 7 minutos.

La Figura 8 es un histograma de la resistencia mecánica de sangre/quitosano-HCl-NaCl y coágulos de sangre/quitosano-HCl-βGP de sangre preparado con quitosano M_n 232 kDa; 81 % de DDA por triplicado.

La Figura 9 es un histograma del tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano, preparado con quitosano M_n 298 kDa; 76 % de DDA, que muestra que todas las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl y sangre/quitosano-HCl-βGP se coagularon en 7 minutos.

La Figura 10 es un histograma de la resistencia mecánica de sangre/quitosano-HCl-NaCl y coágulos de sangre/quitosano-HCl-βGP preparado con quitosano M_n 298 kDa; 76 % de DDA por triplicado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0021] Se proporciona una composición polimérica novedosa que comprende un componente sanguíneo, un polímero y al menos una sal inorgánica. También se proporcionan usos y procedimientos relacionados. En una realización, dicha composición puede usarse para reparar un tejido en un sujeto. En otra realización más, dicha composición se puede usar para limitar el tiempo asociado con la coagulación de la sangre en una composición de quitosano.

[0022] La composición polimérica comprende un polímero, tal como, por ejemplo, quitosano, quitina, hialuronano, glicosaminoglicano, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, sulfato de dermatano, heparina y sulfato de heparina. El polímero debe ser capaz de formar un gel y usarse para el tratamiento de la reparación de tejidos.

[0023] La composición polimérica también comprende un componente sanguíneo. En este documento se contempla cualquier componente sanguíneo, tal como sangre completa, sangre procesada, sangre venosa, sangre arterial, sangre de hueso, sangre de médula ósea, médula ósea, sangre de cordón umbilical o sangre de placenta. En una realización, el componente sanguíneo se deriva de sangre completa para enriquecerse o agotarse para un componente sanguíneo específico. En una realización preferida, la relación de mezcla entre el componente sanguíneo y el polímero es de aproximadamente 3:1.

[0024] La composición polimérica también comprende al menos una sal inorgánica. En una realización preferida, se usa NaCl. Como alternativa, cualquier sal inorgánica, incluyendo sodio, cloruro, potasio, calcio, magnesio, fosfato, sulfato, sal de carboxilato, tales como KCl, CsCl, CaCl₂, CsF, KClO₄, NaNO₃ y CaSO₄ también se contemplan en este documento.

[0025] La composición polimérica puede comprender además un ácido, tal como un ácido mineral o un ácido orgánico. El ácido se usa para disminuir el pH de la composición para facilitar la disolución del quitosano. En una realización preferida, se usa HCl como el ácido. Como alternativa, también podrían usarse ácido acético, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido fluorhídrico o ácido bromhídrico.

[0026] En otra realización, la composición polimérica consiste esencialmente en un componente sanguíneo, un polímero y al menos una sal inorgánica. Dicha composición polimérica no contiene componentes adicionales que participen en la formación del gel o la coagulación de la sangre (tales como productos de coagulación, por ejemplo) pero pueden contener otros componentes tales como un ácido (para facilitar la disolución del quitosano), conservantes, etc.

[0027] Se describe específicamente en este documento la formulación de quitosano y un componente sanguíneo, en condiciones fisiológicas (pH, osmolalidad). En pocas palabras, las soluciones de quitosano-HCl-NaCl se mezclan con sangre, para crear sangre/quitosano-HCl-NaCl. Las composiciones de sangre/quitosano-HCl-NaCl son capaces de formar un gel. Además, el componente sanguíneo en la sangre/quitosano-HCl-NaCl es capaz de coagularse para formar un implante para la reparación de los tejidos. Además, cuando se usa el quitosano que tiene un peso molecular promedio en número menor que M_n 232 kDa, las soluciones de quitosano-HCl-NaCl mezcladas con sangre descrita en este documento se coagula más rápido que las soluciones de quitosano-HCl- β GP.

[0028] Se muestra una realización preferida en el Ejemplo 1 en el que se preparó una formulación novedosa de solución fisiológica de quitosano-HCl-NaCl con quitosano M_n 75 kDa; 79 % de DDA y se mezcló con sangre completa. Las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl se coagularon más rápido que las mezclas de sangre/quitosano-HCl- β GP para crear implantes de sangre/quitosano de coagulación rápida para la reparación de los tejidos.

[0029] Una solución de quitosano (1,62 % p/p)-HCl (38 mM)-NaCl (160 mM) a pH de 6,50 y osmolalidad de 354 mOsm/kg, y una solución de quitosano (1,62 % p/p)-HCl (71 mM)- β GP (2,15 % p/p) a pH de 6,65 y osmolalidad de 334 mOsm/kg (Tabla 1) se mezclaron con sangre completa de conejo fresca. Para preparar coágulos de quitosano/sangre, inmediatamente después de la recolección de sangre completa, se mezcló un volumen de 900 μ l de sangre completa en un tubo criogénico que contenía 300 μ l de solución de quitosano-HCl-NaCl al 1,62 % (o solución de quitosano-HCl- β GP al 1,62 %) y tres bolas de acero inoxidable de 0,39 g. La mezcla se agitó a mano durante 10 segundos (la relación de mezcla de sangre a quitosano fue de 3 a 1).

[0030] Se transfirieron 250 μ l en 3 tubos de vidrio a 37 °C con una jeringa de 1 ml para preparar 3 coágulos (implantes). Se usó un coágulo para probar el tiempo de coagulación y se fijó inmediatamente después de coagularse, el segundo coágulo se usó para probar el tiempo de coagulación y se fijó a los 60 minutos después del mezclado, y el tercer coágulo se usó para probar el tiempo de coagulación y la resistencia mecánica después de 60 minutos.

[0031] Los resultados del tiempo de coagulación (Tablas 2-5 y Figura 1) mostraron que todas las mezclas de sangre/quitosano preparadas con quitosano M_n 75 kDa; 79 % de DDA coagularon en 15 minutos (de 6 minutos a 15 minutos). En 3 de 4 conejos, el tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl fue menor que el tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl- β GP ($p < 0,05$). En el mejor de los casos, el tiempo de coagulación se acortó en un factor de 2. Los resultados de resistencia mecánica (Tabla 6 y Figura 2) demostraron que todos los coágulos de la mezcla de sangre fresca/quitosano eran gel firme y elástico, la resistencia mecánica de todos los coágulos se puntuó como "++++".

[0032] Después de 60 minutos, algo de suero emanaba de los coágulos (Tabla 6). Los resultados de la evaluación de la homogeneidad se muestran en la Tabla 7.

[0033] Otra realización se muestra en el Ejemplo 2, en el que se usaron quitosanos de diferentes pesos moleculares M_n para preparar una formulación novedosa de mezclas fisiológicas de quitosano-HCl-NaCl (Tabla 8). Mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl coagularon más rápido que las mezclas de sangre/quitosano-HCl- β GP cuando el quitosano tiene un peso molecular promedio en número $M_n < 232$ kDa para crear implantes de sangre/quitosano-HCl-NaCl de coagulación rápida con buena resistencia mecánica para la reparación de tejidos (Tablas 9-12 y Figuras 3-6). Los quitosanos con pesos moleculares promedios en número $M_n > 232$ kDa también se usaron para preparar una formulación novedosa de mezclas fisiológicas de quitosano-HCl-NaCl que coagularon en 7 minutos para crear implantes de sangre/quitosano de rápida coagulación con buena resistencia mecánica (Tablas 13-16 y Figuras 7-10).

[0034] Después de 60 minutos, algo de suero emanaba de los coágulos y los resultados de la evaluación de la homogeneidad se muestran en la Tabla 17.

[0035] Por lo tanto, se demuestra en este documento que mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl coagulaban más rápido que las mezclas de sangre/quitosano- β GP cuando el quitosano tenía un peso molecular $M_n < 232$ kDa para crear coágulos de sangre/quitosano (implantes) con buenas propiedades mecánicas. Los quitosanos con un peso molecular promedio en número $M_n > 232$ kDa también se usaron para preparar mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl que se coagularon para crear coágulos de sangre/quitosano (implantes) con buenas propiedades mecánicas. Por lo tanto, estas soluciones pueden ser alternativas a la solución actual de quitosano-HCl- β GP conocida en la técnica con la ventaja de solidificarse más rápidamente.

[0036] Las composiciones descritas en este documento se pueden usar para mejorar la reparación y para regenerar tejidos cartilaginosos y otros tejidos que incluyen, sin limitación, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, abscesos, tumores resecados y úlceras.

[0037] También se contempla en este documento el uso de las composiciones poliméricas descritas en este documento que pueden colocarse o inyectarse en un sitio corporal en el que la mezcla ayuda a la reparación, regeneración, reconstrucción o acumulación de tejidos. Los tejidos reparados incluyen, por ejemplo, sin limitación, cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, abscesos, tumores resecados y úlceras. El tejido que puede repararse o regenerarse es, por ejemplo, sin limitación cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejido periodontal, abscesos, tumores resecados o úlceras. En algunos casos, el sitio de introducción en el cuerpo puede prepararse quirúrgicamente para eliminar los tejidos anormales. Dicho procedimiento se puede hacer agujereando, erosionando o perforando en regiones de tejidos adyacentes o regiones vascularizadas para crear canales para que la composición polimérica migre al sitio que requiere la reparación.

[0038] La presente descripción se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar realizaciones en lugar de limitar su alcance.

EJEMPLO 1

Formulación y caracterización de mezclas de sangre fresca/solución fisiológica de quitosano (sangre de conejo)

1-Preparación de solución de quitosano (1,62 % p/p)-HCl (38 mM)-NaCl (160 mM); sin NaOH, pH: 6,6; volumen total: 10,0 ml

[0039] Se pesaron 0,180 g de quitosano (grado de desacetilación o DDA = 79 % y peso promedio en número o M_n = 75 kDa) en un vaso de precipitados de 20 ml. Se añadió H_2O al vaso de precipitados hasta que el peso de quitosano + H_2O = 9,34 g. Se añadió una barra de agitación magnética al vaso de precipitados y la solución se agitó durante aproximadamente 10 minutos con el fin de hidratar el polvo de quitosano tanto como fuera posible. Se añadieron 0,38 ml de HCl 1 N (Sigma, Producto n.º 318949) a la solución con agitación moderada. El vaso de precipitados se cubrió con parafilm™, y la solución se calentó a aproximadamente 60 °C durante 2 horas, se agitó durante una noche hasta que se disolvió por completo. Se añadieron 0,32 ml de solución de NaCl 5N (Sigma, producto n.º S-9888) al vaso de precipitados y se mezclaron. El pH obtenido de la solución de quitosano fue fisiológico a 6,5 y la osmolalidad también fue fisiológica a 354 mOsm/kg (Tabla 1).

2- Preparación de solución de quitosano (1,62 % p/p)-HCl (71 mM)-βGP (2,15 %), pH: 6,6, volumen total: 9,0 ml

[0040] Se pesaron 0,162 g de quitosano (grado de desacetilación o DDA = 79 % y peso promedio en número o M_n = 75 kDa) en un vaso de precipitados de 20 ml. Se añadió H_2O al vaso de precipitados hasta que el peso de quitosano + H_2O = 6,65 g. Se añadió una barra de agitación magnética al vaso de precipitados para agitar la solución durante aproximadamente 10 minutos con el fin de hidratar el polvo de quitosano tanto como fuera posible. Se añadieron 0,55 ml de HCl 1 N (Sigma, producto n.º 318949) a la solución con agitación moderada. El vaso de precipitados se cubrió con parafilm™ y se agitó durante una noche hasta que se disolvió por completo. Se añadieron 1,8 ml de βGP al 10,75 % (Sigma, producto n.º G9891) en solución de HCl 50 mM al vaso de precipitados y se mezclaron (la relación de mezcla de solución de quitosano/solución de βGP es de 4:1). El pH obtenido de la solución de quitosano fue fisiológico a 6,7 y la osmolalidad también fue fisiológica a 334 mOsm/kg (Tabla 1).

Tabla 1

Composición y propiedades de soluciones de quitosano							
Solución n.º y tipo	C _{quitosano} (% p/p)	C _{HCl} (mM)	C _{NaCl} (mM)	C _{βGP} (% p/p)	Precipitación	pH (medido)	Osmolalidad (mOsm/kg)
Quitosano-HCl-NaCl pH 6,6	1,62	38	160	-	no	6,50	354
Quitosano-HCl-βGP pH 6,6	1,62	71	-	2,15	no	6,65	334

3-Extracción de sangre

[0041] La sangre se extrajo de los conejos usando una técnica estéril, que comienza inyectando 0,3 cc/kg de Hypnorm® IM a los conejos (por ejemplo, 0,9 cc para un conejo de 3 kg). Primero, para cada conejo, se recogieron ~2 ml de sangre en un tubo Vacutainer® que contenía EDTA (Fisher, BD, producto n.º 02-683-99A) para obtener CBC (hemograma completo) y recuento de plaquetas. En segundo lugar, para cada conejo, se recogieron ~5 ml de sangre

usando una jeringa estéril de 5 cc (Fisher, BD, producto n.º 309604). Cuatro conejos fueron usados en este experimento.

4- Preparación de mezclas de sangre/solución fisiológica de quitosano midiendo el tiempo de coagulación y la
5 resistencia mecánica de los coágulos

[0042] Para preparar coágulos de sangre/quitosano-HCl-NaCl (pH 6,6)-1, inmediatamente después de la recogida de sangre completa, se añadió una pipeta de 900 µl de sangre completa en un tubo criogénico que contenía tres bolas de acero inoxidable de 0,39 g y 300 µl de solución de quitosano y se mezcló agitando a mano durante 10 segundos.

- 10 Luego se transfirieron 250 µl en 3 tubos de vidrio a 37 °C con una jeringa de 1 ml para preparar 3 coágulos: el primer coágulo se usó para probar el tiempo de coagulación y se fijó inmediatamente después de que se coaguló; el segundo coágulo se usó para probar el tiempo de coagulación y se fijó a los 60 minutos después de la mezcla; el tercer coágulo se usó para probar el tiempo de coagulación y la resistencia mecánica después de 60 minutos. Este experimento se realizó por triplicado para cada conejo. Para preparar coágulos sanguíneos/quitosano-HCl-βGP (pH 6,6)-2, se repitió
15 el mismo procedimiento como se describió anteriormente, pero una solución de quitosano-HCl-βGP (pH 6,6) se mezcló con sangre.

[0043] La coagulación se determinó por visualización del coágulo a 37 °C. Todos los tres tubos de vidrio se usaron para probar el tiempo de coagulación. Los tubos de vidrio se tomaron suavemente de la placa caliente verticalmente
20 cada minuto, se inclinó lentamente y la mezcla de sangre se visualizó en el fondo del tubo. Si la mezcla era inmóvil y se formaba coágulo, se coagulaba; si la mezcla todavía era móvil en el fondo del tubo, aún no estaba coagulada. La resistencia mecánica se probó colocando el coágulo en el centro de la palma de la mano y presionando el coágulo con un dedo hasta que se aplastó. La resistencia a la compresión, expresión líquida y aspecto aplastado también se observaron. La resistencia mecánica se puntuó con un sistema de 4 "+": "+" representa que el coágulo se rompió
25 fácilmente y el aspecto aplastado era de fragmentos múltiples (más de 5 fragmentos); "++" representa que el coágulo era relativamente firme y el aspecto aplastado era de fragmentos múltiples (3-5 fragmentos); "+++" representa que el coágulo era firme y elástico, el aspecto aplastado era de 2-3 fragmentos; "++++" representa que el coágulo era firme y elástico, el aspecto aplastado era de 2 fragmentos (a veces todavía conectados) o simplemente había un orificio en el centro del coágulo.

[0044] Para el conejo 259F (R1F), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 10 minutos (de 7 minutos a 10 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 2). El tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (8 minutos) fue significativamente menor que el tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (9,7 minutos) (Figura 1).

35 Tabla 2

Tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano del conejo R259F (R1F)				
Mezcla	Número de muestra		Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	Mezcla 1	1	8	8
		2	8	
		3	8	
	Mezcla 2	1	9	
		2	9	
		3	9	
	Mezcla 3	1	7	
		2	7	
		3	7	
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	Mezcla 1	1	10	9,7
		2	10	
		3	10	
	Mezcla 2	1	9	
		2	9	
		3	9	
	Mezcla 3	1	10	
		2	10	
		3	10	

[0045] Para el conejo 260F (R2F), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 9 minutos y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 3 y la Figura 1).

Tabla 3

5

Tiempo de coagulación de coágulos de sangre/quitosano del conejo R260F (R2F)				
Mezcla	Número de muestra		Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	Mezcla 1	1	9	8,3
		2	9	
		3	9	
	Mezcla 2	1	8	
		2	8	
		3	8	
	Mezcla 3	1	8	
		2	8	
		3	8	
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	Mezcla 1	1	9	8,7
		2	9	
		3	9	
	Mezcla 2	1	9	
		2	9	
		3	9	
	Mezcla 3	1	8	
		2	8	
		3	8	

[0046] Para el conejo 261M (R3M), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 15 minutos (de 6 minutos a 15 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 4). El tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (7,3 minutos) fue significativamente menor que el tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (14,3 minutos) (Figura 1).

10

Tabla 4

Tiempo de coagulación del conejo R261M (R3M)				
Mezcla	Número de muestra		Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	Mezcla 1	1	6	7,3
		2	6	
		3	6	
	Mezcla 2	1	8	
		2	8	
		3	8	
	Mezcla 3	1	8	
		2	8	
		3	8	
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	Mezcla 1	1	14	14,3
		2	14	
		3	14	
	Mezcla 2	1	15	
		2	15	
		3	15	
	Mezcla 3	1	14	
		2	14	
		3	14	

[0047] Para el conejo 262M (R3MR4M), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 14 minutos (de 7 minutos a 14 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 5). El tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (8,3 minutos) fue significativamente menor que el tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (12,7 minutos) (Figura 1).

Tabla 5

Tiempo de coagulación del conejo R262M (R4M)				
Mezcla	Número de muestra		Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	Mezcla 1	1	7	8,3
		2	7	
		3	7	
	Mezcla 2	1	8	
		2	8	
		3	8	
	Mezcla 3	1	10	
		2	10	
		3	10	
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	Mezcla 1	1	12	12,7
		2	12	
		3	12	
	Mezcla 2	1	12	
		2	12	
		3	12	
	Mezcla 3	1	14	
		2	14	
		3	14	

- 5 [0048] Los resultados de resistencia mecánica (Tabla 6 y Figura 2) demostraron que todos los coágulos de sangre fresca/quitosano eran firmes y elásticos, las resistencias mecánicas de todos los coágulos se puntuaron como "++++". Después de 60 minutos, había algo de suero emanado de los coágulos (puntuado como ++ en la mayoría de los casos). Aunque los puntajes de resistencia mecánica fueron idénticos para todos los coágulos, 9 de 12 coágulos βGP (coágulo 2) solo tenían un orificio en el centro, mientras que solo 3 de 12 coágulos NaCl (coágulo 1) tenían solo un orificio en el centro, lo que sugiere una mejora en la resistencia mecánica.

Tabla 6

Prueba de resistencia mecánica de coágulos de sangre/quitosano					
Conejo n.º	Componente de mezcla	Muestra n.º	Resistencia a la compresión	Líquido expresado	Aspecto aplastado
R259F	Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	Coágulo 1-1	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
		coágulo 1-2	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
		coágulo 1-3	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
	Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	coágulo 2-1	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-2	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo

		coágulo 2-3	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
R260F	Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	coágulo 1-1	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
		coágulo 1-2	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
		coágulo 1-3	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
	Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	coágulo 2-1	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-2	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-3	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
R261M	Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	coágulo 1-1	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 1-2	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 1-3	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
	Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	coágulo 2-1	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-2	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-3	Firme y elástico +++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo

R262M	Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 (coágulo 1)	coágulo 1-1	Firme y elástico ++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
		coágulo 1-2	Firme y elástico ++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 1-3	Firme y elástico ++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados
	Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (coágulo 2)	coágulo 2-1	Firme y elástico ++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-2	Firme y elástico ++++	Algo de líquido emanado ++	No se rompe pero hay un orificio en el centro del coágulo
		coágulo 2-3	Firme y elástico ++++	Algo de líquido emanado ++	Rompe en 2 fragmentos pero todavía conectados

5-Tratamiento histológico y evaluación de la homogeneidad de coágulos de sangre/quitosano

[0049] Los coágulos fijos fueron seccionados en dos partes. Una parte se crioprotegió con sacarosa, se infiltró con OCT, se sometió a criosección, se tiñó con Safranin O/ Fast Green y se observó mediante microscopía óptica. Una parte se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior. Todas las fotos fueron tomadas de las muestras de coágulos de sangre/quitosano fijadas 60 minutos después de que se prepararon los coágulos; dos fotos tomadas con objetivos 5x y 40x de diferentes regiones de cada muestra se usaron para la evaluación de la homogeneidad. Cada muestra se observó bajo microscopio con especial énfasis en: presencia de burbujas o grietas; presencia y distribución de precipitados de quitosano descritos como: agregados grandes o agregados pequeños; distribución de quitosano y si están distribuidos homogéneamente o no en toda la sección; morfología eritrocítica en términos de discoide, encogido, hinchado o encadenado.

[0050] La histología mostró que la homogeneidad de los coágulos preparados con βGP fue mejor (8 de 12 muestras se puntuaron como "+" y ninguna se puntuó como "-") que la homogeneidad de los coágulos preparados con NaCl (3 de 11 muestras se puntuaron como "+" y 3 de 11 muestras se puntuaron como "-") (Tabla 7).

Tabla 7

Homogeneidad de coágulos de sangre/quitosano			
Muestra del coágulo 1 (con NaCl)	Homogeneidad del coágulo 1	Muestra del coágulo 2 (con βGP)	Homogeneidad del coágulo 2
FB 1-1-R259F	+	FB 2-1-R259F	+
FB 1-2-R259F	+	FB 2-2-R259F	+
FB 1-3-R259F	-	FB 2-3-R259F	±
FB 1-1-R260F	+	FB 2-1-R260F	+
FB 1-2-R260F	±	FB 2-2-R260F	+
FB 1-3-R260F	-	FB 2-3-R260F	+
FB 1-1-R261M	±	FB 2-1-R261M	±
FB 1-2-R261M	-	FB 2-2-R261M	+
FB 1-3-R261M	*	FB 2-3-R261M	+
FB 1-1-R262M	±	FB 2-1-R262M	+
FB 1-2-R262M	±	FB 2-2-R262M	±
FB 1-3-R262M	+	FB 2-3-R262M	±

* Información no disponible

EJEMPLO 2**Formulación y caracterización de coágulos de sangre fresca/quitosano mediante el uso de soluciones de quitosano con diferentes pesos moleculares (sangre de conejo)**

1-Preparación de solución de quitosano (1,62 % p/p)-HCl (38 mM)-NaCl (160 mM); sin NaOH, pH: 6,6; volumen total: 10,0 ml

- 10 **[0051]** Las soluciones de quitosano-HCl-NaCl se prepararon como se describió anteriormente con quitosanos de diferentes M_n y DDA (lote n.º AS-144-02-A: M_n 2,7 kDa y DDA 98 %; lote n.º CH10075: M_n 75 kDa y DDA 79 %; lote n.º CH0100702B: M_n 232 kDa, y DDA 81 %; lote n.º CH0050602A: M_n 298 kDa y DDA 76 %). El pH de las soluciones de quitosano era fisiológico (6,2 a 6,7) y la osmolalidad también era fisiológica (326 a 356 mOsm/kg) (véase la Tabla 8).

- 15 2-Preparación de solución de quitosano (1,62 % p/p)-HCl (71 mM)- β GP (2,15 %), pH: 6,6; volumen total: 9,0 ml

- [0052]** Las soluciones de quitosano-HCl-NaCl se prepararon como se describió anteriormente con quitosanos de diferentes M_n y DDA (lote n.º AS-144-02-A: M_n 2,7 kDa y DDA 98 %; lote n.º CH10075: M_n 75 kDa y DDA 79 %; lote n.º CH0100702B: M_n 232 kDa, y DDA 81 %; lote n.º CH0050602A: M_n 298 kDa y DDA 76 %). El pH de las soluciones de quitosano era fisiológico a 6,7 y la osmolalidad también era fisiológica (340 a 345 mOsm/kg) (Tabla 8).

Tabla 8

Composición y propiedades de soluciones de quitosano							
Solución n.º y tipo	C _{quitosano} (%p/p)	C _{HCl} (mM)	C _{NaCl} (mM)	C _{βGP} (%p/p)	Precipitación	pH (medido)	Osmolalidad (mOsm)
Quitosano-HCl-NaCl pH6,6 (AS-144-02-A)	1,62	55	160	no	no	6,19	356
Quitosano-HCl- β GP pH6,6 (AS-144-02-A)	1,62	77	No	2,15	no	6,69	345
Quitosano -HCl-NaCl pH6,6 (CH10075)	1,62	38	160	no	no	6,62	326
Quitosano-HCl- β GP pH6,6 (CH10075)	1,62	71	No	2,15	no	6,67	344
Quitosano-HCl-NaCl pH6,6 (CH0100702B)	1,62	38	160	no	no	6,65	339
Quitosano-HCl- β GP pH6,6 (CH0100702B)	1,62	71	No	2,15	no	6,71	337
Quitosano-HCl-NaCl pH6,6 (CH0050602A)	1,62	38	160	no	no	6,58	332
Quitosano-HCl- β GP pH6,6 (CH0050602A)	1,62	71	No	2,15	no	6,68	340

25 3- Extracción de sangre

[0053] La sangre se extrajo de conejos usando una técnica estéril, como se describió anteriormente. Cuatro conejos fueron usados en este experimento.

- 30 4-Preparación de mezclas de sangre/solución fisiológica de quitosano, midiendo el tiempo de coagulación y la resistencia mecánica de los coágulos

[0054] Se prepararon mezclas de sangre completa de conejo/quitosano-HCl-NaCl y mezclas de sangre de conejo/quitosano-HCl-βGP en una relación de mezcla de 3:1 v/v como se describió anteriormente. Este experimento se realizó por triplicado para cada conejo. La coagulación del coágulo se determinó mediante la visualización del coágulo a 37 °C como se describió anteriormente. La resistencia mecánica se probó como se describió anteriormente

5 **[0055]** Para el lote de quitosano n.º AS-144-02-A (M_n de 2,7 kDa y 98 % de DDA), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 18 minutos (de 10 minutos a 18 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 9). El tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 fue significativamente menor que el tiempo de coagulación de las mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (Figura 3). Los resultados de la prueba de resistencia mecánica mostraron que todos los coágulos eran firmes y elásticos, las resistencias mecánicas de todos los coágulos se puntuaron como "++++" y los coágulos no se retrajeron significativamente (véase la Tabla 10 y la Figura 4).

15 **Tabla 9**

Tiempo de coagulación de mezclas de sangre fresca/quitosano (lote n.º AS-144-02-A)					
Mezcla	Concentración de solución de quitosano y relación de mezcla		Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)	Comentarios
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl	1,62 % y 3:1 (coágulo 1-1-1)	1	12	11,3	Todas las muestras de mezcla coagularon en 12 minutos (de 10 minutos a 12 minutos).
		2	11		
		3	11		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 1-1-2)	1	11	11	
		2	11		
		3	11		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 1-1-3)	1	11	10,7	
		2	10		
		3	11		
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP	1,62 % y 3:1 (coágulo 1-2-1)	1	18	17,3	Todas las muestras de mezcla coagularon en 18 minutos (de 15 minutos a 18 minutos).
		2	17		
		3	17		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 1-2-2)	1	17	16,7	
		2	16		
		3	17		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 1-2-3)	1	15	15,3	
		2	15		
		3	16		

Tabla 10

Prueba de resistencia mecánica de coágulos de sangre fresca/quitosano (lote n.º AS-144-02-A)			
Muestra	Resistencia a la compresión	Líquido expresado	Aspecto aplastado
Coágulo 1-1-1 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 1-1-2 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 1-1-3 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Algún líquido expresado ++	2 fragmentos
Coágulo 1-2-1 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 1-2-2 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados

Coágulo 1-2-3 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
--	-----------------------	---------------------------------	--------------

5 **[0056]** Para el lote de quitosano n.º CH10075 (M_n de 75 kDa y 79 % de DDA), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 13 minutos (de 6 minutos a 13 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (Tabla 11). El tiempo de coagulación de mezclas de sangre/quitosano-HCl-NaCl pH 6,6 fue significativamente menor que el tiempo de coagulación de mezclas de sangre/quitosano-HCl-βGP pH 6,6 (Figura 5). Los resultados de la prueba de resistencia mecánica mostraron que todos los coágulos eran firmes y elásticos, las resistencias mecánicas de todos los coágulos se puntuaron como "++++" y los coágulos no se retrajeron significativamente (véase la Tabla 12 y la Figura 6).

Tabla 11

10

Tiempo de coagulación de mezclas de sangre fresca/quitosano (lote n.º CH10075)					
Mezcla	Concentración de solución de quitosano y relación de mezcla		Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)	Comentarios
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl	1,62 % y 3:1 (coágulo 2-1-1)	1	7	7	Todas las muestras de mezcla coagularon en 7 minutos (de 6 minutos a 7 minutos).
		2	7		
		3	7		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 2-1-2)	1	6	6,3	
		2	7		
		3	6		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 2-1-3)	1	6	6	
		2	6		
		3	6		
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP	1,62 % y 3:1 (coágulo 2-2-1)	1	12	12,3	Todas las muestras de mezcla coagularon en 13 minutos (de 12 minutos a 13 minutos).
		2	12		
		3	13		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 2-2-2)	1	13	12,7	
		2	13		
		3	12		
	1,62 % y 3:1 (coágulo 2-2-3)	1	13	12,7	
		2	12		
		3	13		

Tabla 12

Prueba mecánica de coágulos de sangre fresca/quitosano (lote n.º CH10075)			
Muestra	Resistencia a la compresión	Líquido expresado	Aspecto aplastado
Coágulo 2-1-1 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 2-1-2 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 2-1-3 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 2-2-1 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 2-2-2 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 2-2-3 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico ++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados

[0057] Para el lote de quitosano n.º CH0100702B (M_n de 232 kDa y 81 % de DDA), todas las mezclas de sangre/quitosano coagularon en 7 minutos (de 3 minutos a 7 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 13 y la Figura 7). Los resultados de la prueba de resistencia mecánica mostraron que todos los coágulos eran 5 firmes y elásticos, las resistencias mecánicas de todos los coágulos se puntuaron como "++++" y los coágulos no se retrajeron significativamente (véase la Tabla 14 y la Figura 8).

Tabla 13

Tiempo de coagulación de mezcla de sangre fresca/quitosano (lote n.º CH0100702B)				
Mezcla	Concentración de solución de quitosano y relación de mezcla	Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)	Comentarios
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl	1,62 % y 3:1 (coágulo 3-1-1)	1	7	Todas las muestras de mezcla coagularon en 7 minutos (de 6 minutos a 7 minutos).
		2	7	
		3	6	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 3-1-2)	1	7	
		2	7	
		3	6	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 3-1-3)	1	7	
		2	6	
		3	6	
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP	1,62 % y 3:1 (coágulo 3-2-1)	1	3	Todas las muestras de mezcla coagularon en 4 minutos (de 3 minutos a 4 minutos).
		2	4	
		3	4	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 3-2-2)	1	4	
		2	3	
		3	3	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 3-2-3)	1	3	
		2	3	
		3	4	

10

Tabla 14

Prueba mecánica de coágulos de sangre fresca/quitosano (lote n.º CH0100702B)			
Muestra	Resistencia a la compresión	Líquido expresado	Aspecto aplastado
Coágulo 3-1-1-de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 3-1-2-de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado ++	2 fragmentos
Coágulo 3-1-3-de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 3-2-1-de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado ++	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 3-2-2-de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 3-2-3-de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados

[0058] Para el lote de quitosano n.º CH0050602A (M_n de 298 kDa, 76 % de DDA), todas las mezclas de 15 sangre/quitosano coagularon en 7 minutos (de 5 minutos a 7 minutos) y formaron coágulos elásticos firmes (véase la Tabla 15 y la Figura 9). Los resultados de la prueba de resistencia mecánica mostraron que todos los coágulos eran

firmes y elásticos, las resistencias mecánicas de todos los coágulos se puntuaron como "++++" y los coágulos no se retrajeron significativamente (véase la Tabla 16 y la Figura 10).

Tabla 15

5

Tiempo de coagulación de mezcla de sangre fresca/quitosano (lote n.º CH0050602A)				
Mezcla	Concentración de solución de quitosano y relación de mezcla	Tiempo de coagulación (min)	Valor medio (min)	Comentarios
Sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl	1,62 % y 3:1 (coágulo 4-1-1)	1	7	Todas las muestras de mezcla coagularon en 7 minutos (de 6 minutos a 7 minutos).
		2	7	
		3	7	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 4-1-2)	1	7	
		2	7	
		3	6	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 4-1-3)	1	7	
		2	6	
		3	6	
Sangre fresca/quitosano-HCl-βGP	1,62 % y 3:1 (coágulo 4-2-1)	1	7	Todas las muestras de mezcla coagularon en 7 minutos (de 5 minutos a 7 minutos).
		2	6	
		3	7	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 4-2-2)	1	7	
		2	7	
		3	6	
	1,62 % y 3:1 (coágulo 4-2-3)	1	6	
		2	6	
		3	5	

Tabla 16

Prueba mecánica de coágulos de sangre fresca/quitosano (lote n.º CH0050602A)			
Muestra	Resistencia a la compresión	Líquido expresado	Aspecto aplastado
Coágulo 4-1-1 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos
Coágulo 4-1-2 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 4-1-3 de sangre fresca/quitosano-HCl-NaCl (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 4-2-1 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	Orificio en el centro
Coágulo 4-2-2 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados
Coágulo 4-2-3 de sangre fresca/quitosano-HCl-βGP (1,62 %, 3:1)	Firme y elástico +++++	Casi ningún líquido expresado +	2 fragmentos pero todavía conectados

[0059] El tratamiento histológico y la evaluación de homogeneidad se realizaron como se describió anteriormente.

[0060] La histología mostró que la homogeneidad de los coágulos preparados con β GP fue mejor (9 de 12 muestras se puntuaron como "+" y ninguna se puntuó como "-") que la homogeneidad de los coágulos preparados con NaCl (2 de 12 muestras se puntuaron como "+" y 7 de 12 muestras se puntuaron como "-") (véase la Tabla 17).

Tabla 17

Homogeneidad de coágulos de sangre/quitosano			
Muestras de coágulo (con NaCl)	Homogeneidad de coágulos (con NaCl)	Muestras de coágulo (con β GP)	Homogeneidad de coágulos (con β GP)
sangre 1-1-1 (AS-144-02-A)	+ (entre $\pm$ y +)	sangre 1-2-1 (AS-144-02-A)	$\pm$
sangre 1-1-2 (AS-144-02-A)	$\pm$ (entre $\pm$ y +)	sangre 1-2-2 (AS-144-02-A)	+ (entre $\pm$ y +)
sangre 1-1-3 (AS-144-02-A)	$\pm$ (entre $\pm$ y +)	sangre 1-2-3 (AS-144-02-A)	+ (entre $\pm$ y +)
sangre 2-1-1 (CH10075)	-	sangre 2-2-1 (CH10075)	+
sangre 2-1-2 (CH10075)	-	sangre 2-2-2 (CH10075)	+ (entre $\pm$ y +)
sangre 2-1-3 (CH10075)	-	sangre 2-2-3 (CH10075)	+
sangre 3-1-1 (CH0100702B)	+	sangre 3-2-1 (CH0100702B)	+
sangre 3-1-2 (CH0100702B)	+	sangre 3-2-2 (CH0100702B)	+
sangre 3-1-3 (CH0100702B)	-	sangre 3-2-3 (CH0100702B)	+
sangre 4-1-1 (CH0050602A)	-	sangre 4-2-1 (CH0050602A)	+
sangre 4-1-2 (CH0050602A)	-	sangre 4-2-2 (CH0050602A)	+
sangre 4-1-3 (CH0050602A)	-	sangre 4-2-3 (CH0050602A)	+

10

[0061] La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, usos o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción como parte de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que se refiere la invención y que puede aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en este documento, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl que comprende:
 - 5 a) sangre completa; y
 - b) una solución de quitosano que comprende: quitosano que tiene un peso molecular promedio de $M_n < 232\text{kDa}$, HCl, y NaCl a una concentración de 160 mM;en la que la composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl tiene un pH entre 6,0 y 7,8; y
10 en la que la composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl coagula más rápidamente que una composición de sangre/quitosano-HCl- β -glicerol fosfato.
2. La composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl de la reivindicación 1, en la que la composición polimérica
15 tiene un pH entre 6,2 y 6,7, y más preferentemente un pH de 6,6.
3. La composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl de la reivindicación 1 o 2, en la que el grado de desacetilación de quitosano (DDA) está entre 20 % y 100 %, y más preferentemente entre 76 % y 98 %.
4. La composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la
20 relación de sangre completa: quitosano es de 3:1 v/v.
5. La composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl de la reivindicación 1, en la que el HCl está en una concentración de 38 mM.
- 25 6. Una composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la reparación de un tejido en un sujeto, en la que la composición polimérica se adhiere al tejido y promueve la proliferación celular.
7. La composición de sangre/quitosano-HCl-NaCl para su uso según la reivindicación 6, en la que dicho tejido
30 se selecciona de entre el grupo que consiste en cartílago, menisco, ligamento, tendón, hueso, piel, córnea, tejidos periodontales, tejidos maxilofaciales, tejidos temporomandibulares, abscesos, tumores resecados y úlceras.

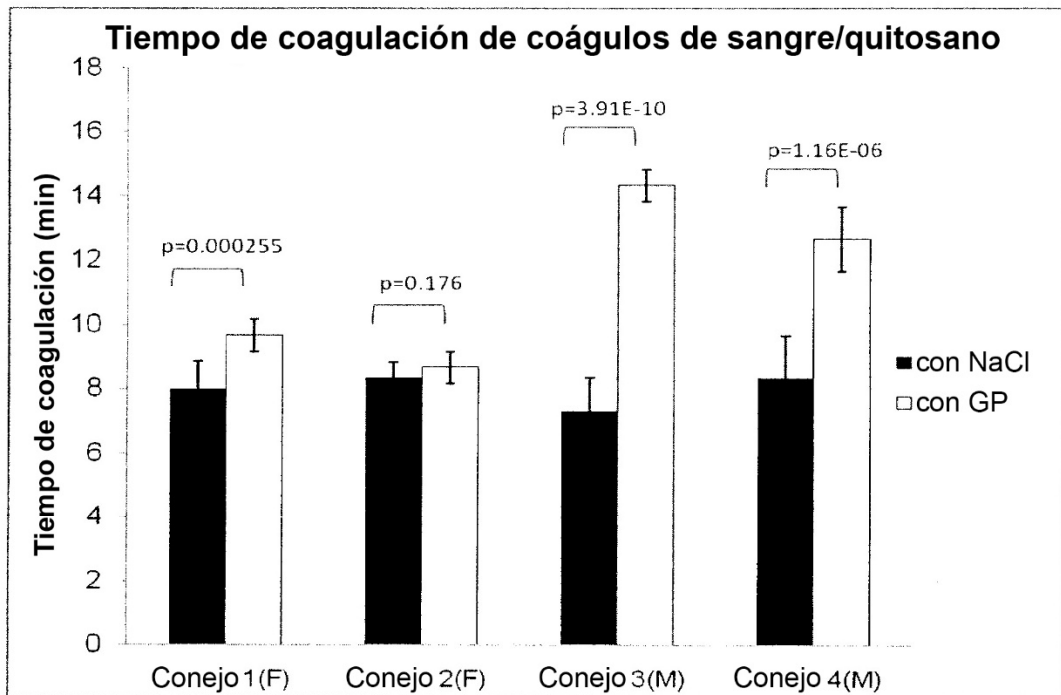


Fig. 1

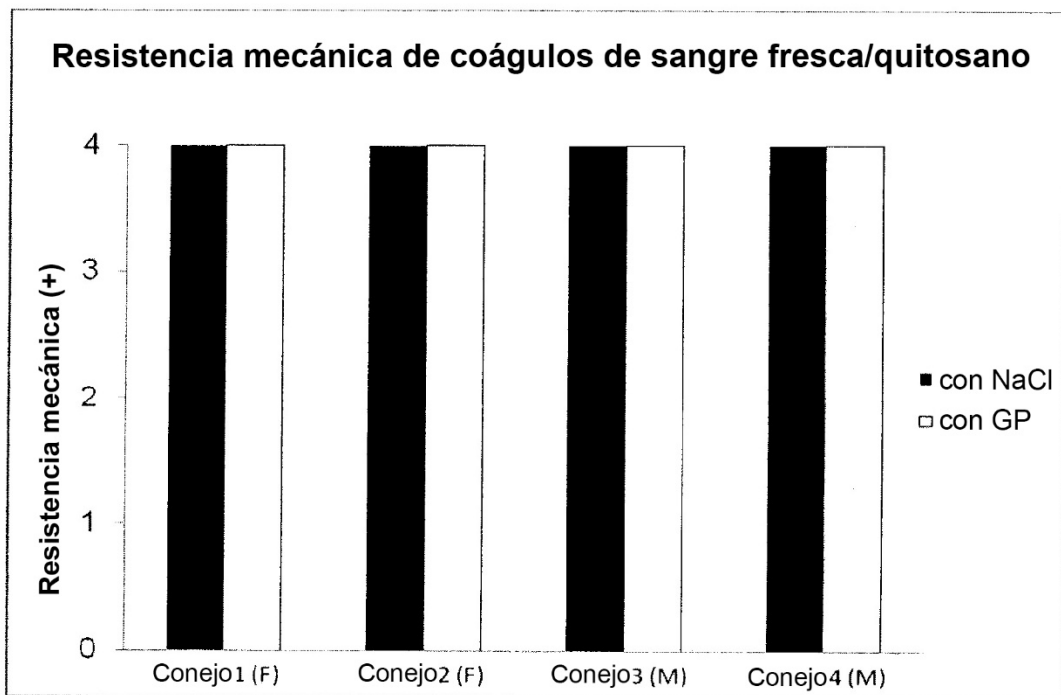


Fig. 2

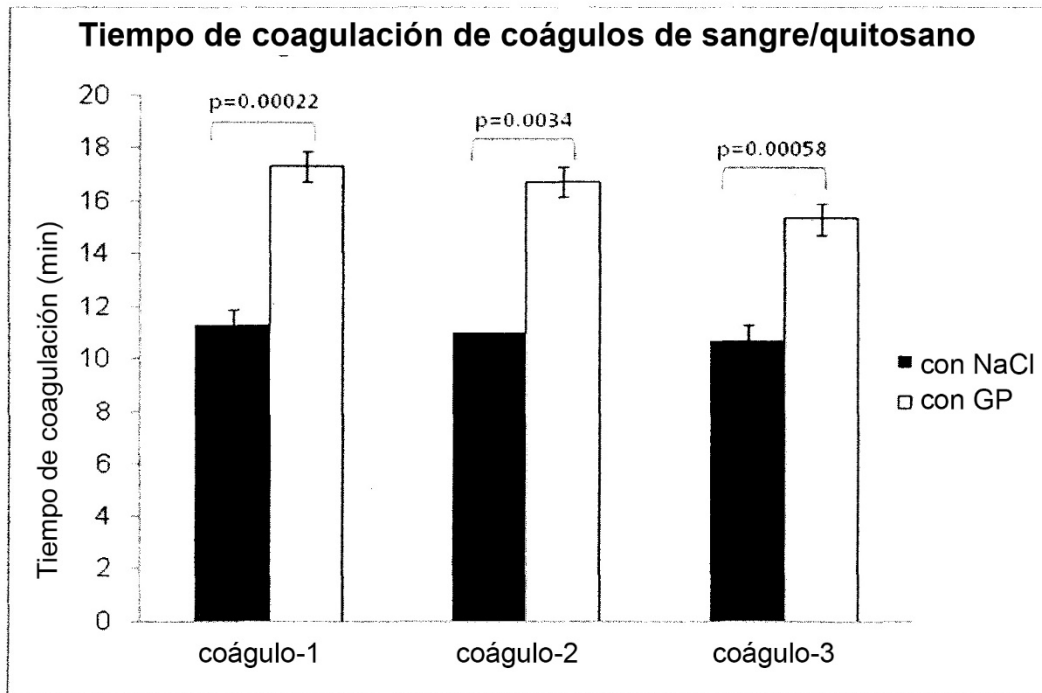


Fig. 3

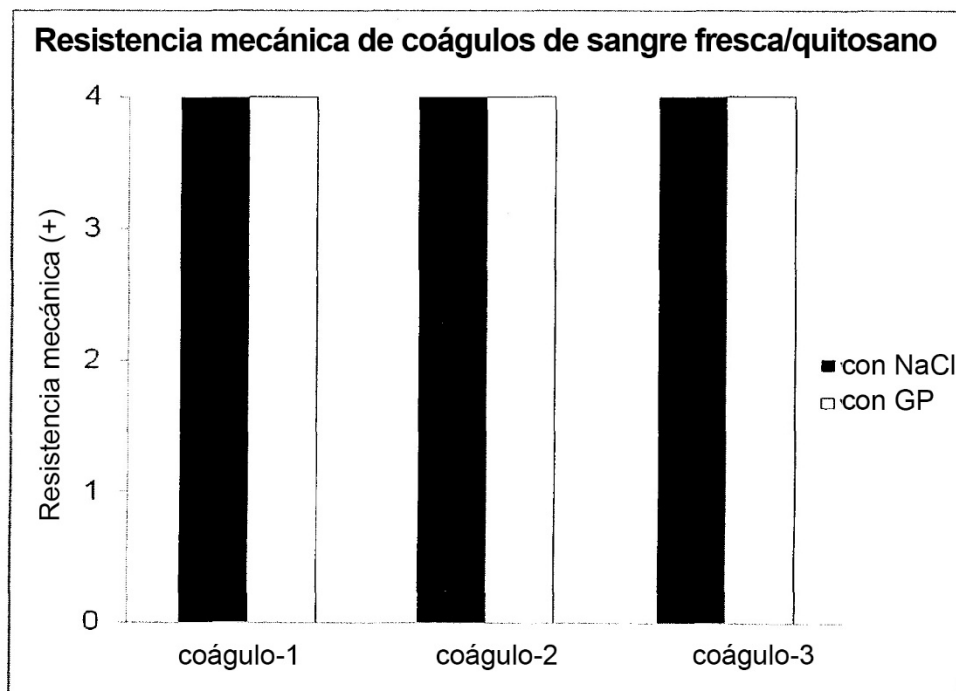


Fig. 4

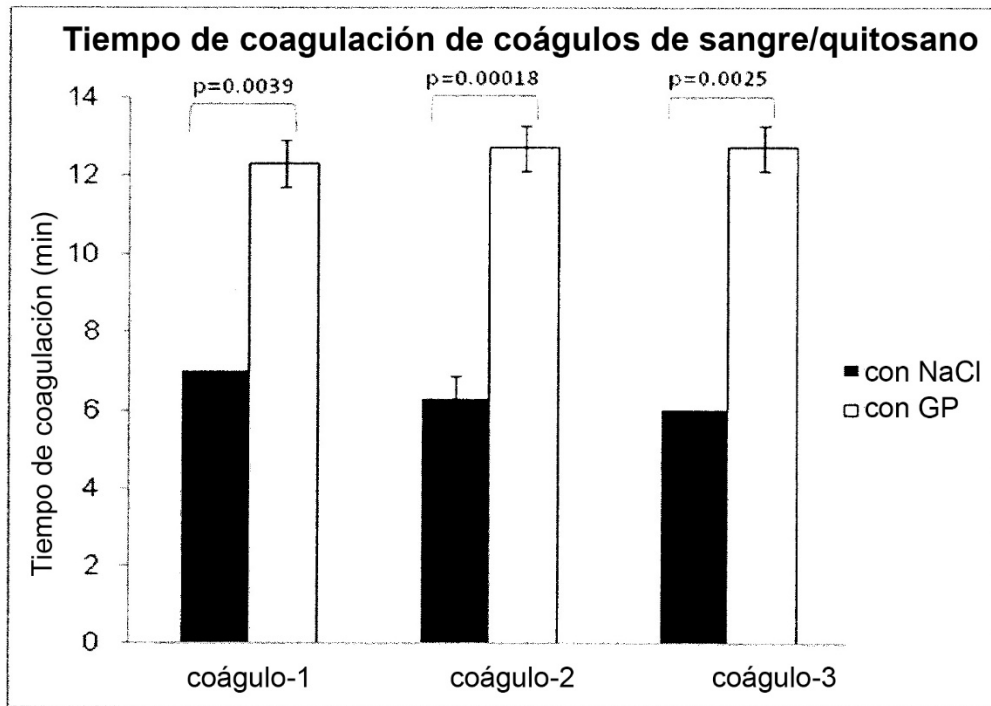


Fig. 5

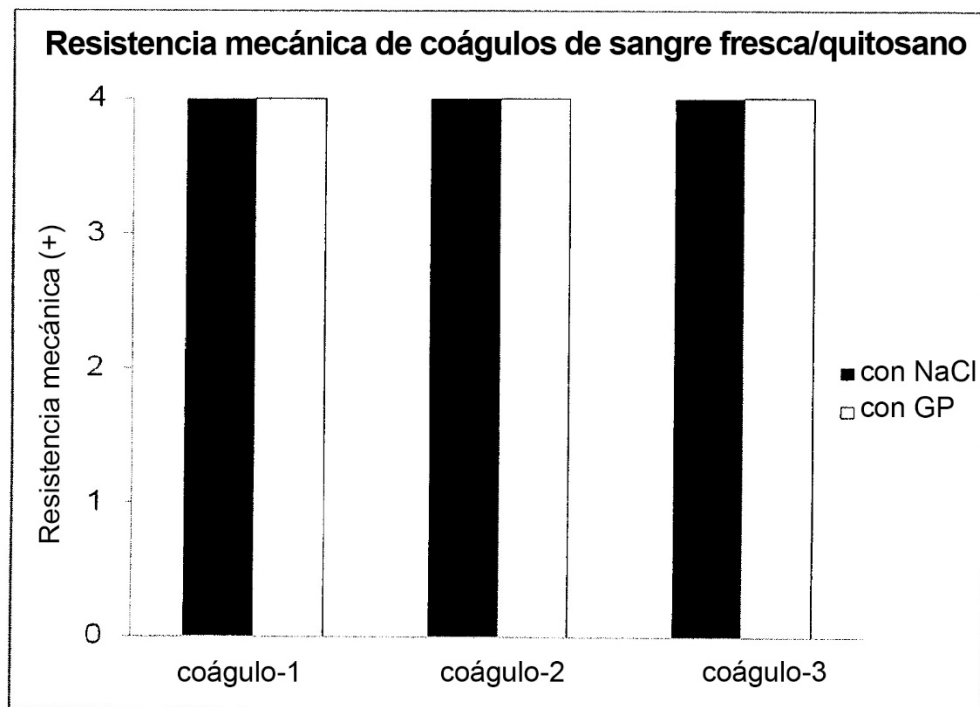


Fig. 6

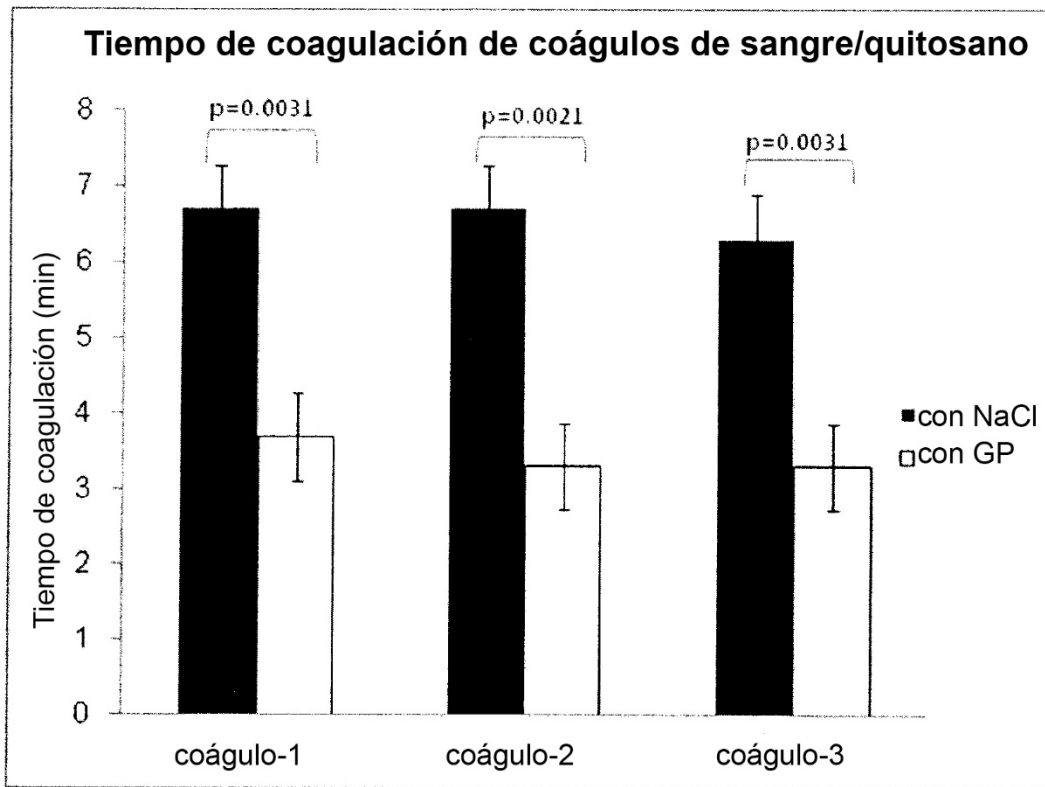


Fig. 7

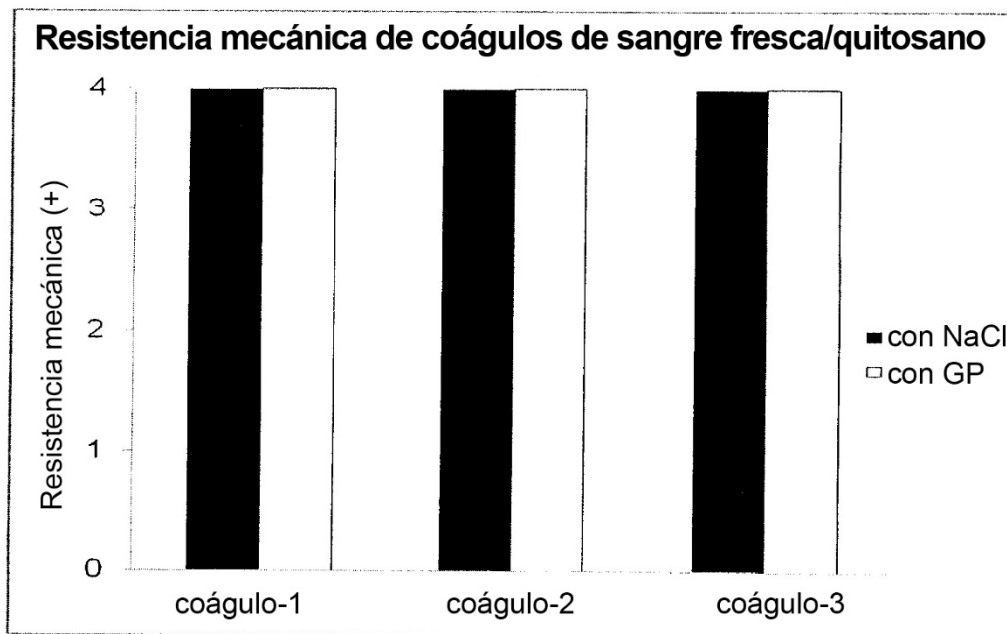


Fig. 8

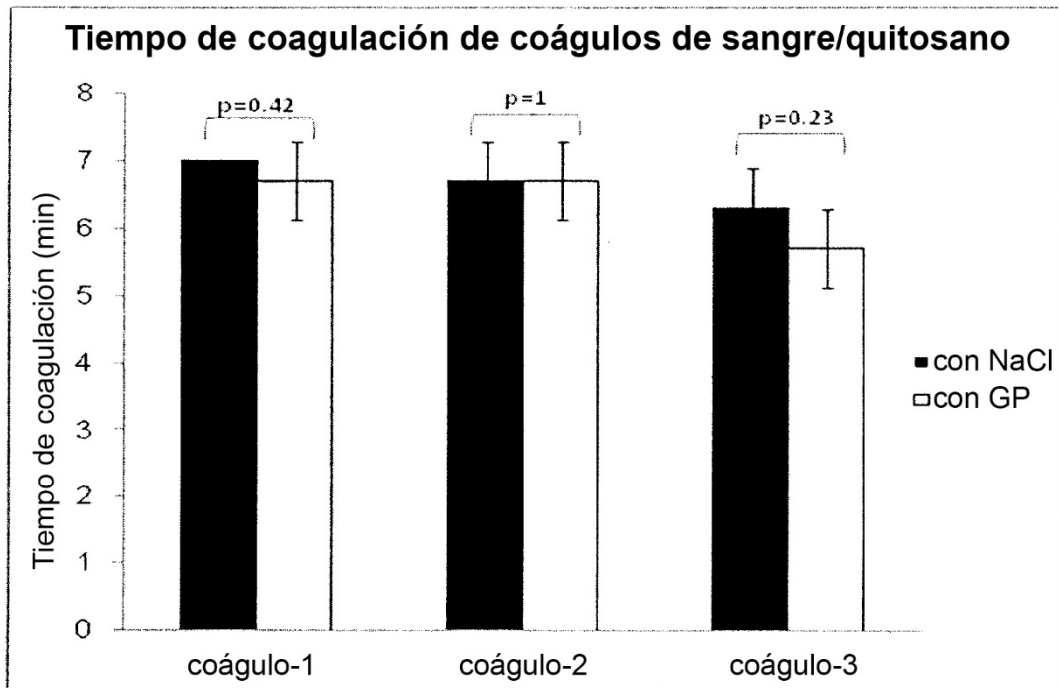


Fig. 9

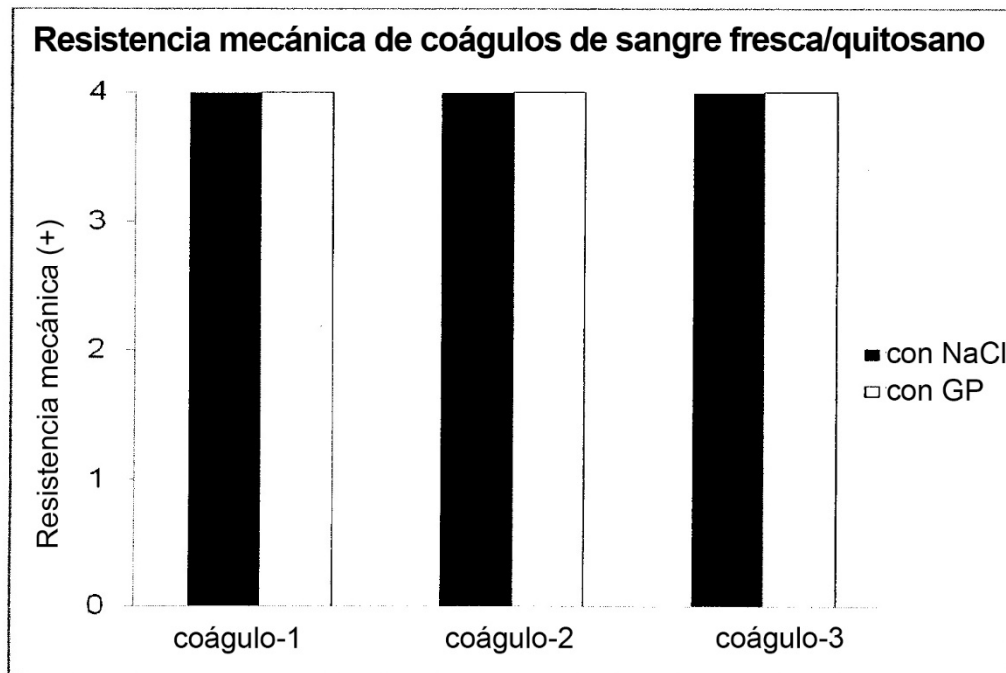


Fig. 10