Industria y C

SUPERINTEND

CSA716748

Organizacion y ion CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE
INVENTARIO

OPS.

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 09-20987

54. **TÍTULO** SELLADOR SECO DE ACCION RAPIDA Y METODOS DE USO Y FABRICACION

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** BAXTER INTERNATIONAL INC., y BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIO Deerfield, Illinois, U.S.A. y WALLISELLEN, SUIZA Respectivamente

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

(FORMA P-10)

98124 Imprenta Nacional de Colombia - 2007

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-020987- -00000-0000
Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **BAXTER INTENATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A.**
Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América y Suiza, respectivamente.

Dirección: One Baxter Parkway
Deerfield,
60015 Illinois
Estados Unidos de América

y

Hertistrasse 2,
8304 Wallisellen,
Suiza

Domicilio: Deerfield,
Illinois,
Estados Unidos de América

y

Wallisellen,
Suiza

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Woonza, M. RHEE**
3845 LaDonna Avenue,
Palo Alto,
California 94306,
Estados Unidos de América

2. **Cary, J, REICH**
114 Ayala Court,
Los Gatos,
California 95032,
Estados Unidos de América

3. **A., Edward OSAWA**
40 Eastwood Drive,
San Francisco,
California 94112,
Estados Unidos de América

4. **Felix VEGA**
53 Carmelita Street,
San Francisco,
California 94117,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/074984 Fecha: 1 de agosto de 2007
Publicación Internacional No. WO 2008/016983 A2 Fecha: 7 de febrero de 2008

6 **Título (54)**
SELLADOR SECO DE ACCIÓN RÁPIDA Y MÉTODOS DE USO Y FABRICACIÓN

7 **Clasificación Internacional (51)** A61L 024/000

8 **Prioridad** SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	02 de agosto de 2006	60/821,190

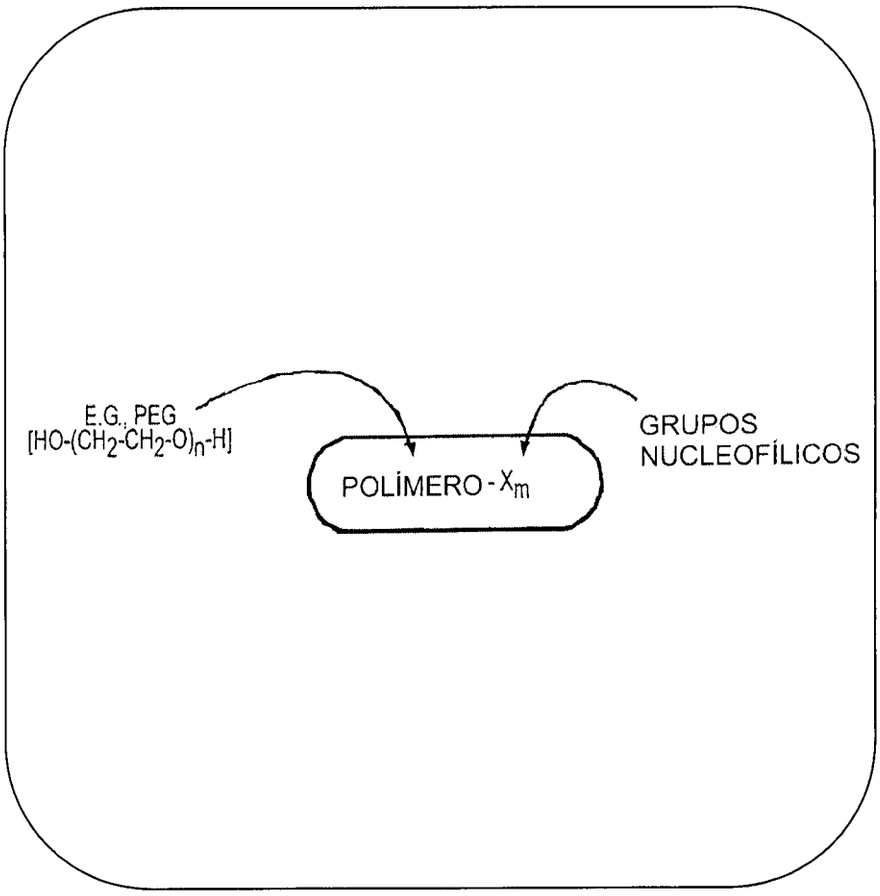
9 **Comprobante de pago No.:** 08-95,225 **Fecha:** 9 de diciembre de 2008
09-525 y 09-545 6 de enero de 2009
09-12,703 y 09-12,693 16 de febrero de 2009
09-14,815 y 09-14,816 24 de febrero de 2009
09-14,846 24 de febrero de 2009

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 540.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 87 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por $2.175.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes de las sociedades **BAXTER INTERNATIONAL INC.** y **BAXTER HEALTHCARE S.A.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/016983 A2

   Descripción:

   Páginas 79 en el idioma original

   Páginas 150 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 102

   Figuras: Número (s) 14

2. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

05873
08613

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado(s) .....
BAXTER INTERNATIONAL INC.
.....
domiciliado(s) en .....
Deerfield, Illinois, E.E.U.U.
.....
por el presente conferimos poder a
GERMAN CAVELIER tpa. 832
GONZALO PERDOMO tpa. 831
EMILIO FERRERO tpa. 31929.....
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa. 23555.....
Domiciliados en la Carrera 4a. No. 72-35,
Bogotá, Colombia
.....

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas y de servicio; el depósito de nombres comerciales y enseñas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y juicios que promovamos o se nos promuevan; y c) para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, desistir, cancelar, recibir, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy ...junio 16 de 1993.....
en Deerfield, Illinois 60015 E.E.U.U...

I (we), the undersigned BAXTER INTERNATIONAL INC.,
.....
of Deerfield, United States of America,
.....
hereby grant to Messrs. Cavelier, GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.
.....
Professional Cards Numbers: 832, 831, 3192 and 23555 respectively. Domiciled at Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia
.....

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, collective and service marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us); and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys-in-fact in or out of Court.

Given and signed this ..JUNE 16, 1993.....
in .DEERFIELD, ILLINOIS 60015 USA.....

BAXTER INTERNATIONAL INC.,
A. Gerard Sieck
A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

6

LINDA IANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK
18 NORTH COUNTY STREET
WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

General Services 708/360-3610 • Elections 708/360-6628 • Tax Extension & Redemption 708/360-6657

STATE OF ILLINOIS)
) SS
COUNTY OF L A K E)

CERTIFICATE OF AUTHORITY

I, Linda Ianuzi Hess, County Clerk of Lake County in the State of Illinois, which office is an office of record having a seal, certify that Mary H. Cross by whom the foregoing or annexed document was notarized, was, on the 26 day of June, 1990, appointed a Notary Public in and for the County of Lake, State of Illinois and that as such, full faith and credit is and ought to be given to this Notary's official attestations. In testimony whereof I have affixed my signature and the seal of this office this 17 day of June, 1993.

Linda Ianuzi Hess
LINDA IANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK

Certification not valid unless the seal of Lake County, Illinois is affixed.

113-208 12/89

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

7

Consulado General de Colombia

122 SOUTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 1441
CHICAGO, ILLINOIS 60603

TEL (312) 341-0658 FAX (312) 341-1980

No. 1610 / 93

Chicago, JUN 29 1993

El suscrito Cónsul General de Colombia, **CERTIFICA** que el señor Linda Tamuzi Hess quien autoriza el presente documento, ejercía legalmente, en la fecha allí expresada, las funciones de Secretaria del Condado y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este consulado.

El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
US$ 6.00 (Seis dólares)
US$ 15.00 (Quince dólares)
PAGADO DERECHOS CONSULARES
FONDO ROTATORIO

María Teresa González
MARIA TERESA GONZALEZ
Encargada de Funciones Consulares

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

CERTIFICADO NOTARIAL (CORPORACION)

Estados Unidos de América
Condado de Lake
Estado de Illinois ss:
Hoy 16 de junio de 19 93
compareció A. Gerard Sieck, a quien conozco, quien, debidamente juramentado, declaró y dijo que él es SubSecretario
BAXTER INTERNATIONAL INC
compañía, nombrado en el documento que antecede, una corporación organizada conforme a las leyes del Estado de Delaware
domiciliado en la ciudad de Deerfield
Estado de Illinois, E.E.U.U. y legalmente constituído para un período de duración que aún no ha terminado, que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder y que el sello estampado por él al pié de al poder, en nombre y en representación de la expresada compañía, es el sello social de ella.

El suscrito Notario ha visto los estatutos de incorporación firmados en Deerfield
Estado de Illinois con fecha
oct. 19/31 y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público) .....

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of ILLINOIS ss:
County of LAKE
On this 16th day of June, 19 93
personally came A. GERARD SIECK
known to me, who being by me duly sworn did depose and say that he is the ASSISTANT SECRETARY
of BAXTER INTERNATIONAL INC.
the Company named within, a Corporation organized under the laws of the State of DELAWARE
domiciled at the City of DEERFIELD
State of ILLINOIS
of USA and legally constituted for a period of tenure not yet expired, that the deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney, and that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the Corporate seal thereof

The undersigned Notary Public has seen the Articles of Incorporation of said Corporation executed at DEERFIELD State of ILLINOIS
under date of OCT. 19, 1931 and hereby certifies that under the laws of said State the foregoing acknowledgment is a sufficient proof that the facts therein contained are true, which the attests.

Mary H. Cross
MARY H. CROSS, NOTARY PUBLIC

"OFFICIAL SEAL"
Mary H. Cross
Notary Public, State of Illinois
My Commission Expires 6/26/94

Bernarda R. de Martinez
Traductora e Interprete Oficial

DOY FE
DESPACHO NOTARIAL 1994
DESPACHO NOTARIA SEXTA DEL CIRCUITO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCION OFICIAL No. 8.90.93 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un Poder escrito en inglés y español otorgado por la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC.**, a favor de los Doctores **GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO Y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**).

Dado y firmado hoy **16 de junio de 1993**, en Deerfield, Illinois, Estados Unidos de América, por el señor **A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY**

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia y representación de la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC.**, expedido en la Ciudad de Deerfield, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, el **19 de octubre de 1993.**

(Firmado), **Mary H. Cross, Notario Público**

(Sello Notarial en tinta que dice): "SELLO OFICIAL" Mary Cross, Notario Público, Estado de Illinois Mi Comisión Expira 6/26/94

NOTARIA SEXTA BOGOTA AUTENTICACIONES

CERTIFICACION

LINDA IANUZI HESS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

10

ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

18 NORTH COUNTY STREET

WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Servicios Generales 708/360-3610 * Elecciones 708/360-6628 * Prórrogas y Redenciones de Impuestos 708/360-6657

ESTADO DE ILLINOIS)

) **SS**

CONDADO DE LAKE)

CERIFICADO DE AUTORIDAD

Yo, **Linda Ianuzi Hess**, Escribano de Condado del condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que **Mary H. Cross** quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, **Notario Público** nombrado en y para el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. **En testimonio de lo cual** he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy **junio 17 de 1993**.

(Firmado): **LINDA IANUZI HESS**

ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

(Sello seco en relieve que dice): SELLO OFICIAL CONDADO LAKE ILLINOIS

(Impreso): Esta certificacion no es válida a menos que porte el sello del Condado Lake, Illinois.

(Impreso): 113-208 12/89

(En español): Legalización de la firma que antecede hecha por el **CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS**, bajo el **No. 1610/93**, de fecha **junio 29 de 1993**, firmado por la señora María Teresa González, Encargada de Asuntos Consulares.

NOTARIA SEXTA
AUTENTICACIONES
BOGOTA

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiun dólares.

(Sello Consular en tinta que dice): CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA * CHICAGO *

Legalización de la firma que antecede hecha por el **MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA** bajo el **No. 481652** de fecha **5 de agosto de 1993**, firmada por el señor Nelson Sánchez Torres, Jefe Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, agosto 9 de 1993

COLO 5873-702-001-4

BRM-27

Bernarda R. de Martinez

Bernarda R. de Martinez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

No. 487876

MINISTERIO RELACIONES EXTERIORES
AREA DE NEGOCIOS GENERALES
HACE CONSTAR
Que el señor (a)
BERNARDA DE MARTINEZ
Cuya firma aparece al pie del presente documento, desempeñaba en esa fecha las funciones allí indicadas.
Santafé de Bogotá, D. C.
12 AGO. 1993

El suscrito Jefe de Legalizaciones no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.

SANCHEZ TORRES
JEFE LEGALIZACIONES

NOTARIA SEXTA
Notario Encargado
Santafé de Bogotá

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA PUESTA EN ESTE DOCUMENTO POR

A. de Martinez

C. C. No. _____ coincide con la registrada en esta Notaría.
SANTAFE DE BOGOTA D. C.

NOTARIA SEXTA
BOGOTA
AUTENTICACIONES

10 AGO. 1993

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.03/00 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

MODIFICACIÓN A LA TRADUCCIÓN OFICIAL No. 8.90.93. REALIZADA POR BERNARDA R. DE MARTÍNEZ CON FECHA 9 DE AGOSTO DE 1993.

Se modifica específicamente lo que se subraya en la siguiente transcripción de la parte de la traducción que corresponde al CERTIFICADO DE AUTORIDAD otorgado por el Escribano del Condado de Lake, la cual dice así: "Yo, **Linda Ianuzi Hess**, Escribano de Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que **Mary H. Cross** quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, **Notario Público** nombrado en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy **junio 17 de 1993**".

PARA QUE AHORA SE LEA ASÍ:

Yo, **Linda Ianuzi Hess**, Escribano de Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que **Mary H. Cross**, quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, fue nombrada el 26 de junio de 1990 un **Notario Público** en y para todo el Condado de Illinois y como tal, a todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy **junio 17 de 1993.**

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
18 FEB 2000
AMPARO QUINTERO ARTUNDUAGA
NOTARIA

(Al dorso) Legalización de la firma que antecede expedida por el **MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES** bajo el **No. 481652** del **5 de agosto de 1993**, firmada por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO WPCL 5873-702-001-4

MAR.13/00

TRADUCCION No.: 98.03/00

MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

2333930

ELVIRA MARTELO

LA FIRMA APARECE EN EL

LEGALIZACIONES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 14 MAR. 2000

CODIGO DE LAS CIVILES

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS
Notario Sexto Encargado

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA,
D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

19 FEB. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TELEFAX: (57) (1) 2358850
TELEX: 45479 CAVE CO
(23)740 2375 CAVE UC

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4º, No. 72-35
BOGOTA 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO (57) (1) 2120100
CABLES: CAVELEYES

14

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BAXTER INTERNATIONAL INC.

Poder conferido el: 16-06-93

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder conferido en el doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,

GERMAN CAVELIER
T.P.A. No. 832
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:

EMILIO FERRERO
T.P.A. Nº 31.929
C.C. No. 4 [illegible]

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

2e-780-2

...SEXTA DE BOGOTA
...PRESENTACION PERSONAL 07 ABR 1994

...Emilio Ferrero...

...Emilio Ferrero...

...C.C. 4580.19...

...2877927...

...domiciliado(s) en...

...reconoce(n) en el pre...

...contenido del mismo es...

En constancia se firma esta diligencia

NOTARIA SEXTA
BOGOTA
AUTENTICACIONES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Emilio Ferrero

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

15
12053A

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 – COLOMBIA

192

Representación, Ratificación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation, Ratification and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER-OF- ATTORNEY

7532-1
7-7113

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BAXTER HEALTHCARE S.A.

domiciliado (s) en/of Hertistrasse 2,

CH-8304 Wallisellen, SUIZA

por el presente ratificamos la solicitud de patente que se tramita en el expediente N° 06.127.737

presentada por Emilio FERRERO
como agente oficioso ante la División de Nuevas Creaciones

en Bogotá, Colombia
el

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar.

hereby ratify the patent application under File N° 06.127.737

filed without a Power of Attorney by Emilio FERRERO
before "División de Nuevas Creaciones"

in Bogotá, Colombia
on December 20, 2006.

and do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be [illegible] shall take his place.

DERECHO, SOBRE LA(S) [illegible] ANTERIOR(ES) COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

...o cesare la ausencia o impedimento del representante principal, ... su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la ...resentación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola ...r el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de ...a representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 7-02-07

en/in Zurich, Suiza

por/by

Firma

Ignacio Martinez de Lecea
Corporate Counsel

R. Binggeli Signature
Director of Tax, Europe
Baxter Healthcare SA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

17

Official Certification

Seen for authentication of the signatures in front, affixed by

- Rebecca Elaine Binggeli-Wacaser, born 1st of November 1969, citizen of the United States of America, residing at Bälstrasse 43, 8194 Hüntwangen, who is personally known to us,

- Ignacio Martinez de Lecea, born 19th February 1971, citizen of Spain, residing at Brandschenkestrasse 72, 8002 Zurich,

who, according to our electronic data recall of today (state of data: 8th February, 2007, are entered in the Commercial Register with the right to sign jointly by two for the

Baxter Healthcare SA, having its registered domicile in Wallisellen, Switzerland.

The signatures have been acknowledged in our presence by the authorized agent, Miss Martina Salomo, who is personally known to us.

Wallisellen, 8th February, 2007

NOTARIAT WALLISELLEN

Roland Furrer, Deputy Notary public

Begl.-Nr. 165/6
CHF 50.--

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Confederación Suiza, Cantón de Zurich
Confederação Suiça, Cantão de Zurique
El presente documento público / Este documento público

2. Ha sido firmado por Ken Roland Furrer
foi assinado por

3. Actuando en calidad de Notarstellvertreter
na sua qualidade de

4. Se halla sellado/timbrado con/está provisto do sello/carimbo do (da)
Notariat Wallisellen

Certificado

5. En/em 8090 Zurich/Zurique 6. El/no día 9. Feb. 2007

7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich
pela Chancelaria de Estado do Cantão de Zurique

8. Con el número/sob o número 317/2007

9. Sello/timbre/selo/sceau 10. Firma/Assinatura
Fr. 30.–
I. Schärer

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCIÓN OFICIAL 082/2007 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE ACUERDO CON EL CUAL **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, EMPRESA DOMICILIADA EN HERTISTRASSE 2, CH-8304 WALLISELLEN, SUIZA RATIFICA LA SOLICITUD DE PATENTE QUE SE TRAMITA EN EL EXPEDIENTE No. 06.127.737, PRESENTADA POR EMILIO FERRERO COMO AGENTE OFICIOSO ANTE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EN BOGOTÁ, COLOMBIA Y OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832.

EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 7 DE FEBRERO DE 2007 EN ZURICH, SUIZA POR IGNACIO MARTÍNEZ DELECEA ABOGADO SOCIETARIO Y POR R. BINGGELI, DIRECTOR DE IMPUESTOS, EUROPA, BAXTER HEALTHCARE S.A.

CERTIFICACIÓN OFICIAL

Visto para la autenticación de las firmas en el anverso, fijadas por

REBECCA ELAINE BINGGELI-WACASER, nacida el primero de noviembre de 1969, ciudadana de los Estados Unidos de América, residente en Bälstrasse 43, 8194 Hüntwangen, a quien conozco personalmente

IGNACIO MARTÍNEZ DE LECEA, nacido el 19 de febrero de 1971, ciudadano español, residente en Brandschenkestrasse 72, 8002 Zurich

Quienes, de acuerdo con la consulta electrónica de datos de hoy (8 de febrero de 2007) se encuentran registrados en el registro comercial y tienen el derecho a firmar conjuntamente a nombre de Baxter Healthcare SA, que tiene domicilio registrado en Wallisellen, Suiza.

Sus firmas han sido reconocidas en nuestra presencia por la agente autorizada, señorita Martina Salomo, a quien conozco personalmente.

Wallisellen, 8 de febrero de 2007.

Firmado: RONALD FURRER, notario público suplente

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCUITO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2007
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

19

NOTARIA DE WALLISELLEN

Bel Nr. 165/6

CHF 50.–

Nota de apostilla en español #3170/2007 del 9 de febrero de 2007.

Firmado: I Schärer.

COLO-13936-841-009-4

WPCL002G ID 8719

Bogotá, 11 de abril de 2007.

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
INGLES - ESPAÑOL INGLES
Res. 541 Febrero de 1970

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA
19 FEB. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Gilberto Peire Collado Noguera

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR (LA)(LOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA 11 ABR 2007

REPUBLICA DE COLOMBIA
Juan Manuel Botero Martínez
SANTAFE DE BOGOTA D.C.
Notario Sexto

NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2007 APR 11 P 12:44

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

84015b Eduardo Celis

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DE SEMEJANZA LAS FIRMAS INSCRITAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

19 FEB. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 February 2008 (07.02.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/016983 A2

(51) International Patent Classification:
A61L 24/00 (2006.01) *A61L 27/40* (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01) *A61L 27/56* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/074984

(22) International Filing Date: 1 August 2007 (01.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/821,190 2 August 2006 (02.08.2006) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **BAXTER INTERNATIONAL INC.** [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015 (US). **BAXTER HEALTHCARE S.A.** [CH/CH]; Hertistrasse 2, CH-8304 Wallisellen, Kanton Zurich (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **RHEE, Woonza, M.** [US/US]; 3845 LaDonna Avenue, Palo Alto, CA 94306 (US). **REICH, Cary, J.** [US/US]; 114 Ayala Court, Los Gatos, CA 95032 (US). **OSAWA, A., Edward** [US/US]; 40 Eastwood Drive, San Francisco, CA 94112 (US). **VEGA, Felix** [US/US]; 53 Carmelita Street, San Francisco, CA 94117 (US).

(74) Agent: **CASSELL, Nathan, S.**; Townsend and Townsend and Crew LLP, 1200 Seventeenth Street, Suite 2700, Denver, CO 80202, (US).

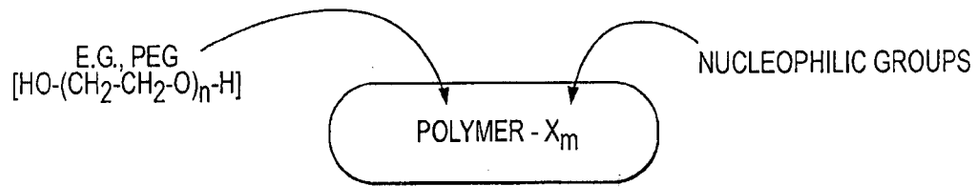
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 2008/016983 A2

(54) Title: RAPIDLY ACTING DRY SEALANT AND METHODS FOR USE AND MANUFACTURE



(57) Abstract: Compositions, methods, and kits are provided for sealing applications. Compositions are prepared by combining a first cross-linkable component with a second cross linkable component to form a porous matrix having interstices, and combining the porous matrix with a hydrogel-forming component to fill at least some of the interstices. The compositions exhibit minimal swelling properties.

RAPIDLY ACTING DRY SEALANT AND METHODS FOR USE AND MANUFACTURE

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit of priority from U.S. Patent Application No. 60/821,190 filed August 2, 2006. This application is also related to U.S. Patent Nos. 5,874,500, 6,063,061, 6,066,325, 6,166,130, and 6,458,889. The contents of each of these filings are hereby incorporated by reference.

STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT

[0002] NOT APPLICABLE

REFERENCE TO A "SEQUENCE LISTING," A TABLE, OR A COMPUTER PROGRAM LISTING APPENDIX SUBMITTED ON A COMPACT DISK.

[0003] NOT APPLICABLE

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] U.S. Pat. No. 5,162,430, issued Nov. 10, 1992, to Rhee et al. discusses collagen-synthetic polymer conjugates prepared by covalently binding collagen to synthetic hydrophilic polymers such as various derivatives of polyethylene glycol. U.S. Pat. No. 5,324,775, issued Jun. 28, 1994, to Rhee et al. discusses various insert, naturally occurring, biocompatible polymers (such as polysaccharides) covalently bound to synthetic, non-immunogenic, hydrophilic polyethylene glycol polymers. U.S. Pat. No. 5,328,955, issued Jul. 12, 1994, to Rhee et al. discusses various activated forms of polyethylene glycol and various linkages which can be used to produce collagen-synthetic polymer conjugates having a range of physical and chemical properties.

[0005] Ser. No. 08/403,358, filed Mar. 14, 1995, discusses a crosslinked biomaterial composition that is prepared using a hydrophobic crosslinking agent, or a mixture of hydrophilic and hydrophobic crosslinking agents. Hydrophobic crosslinking agents can

include any hydrophobic polymer that contains, or can be chemically derivatized to contain, two or more succinimidyl groups.

[0006] U.S. Pat. No. 5,580,923, issued Dec. 3, 1996, to Yeung et al. discusses a composition useful in the prevention of surgical adhesions comprising a substrate material and an anti-adhesion binding agent, where the substrate material preferably comprises collagen and the binding agent preferably comprises at least one tissue-reactive functional group and at least one substrate-reactive functional group.

[0007] U.S. Pat. No. 5,614,587, issued March 25, 1997, to Rhee et al. discusses bioadhesive compositions comprising collagen crosslinked using a multifunctionally activated synthetic hydrophilic polymer, as well as methods of using such compositions to effect adhesion between a first surface and a second surface, wherein at least one of the first and second surfaces can be a native tissue surface.

[0008] Japanese patent publication No. 07090241 discusses a composition used for temporary adhesion of a lens material to a support, to mount the material on a machining device, comprising a mixture of polyethylene glycol, having an average molecular weight in the range of 1000-5000, and poly-N-vinylpyrrolidone, having an average molecular weight in the range of 30,000-200,000.

[0009] West and Hubbell, Biomaterials (1995) 16:1153-1156, discuss the prevention of post-operative adhesions using a photopolymerized polyethylene glycol-co-lactic acid diacrylate hydrogel and a physically crosslinked polyethylene glycol-co-polypropylene glycol hydrogel, Poloxamer 407®.

[0010] U.S. Patent Nos. 5,672,336 and 5,196,185 describe a wound dressing comprising a micro-particulate fibrillar collagen having a particle size of 0.5-2.0 μm. This composition generally comprises an aqueous phase and may not form a hydrogel as described in the present invention. U.S. Pat. No. 5,698,213 describes a cross-linked aliphatic poly-ester hydrogel useful as an absorbable surgical device and drug delivery vehicle. U.S. Pat. No. 5,674,275 describes an acrylate or methacrylate based hydrogel adhesive. U.S. Pat. No. 5,306,501 describes a polyoxyalkylene based thermoreversible hydrogel useful as a drug delivery vehicle.

23

[0011] U.S. Pat. Nos. 4,925,677 and 5,041,292 describe a hydrogel comprising a protein component cross-linked with a polysaccharide or mucopolysaccharide and useful as a drug delivery vehicle.

[0012] Biodegradable injectable drug delivery polymers are described in U.S. Pat. No. 5,384,333 and by Jeong et al. (1997) "Nature," 388:860-862. Biodegradable hydrogels for controlled released drug delivery are described in U.S. Pat. No. 4,925,677. Resorbable collagen-based drug delivery systems are described in U.S. Pat. Nos. 4,347,234 and 4,291,013. Aminopolysaccharide-based biocompatible films for drug delivery are described in U.S. Pat. Nos. 5,300,494 and 4,946,870. Water soluble carriers for the delivery of taxol are described in U.S. Pat. No. 5,648,506.

[0013] Polymers have been used as carriers of therapeutic agents to effect a localized and sustained release (Langer, et al., Rev. Macro. Chem. Phys., C23 (1), 61, 1983; Controlled Drug Delivery, Vol. I and II, Bruck, S.D., (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1983; Leong et al., Adv. Drug Delivery Review, 1:199, 1987). These therapeutic agent delivery systems simulate infusion and offer the potential of enhanced therapeutic efficacy and reduced systemic toxicity.

[0014] Other classes of synthetic polymers which have been proposed for controlled release drug delivery include polyesters (Pitt, et al., in Controlled Release of Bioactive Materials, R. Baker, Ed., Academic Press, New York, 1980); polyamides (Sidman, et al., Journal of Membrane Science, 7:227, 1979); polyurethanes (Maser, et al., Journal of Polymer Science, Polymer Symposium, 66:259, 1979); polyorthoesters (Heller, et al., Polymer Engineering Scient, 21:727, 1981); and polyanhydrides (Leong, et al., Biomaterials, 7:364, 1986).

[0015] Collagen-containing compositions which have been mechanically disrupted to alter their physical properties are described in U.S. Pat. Nos. 5,428,024; 5,352,715; and 5,204,382. These patents generally relate to fibrillar and insoluble collagens. An injectable collagen composition is described in U.S. Pat. No. 4,803,075. An injectable bone/cartilage composition is described in U.S. Pat. No. 5,516,532. A collagen-based delivery matrix comprising dry particles in the size range from 5 μm to 850 μm which may be suspended in water and which has a particular surface charge density is described in WO 96/39159. A collagen preparation having a particle size from 1 μm to 50 μm useful as an aerosol spray to form a wound dressing is described in U.S. Pat. No. 5,196,185. Other patents describing collagen compositions include U.S. Pat. Nos. 5,672,336 and 5,356,614. A polymeric, non-

erodible hydrogel that may be cross-linked and injected via a syringe is described in WO 96/06883.

[0016] The following pending applications, assigned to the assignee of the present application, contain related subject matter: U.S. Ser. No. 08/903,674, filed on Jul. 31, 1997; U.S. Ser. No. 60/050,437, filed on Jun. 18, 1997; U.S. Ser. No. 08/704,852, filed on Aug. 27, 1996; U.S. Ser. No. 08/673,710, filed Jun. 19, 1996; U.S. Ser. No. 60/011,898, filed Feb. 20, 1996; U.S. Ser. No. 60/006,321, filed on Nov. 7, 1996; U.S. Ser. No. 60/006,322, filed on Nov. 7, 1996; U.S. Ser. No. 60/006,324, filed on Nov. 7, 1996; and U.S. Ser. No. 08/481,712, filed on Jun. 7, 1995. The full disclosures of each of these applications is incorporated herein by reference. Each publication cited above and herein is incorporated herein by reference in its entirety. There are a variety of materials suitable for use as bioadhesives, for tissue augmentation, for the prevention of surgical adhesions, for coating surfaces of synthetic implants, as drug delivery matrices, for ophthalmic applications, and the like. Yet in many cases the setting time for these materials can be less than optimal, whereas for surgical and other medical applications, a rapidly acting material is often preferred. In other cases, currently available materials may exhibit swelling properties that are undesirable for certain surgical applications. Thus, what is needed is a rapidly acting material, for use as, for example, a tissue sealant for hemostatic and/or wound sealing applications. It would also be desirable to provide materials that exhibit minimal swelling properties.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0017] The present invention provides compositions for the achievement of hemostasis or other fluid containment in an *in vivo* context. The compositions of the invention comprise first and second cross-linkable components and at least one hydrogel-forming component, in a composition suitable for applying to a vertebrate to facilitate fluid containment. Compositions include rapidly acting materials, for use as, for example, a tissue sealant for hemostatic and/or wound sealing applications. Compositions exhibit minimal swelling properties.

[0018] In a first aspect, embodiments of the present invention provide a composition that includes a first cross-linkable component, a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions, and a hydrogel-forming component. The first and second cross-linkable component cross-link to form a

porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices. In some aspects, the pH of the hydrogel-forming component may affect a reaction time for forming a sealant matrix barrier. For example, in some embodiments, a composition that includes a hydrogel-forming component having a pH of 6.75 provides a slower reaction time than composition that includes a hydrogel-forming component having a pH of 9.5.

[0019] The first cross-linkable component can include multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component can include multiple electrophilic groups. In some aspects, the first cross-linkable component includes a multi-nucleophilic polyalkylene oxide having m nucleophilic groups, and the second cross-linkable component includes a multi-electrophilic polyalkylene oxide having n electrophilic groups, where m and n are each greater than or equal to two, and wherein m+n is greater than or equal to five. In some aspects, n is two, and m is greater than or equal to three. The multi-nucleophilic polyalkylene oxide can be tetrafunctionally activated. In some aspects, m is two, and n is greater than or equal to three. The multi-electrophilic polyalkylene oxide can be tetrafunctionally activated. In some cases, both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide are tetrafunctionally activated. The multi-nucleophilic polyalkylene oxide can include two or more nucleophilic groups, for example NH_2, -SH, -H, $-PH_2$, and/or -CO-NH-NH_2. In some cases, the multi-nucleophilic polyalkylene oxide includes two or more primary amino groups. In some cases, the multi-nucleophilic polyalkylene oxide includes two or more thiol groups. The multi-nucleophilic polyalkylene oxide can be polyethylene glycol or a derivative thereof. In some cases, the polyethylene glycol includes two or more nucleophilic groups, which may include a primary amino group and/or a thiol group. The multi-electrophilic polyalkylene oxide can include two or more electrophilic groups such as $-CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, -N=C=O, $-SO_2CH=CH_2$, $-N(COCH)_2$, and/or -S-S-(C_5H_4N). The multi-electrophilic polyalkylene oxide may include two or more succinimidyl groups. The multi-electrophilic polyalkylene oxide may include two or more maleimidyl groups. In some cases, the multi-electrophilic polyalkylene oxide can be a polyethylene glycol or a derivative thereof.

[0020] In some aspects, the composition includes a polysaccharide or a protein. The polysaccharide can be a glycosaminoglycan, such as hyaluronic acid, chitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratin sulfate, keratosulfate, heparin, or a derivative thereof. The protein can be collagen or a derivative thereof. The multi-

nucleophilic polyalkylene oxide or the multi-electrophilic polyalkylene oxide, or both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide, may include a linking group. In some cases, the multi-nucleophilic polyalkylene oxide can be given by the formula: polymer-Q^1-X_m. The multi-electrophilic polyalkylene oxide can be given by the formula: polymer-Q^2-Y_n. X can be a electrophilic group and Y can be a nucleophilic group, m and n can each be 2 to 4, m+n can be ≤ 5, and each of Q^1 and Q^2 can be linking groups such as -O-$(CH_2)_{n'}$-, -S-, -$(CH_2)_{n'}$-, -NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-CR^1H, and/or -O-R^2-CO-NH. In some cases, n' can be 1 to 10, R^1 can be -H, -CH_3, or -C_2H_5, R^2 can be -CH_2- or -CO-NH-CH_2CH_2-, and Q^1 and Q^2 can be the same or different or can be absent. In some aspects, Y can be -$CO_2N(COCH_2)_2$ or -$CO_2N(COCH_2)_2$. In some cases, the multi-nucleophilic polykylene oxide or the multi-electrophilic polyalkylene oxide, or both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide, further include a biodegradable group. The biodegradable group can be a lactide, glycolide, ϵ-caprolactone, poly(α-hydroxy acid), poly(amino acid), or a poly(anhydride). In some aspects, the hydrogel forming component is capable of being hydrated to form a fragmented biocompatible hydrogel that includes gelatin and absorbs water when delivered to a moist tissue target site. The hydrogel can include subunits having sizes ranging from about 0.01 mm to about 5 mm when fully hydrated and an equilibrium swell ranging from about 400% to about 5000%. In some cases, the hydrogel has an in vivo degradation time of less than one year. In some cases, the hydrogel is at least partially hydrated with an aqueous medium and includes an active agent, which may include a clotting agent, such as thrombin.

[0021] In another aspect, embodiments of the present invention provide a method for delivering an active agent to a patient. The method can include administering to a target site on the patient an amount of a composition as described herein. In some aspects, embodiments include a method for delivering a sealing agent to a patient. The method can include administering to a bleeding target site an amount of a composition as described herein in an amount sufficient to inhibit bleeding. In some aspects, embodiments include a method for delivering thrombin to a patient. The method can include administering to a bleeding target site an amount of a composition as described herein in an amount sufficient to inhibit bleeding.

[0022] In still another aspect, embodiments of the present invention encompass a composition that includes a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic

polyalkylene oxide, and a hydrogel forming component. The multi-nucleophilic polyalkylene oxide further can include at least one primary amino group and at least one thiol group. Under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross linking. Embodiments encompass compositions where the multi-nucleophilic polyalkylene oxide includes two or more thiol groups and the multi-electrophilic polyalkylene oxide includes two or more electrophilic groups such as a succinimidyl group and/or a maleimidyl group. Embodiments also encompass compositions where the multi-nucleophilic polyalkylene oxide includes two or more nucleophilic groups such as a primary amino group and/or a thiol groups. The multi-electrophilic polyalkylene oxide can include two or more succinimidyl groups. In some cases, embodiments encompass compositions that include a first polyethylene glycol having two or more thiol groups, a second polyethylene glycol having two or more succinimidyl groups or maleimidyl groups, and a hydrogel forming component. The sum of the thiol groups and the succinimidyl or maleimidyl groups may be at least five, and under reaction-enabling conditions the first polyethylene glycol and second polyethylene glycol may be capable of substantially immediate cross linking. In some cases, the first polyethylene glycol includes four thiol groups and the second polyethylene glycol includes four succinimidyl groups. In some cases, the composition includes a protein or a polysaccharide. The polysaccharide can be a glycosaminoglycan, such as hyaluronic acid, chitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratin sulfate, keratosulfate, heparin, or a derivative thereof. The protein can be collagen or a derivative thereof.

[0023] In another aspect, embodiments of the present invention include a method for sealing a tissue tract. The method can include at least partly filling a tissue tract with a composition that includes a first cross-linkable component, a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions, and a hydrogel-forming component. The first and second cross-linkable components can cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component can be capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices. In some cases, the hydrogel includes subunits that have sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, that have an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and that degrade in the tissue tract after from about 1 to

about 120 days. In some cases, the first cross-linkable component includes multiple nucleophilic groups and the second polymer comprises multiple electrophilic groups.

[0024] In still another aspect, embodiments of the present invention include a method for inhibiting bleeding at a target site in a patient's body. The method can include delivering a composition to the target site in an amount sufficient to inhibit bleeding, where the composition includes a first cross-linkable component, a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions, and a hydrogel-forming component. The first and second cross-linkable components can cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel forming component may be capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices. The hydrogel can include subunits that have sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, that have an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and that degrade in the tissue tract after from about 1 to about 120 days. The first cross-linkable component can include multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component can include multiple electrophilic groups. In another aspect, embodiments of the present invention include a method for delivering a bioactive substance to a target site in a patient's body. The method can include delivering a composition in combination with the bioactive substance to the target site, where the composition includes a first cross-linkable component, a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions, and a hydrogel-forming component. The first and second cross-linkable components can cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel forming component may be capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices. The hydrogel can have subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and can degrade in the tissue tract after from about 1 to about 120 days. In some cases, the first cross-linkable component includes a multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component includes multiple electrophilic groups. The bioactive substance can be a hemostatic agent, such as thrombin.

[0025] In another aspect, embodiments of the present invention include a method for delivering a swellable composition to a target site in tissue. The method can include applying the composition to the target site, where the composition includes a first cross-linkable component, a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable

component under reaction enabling conditions, and a hydrogel-forming component. The first and second cross-linkable components can cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel forming component can be capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices. The hydrogel can include subunits that have sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, that have an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and that degrade in the tissue tract after from about 1 to about 120 days. The composition may be hydrated at less than its equilibrium swell upon application to the target site where it swells to an equilibrium swell value. In some aspects, the first cross-linkable component includes multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component includes multiple electrophilic groups. In some aspects, the target site is in tissue can be muscle, skin, epithelial tissue, smooth, skeletal or cardiac muscle, connective or supporting tissue, nerve tissue, ophthalmic and other sense organ tissue, vascular and cardiac tissue, gastrointestinal organs and tissue, pleura and other pulmonary tissue, kidney, endocrine glands, male and female reproductive organs, adipose tissue, liver, pancreas, lymph, cartilage, bone, oral tissue, and mucosal tissue, and spleen and other abdominal organs. In some aspects, the target site includes a void region within the selected tissue, such as a tissue divot, tissue tract, intravertebral space, or body cavity. In some cases, the hydrogel has a degree of hydration in the range from 50% to 95% of the hydration at equilibrium swell. In some cases the hydrogel includes a plasticizer, such as polyethylene glycol, sorbitol, or glycerol. The plasticizer may be present at from 0.1% by weight to 30% by weight of the composition of the hydrogel component. In some cases, the hydrogel includes a cross-linked protein hydrogel. The protein can include gelatin, soluble collagen, albumin, hemoglobin, fibrogen, fibrin, casein, fibronectin, elastin, keratin, laminin, and derivatives and combinations thereof. In some cases, the hydrogel includes a cross-linked polysaccharide. The polysaccharide can include glycosaminoglycans, starch derivatives, cellulose derivatives, hemicellulose derivatives, xylan, agarose, alginate, and chitosan and combinations thereof. In some cases, the hydrogel includes a cross-linked non-biologic polymer. The cross-linked non-biologic polymer can include polyacrylates, polymethacrylates, polyacrylamides, polyvinyl resins, polyactide-glycolides, polcaprolactones, polyoxyethlenes, and combinations thereof. In some cases, the hydrogel includes at least two components selected from a group that includes cross-linked proteins, cross-linked polysaccharides, and cross-linked non-biologic polymers. The hydrogel can include a hydrogel polymer and a hydrogel cross-linking agent. The hydrogel polymer and the hydrogel cross-linking agent may have been reacted under conditions which yield cross-

linking of hydrogel polymer molecules. In some cases, the hydrogel includes a molecular cross linked hydrogel polymer that has been produced by irradiation of the hydrogel under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules. In some cases, the hydrogel includes a molecular cross linked hydrogel that has been produced by reaction of monounsaturated and polyunsaturated hydrogel monomers under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

[0026] In yet another aspect, embodiments of the present invention encompass a method of forming a three dimensional synthetic polymer matrix. The method includes providing a first cross-linkable component containing m nucleophilic groups and a second cross-linkable component containing n electrophilic groups. The electrophilic groups react with the nucleophilic groups to form covalent bonds therewith, m and n are each greater than or equal to two, and m+n is greater than or equal to five. The method also includes combining the first cross-linkable component and the second cross-linkable component, adding a hydrogel forming component to the first cross-linkable component and the second cross-linkable component, and allowing the first cross-linkable component and the second cross-linkable component to become cross-linked to one another to form a three dimensional matrix. The method can also include contacting a first tissue surface and a second surface with the first cross-linkable component, the second cross linkable component, and the hydrogel forming component. In some cases, the second surface is a native tissue surface. In some cases, the second surface is a non-native tissue surface, such as a synthetic implant. The synthetic implant can be a donor cornea, an artificial blood vessel, a heart valve, an artificial organ, a bond prosthesis, an implantable lenticule, a vascular graft, a stent, or a stent/graft combination. In some cases, the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel forming component are each applied in powdered form at the first tissue surface. In some cases, the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel forming component are each applied as a powder in a single combined mixed powder formulation at the first tissue surface. The mixed powder formulation can include a protein and/or a polysaccharide. The first tissue surface may be on or in a hard tissue or a soft tissue. The first tissue surface can include, surround or be adjacent to a surgical site. The method can also include closing the surgical site. In some cases, the mixed powder formulation includes collagen. In some cases, the mixed powder formulation includes a biologically active agent. In some aspects, embodiments of the present invention encompass a mixed powder composition that includes a first cross-linkable

component in powdered form having multiple nucleophilic groups, a second cross-linkable component in powdered form having multiple electrophilic groups, and a hydrogel forming component in powdered form. Under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

[0027] In a related aspect, the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition. The first cross-linkable component can be present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition. In some cases, the second cross-linkable component can be present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition. A weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component can be in the range from about 45% to about 55%. Relatedly, a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component can be about 50%. In some cases, a weight ratio between the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component can be within a range from about 28% to about 42% w/w. Relatedly, a weight ratio between the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component can be within a range from about 20% to about 30% w/w. In some aspects, the first cross-linkable component can be present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition. Relatedly, the second cross-linkable component can be present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition. A weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component can be in the range from about 45% to about 55%. Similarly, a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component can be about 50%.

[0028] In another aspect, embodiments of the present invention provide sealant matrix composition kits. A kit can include, for example, a container and a mixed powder composition disposed within the container. The composition can include a first cross-linkable component having multiple nucleophilic groups and a second cross-linkable component having multiple electrophilic groups. The first cross-linkable component, the second cross-linkable component, or both, may be in powdered form. The kit can also include a hydrogel forming component in powdered form. Under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components may be capable of substantially

immediate cross-linking. In some cases, the container includes a syringe barrel and a syringe plunger. A kit can also include written instructions for applying the mixed powder composition to a bleeding target site in a patient. In some cases, the mixed powder includes an active agent. The active agent may include thrombin. In another aspect, a kit may include a collagen sponge or other suitable support, and a mixed powder composition fixed with a surface of the sponge or support. The composition can include a first cross-linkable component having multiple nucleophilic groups and a second cross-linkable component having multiple electrophilic groups. The first cross-linkable component, the second cross-linkable component, or both, may be in powdered form. The kit can also include a hydrogel forming component in powdered form. Under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components may be capable of substantially immediate cross-linking.

[0029] For a fuller understanding of the nature and advantages of the present invention, reference should be had to the ensuing detailed description taken in conjunction with the accompanying drawings.

[0030] The present invention includes but is not limited to:

[0031] A composition comprising:
a first cross-linkable component;
a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and
a hydrogel-forming component;
wherein the first and second cross-linkable component cross-link to form a porous matrix having interstices, and wherein the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices.

[0032] The composition of paragraph 31, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

[0033] The composition of paragraph 31, wherein the first cross-linkable component comprises a multi-nucleophilic polyalkylene oxide having m nucleophilic groups, and the second cross-linkable component comprises a multi-electrophilic polyalkylene oxide having n electrophilic groups, wherein m and n are each greater than or equal to two, and wherein m+n is greater than or equal to five.

[0034] The composition of paragraph 33, wherein n is two, and wherein m is greater than or equal to three.

[0035] The composition of paragraph 34, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is tetrafunctionally activated.

[0036] The composition of paragraph 33, wherein m is two, and wherein n is greater than or equal to three.

[0037] The composition of paragraph 36, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is tetrafunctionally activated.

[0038] The composition of paragraph 33, wherein both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide are tetrafunctionally activated.

[0039] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of NH_2, -SH, -H, $-PH_2$, and -CO-NH-NH_2.

[0040] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more primary amino groups.

[0041] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more thiol groups.

[0042] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is polyethylene glycol or a derivative thereof.

[0043] The composition of paragraph 42, wherein the polyethylene glycol further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of a primary amino group and a thiol group.

[0044] The composition of paragraph 33, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more electrophilic groups selected from the group consisting of $CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, -N=C=O, $-SO_2CH=CH_2$, $N(COCH)_2$, and -S-S-(C_5H_4N).

[0045] The composition of paragraph 33, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more succinimidyl groups.

[0046] The composition of paragraph 33, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more maleimidyl groups.

[0047] The composition of paragraph 33, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is a polyethylene glycol or a derivative thereof.

[0048] The composition of paragraph 33 further comprising a polysaccharide or a protein.

[0049] The composition of paragraph 33 further comprising a polysaccharide, wherein the polysaccharide is a glycosaminoglycan.

[0050] The composition of paragraph 49, wherein the glycosaminoglycan is selected from the group consisting of hyaluronic acid, chitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratin sulfate, keratosulfate, heparin, and derivatives thereof.

[0051] The composition of paragraph 33 further comprising a protein, wherein the protein is collagen or a derivative thereof.

[0052] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide or the multi-electrophilic polyalkylene oxide, or both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide, further comprise(s) a linking group.

[0053] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is given by the formula:

polymer-Q^1-X_m

and wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is given by the formula:

polymer-Q^2-Y_n

wherein X is an electrophilic group and Y is a nucleophilic group;

wherein m and n are each 2 to 4;

wherein $m+n \leq 5$;

wherein each of Q^1 and Q^2 are linking groups selected from the group consisting of -O-$(CH_2)_{n'}$-, -S-, -$(CH_2)_{n'}$-, -NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-CR^1H, and -O-R^2-CO-NH;

wherein n'=1 to 10;

wherein R^1 =-H, -CH_3, or -C_2H_5;

wherein R^2 =-CH_2- or -CO-NH-CH_2CH_2-; and

wherein Q^1 and Q^2 may be the same or different or may be absent.

[0054] The composition of paragraph 53, wherein Y is given by the formula:

$-CO_2N(COCH_2)_2$.

[0055] The composition of paragraph 53, wherein Y is given by the formula:

$-N(COCH)_2$.

[0056] The composition of paragraph 33, wherein the multi-nucleophilic polykylene oxide or the multi-electrophilic polyalkylene oxide or both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprise(s) a biodegradable group.

[0057] The composition of paragraph 56, wherein the biodegradable group is selected from the group consisting of lactide, glycolide, ϵ-caprolactone, poly(α-hydroxy acid), poly(amino acid), and poly(anhydride).

[0058] The composition of paragraph 31, wherein the hydrogel forming component is capable of being hydrated to form a fragmented biocompatible hydrogel that comprises gelatin and will absorb water when delivered to a moist tissue target site, and wherein the hydrogel comprises subunits having sizes ranging from about 0.01 mm to about 5 mm when fully hydrated and has an equilibrium swell ranging from about 400% to about 5000%.

[0059] The composition of paragraph 58, wherein the hydrogel has an in vivo degradation time of less than one year.

[0060] The composition of any of paragraphs 58 and 59, wherein the hydrogel is at least partially hydrated with an aqueous medium comprising an active agent.

[0061] The composition of paragraph 60, wherein the active agent is a clotting agent.

[0062] The composition of paragraph 61, wherein the clotting agent is thrombin.

[0063] A method for delivering an active agent to a patient, the method comprising administering to a target site on the patient an amount of the composition of paragraph 60.

[0064] A method for delivering a sealing agent to a patient, the method comprising administering to a bleeding target site an amount of the composition of paragraph 31 sufficient to inhibit bleeding.

[0065] A method for delivering thrombin to a patient, the method comprising administering to a bleeding target site an amount of the composition of paragraph 62 sufficient to inhibit bleeding.

[0066] A composition comprising a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic polyalkylene oxide, and a hydrogel forming component, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises at least one primary amino group and at least one thiol group, and wherein under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross linking.

[0067] A composition comprising a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic polyalkylene oxide, and a hydrogel forming component, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more thiol groups and the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more electrophilic groups selected from the group consisting of succinimidyl groups and maleimidyl groups, and wherein under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross linking.

[0068] A composition comprising a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic polyalkylene oxide, and a hydrogel forming component, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of primary amino groups and thiol groups, and the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more succinimidyl groups, and wherein under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross linking.

[0069] A composition comprising a first polyethylene glycol comprising two or more thiol groups, a second polyethylene glycol comprising two or more succinimidyl groups or maleimidyl groups, and a hydrogel forming component, wherein the sum of the thiol groups and the succinimidyl or maleimidyl groups is at least five, and wherein under reaction-enabling conditions the first polyethylene glycol and second polyethylene glycol are capable of substantially immediate cross linking.

[0070] The composition of paragraph 69, wherein the first polyethylene glycol further comprises four thiol groups and the second polyethylene glycol further comprises four succinimidyl groups.

37

[0071] The composition of paragraph 69 further comprising a protein or a polysaccharide.

[0072] The composition of paragraph 69 further comprising a polysaccharide, wherein the polysaccharide is a glycosaminoglycan.

[0073] The composition of paragraph 72, wherein the glycosaminoglycan is selected from the group consisting of hyaluronic acid, chitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratin sulfate, keratosulfate, heparin, and derivatives thereof.

[0074] The composition of paragraph 69 further comprising a protein, wherein the protein is collagen or a derivative thereof.

[0075] A method for sealing a tissue tract, the method comprising at least partly filling a tissue tract with a composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days.

[0076] The method of paragraph 75, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second polymer comprises multiple electrophilic groups.

[0077] A method for inhibiting bleeding at a target site in a patient's body, the method comprising delivering a composition to the target site in an amount sufficient to inhibit bleeding, the composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days.

[0078] The method of paragraph 77, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

[0079] A method for delivering a bioactive substance to a target site in a patient's body, the method comprising delivering a composition in combination with the bioactive substance to the target site, the composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days.

[0080] The method of paragraph 79, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

[0081] A method as in paragraph 79, wherein the bioactive substance is a hemostatic agent.

[0082] A method as in paragraph 79, wherein the bioactive substance is thrombin.

[0083] A method for delivering a swellable composition to a target site in tissue, said method comprising applying the composition to the target site, the composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days, the composition being hydrated at less than its equilibrium swell upon application to the target site where it swells to an equilibrium swell value.

[0084] The method of paragraph 83, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

[0085] The method of paragraph 83, wherein the target site is in tissue selected from the group consisting of muscle, skin, epithelial tissue, connective or supporting tissue, nerve tissue, ophthalmic and other sense organ tissue, vascular and cardiac tissue, gastrointestinal organs and tissue, pleura and other pulmonary tissue, kidney, endocrine glands, male and female reproductive organs, adipose tissue, liver, pancreas, lymph, cartilage, bone, oral tissue, and mucosal tissue, and spleen and other abdominal organs.

[0086] The method of paragraph 85, wherein the target site is a void region within the selected tissue.

[0087] The method of paragraph 86, wherein the void region is selected from the group consisting of tissue divots, tissue tracts, intravertebral spaces, and body cavities.

[0088] The method of paragraph 83, wherein the hydrogel has a degree of hydration in the range from 50% to 95% of the hydration at equilibrium swell.

[0089] The method of paragraph 83, wherein the hydrogel comprises a plasticizer.

[0090] The method of paragraph 89, wherein the plasticizer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, sorbitol, and glycerol.

40

[0091] The method of paragraph 89, wherein the plasticizer is present at from 0.1% by weight to 30% by weight of the composition of the hydrogel component.

[0092] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises a cross-linked protein hydrogel.

[0093] A method as in paragraph 92, wherein the protein is selected from the group consisting of gelatin, soluble collagen, albumin, hemoglobin, fibrogen, fibrin, casein, fibronectin, elastin, keratin, laminin, and derivatives and combinations thereof.

[0094] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises a cross-linked polysaccharide.

[0095] A method as in paragraph 94, wherein the polysaccharide is selected from the group consisting of glycosaminoglycans, starch derivatives, cellulose derivatives, hemicellulose derivatives, xylan, agarose, alginate, and chitosan and combinations thereof.

[0096] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises a cross-linked non-biologic polymer.

[0097] A method as in paragraph 96, wherein the cross-linked non-biologic polymer selected from the group consisting of polyacrylates, polymethacrylates, polyacrylamides, polyvinyl resins, polyactide-glycolides, polcaprolactones, polyoxyethlenes, and combinations thereof.

[0098] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises at least two components selected from the group consisting of cross-linked proteins, cross-linked polysaccharides, and cross-linked non-biologic polymers.

[0099] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises a hydrogel polymer and a hydrogel cross-linking agent, wherein the hydrogel polymer and hydrogel cross-linking agent have been reacted under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

[0100] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises a molecular cross linked hydrogel polymer that has been produced by irradiation of the hydrogel under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

[0101] A method as in any one of paragraphs 75-91, wherein the hydrogel comprises a molecular cross linked hydrogel that has been produced by reaction of monounsaturated and

polyunsaturated hydrogel monomers under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

[0102] A method of forming a three dimensional synthetic polymer matrix comprising the steps of:

providing a first cross-linkable component containing m nucleophilic groups and a second cross-linkable component containing n electrophilic groups, wherein the electrophilic groups react with the nucleophilic groups to form covalent bonds therewith, wherein m and n are each greater than or equal to two, and wherein m+n is greater than or equal to five;

combining the first cross-linkable component and the second cross-linkable component;

adding a hydrogel forming component to the first cross-linkable component and the second cross-linkable component;

allowing the first cross-linkable component and the second cross-linkable component to become cross-linked to one another to form a three dimensional matrix.

[0103] The method of paragraph 102, further comprising contacting a first tissue surface and a second surface with the first cross-linkable component, the second cross linkable component, and the hydrogel forming component.

[0104] The method of paragraph 103, wherein the second surface is a native tissue surface.

[0105] The method of paragraph 103, wherein the second surface is a non-native tissue surface.

[0106] The method of paragraph 105, wherein the non-native tissue surface is a synthetic implant.

[0107] The method of paragraph 106, wherein the synthetic implant is selected from the group consisting of a donor cornea, an artificial blood vessel, a heart valve, an artificial organ, a bond prosthesis, an implantable lenticule, a vascular graft, a stent, and a stent/graft combination.

[0108] The method of paragraph 102, wherein the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel forming component are each applied in powdered form at the first tissue surface.

[0109] The method of paragraph 102, wherein the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel forming component are each applied as a powder in a single combined mixed powder formulation at the first tissue surface.

[0110] The method of paragraph 109, wherein the mixed powder formulation further comprises a protein or a polysaccharide.

[0111] The method of paragraph 102, wherein the first tissue surface is on or in a hard tissue or a soft tissue.

[0112] The method of paragraph 102, wherein the first tissue surface comprises, surrounds or is adjacent to a surgical site, and wherein the method further comprises the step of closing the surgical site.

[0113] The method of paragraph 102, wherein the mixed powder formulation further comprises collagen.

[0114] The method of paragraph 102, wherein the mixed powder formulation further comprises a biologically active agent.

[0115] A mixed powder composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form; and

a hydrogel forming component in powdered form;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

[0116] The mixed powder composition of paragraph 115, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the first cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

[0117] The mixed powder composition of paragraph 115, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the second cross-linkable component is present at a

concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

[0118] The mixed powder composition of paragraph 115, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is in the range from about 45% to about 55%.

[0119] The mixed powder composition of paragraph 115, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is about 50%.

[0120] The mixed powder composition of paragraph 115, wherein a weight ratio between the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component is within a range from about 28% to about 42% w/w.

[0121] The mixed powder composition of paragraph 115, wherein a weight ratio between the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component is within a range from about 20% to about 30% w/w.

[0122] The mixed powder composition of paragraph 121, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the first cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

[0123] The mixed powder composition of paragraph 121, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the second cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

[0124] The mixed powder composition of paragraph 121, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is in the range from about 45% to about 55%.

[0125] The mixed powder composition of paragraph 121, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is about 50%.

[0126] A kit comprising:

a container; and

a mixed powder composition disposed within the container, the composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form; and

a hydrogel forming component in powdered form;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

[0127] The kit of paragraph 126, wherein the container comprises a syringe barrel and a syringe plunger.

[0128] The kit of paragraph 126, further comprising written instructions for applying the mixed powder composition to a bleeding target site in a patient.

[0129] The kit of paragraph 126, wherein the mixed powder further comprises an active agent.

[0130] The kit of paragraph 129, wherein the active agent comprises thrombin.

[0131] A kit comprising:

a collagen sponge; and

a mixed powder composition fixed with a surface of the sponge, the mixed powder composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form; and

a hydrogel forming component in powdered form;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

[0132] A composition for the manufacture of a medicament comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable component cross-link to form a porous matrix having interstices, and wherein the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices.

[0133] The composition of paragraph 132, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

[0134] The composition of paragraph 133, wherein the first cross-linkable component comprises a multi-nucleophilic polyalkylene oxide having m nucleophilic groups, and the second cross-linkable component comprises a multi-electrophilic polyalkylene oxide having n electrophilic groups, wherein m and n are each greater than or equal to two, and wherein m+n is greater than or equal to five.

[0135] The composition of paragraph 134, wherein n is two, and wherein m is greater than or equal to three.

[0136] The composition of paragraph 135, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is tetrafunctionally activated.

[0137] The composition of paragraph 134, wherein m is two, and wherein n is greater than or equal to three.

[0138] The composition of paragraph 137, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is tetrafunctionally activated.

[0139] The composition of paragraph 134, wherein both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide are tetrafunctionally activated.

[0140] The composition of paragraph 134, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of NH_2, -SH, -H, $-PH_2$, and -CO-NH-NH_2.

[0141] The composition of paragraph 134, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more primary amino groups.

[0142] A composition comprising:

a collagen sponge comprising native collagen fibers; and

a mixed powder composition fixed with a surface of the sponge, the mixed powder composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form and comprising about 10% of the mixed powder;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form and comprising about 10% of the mixed powder; and

a hydrogel forming component in powdered form, comprising about 80% of the mixed powder;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0143] **FIG. 1** illustrates a first cross-linkable component according to some embodiments of the present invention.

[0144] **FIG. 2** illustrates a second cross-linkable component according to some embodiments of the present invention.

[0145] **FIG. 3** shows the formation of a crosslinked matrix composition from a hydrophilic polymer according to some embodiments of the present invention.

[0146] **FIG. 4** shows the formation of a crosslinked matrix composition from a hydrophobic polymer according to some embodiments of the present invention.

[0147] **FIG. 5** illustrates a hydrogel-forming component subunit according to some embodiments of the present invention.

[0148] **FIG. 6** illustrates the correlation between percent swell and the percent solids of a fragmented crosslinked polymeric gel useful as a hydrogel-forming component in a sealant composition according to some embodiments of the present invention.

[0149] **FIGS. 7A-E** illustrate the application of a sealant matrix composition to treat a splenic artery puncture according to embodiments of the present invention.

[0150] **FIGS. 8A-E** illustrate the application of a sealant matrix composition to treat a hepatic resection according to embodiments of the present invention.

[0151] **FIG. 9** illustrates the processing and packaging of a sealant matrix composition according to embodiments of the present invention.

[0152] **FIG. 10** illustrates the processing and packaging of a sealant matrix composition according to embodiments of the present invention.

[0153] **FIG. 11** illustrates the effect of PEG concentration on gel strength, according to embodiments of the present invention.

[0154] **FIG. 12** illustrates the effect of PEG concentration on swelling ratio, according to embodiments of the present invention.

[0155] **FIG. 13** illustrates the effect of PEG concentration on swelling ratio, according to embodiments of the present invention.

[0156] **FIG. 14** illustrates the effect of PEG concentration on swelling ratio, according to embodiments of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0157] According to some embodiments, the present invention provides dry sealant matrix compositions for the achievement of hemostasis or other fluid containment in an *in vivo* context by sealing a tissue breach or defect. The compositions of some embodiments of the invention comprise first and second cross-linkable components and at least one hydrogel-forming component, in a dry composition suitable for applying to a tissue of a vertebrate to facilitate fluid containment. The first and second components in the compositions of the invention react under *in-vivo* conditions to form a cross-linked matrix, while the hydrogel-forming component rapidly absorbs the biological fluid coming through the tissue breach, as well as strengthening the resultant physical sealant matrix barrier formed as the first and second components cross-link. As described in this application, "sealant matrix compositions" may refer to compositions of the invention before application to the tissue site *in vivo*, and "sealant matrix barrier" may refer to the resulting matrix barrier after the compositions of the invention contact biological fluids and the first and second components cross-link to form a porous cross-linked matrix containing the hydrogel. Sealant matrix compositions may be produced in a variety of formats, including powders, cakes,

pads, and the like. Cake embodiments include sealant matrix composition powder samples that have been heated or baked to form an aggregate body. Pad embodiments include sealant matrix composition powder samples that have been placed on a sponge such as a collagen sponge or other support, which is then baked to created a solidified powder that is fused to the sponge or support.

[0158] Although the present invention may be used to contain non-blood biological fluids (e.g., lymph or spinal fluid), the sealant matrix formed by the compositions of some embodiments of the present invention may also be called a "hemostatic matrix," as this is a primary use described herein.

[0159] In addition to providing rapid hemostasis and a barrier with high adherence to surrounding tissues, the sealant matrix of some embodiments of the present invention has several advantages over previously disclosed materials used to achieve hemostasis. First, the sealant matrix of some embodiments of the present invention may be used under conditions where the tissue breach is quite wet (e.g., rapidly oozing or spurting arterial bleeds, such as abrasive or sharp trauma to an internal organ). In comparison, many compositions currently marketed for hemostasis require a relatively dry site for proper adherence of the composition and the maintenance of hemostasis. For example, in some cases certain PEG mixtures may be placed in a rapidly bleeding site, however it is likely that they could be washed away. Similarly, in some cases certain gelatin compositions could hydrate in a rapidly bleeding site, however it is likely that they could have difficulty remaining at the site. Advantageously, it has been discovered that preparations which include a first cross-linkable component, a second cross-linkable component, and a hydrogel-forming component can provide a material that in reaction enabling conditions remains immobilized even with substantial bleeding to form a mechanically stable clot-like material to staunch the bleeding. Second, the sealant matrix of some embodiments of the present invention functions by physically sealing the tissue breach, without reliance on any endogenous clotting capacity of the vertebrate. Thus, the sealant matrix can be utilized on vertebrates with low fibrinogen concentration in their blood, or even with blood substitutes that contain no fibrinogen. For example, when first and second cross-linkable components are combined with a hydrogel forming component and applied to a bleeding surface, a synergistic interaction between the cross-linkable components and the hydrogel forming component can occur. According to some embodiments, the first and second cross-linkable components can, in the presence of they hydrogel forming component, react and cross-link at the bleeding target site to form a relatively rigid

framework. Relatedly, the hydrogel forming component can fill in the relatively rigid framework and mediate the formation of a physical seal.

[0160] In accordance with some embodiments of the present invention, sealant matrix compositions can be prepared mixing a first cross-linkable component with a second cross-linkable component and a hydrogel-forming component under conditions in which the first and second cross-linkable components do not cross-link (i.e., lack of moisture, proper pH, temperature, etc.). Upon contact with the biological fluid, or in other reaction enabling conditions, the cross-linkable first and second components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is hydrated to form a hydrogel filling at least some of the interstices. Optionally, the cross-linkable components may also cross-link with the hydrogel-forming component and/or surrounding tissues.

I. Sealant Matrix Cross-Linkable Components

[0161] Often, the first cross-linkable component contains two or more nucleophilic groups and the second cross-linkable component contains two or more electrophilic groups capable of covalently binding with the nucleophilic groups on the first cross-linkable component. The first and second components can cross-link to form a porous matrix. Exemplary first and second components and porous matrices are described in U.S. Patent Nos. 5,874,500; 6,166,130; 6,312,725;,6,328,229;, and 6,458,889; the contents of which are hereby incorporated by reference.

[0162] The first and second components are typically selected to be non-immunogenic and, as such, may not require a "skin test" prior to starting treatment. Further, these components and the hydrogel-forming component may be selected to resist enzymatic cleavage by matrix metalloproteinases (e.g., collagenase) to provide greater long-term persistence *in vivo* than currently available collagen compositions. Alternatively, the first and second components and the hydrogel-forming components may be selected to be eliminated or resorbed during wound healing in order to avoid the formation of fibrous tissue around the sealant matrix *in vivo*.

[0163] In one embodiment, the first component may be a synthetic polymer containing multiple nucleophilic groups (represented below as "X") which can react with a second component synthetic polymer containing multiple electrophilic groups (represented below as "Y"), resulting in a covalently bound polymer network, as follows:

50

polymer-X_m + polymer-Y_n → polymer-Z-polymer

wherein

$m \geq 2$, $n \geq 2$, and $m + n \geq 5$;

X = $-NH_2$, -SH, -OH, $-PH_2$, $-CO-NH-NH_2$, etc., and can be the same or different;

Y = $-CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, -N=C=O, SO_2 $CH=CH_2$, $-N(COCH)_2$), -S-S-(C_5H_4N), etc., and can be the same or different; and

Z = functional group resulting from the union of a nucleophilic group (X) and an electrophilic group (Y).

[0164] As noted above, X and Y may be the same or different, i.e., the first component may have two different nucleophilic groups and/or the second component may have two different electrophilic groups. An exemplary first component polymer or first cross-linkable component is illustrated in **FIG. 1**. An exemplary second component polymer or second cross-linkable component is illustrated in **FIG. 2**.

[0165] The backbone of the first and second component polymers can be an alkylene oxide, particularly, ethylene oxide, propylene oxide, and mixtures thereof. Examples of difunctional alkylene oxides can be represented by:

X-polymer-X Y-polymer-Y

wherein X and Y are as defined above, and the term "polymer" represents-$(CH_2CH_2O)_n$ - or -$(CH(CH_3)CH_2O)_n$ - or -$(CH_2CH_2O)_n$ -$(CH(CH_3)CH_2O)_n$ -.

[0166] The functional group X or Y is commonly coupled to the polymer backbone by a linking group (represented below as "Q"), many of which are known or possible. Although the components of the invention have two or more functional groups, the examples below show only one functional group and the resulting cross-linking for the sake of simplicity. There are many ways to prepare the various functionalized polymers, some of which are listed below:

polymer-Q^1-X + polymer-Q^2-Y → polymer-Q^1-Z-Q^2-polymer

wherein Q =	whole structure =
-O-$(CH_2)_n$ -	polymer-O-$(CH_2)_n$-X (or Y)
-S-$(CH_2)_n$ -	polymer-S-$(CH_2)_n$-X (or Y)
-NH-$(CH_2)_n$ -	polymer-NH-$(CH_2)_n$-X (or Y)

$-O_2C-NH-(CH_2)_n-$	polymer-O $O_2C-NH-(CH_2)_n-X$ (or Y)
$-O_2C-(CH_2)_n-$	polymer-$O_2C-(CH_2)_n$ -X (or Y)
$-O_2C-CR^1H-$	polymer-O_2C-CRH-X (or Y)
$-O-R^2-CO-NH-$	polymer-O-R-CO-NH-X (or Y)

wherein

n = 1-10 in each case;

R^1 = H, CH_3, C_2H_5, . . . C_pH_{2p+1};

R^2 = CH_2, CO-NH-CH_2CH_2.

Q^1 and Q^2 may be the same or different.

[0167] For example, when Q^2 = OCH_2CH_2 (there is no Q_1 in this case); Y = $-CO_2N(COCH_2)_2$; and X = $-NH_2$, -SH, or -OH, the resulting reactions and Z groups would be as follows:

polymer-NH_2 + polymer-$OCH_2CH_2CO_2$-$N(COCH_2)_2$ → -NH-OCH_2CH_2CO-polymer (amide)

polymer-SH + polymer-$OCH_2CH_2CO_2$-$N(COCH_2)_2$ → -S-OCH_2CH_2CO-polymer (thioester)

polymer-OH + polymer-$OCH_2CH_2CO_2$-$N(COCH_2)_2$ → -O-OCH_2CH_2 CO-polymer (ester)

[0168] An additional group, represented below as "D", can be inserted between the polymer and the linking group to increase degradation of the crosslinked polymer composition *in vivo*, for example, for use in drug delivery applications:

polymer-D-Q-X + polymer-D-Q-Y → polymer-D-Q-Z-Q-D-polymer-

[0169] Some useful biodegradable groups "D" include lactide, glycolide, ϵ-caprolactone, poly(α-hydroxy acid), poly(amino acids), poly(anhydride), and various di- or tripeptides.

A. First and Second Components with Polymer Backbones

[0170] As noted above, in order to prepare the compositions of the present invention, it is useful to provide a first component polymer containing two or more nucleophilic groups, such as primary amino groups or thiol groups, and a second component polymer containing two or more electrophilic groups capable of covalently binding with the nucleophilic groups on the first component polymer. The first and second component polymers can be synthetic.

[0171] As used with respect to first and second component polymers, the term "polymer" refers *inter alia* to polyalkyls; di-, tri-, oligo-, and polyamino acids; and tri-, oligo-, or polysaccharides.

[0172] As used with respect to first and second component polymers, the term "synthetic polymer" encompasses polymers that are not naturally occurring and that are produced via chemical synthesis. As such, naturally occurring proteins such as collagen and naturally occurring polysaccharides such as hyaluronic acid may be excluded. Synthetic collagen, and synthetic hyaluronic acid, and their derivatives, are included. Synthetic polymers containing either nucleophilic or electrophilic groups encompass "multifunctionally activated synthetic polymers". The term "multifunctionally activated" (or, simply, "activated") can refer to synthetic polymers which have, or have been chemically modified to have, two or more nucleophilic or electrophilic groups which are capable of reacting with one another (i.e., the nucleophilic groups react with the electrophilic groups) to form covalent bonds. Types of multifunctionally activated synthetic polymers include difunctionally activated, tetrafunctionally activated, and star-branched polymers.

[0173] Multifunctionally activated synthetic polymers for use in the present invention often contain at least two, or at least three, functional groups in order to form a three-dimensional crosslinked network with synthetic polymers containing multiple nucleophilic groups (i.e., "multi-nucleophilic polymers"). In other words, they are typically at least difunctionally activated, or trifunctionally or tetrafunctionally activated. If the first synthetic polymer is a difunctionally activated synthetic polymer, the second synthetic polymer typically contains three or more functional groups in order to obtain a three-dimensional crosslinked network. Both the first and the second component polymer may contain at least three functional groups.

B. First Component Polymer

[0174] First component polymers containing multiple nucleophilic groups are also referred to generically herein as "multi-nucleophilic polymers". For use in the present invention, multi-nucleophilic polymers often contain at least two, or at least three, nucleophilic groups. If a synthetic polymer containing only two nucleophilic groups is used, a synthetic polymer containing three or more electrophilic groups will often be used in order to obtain a three-dimensional crosslinked network.

[0175] Multi-nucleophilic polymers for use in the compositions and methods of the present invention include synthetic polymers that contain, or have been modified to contain, multiple nucleophilic groups such as primary amino groups and thiol groups. Such multi-nucleophilic polymers can include: (i) synthetic polypeptides that have been synthesized to contain two or more primary amino groups or thiol groups; and (ii) polyethylene glycols that have been modified to contain two or more primary amino groups or thiol groups. In general, reaction of a thiol group with an electrophilic group tends to proceed more slowly than reaction of a primary amino group with an electrophilic group.

[0176] Multi-nucleophilic polypeptides can be synthetic polypeptides that have been synthesized to incorporate amino acids containing primary amino groups (such as lysine) and/or amino acids containing thiol groups (such as cysteine). For instance, the first component polymer can be a dilysine, trilysine, quatralysine, pentalysine, or a dicysteine, tricysteine, quatracysteine, pentacystein, or oligopeptides or polypeptides comprising two or more lysines or cysteines and other amino acids (e.g., glycine, alanine,), preferably non-hydrophobic amino acids. Poly(lysine), a synthetically produced polymer of the amino acid lysine (145 MW), is often used. Poly(lysine)s have been prepared having anywhere from 6 to about 4,000 primary amino groups, corresponding to molecular weights of about 870 to about 580,000. Poly(lysine)s of varying molecular weights are commercially available from Peninsula Laboratories, Inc. (Belmont, Calif.).

[0177] Polyethylene glycol can be chemically modified to contain multiple primary amino or thiol groups according to methods set forth, for example, in Chapter 22 of Poly(ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, N.Y. (1992). Polyethylene glycols which have been modified to contain two or more primary amino groups are referred to herein as "multi-amino PEGs". Polyethylene glycols which have been modified to contain two or more thiol groups are referred to herein as "multi-thiol PEGs". As used herein, the term "polyethylene glycol(s)" includes modified and or derivatized polyethylene glycol(s).

[0178] Various forms of multi-amino PEG are commercially available from Shearwater Polymers (Huntsville, Ala.) and from Texaco Chemical Company (Houston, Tex.) under the name "Jeffamine". Multi-amino PEGs useful in the present invention include Texaco's Jeffamine diamines ("D" series) and triamines ("T" series), which contain two and three primary amino groups per molecule, respectively.

[0179] Polyamines such as ethylenediamine (H_2N-CH_2CH_2-NH_2), tetramethylenediamine (H_2N-$(CH_2)_4$-NH_2), pentamethylenediamine (cadaverine) (H_2N-$(CH_2)_5$-NH_2), hexamethylenediamine (H_2N-$(CH_2)_6$-NH_2), bis(2-hydroxyethyl)amine (HN-$(CH_2CH_2OH)_2$), bis(2)aminoethyl)amine (HN-$(CH_2CH_2NH_2)_2$), and tris(2-aminoethyl)amine (N-$(CH_2CH_2NH_2)_3$) may also be used as the first component synthetic polymer containing multiple nucleophilic groups.

C. Second Component Polymer

[0180] Second component polymers containing multiple electrophilic groups are also referred to herein as "multi-electrophilic polymers." For use in the present invention, the multi-electrophilic polymers often contain at least two, or at least three, electrophilic groups in order to form a three-dimensional crosslinked network with multi-nucleophilic polymers.

[0181] Multi-electrophilic polymers for use in the compositions of the invention can be polymers which contain two or more succinimidyl groups capable of forming covalent bonds with nucleophilic groups on other molecules. Succinimidyl groups are highly reactive with materials containing primary amino (-NH_2) groups, such as multi-amino PEG, poly(lysine), or collagen. Succinimidyl groups are slightly less reactive with materials containing thiol (-SH) groups, such as multi-thiol PEG or synthetic polypeptides containing multiple cysteine residues.

[0182] As used herein, the term "containing two or more succinimidyl groups" is meant to encompass polymers which are commercially available containing two or more succinimidyl groups, as well as those that are chemically derivatized to contain two or more succinimidyl groups. As used herein, the term "succinimidyl group" is intended to encompass sulfosuccinimidyl groups and other such variations of the "generic" succinimidyl group. The presence of the sodium sulfite moiety on the sulfosuccinimidyl group serves to increase the solubility of the polymer.

D. Hydrophilic Polymers for Use as First or Second Component Backbones

[0183] Hydrophilic polymers and, in particular, various polyethylene glycols, can be used in the first and second component polymer backbones according to some embodiments of the present invention. As used herein, the term "PEG" encompasses polymers having the repeating structure $(OCH_2CH_2)_n$.

[0184] A structure for a tetrafunctionally activated form of PEG is shown in **FIG. 3**, as is a generalized reaction product obtained by reacting a tetrafunctionally activated PEG with a multi-amino PEG. As depicted in the figure, the succinimidyl group is a five-member ring structure represented as $-N(COCH_2)_2$. In **FIG. 3**, the symbol ^^^ denotes an open linkage.

[0185] Embodiments include the reaction of tetrafunctionally activated PEG succinimidyl glutarate, referred to herein as SG-PEG, with multi-amino PEG, and the reaction product obtained thereby. Another activated form of PEG is referred to as PEG succinimidyl propionate (SE-PEG). Embodiments include tetrafunctionally activated SE-PEG and the reaction product obtained by reacting it with multi-amino PEG. In some embodiments there are three repeating CH_2 groups on either side of the PEG. Further embodiments encompass a conjugate which includes an "ether" linkage which is less subject to hydrolysis. This is distinct from the conjugate shown in **FIG. 3**, wherein an ester linkage is provided. The ester linkage is subject to hydrolysis under physiological conditions. Other functionally activated forms of polyethylene glycol are contemplated by embodiments of the present invention, as are the conjugates formed by reacting tetrafunctionally activated PEGs with a multi-amino PEG. In some embodiments, a conjugate includes both an ether and an amide linkage. These linkages are stable under physiological conditions.

[0186] Another functionally activated form of PEG is referred to as PEG succinimidyl succinamide (SSA-PEG). Embodiments include the tetrafunctionally activated form of this compound and the reaction product obtained by reacting it with multi-amino PEG. These and related compounds may also be used in compositions according to embodiments of the invention. Embodiments also encompass a conjugate which includes an "amide" linkage which, like the ether linkage previously described, is less subject to hydrolysis and is therefore more stable than an ester linkage. Yet another activated form of PEG is provided in a compound embodiment referred to as PEG succinimidyl carbonate (SC-PEG). Embodiments include tetrafunctionally activated SC-PEG and the conjugate formed by reacting it with multi-amino PEG.

[0187] As discussed above, activated polyethylene glycol derivatives for use in embodiments of the invention can contain succinimidyl groups as the reactive group. However, different activating groups can be attached at sites along the length of the PEG molecule. For example, PEG can be derivatized to form functionally activated PEG propion aldehyde (A-PEG). Embodiments encompass the tetrafunctionally activated form as well as

the conjugate formed by the reaction of A-PEG with multi-amino PEG. The linkage may be referred to as a $-(CH_2)_m$-NH- linkage, where m = 1-10.

[0188] Yet another form of activated polyethylene glycol is functionally activated PEG glycidyl ether (E-PEG). Embodiments encompass the tetrafunctionally activated compound, as well as the conjugate formed by reacting such with multi-amino PEG. Another activated derivative of polyethylene glycol is functionally activated PEG-isocyanate (I-PEG). Embodiments include conjugate formed by reacting such with multi-amino PEG. Another activated derivative of polyethylene glycol is functionally activated PEG-vinylsulfone (V-PEG). Embodiments include the conjugate formed by reacting such with multi-amino PEG.

[0189] Multifunctionally activated polyethylene glycols for use in compositions and other embodiments of the present invention can include polyethylene glycols containing succinimidyl groups, such as SG-PEG and SE-PEG, which can be in trifunctionally or tetrafunctionally activated form. Many of the activated forms of polyethylene glycol described above are now available commercially from Shearwater Polymers, Huntsville, Ala., and Union Carbide, South Charleston, W.Va.

E. Derivatization of the First and Second Component Polymers to Contain Functional Groups

[0190] Certain polymers, such as polyacids, can be derivatized to contain two or more functional groups, such as succinimidyl groups. Polyacids for use in the present invention include, without limitation, trimethylolpropane-based tricarboxylic acid, di(trimethylol propane)-based tetracarboxylic acid, heptanedioic acid, octanedioic acid (suberic acid), and hexadecanedioic acid (thapsic acid). Many of these polyacids are commercially available from DuPont Chemical Company.

[0191] According to a general method, polyacids can be chemically derivatized to contain two or more succinimidyl groups by reaction with an appropriate molar amount of N-hydroxysuccinimide (NHS) in the presence of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

[0192] Polyalcohols such as trimethylolpropane and di(trimethylol propane) can be converted to carboxylic acid form using various methods, then further derivatized by reaction with NHS in the presence of DCC to produce trifunctionally and tetrafunctionally activated polymers, respectively, as described in U.S. application Ser. No. 08/403,358. Polyacids such

as heptanedioic acid (HOOC-$(CH_2)_2$-COOH), octanedioic acid (HOOC-$(CH_2)_2$-COOH), and hexadecanedioic acid (HOOC-$(CH_2)_{14}$-COOH) are derivatized by the addition of succinimidyl groups to produce difunctionally activated polymers.

[0193] Polyamines such as ethylenediamine (H_2N-CH_2CH_2-NH_2), tetramethylenediamine (H_2N-$(CH_2)_4$-NH_2), pentamethylenediamine (cadaverine) (H_2N-$(CH_2)_5$-NH_2), hexamethylenediamine (H_2N-$(CH_2)_6$-NH_2), bis(2-hydroxyethyl)amine (HN-$(CH_2CH_2OH)_2$), bis(2)aminoethyl)amine (HN-$(CH_2CH_2NH_2)_2$), and tris(2-aminoethyl)amine (N-$(CH_2CH_2NH_2)_3$) can be chemically derivatized to polyacids, which can then be derivatized to contain two or more succinimidyl groups by reacting with the appropriate molar amounts of N-hydroxysuccinimide in the presence of DCC, as described in U.S. application Ser. No. 08/403,358. Many of these polyamines are commercially available from DuPont Chemical Company.

[0194] In some embodiments, a first cross-linkable component (e.g. multi-amino PEG) is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the total cross-linkable component composition, and a second cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the total cross-linkable component composition. For example, a final cross-linkable component composition having a total weight of 1 gram (1000 milligrams) could contain between about 5 to about 200 milligrams of the first cross-linkable component (e.g. multi-amino PEG), and between about 5 to about 200 milligrams of the second cross-linkable component.

[0195] In some embodiments, the weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is in the range from about 20% to about 80%. In related embodiments, this ratio is in the range from about 45% to about 55%. In some cases, the ratio is about 50%. The weight ratio is determined on the basis of a gel strength test. The first cross-linkable component and the second cross-linkable component may have the same molecular weight.

II. Hydrogel-Forming Components for use in the Sealant Matrix Composition

[0196] Hydrogel-forming components for use according to the present invention can include resorbable biocompatible molecular cross-linked gels and hydrogels as discussed in U.S. Patent Nos. 4,640,834; 5,209,776; 5,292,362; 5,714,370; 6,063,061; and, 6,066,325, which are hereby incorporated by reference. Materials made by the techniques described in these patents are commercially available under the FLOSEAL trademark from the Baxter

Healthcare Corporation, in a kit for mixture with thrombin solution for use as a hemostatic agent. Alternatively, any hydratable cross-linked polymers may be used as hydrogel-forming components in the invention. For example, alginates, agaroses, gelatins (e.g., SURGIFOAM™ powder), or other synthetic, carbohydrate or protein-based hydratable cross-linked polymers may be used. The primary characteristics of useful hydrogel-forming components are biocompatibility, rapid absorption and retention of fluid. Thus, although polyacrylamide may be used as a hydrogel-forming component in the invention, it would be less preferred due to its poor biocompatibility in many internal applications. Often, the hydratable cross-linked polymers for use as the hydrogel-forming component have a particle size of about 70 to about 300 microns, and a pH of about 6.8 to about 9.5. Hydrogel-forming components can provide mechanical stability to the first and second cross-linkable components, particularly when a sealant matrix is subject to forces, pressures, or dilutions.

[0197] In some embodiments, the weight ratio between the first and second cross-linkable components, and the hydrogel-forming component, is within a range from about 28% to about 42% w/w. In some cases, a composition may contain a concentration of combined first and second cross-linkable components that is about 5% to about 75% of the total mass of the composition, and a concentration of hydrogel forming component that is about 95% to about 25% of the total mass of the composition. Relatedly, a composition may contain a concentration of combined first and second cross-linkable components that is about 5% to about 40% of the total mass of the composition, and a concentration of hydrogel forming component that is about 95% to about 60% of the total mass of the composition. Similarly, a composition may contain a concentration of combined first and second cross-linkable components that is about 10% to about 30% of the total mass of the composition, and a concentration of hydrogel forming component that is about 90% to about 70% of the total mass of the composition. For example, a composition may contain about 20% combined first and second cross-linkable components, and about 80% hydrogel forming component. In some embodiments, a combined first and second cross-linkable component composition can have a fixed weight ratio of 50:50%, and the w/w ratio of the combined first and second cross-linkable component composition to the hydrogel-forming component can be with a range from about 20% to about 30%. The w/w ratio of the combined first and second cross-linkable component composition to the hydrogel-forming component can be selected based on a gel strength/adherence test. The hydrogel-forming component can act as an absorbent to provide a semi-dry surface for the first and second cross-linkable components to polymerize.

Embodiments of the present invention encompass dry sealant matrix composition kits that include cross-linkable components and hydrogel-forming components in amounts according to these ratios.

[0198] According to some embodiments, the term "biocompatible" refers to materials that meet the criteria in standard # ISO 10993-1 promulgated by the International Organization for Standardization (NAMSA, Northwood, Ohio). According to some embodiments, the term "resorbable" refers to compositions that degrade or solubilize, when placed directly into a target site in a patient's body (and not protected within an implant device such as a breast implant), over a time period of less than one year, usually from 1 to 120 days. Protocols for measuring resorption and degradation are known. According to some embodiments, the term "molecular cross-linked" refers to materials that include polymer molecules (i.e. individual chains) which are attached by bridges composed of either an element, a group, or a compound, where the backbone atoms of the polymer molecules are joined by primary chemical bonds. Cross-linking may be effected in a variety of ways, as will be described in greater detail below.

[0199] According to some embodiments, the term "hydrogel" encompasses compositions that include a single phase aqueous colloid in which a biologic or non-biologic polymer, as defined in more detail below, absorbs water or an aqueous buffer. A hydrogel can comprise multiple sub-networks, where each sub-network is a molecular cross-linked hydrogel having dimensions which depend on the degree of hydration and are within the ranges set forth above. Often, the hydrogels will have little or no free water, i.e., water cannot be removed from the hydrogel by simple filtration.

[0200] "Percent swell" can be defined as the dry weight is subtracted from the wet weight, divided by the dry weight and multiplied by 100, where wet weight is measured after a wetting agent has been removed as completely as possible from the exterior of the material, e.g., by filtration, and where dry weight is measured after exposure to an elevated temperature for a time sufficient evaporate the wetting agent, e.g., 2 hours at 120° C.

[0201] "Equilibrium swell" can be defined as the percent swell at equilibrium after the hydratable cross-linked polymer material has been immersed in a wetting agent for a time period sufficient for water content to become constant, typically 18 to 24 hours.

[0202] "Target site" is typically the location to which the sealant matrix composition is to be delivered, usually a tissue breach or defect. Often, the target site will be the tissue location

of interest, but in some cases the sealant matrix composition may be administered or dispensed to a location near the location of interest, e.g. ,when the material swells *in situ* to cover the location of interest.

[0203] The hydratable cross-linked polymers for use as hydrogel-forming components in at least some embodiments of the present invention may be formed from biologic and non-biologic polymers. Suitable biologic polymers include proteins, such as gelatin, soluble collagen, albumin, hemoglobin, casein, fibrinogen, fibrin, fibronectin, elastin, keratin, laminin, and derivatives and combinations thereof. Soluble non-fibrillar collagen is similarly suitable. Exemplary gelatin formulations are set forth below. Other suitable biologic polymers include polysaccharides, such as glycosaminoglycans (e.g., hyaluronic acid and chondroitin sulfate), starch derivatives, xylan, cellulose derivatives, hemicellulose derivatives, agarose, alginate, chitosan, and derivatives and combinations thereof. Suitable non-biologic polymers can be selected to be degradable by either of two mechanisms, i.e. (1) break down of the polymeric backbone or (2) degradation of side chains which result in aqueous solubility. Exemplary nonbiologic polymers include synthetics, such as polyacrylates, polymethacrylates, polyacrylamides, polyvinyl resins, polylactide-glycolides, polycaprolactones, polyoxyethylenes, and derivatives and combinations thereof.

[0204] The hydratable cross-linked polymer molecules for use as hydrogel-forming components may be cross-linked in any manner suitable to form an aqueous hydrogel. For example, these polymeric molecules may be cross-linked using bi- or poly-functional cross-linking agents which covalently attach to two or more polymer molecules chains. Exemplary bifunctional cross-linking agents include aldehydes, epoxies, succinimides, carbodiimides, maleimides, azides, carbonates, isocyanates, divinyl sulfone, alcohols, amines, imidates, anhydrides, halides, silanes, diazoacetate, aziridines, and the like. Alternatively, cross-linking may be achieved by using oxidizers and other agents, such as periodates, which activate side-chains or moieties on the polymer so that they may react with other side-chains or moieties to form the cross-linking bonds. An additional method of cross-linking comprises exposing the polymers to radiation, such as gamma radiation, to activate the side polymer to permit cross-linking reactions. Dehydrothermal cross-linking methods are also suitable. Dehydrothermal cross-linking of gelatin can be achieved by holding it at an elevated temperature, typically 120°C, for a period of at least 8 hours. Increasing the extent of cross-linking, as manifested in a decline in percent swell at equilibrium, can be achieved by elevating the holding temperature, extending the duration of the holding time, or a

combination of both. Operating under reduced pressure can accelerate the cross-linking reaction. Preferred methods for cross-linking gelatin molecules are described below.

[0205] Hydrogels may include a plasticizer to increase the malleability, flexibility, and rate of degradation of the hydrogel. The plasticizer may be an alcohol, such as polyethylene glycol, sorbitol, or glycerol. Often, the plasticizer will be polyethylene glycol having a molecular weight ranging from about 200 to 1000 D, or having a molecular weight of about 400 D. The plasticizers can be present in the hydrogel at from about 0.1% by weight to about 30% by weight, preferably from 1% by weight to 5% by weight of the polymer composition. The plasticizers can be particularly beneficial for use with hydrogels having a high solids content, typically above 10% by weight of the composition (without plasticizer).

[0206] Exemplary methods for producing molecular cross-linked gelatins are as follows. Gelatin is obtained and placed in an aqueous buffer to form a non-cross-linked gel, typically having a solids content from about 1% to about 70% by weight, or from about 3% to about 10% by weight. The gelatin is cross-linked, typically by exposure to either glutaraldehyde (e.g. 0.01% to 0.05% w/w, overnight at 0° C to 15° C in aqueous buffer), sodium periodate (e.g. 0.05 M, held at 0° C to 8° C for 48 hours) or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide ("EDC") (e.g., 0.5% to 1.5% w/w, overnight at room temperature), or by exposure to about 0.3 to 3 megarads of gamma or electron beam radiation. Alternatively, gelatin particles can be suspended in an alcohol, such as methyl alcohol or ethyl alcohol, at a solids content of about 1% to about 70% by weight, or about 3% to about 10% by weight, and cross-linked by exposure to a cross-linking agent, typically glutaraldehyde (e.g., 0.01% to 0.1% w/w, overnight at room temperature). In the case of aldehydes, the pH is typically held from about 6 to about 11, or from about 7 to about 10. When cross-linking with glutaraldehyde, the cross-links are formed via Schiff bases which may be stabilized by subsequent reduction, e.g. by treatment with sodium borohydride. After cross-linking, the resulting granules may be washed in water and optionally rinsed in an alcohol, dried and resuspended to a desired degree of hydration in an aqueous medium having a desired buffer and pH. The resulting hydrogels may then be loaded into the applicators of the present invention, as described in more detail hereinafter. Alternatively, the hydrogels may be mechanically disrupted prior to or after cross-linking, also as described in more detail hereinafter.

[0207] Exemplary methods for producing molecular cross-linked gelatin compositions having equilibrium percent swells in the range from about 400% to about 1300%, or from about 600% to about 950%, are as follows. Gelatin is obtained and placed in an aqueous buffer (typically at a pH of about 6 to about 17, or at a pH between about 7 and about 10) containing a cross-linking agent in solution (often glutaraldehyde, typically at a concentration of 0.01% to 0.1% w/w) to form a gel, typically having a solids content from 1% to 70% by weight, usually from 3% to 10% by weight. The gel is well mixed and held overnight at 0° to 15° C as cross-linking takes place. It is then rinsed three times with deionized water, twice with an alcohol (preferably methyl alcohol, ethyl alcohol, or isopropyl alcohol) and allowed to dry at room temperature. Optionally, the gel may be treated with sodium borohydride to further stabilize the cross-linking. In some cases, the hydrogel-forming component can include a gelatin having, for example, a large number of glycine residues (e.g. 1 in 3 arranged every third residue), proline residues, and 4-hydroxyproline residues. An exemplary gelatin subunit is shown in **FIG. 5**. Gelatin embodiments include molecules having an amino acid composition of : glycine 21 %, proline 12 %, hydroxyproline 12 %, glutamic acid 10 %, alanine 9 %, arginine 8%, aspartic acid 6 %, lysine 4 %, serine 4 %, leucine 3 %, valine 2 %, phenylalanine 2 %, threonine 2 %, isoleucine 1 %,hydroxylysine 1 %, methionine and histidine <1% and tyrosine < 0.5 %. **FIG. 6** illustrates the correlation between percent swell and the percent solids of a fragmented crosslinked polymeric gel embodiment useful as a hydrogel-forming component in a sealant composition.

[0208] The molecular cross-linked hydrogels are preferably mechanically disrupted in a batch process prior for use as a hydrogel-forming component. The primary purpose of this mechanical disruption step is to create multiple subunits of hydrogel having a size which enhances the ability to fill and pack the space to which it is being delivered. Without mechanical disruption, the molecular cross-linked hydrogels will have difficulty conforming to and filling the irregularly shaped target spaces which are being treated. By breaking the hydrogel down to smaller sized sub-units, such spaces can be filled much more efficiently while retaining the mechanical integrity and persistence of the cross-linked hydrogel.

[0209] Molecular cross-linking of the polymer chains of the hydrogel can be performed before or after its mechanical disruption. The hydrogels may be mechanically disrupted in batch operations, such as mixing, so long as the hydrogel composition is broken down into sub-units having a size in the 0.01 mm to 5.0 mm range set forth above. Other batch mechanical disruption processes include pumping through a homogenizer or mixer or through

a pump which compresses, stretches, or shears the hydrogel to a level which exceeds a fractural yield stress of the hydrogel. In some cases, extrusion of the polymeric composition causes the hydrogel to be converted from a substantially continuous network, i.e. a network which spans the dimensions of the original hydrogel mass, to a collection of sub-networks or sub-units having dimensions in the ranges set forth above.

[0210] In a presently preferred embodiment, the hydratable cross-linked polymer may be initially prepared (e.g. by spray drying) and/or be mechanically disrupted prior to being cross-linked, often usually prior to hydration to form a hydrogel. The hydratable cross-linked polymer may be provided as a finely divided or powdered dry solid which may be disrupted by further comminution to provide particles having a desired size, usually being narrowly confined within a small range. Further size selection and modification steps, such as sieving, cyclone classification, etc., may also be performed. For the exemplary gelatin materials described hereinafter, the dry particle size is preferably in the range from about 0.01 mm to about 1.5 mm, more preferably from about 0.05 mm to about 1.0 mm. An exemplary particle size distribution will be such that greater than about 95% by weight of the particles are in the range from about 0.05 mm to about 0.7 mm. Methods for comminuting the polymeric starting material include homogenization, grinding, coacervation, milling, jet milling, and the like. Powdered polymeric starting materials may also be formed by spray drying. The particle size distribution may be further controlled and refined by conventional techniques such as sieving, aggregation, further grinding, and the like.

[0211] The dry powdered solid may then be suspended in an aqueous buffer, as described elsewhere herein, and cross-linked. In other cases, the hydratable cross-linked polymer may be suspended in an aqueous buffer, cross-linked, and then dried. The cross-linked, dried polymer may then be disrupted, and the disrupted material subsequently resuspended in an aqueous buffer. In all the cases, the resulting material comprises a cross-linked hydrogel having discrete sub-networks having the dimensions set forth above.

[0212] The hydratable cross-linked polymers useful as hydrogel-forming components, after mechanical disruption, will typically be resorbable, i.e., they will biodegrade in the patient's body, in a period of less than one year, usually from 1 to 120 days, preferably from 1 to 90 days, and more preferably from 2 to 30 days following their initial application. Techniques for measuring the length of time required for resorption are known.

III. Preparation and Use of One Group of Embodiments of the Sealant Matrix Compositions: Combination Of Porous Matrix And Hydratable Cross-Linked Polymer

[0213] Compositions according to the present invention comprise a first cross-linkable component combined with a second cross-linkable component which are capable of cross-linking to form a porous matrix having interstices, which is combined with a hydratable cross-linked polymer that is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices. It will be appreciated that the compositions of the present invention can be used for a variety of biomedical applications, including each of the applications discussed above with reference to altering the (1) the first and second components (i.e. porous matrix); and, (2) the hydratable cross-linked polymer. For example, such compositions can act as a mechanical sealant to stop or inhibit bleeding by forming a rapid physical barrier to blood. Accordingly, some embodiments of the present invention can provide results without a direct "hemostatic" effect (e.g., biochemical effect on clotting cascade; involving clotting initiators).

[0214] The hydrogel-forming component can serve as an absorbent (e.g. for blood and other fluids and tissues). By absorbing blood, the hydrogel-forming component can ensure that a higher concentration of the first and second cross-linkable components is maintained at the treatment site, and can ensure that a semi-dry surface is provided for the first and second cross-linkable components to cross-link with each other and to the surrounding tissues. In some embodiments, the first and second components can cross-link at the same time the hydrogel-forming component is absorbing blood. This absorbtion and cross-linking can occur within a matter of seconds, and the resulting sealant matrix barrier can reach full strength at 30 minutes to one hour.

[0215] Generally, the sealant matrix compositions are "dry," although some minimal moisture content may be present, e.g., in the hydrogel-forming component. In some cases, it is possible to partially pre-hydrate the hydratable cross-linked polymer prior to application, although it may be necessary to do so at a higher pH than physiological pH, or under other conditions which will prevent the first and second components from cross-linking prior to application at the target site. Often, sealant matrix compositions will be in a powdered or fused-cake form.

[0216] The concentrations of the first component and the second component used to prepare the sealant matrix compositions may vary depending upon a number of factors,

including the types and molecular weights of the particular cross-linkable components used and the desired end use application. In some embodiments, the weight ratio of the first and second components to the hydrogel-forming component ranges from 10 - 50% w/w, 15-45% w/w, 20-42% w/w, 30 - 40% w/w and 28 to about 42 % w/w. In some embodiments, particle sizes for the first and second polymers can range from about 50 to about 90 microns. In some embodiments, particle sizes for the hydratable cross-linked polymer can range from about 250 to about 400 microns.

[0217] In some embodiments, the first and second components may be provided as in dry particulate or powder form. In this form the first and second components may be mixed together, and further may be mixed with the hydrogel-forming component, also in dry particulate or powder form. Mixture of the components may be accomplished by any mechanical admixture means, such as milling blade mixing. The resulting dry powder sealant matrix composition may then be packaged in various containers, e.g., cartons, envelops, jars, and the like. Admixture and filling may be done under aseptic conditions, or the sealant matrix composition may be sterilized after packaging, e.g., by gamma radiation. The dry powder embodiments of the invention are then ready for use. The first and second cross-linkable polymers will react to cross-link under physiological conditions (e.g., blood pH,) and so the three component sealant matrix composition of the composition may be applied directly at the desired site in dry form to seal a tissue defect, provided that sufficient hydrating bodily fluid is present. Thus, the powdered sealant matrix composition may simply be poured onto and into the tissue defect target site, and held in place (e.g., with a gauze pad or surgical glove) until the sealant matrix barrier forms. This is particularly useful and convenient in trauma situations (e.g., in an emergency suite or battlefield) where ready-to-use products that can be used with various tissue defect sizes are desirable.

[0218] In other embodiments, the first and second components and the hydrogel-forming component may be immobilized on a support, or backing, forming a "sealant matrix pad". In these embodiments, a support, such as a collagen sponge, is provided, and then the sealant matrix composition is fixed onto the support for use. Because the sealant matrix compositions bond easily with tissues, organic materials, and synthetic materials, these embodiments can be advantageous in that a more easily handled support may be used to apply the sealant matrix composition. Due to the fact that a relatively small amount of sealant matrix composition is required to create an effective sealant matrix barrier, a relatively thin layer of sealant matrix composition may be fixed to the support. For instance,

in the examples set forth below, only about 0.5 – 1.0 g of sealant matrix composition fixed on the surface created a 3cm x 3cm pad with very good haemostatic properties. As will be appreciated by those skilled in the surgical arts, these embodiments are desirable in situations where the size of the tissue defect is anticipated, and when improved handling characteristics as compared to a powder are desired. Like the dry powder embodiments, the sealant matrix pad embodiments of the sealant matrix compositions may be applied directly to the tissue defect without further preparation by pressing the sealant matrix composition side of the pad against the tissue defect until the cross-linkable components have cross-linked.

[0219] The support for the sealant matrix pad embodiments of the invention may be any biocompatible material. Although collagen supports are described in detail herein, other materials for supports may be used. For example, other protein or polysaccharide support material which are biocompatible may be used. These support materials may degrade at approximately the same rate *in vivo* as the sealant matrix barrier, or may degrade at different rates from the sealant matrix barrier. Collagen sponges and their preparation are well known in the surgical arts, and the preparation and handling of collagen is described fully below. Likewise, sponges prepared from fibrin may be used. Carbohydrate based materials such as cellulose (for external applications) or chitosan may also be used. In addition, biocompatible and biodegradable synthetic polymers may be used. Those of skill in the surgical arts will recognize that forms other than sponges may be used for supports in the sealant matrix pad embodiments of the invention. For example, a sheet or film of collagen or other materials may be used. In addition, the support may take any useful shape, such as cones, hemispheres, rods, wedges, and the like, in order to provide a pad that will more closely approximate the shape of the tissue defect. For example, a sealant matrix pad which utilizes a cone-shaped collagen sponge as a support may be useful in treating a gunshot wound.

[0220] Typically, such supports will act as a structural or mechanical component. The supports may have some degree of porosity, to allow blood or other liquids to seep into the support and have increased contact with the compositions. Such constructions may have a swelling factor of about 1.3X to about 1.5X, and therefore can be ideal for surgical applications. For example, the sponge-supported compositions can be used in neurosurgery to seal dura, where excessive swelling can place unwanted pressure on the brain. In general, the supports should be flexible enough to conform to a typical tissue defect, and should have good handling properties in the surgical context.

[0221] The sealant matrix compositions may be immobilized on the support by a variety of means. In some embodiments described below, gentle heat is sufficient to immobilize powdered sealant matrix compositions containing 4-arm PEG first and second components, and a cross-linked gelatin hydrogel-forming component. In these embodiments, the powdered sealant matrix composition was placed onto a collagen sponge, and heated to 60-70° C for about 1-2 minutes. The dry powder matrix melted slightly at this heat, fixing it to the surface of the collagen sponge. Alternatively, the sealant matrix composition may be fixed to the support using binding agents, or other excipients known in the pharmaceutical arts. In general, the technique used to fix the sealant matrix composition to the support will depend on the first and second components and the hydrogel-forming component of the sealant matrix composition. The method used to fix the sealant matrix composition onto the support should not appreciably decrease the ability of the first and second component to cross-link when exposed to physiological conditions, or the ability of the hydrogel-forming component to absorb biological fluids.

[0222] In other embodiments, the sealant matrix composition may be formed into a sheet or film without a support. Such forming of the sealant matrix composition may be achieved using the methods described above for fixing a sealant matrix composition to a support for the sealant matrix pad embodiments.

IV. Addition of Additional Components in the Sealant Matrix Composition

[0223] In additional embodiments of the present invention, components other than the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component may be added to the sealant matrix compositions of the invention. In general, these additional components may be admixed with the first and second and hydrogel-forming components in dry form. Additional components may add further mechanical strength or otherwise improve the performance of the sealant matrix compositions of the invention for particular applications. For instance, because it is opaque and less tacky than nonfibillar collagen, fibrillar collagen may sometimes be less preferred for use in bioadhesive compositions. However, as disclosed in U.S. Patent No. 5,614,587, fibrillar collagen, or mixtures of nonfibrillar and fibrillar collagen, may be preferred for use in adhesive compositions intended for long-term persistence *in vivo*. Various deacetylated and/or desulfated glycosaminoglycan derivatives can be incorporated into the composition in a similar manner as that described above for collagen.

[0224] Naturally occurring proteins, such as collagen, and derivatives of various naturally occurring polysaccharides, such as glycosaminoglycans, can be incorporated into the sealant matrix barrier when the first and second components of the invention react under physiological conditions to cross-link. When these other components also contain functional groups which will react with the functional groups on the synthetic polymers, their presence during crosslinking of the first and second components at the target site will result in formation of a crosslinked synthetic polymer-naturally occurring polymer matrix. In particular, when the naturally occurring polymer (protein or polysaccharide) also contains nucleophilic groups such as primary amino groups, the electrophilic groups on the second cross-linkable component will react with the primary amino groups on these components, as well as the nucleophilic groups on the first cross-linkable component, to cause these other components to become part of the sealant matrix barrier.

[0225] In general, glycosaminoglycans are typically chemically derivatized by deacetylation, desulfation, or both in order to contain primary amino groups available for reaction with electrophilic groups on the second cross-linkable component. Glycosaminoglycans that can be derivatized according to either or both of the aforementioned methods include the following: hyaluronic acid, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B (dermatan sulfate), chondroitin sulfate C, chitin (can be derivatized to chitosan), keratan sulfate, keratosulfate, and heparin. Derivatization of glycosaminoglycans by deacetylation and/or desulfation and covalent binding of the resulting glycosaminoglycan derivatives with synthetic hydrophilic polymers is described in further detail in commonly assigned, allowed U.S. Patent No. 5,510,418, the contents of which are hereby incorporated by reference.

[0226] Similarly, electrophilic groups on the second cross-linkable component may react with primary amino groups on lysine residues or thiol groups on cysteine residues of certain naturally occurring proteins. Lysine-rich proteins such as collagen and its derivatives are especially reactive with electrophilic groups on synthetic polymers. As used herein, the term "collagen" is intended to encompass collagen of any type, from any source, including, but not limited to, collagen extracted from tissue or produced recombinantly, collagen analogues, collagen derivatives, modified collagens, and denatured collagens such as gelatin. Covalent binding of collagen to synthetic hydrophilic polymers is described in detail in commonly assigned U.S. Pat. No. 5,162,430, issued Nov. 10, 1992, to Rhee et al.

[0227] In general, collagen from any source may be used in the compositions of the invention; for example, collagen may be extracted and purified from human or other mammalian source, such as bovine or porcine corium and human placenta, or may be recombinantly or otherwise produced. The preparation of purified, substantially non-antigenic collagen in solution from bovine skin is well known in the art. U.S. Pat. No. 5,428,022, issued Jun. 27, 1995, to Palefsky et al., discloses methods of extracting and purifying collagen from the human placenta. U.S. Patent No. 5,667,839 discloses methods of producing recombinant human collagen in the milk of transgenic animals, including transgenic cows. The term "collagen" or "collagen material" as used herein refers to all forms of collagen, including those which have been processed or otherwise modified.

[0228] Collagen of any type, including, but not limited to, types I, II, III, IV, or any combination thereof, may be used in the compositions of the invention, although type I is often preferred. Either atelopeptide or telopeptide-containing collagen may be used; however, when collagen from a xenogeneic source, such as bovine collagen, is used, atelopeptide collagen is often preferred, because of its reduced immunogenicity compared to telopeptide-containing collagen.

[0229] Collagen that has not been previously crosslinked by methods such as heat, irradiation, or chemical crosslinking agents can be used in the compositions of the invention, and previously crosslinked collagen may be used as well. Non-crosslinked atelopeptide fibrillar collagen is commercially available from Collagen Corporation (Palo Alto, Calif.) at collagen concentrations of 35 mg/ml and 65 mg/ml under the trademarks Zyderm® I Collagen and Zyderm II Collagen, respectively. Glutaraldehyde crosslinked atelopeptide fibrillar collagen is commercially available from Collagen Corporation at a collagen concentration of 35 mg/ml under the trademark Zyplast® Collagen. Collagens for use in the present invention are generally in dry lyophilized powder form.

[0230] Because of its tacky consistency, nonfibrillar collagen is typically used in compositions of the invention that are intended for use as bioadhesives. The term "nonfibrillar collagen" encompasses any modified or unmodified collagen material that is in substantially nonfibrillar form at pH 7, as indicated by optical clarity of an aqueous suspension of the collagen.

[0231] Collagen that is already in nonfibrillar form may be used in the compositions of the invention. As used herein, the term "nonfibrillar collagen" is intended to encompass collagen

types that are nonfibrillar in native form, as well as collagens that have been chemically modified such that they are in nonfibrillar form at or around neutral pH. Collagen types that are nonfibrillar (or microfibrillar) in native form include types IV, VI, and VII.

[0232] Chemically modified collagens that are in nonfibrillar form at neutral pH include succinylated collagen and methylated collagen, both of which can be prepared according to the methods described in U.S. Pat. No. 4,164,559, issued Aug. 14, 1979, to Miyata et al., which is hereby incorporated by reference in its entirety. Due to its inherent tackiness, methylated collagen is typically used in bioadhesive compositions, as disclosed in U.S. Patent No. 5,614,587.

[0233] Collagens for use in the sealant matrix compositions of the present invention may start out in fibrillar form, then be rendered nonfibrillar by the addition of one or more fiber disassembly agents. The fiber disassembly agent is typically present in an amount sufficient to render the collagen substantially nonfibrillar at pH 7, as described above. Fiber disassembly agents for use in the present invention include, without limitation, various biocompatible alcohols, amino acids, inorganic salts, and carbohydrates, with biocompatible alcohols being particularly preferred. Preferred biocompatible alcohols include glycerol and propylene glycol. In some cases, non-biocompatible alcohols, such as ethanol, methanol, and isopropanol, may not be desirable for use in the first and second polymers of the present invention, due to their potentially deleterious effects on the body of the patient receiving them. Examples of amino acids include arginine. Examples of inorganic salts include sodium chloride and potassium chloride. Although carbohydrates, such as various sugars including sucrose, may be used in the practice of the present invention, they are not as preferred as other types of fiber disassembly agents because they can have cytotoxic effects *in vivo*.

[0234] For use in tissue adhesion, in addition to sealing, it may also be desirable to incorporate proteins such as albumin, fibrin or fibrinogen into the sealant matrix composition to promote cellular adhesion. In addition, the introduction of hydrocolloids such as carboxymethylcellulose may promote tissue adhesion and/or swellability.

[0235] The sealant matrix compositions of the present invention may also comprise one or more additional biologically active agents or compounds. In one embodiment, biologically active agents such as taxol derivatives may be added to the sealant matrix composition to prevent adhesion at the tissue defect site. In other embodiments, biologically active agents

such as antibiotic or antimicrobial agents may be added to the sealant matrix for use, e.g., in trauma-induced wound situations (e.g., knife or bullet wounds) where pathogenic organisms may have entered the tissue defect site, or wound. In other embodiments, biologically active agents such as growth factors may be delivered from the composition to a local tissue site in order to facilitate tissue healing and regeneration. In further embodiments, blood clotting agents, such as thrombin, may be added to further improve sealing and tissue regeneration by activating the clotting cascade. Exemplary bioactive components include, but are not limited to, proteins, carbohydrates, nucleic acids, and inorganic and organic biologically active molecules such as enzymes, antibiotics, antineoplastic agents, bacteriostatic agents, anti-adhesion formation agents (such as taxol derivatives,) bacteriocidal agents, antiviral agents, hemostatic agents, local anesthetics, anti-inflammatory agents, hormones, antiangiogenic agents, antibodies, neurotransmitters, psychoactive drugs, drugs affecting reproductive organs and oligonucleotides, such as antisense oligonucleotides. The term "biologically active agent" or "active agent" as used herein encompasses organic or inorganic molecules which exert biological effects *in vivo*. Examples of active agents include, without limitation, enzymes, receptor antagonists or agonists, hormones, growth factors, autogenous bone marrow, antibiotics, anti-adhesion formation agents, antimicrobial agents, other pharmaceutical agents, and antibodies. The term "active agent" is also intended to encompass combinations or mixtures of two or more active agents, as defined above.

[0236] Such bioactive components will typically be present at relatively low concentrations, typically below 10% by weight of the compositions, usually below 5% by weight, and often below 1% by weight. Two or more of such active agents may be combined in a single composition and/or two or more compositions may be used to deliver different active components where said components may interact at the delivery site. Exemplary hemostatic agents include thrombin, fibrinogen and clotting factors. Hemostatic agents like thrombin may be added in concentrations ranging, for example, from about 50 to about 10,000 Units thrombin per ml hydrogel, or from about 100 to about 1000 Units thrombin per ml hydrogel.

[0237] The crosslinked first and second polymer compositions can also be prepared to contain various imaging agents such as iodine or barium sulfate, or fluorine, in order to aid visualization of the compositions after administration via X-ray, or ^{19}F-MRI, respectively.

[0238] Preferred active agents for use in the compositions of the present invention include growth factors, such as transforming growth factors (TGFs), fibroblast growth factors (FGFs), platelet derived growth factors (PDGFs), epidermal growth factors (EGFs), connective tissue activated peptides (CTAPs), osteogenic factors, and biologically active analogs, fragments, and derivatives of such growth factors. Members of the transforming growth factor (TGF) supergene family, which are multifunctional regulatory proteins, are particularly preferred. Members of the TGF supergene family include the beta transforming growth factors (for example, TGF-β1, TGF- β 2, TGF- β 3); bone morphogenetic proteins (for example, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); heparin-binding growth factors (for example, fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF)); Inhibins (for example, Inhibin A, Inhibin B); growth differentiating factors (for example, GDF-1); and Activins (for example, Activin A, Activin B, Activin AB).

[0239] Growth factors can be isolated from native or natural sources, such as from mammalian cells, or can be prepared synthetically, such as by recombinant DNA techniques or by various chemical processes. In addition, analogs, fragments, or derivatives of these factors can be used, provided that they exhibit at least some of the biological activity of the native molecule. For example, analogs can be prepared by expression of genes altered by site-specific mutagenesis or other genetic engineering techniques.

[0240] Biologically active agents may be incorporated into the sealant matrix composition by admixture. In one embodiment, active agents may be mixed into powdered sealant matrix compositions in a dry or lyophilized form. In another embodiment, this admixture may be fixed onto a solid support such as collagen as described above for the sealant matrix compositions. In other embodiments, the agents may be incorporated into the sealant matrix compositions, as described above, by binding these agents with the functional groups on the first or second component synthetic polymers. Processes for covalently binding biologically active agents such as growth factors using functionally activated polyethylene glycols are described in commonly assigned U.S. Pat. No. 5,162,430, issued Nov. 10, 1992, to Rhee et al. Such compositions preferably include linkages that can be easily biodegraded, for example as a result of enzymatic degradation, resulting in the release of the active agent into the target tissue, where it will exert its desired therapeutic effect.

[0241] A simple method for incorporating biologically active agents containing nucleophilic groups into the crosslinked polymer composition involves mixing the active agent with the first component, second component, and hydrogel forming component prior to administration in a dry state. Upon application of the sealant matrix composition to the tissue defect and contact with biological fluid, the biologically active agent will react with the second component and be cross-linked into the porous cross-linked matrix of the first and second components, as the hydrogel-forming component absorbs the biological fluid. This procedure will result in covalent binding of the active agent to the crosslinked component polymer matrix portion of the sealant matrix barrier which is formed, producing a highly effective sustained release composition.

[0242] The type and amount of active agent used will depend, among other factors, on the particular site and condition to be treated and the biological activity and pharmacokinetics of the active agent selected.

V. Use of Sealant Matrix Compositions as Bioadhesives

[0243] The sealant matrix compositions of the present invention are generally adhesive and bond to tissues strongly, as the electrophilic groups of the second cross-linkable component react with nucleophilic groups of collagen in the tissue of the target site. Some porous matrix compositions of the invention can have unusually high tackiness. Thus, in addition to use as a barrier matrix for hemostasis, the sealant matrix compositions of the present invention are useful as bioadhesives to bond wet or moist tissues under physiological conditions. As used herein, the terms "bioadhesive", "biological adhesive", and "surgical adhesive" may be used interchangeably to encompass biocompatible compositions capable of effecting temporary or permanent attachment between the surfaces of two native tissues, or between a native tissue surface and a non-native tissue surface or a surface of a synthetic implant.

[0244] In a general method for effecting the attachment of a first surface to a second surface, the sealant matrix composition (for example, in dry powder or sheet form) is applied to a first surface. The first surface is then contacted with the second surface, preferably immediately, to effect adhesion between the two surfaces. At least one of the first and second surfaces is preferably a native tissue surface. When a mechanically stable hydrogel forming component is used in the composition, such as the crosslinked gelatin used in the examples, the resulting porous matrix exhibits increased mechanical strength as opposed to a composition containing the first and second cross-linkable components alone. Thus, the

strength of the adhesion between the two tissue surfaces is also increased, as the layer of porous matrix between the tissues will be less likely to separate internally under physiological mechanical stresses.

[0245] The two surfaces may be held together manually, or using other appropriate means, while the crosslinking reaction is proceeding to completion. Crosslinking is typically complete within 5 to 60 minutes after applying the sealant matrix composition. However, the time required for complete crosslinking to occur is dependent on a number of factors, including the types and molecular weights of the first and second cross-linkable components and, most particularly, the effective concentrations of the two components at the target site (i.e., higher concentrations result in faster crosslinking times).

[0246] At least one of the first and second surfaces is preferably a native tissue surface. As used herein, the term "native tissue" encompasses biological tissues that are native to the body of the specific patient being treated. As used herein, the term "native tissue" encompasses biological tissues that have been elevated or removed from one part of the body of a patient for implantation to another part of the body of the same patient (such as bone autografts, skin flap autografts, etc.). For example, the compositions of some embodiments of the invention can be used to adhere a piece of skin from one part of a patient's body to another part of the body, as in the case of a burn victim.

[0247] The other surface may be a native tissue surface, a non-native tissue surface, or a surface of a synthetic implant. As used herein, the term "non-native tissue" encompasses biological tissues that have been removed from the body of a donor patient (who may be of the same species or of a different species than the recipient patient) for implantation into the body of a recipient patient (e.g., tissue and organ transplants). For example, the crosslinked polymer compositions of the present invention can be used to fix a xenograft heart valve into the heart of a patient and seal around the heart valve to prevent leakage..

[0248] As used herein, the term "synthetic implant" encompasses any biocompatible material intended for implantation into the body of a patient not encompassed by the above definitions for native tissue and non-native tissue. Synthetic implants include, for example, artificial blood vessels, heart valves, artificial organs, bone prostheses, implantable lenticules, vascular grafts, stents, and stent/graft combinations, etc.

VI. Use of the Sealant Matrix Compositions to Prevent Adhesions

[0249] Another use of the sealant compositions of the invention is to coat tissues in order to prevent the formation of adhesions following surgery or injury to internal tissues or organs. In a general method for coating tissues to prevent the formation of adhesions following surgery, the first and second synthetic polymers are mixed with the hydratable crosslinked polymer or premixed, then a thin layer of the reaction mixture is applied to the tissues comprising, surrounding, and/or adjacent to the surgical site before substantial crosslinking has occurred between the nucleophilic groups on the first synthetic polymer and the electrophilic groups on the second synthetic polymer. Application of the reaction mixture to the tissue site may be by extrusion, sprinkling, brushing, spraying (as described above) for powdered compositions, by placement of a thin film or sheet of the sealant matrix composition onto the tissue, or by any other convenient means.

[0250] Following application of the reaction mixture to the surgical site, crosslinking is allowed to continue *in situ* prior to closure of the surgical incision. Once crosslinking has reached equilibrium, tissues which are brought into contact with the coated tissues will not stick to the coated tissues. At this point in time, the surgical site can be closed using conventional means (sutures, etc.).

[0251] In general, compositions that achieve complete crosslinking within a relatively short period of time (i.e., 5-15 minutes following mixture of the first synthetic polymer and the second synthetic polymer) may be preferred for use in the prevention of surgical adhesions, so that the surgical site may be closed relatively soon after completion of the surgical procedure. Furthermore, it is preferred that a hydratable crosslinked polymer with a relatively high mechanical strength be used in the compositions, such as the crosslinked gelatin used in the examples, to increase the mechanical stability of the coating.

[0252] The following examples describe the production and characterization of a first cross-linkable component with a second cross-linkable component and a hydrogel-forming component to form sealant matrix compositions, and are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make the preferred embodiments of the conjugates, compositions, and devices and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, temperature, molecular weight, etc.) but some experimental errors and deviation should be accounted for. Unless indicated

otherwise, parts are parts by weight, molecular weight is weight average molecular weight, temperature is in degrees Centigrade, and pressure is at or near atmospheric.

VII. Examples

Example 1: First And Second Component Compositions for use in Sealant Matrix: Preparation of Crosslinked Multi-amino PEG Compositions

[0253] The following stock solutions of various di-amino PEGs were prepared: Ten (10) grams of Jeffamine ED-2001 (obtained from Texaco Chemical Company, Houston, Tex.) was dissolved in 9 ml of water. Ten (10) grams of Jeffamine ED-4000 (also obtained from Texaco Chemical Company) was dissolved in 9 ml of water. 0.1 grams of di-amino PEG (3400 MW, obtained from Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.) was dissolved in 300 µl of water. Each of the three di-amino PEG solutions prepared above was mixed with aqueous solutions of trifunctionally activated SC-PEG (TSC-PEG, 5000 MW, also obtained from Shearwater Polymers) as set forth in **Table 1**, below.

TABLE 1

Preparation of Crosslinked Polymer Compositions

Di-amino PEG	TSC-PEG + Aqueous Solvent
50 µl	0 mg + 50 µl water
50 µl	10 mg + 50 µl PBS
50 µl	10 mg + 100 µl PBS
250 µl	50 mg + 500 µl PBS

[0254] The solutions of di-amino PEG and TSC-PEG were mixed using syringe-to-syringe mixing. Each of the materials was extruded from the syringe and allowed to set for 1 hour at 37° C. Each of the materials formed a gel. In general, the gels became softer with increasing water content; the gels containing the least amount of aqueous solvent (water or PBS) were firmest.

Example 2: First And Second Component Compositions for use in Sealant Matrix: Preparation of Crosslinked Poly(lysine) Compositions

[0255] Ten (10) milligrams of poly-L-lysine hydrobromide (8,000 MW, obtained from Peninsula Laboratories, Belmont, Calif.) in 0.1 ml phosphate buffer (0.2M, pH=6.6) was mixed with 10 mg of tetrafunctionally activated SE-PEG (10,000 MW, obtained from

Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.) in 0.1 ml PBS. The composition formed a soft gel almost immediately.

Example 3: First And Second Component Compositions for use in Sealant Matrix: Effect of pH on Gel Formation of Tetra-amino PEG/Tetra SE-PEG Formulations

[0256] Gels comprising various concentrations of tetra-amino PEG and tetra SE-PEG at pH 6, 7, and 8 were prepared in petri dishes. Following mixing of the tetra-amino PEG and tetra SE-PEG, the dishes were tilted repeatedly; the gelation time was considered to be the point at which the formulation ceased to flow. The effect of pH on gelation time of the various tetra-amino PEG/tetra SE-PEG formulations at room temperature is shown in **Table 2**, below.

TABLE 2

Effect of pH on Gel Formation of Tetra-amino PEG/Tetra SE-PEG Formulations

Tetra-amino PEG Conc. (mg/ml)	Tetra SE-PEG Conc. (mg/ml)	pH	Gelation Time
20	20	6	>90.0 min
20	20	7	20.0 min
20	20	8	1.4 min
50	50	6	24.0 min
50	50	7	3.5 min
50	50	8	10.0 sec
100	100	6	9.0 min
100	100	7	47.0 sec
100	100	8	10.0 sec
200	200	6	2.0 min
200	200	7	9.0 sec
200	200	8	5.0 sec

[0257] The time required for gel formation decreased with increasing pH and increasing tetra-amino PEG and tetra SE-PEG concentrations.

Example 4: Evaluation of Hydrogel-Forming Component Materials and Methods of Cross-Linking and Measuring Percent Swell

[0258] Gelatin particles were allowed to swell in an aqueous buffer (e.g., 0.2 M sodium phosphate, pH 9.2) containing a cross-linking agent (e.g., 0.005 to 0.5% by weight glutaraldehyde). The reaction mixture was held refrigerated overnight and then rinsed three times with deionized water, twice with ethyl alcohol, and allowed to dry at ambient temperature. The dried, cross-linked gelatin was resuspended in an aqueous buffer at a low solids concentration (2-3%) at ambient temperature for a fixed period of time. Buffer was in substantial excess of the concentration needed for equilibrium swelling, and two phases (a

hydrogel phase and a buffer) were present. The suspension containing wet hydrogel was then filtered by applying vacuum on a 0.8 μm nominal cut-off filter membrane (Millipore, Bedford, Mass.). After removal of extraneous buffer, the combined weight of the retained wet hydrogel and wet filter membrane was recorded. The hydrogel and membrane were then dried at approximately 120° C for at least two hours, and the combined weight of the dried hydrogel residue and dried filter membrane was recorded. Several measurements of samples of wet filter membrane without hydrogel residue and dried filter membrane without hydrogel were also performed and were used to deduce the net weight of wet hydrogel and dry hydrogel. "Percent swell" was then calculated as follows:

percent swell = 100 X [(wet weight of hydrogel - dry weight of hydrogel)/dry weight of hydrogel]

[0259] Swell measurements were conducted at least in triplicate and averaged for a given sample of gelatin. The value of percent swell for samples resuspended in buffer for 18 to 24 hr prior to measuring wet weight was defined as "equilibrium swell."

[0260] The resulting cross-linked gelatin materials displayed equilibrium swell values in the range from 400% to 1300%. The degree of equilibrium swell depended on the method and extent of cross-linking.

Example 5: Hydrogel-Forming Components for Use in the Sealant Matrix: Fragmented Hydratable Cross-Linked Polymeric Product Composed of Gelatin Cross-Linked Using EDC

[0261] Gelatin (Atlantic Gelatin, General Foods Corp., Woburn, Mass.) was allowed to dissolve in distilled water at 1 to 10% solids (w/w) (more preferably at 8%) at 70° C. 1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Sigma, St. Louis, Mo.) at 0.2% to 3.5% (or 0.2% to 0.3%) was then added. The resultant hydrogel formed on stirring was left at room temperature for one hour. The hydrogel was dried using a Freezone 12 freeze dry system, (Labconco, Mo.) and ground finely using a Waring Blender model No. 31BC91 (VWR, Willard, Ohio). The dried polymeric composition was then loaded into syringes and equilibrated with buffer. The equilibrium swell was determined to be at least 1000%. The results are shown in **Table 3**.

TABLE 3

Gelatin (mg)	EDC	Swell (%)

500 (8%)	13.5 mg (0.25%)	1080
500 (8%)	13.5 mg (0.25%)	1126
100 (7.4%)	0.945 mg (0.35%)	1620
100 (7.4%)	9.45 mg (3.5%)	1777

Example 6: Hydrogel-Forming Components for Use in the Sealant Matrix: Fragmented Hydratable Cross-Linked Polymeric Product Composed of Gelatin and Poly(L)Glutamic Acid, Cross-Linked Using EDC

[0262] Gelatin (Atlantic Gelatin, General Foods Corp., Woburn, Mass.) was allowed to dissolve in distilled water at 1 to 10% solids (w/w) (more preferably at 6 to 8%) at 70° C. 0 to 10% (w/w) (more preferably 2-5%) Poly(L)glutamic acid (PLGA) (Sigma, St. Louis, Mo.) and 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Sigma) at 0.2 to 3.5% (or 0.2 to 0.4%) were then added. The resultant hydrogel formed on stirring was left at room temperature for one hour. The hydrogel was allowed to swell in excess saline for a fixed period of time (for example 20 hr). The hydrogel was then filtered by applying vacuum on a filter membrane (Millipore, Bedford, Mass.). The equilibrium swell was determined to be at least 1500%. The results are shown in **Table 4**.

TABLE 4

Gelatin (mg)	PLGA (mg)	EDC	Swell (%)
375 (6%)	125 (2%)	13.5 mg (.25%)	1510
375 (6%)	125 (2%)	13.5 mg (.25%)	1596
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2535
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2591
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2548
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2526
200 (3.2%)	300 (4.8%)	13.5 mg (.25%)	2747
200 (3.2%)	300 (4.8%)	13.5 mg (.25%)	2677
200 (3.2%)	300 (4.8%)	13.5 mg (.25%)	2669
150 (2.4%)	350 (5.6%)	13.5 mg (.25%)	3258

150 (2.4%)	350 (5.6%)	13.5 mg (.25%)	3434
150 (2.4%)	350 (5.6%)	13.5 mg (.25%)	3275
75 (5.5%)	25 (1.9%)	0.945 mg (0.35%)	2437
50 (3.7%)	50 (3.7%)	0.945 mg (0.35%)	2616
25 (1.9%)	75 (5.5%)	0.945 mg (0.35%)	5383
75 (5.5%)	25 (1.9%)	9.45 mg (3.5%)	1976
50 (3.7%)	50 (3.7%)	9.45 mg (3.5%)	2925
25 (1.9%)	75 (5.5%)	9.45 mg (3.5%)	4798

Example 7: Hydrogel-Forming Components for Use in the Sealant Matrix: Production of a Fragmented Hydratable Cross-Linked Polymeric Hydrogel

[0263] Bovine Corium (Spears Co. PA) was agitated in an aqueous sodium hydroxide (Spectrum Chemical Co., CA) solution (0.1 M to 1.5 M, or 0.4 to 1.2M) for a period of one to 18 hours (or one to four hours) at a temperature of 2° C to 30°C (preferably 22° C to 30° C). The corium slurry was then neutralized using an inorganic acid such as hydrochloric acid, phosphoric acid or sulfuric acid (Spectrum Chemical Co., CA.) and the neutralized liquid phase was then separated from the insoluble corium by filtration through a sieve. The corium was then washed with non-pyrogenic water and an alcohol such as isopropyl alcohol (Spectrum Chemical Co., CA.). After three to twelve washes, the corium was suspended in non-pyrogenic water and the corium, water slurry may be then heated to 50° C to 90° C preferably 60° C to 80° C to thermally gelatinize the corium. During the gelatinization cycle, the pH of the corium, water slurry was adjusted and controlled from pH 3 to pH 11, or pH 7 to pH 9. Also, the insoluble corium in the slurry may be disrupted by agitation and/or homogenization. The disruption can occur before or after the thermal gelatinization cycle. Thermal gelatinization was conducted for one to six hours. After gelatinization, the slurry was clarified by filtration. The gelatin slurry was dewatered by drying in air at 15° C to 40° C, preferably 20° C to 35° C. The dry gelatin, where dry implies a moisture content less than 20% by weight, was then disrupted by grinding.

[0264] Dry gelatin was added to a cold (5° C to 15° C) aqueous solution of containing glutaraldehyde (Amresco Inc., OH.) at 0.0025% to 0.075% by weight and at a pH between 7 and 10. The concentration of gelatin in this solution was between 1% and 10% by weight. The glutaraldehyde cross-links the gelatin granules over a period of one to 18 hours after

which the gelatin was separated from the aqueous phase by filtration or sedimentation. The gelatin particles were then added to an aqueous solution containing 0.00833% to 0.0667% by weight sodium borohydride (Spectrum Chemical Co., CA.) with the gelatin concentration again being between 1% and 10% by weight and the pH being between 7 and 12, or between 7 to 9. After one to six hours, the cross-linked gelatin was separated from the aqueous phase by filtration or sedimentation. The gelatin may then be resuspended in non-pyrogenic water with the gelatin concentration being between 1% and 10% by weight to remove residual cross-linking and reducing agents followed by separation from the aqueous phase by filtration or sedimentation. Final collection of the cross-linked gelatin was done on a filter mesh or sieve and the gelatin was given a final rinse with non-pyrogenic water. The wet, cross-linked gelatin was then placed in a drying chamber at 15° C to 40° C. Dry, cross-linked gelatin (i.e. cross-linked gelatin with a moisture content below 20% by weight) was removed from the drying chamber and then ground using a mechanical, grinding mill to produce a powder with a typical particle size distribution from 0.020 mm to 2.000 mm.

Example 8: Rapidly Acting Dry Hemostatic Sealant Powder

[0265] A rapidly acting dry hemostatic sealant powder was prepared by combining a first cross-linkable component, a second cross-linkable components, and a hydrogel-forming component. The first cross-linkable polymer (PEG-A) was a PEG-succinimidyl powder, the second cross-linkable polymer (PEG-B) was a PEG-thiol powder, and the hydrogel-forming component was a cross-linked gelatin powder.

Example 9: Rapidly Acting Dry Sealant Pad

[0266] A rapidly acting dry sealant pad was prepared by combining a first cross-linkable component, a second cross-linkable components, and a hydrogel-forming component. The resulting composition, a powdered sealant matrix composition, was placed onto a lyophilized collagen sponge, and heated to 60-70° C for about 1-2 minutes. The dry powder matrix melted slightly at this heat, fixing it to the surface of the collagen sponge, thus forming a sealant matrix pad. Alternatively, the sealant matrix composition may be fixed to the support using binding agents, or other excipients known in the pharmaceutical arts. In general, the technique used to fix the sealant matrix composition to the support may depend on the first and second components and the hydrogel-forming component of the sealant matrix composition. Sealant matrix pad embodiments of the present invention provide a convenient

format by which sealant matrix compositions may be handled and delivered to a surgical site via a sponge or other suitable support means.

Example 10: Sealant Powder To Treat Splenic Artery Puncture

[0267] **FIGS. 7A-E** illustrate the application of a sealant matrix composition to treat a splenic artery puncture according to embodiments of the present invention. The pig was heparinized to approximately 3X baseline. As depicted in **FIG. 7A**, a splenic artery puncture was surgically induced in a pig with an 18g needle 700. Following the puncture, excessive bleeding 705 was observed from the artery 710. As shown in **FIGS. 7B and 7C**, approximately 700 mg of a sealant powder matrix composition 720 was applied to the puncture site via a syringe 730, and gently compressed or placed against the site for two minutes using a gloved finger 740. The sealant powder formed a coagulum 750 that was observed to adequately stop the bleeding. The site was irrigated at 5 minutes post-application with an irrigation device 760, as illustrated in **FIG. 7D**, and excess powder composition was washed away. When the coagulum was grasped with forceps, it appeared to adhere quite well to the tissue and had good integrity. As shown in **Fig. 7E**, the coagulum 750 was removed at 44 minutes post-application, by peeling off with forceps 770, and resumed bleeding 715 was observed.

Example 11: Sealant Powder To Treat Hepatic Resection

[0268] **FIGS. 8A-E** illustrate the application of a sealant matrix composition to treat a hepatic resection according to embodiments of the present invention. A pig was heparinized to approximately 3X baseline. As shown in **FIG. 8A**, the tip 800, or edge, of the middle lobe of the liver 805 was resected in the pig using scissors 810. Following the resection, excessive bleeding 815 was observed from the site. As depicted in **FIG. 8B**, approximately 6 ml (2 g) of a sealant matrix composition 820 was applied to the site, and held in place with the tip of a syringe 825 for 2 minutes. As shown in **FIG. 8C**, a gloved finger can be used to compress or hold the powder against the lesion. The sealant powder formed a coagulum 835 that was observed to adequately stop the bleeding. The site was irrigated at 8 minutes post-application with an irrigation device 840, as illustrated in **FIG. 8D**. When the coagulum was grasped with forceps, it appeared to adhere quite well to the tissue and had good integrity. The coagulum 835 was removed at 28 minutes post-application, by peeling off with forceps 845, and resumed bleeding 850 was observed.

Example 12: Sealant Powder to Treat Splenic Lesion

[0269] A splenic lesion was surgically induced in a pig with a 6 mm biopsy tissue punch, and the tissue core was removed with scissors. The pig was heparinized to approximately 2.5X baseline. Following the tissue punch, excessive bleeding was observed from the spleen. Approximately 700 mg (2 ml) of a sealant matrix composition powder was applied to the puncture using the edge of a 12 ml syringe. No compression was used to hold the material in place. The sealant powder formed a coagulum that was observed to adequately stop the bleeding. The site was irrigated at 4 minutes post-application. When the coagulum was grasped with forceps, it appeared to adhere quite well to the tissue and had good integrity. The coagulum was removed at 25 minutes post-application, by peeling off, and resumed bleeding was observed.

Example 13: Mechanical Stress Test

[0270] Sealant matrix barrier was prepared by reacting 0.60 to 0.65 g of a sealant matrix composition powder with 1 ml porcine plasma in a plastic mold. The mixture was allowed to cure at room temperature for approximately 30 minutes. Both ends of a 3 x 1 x 0.3 cm block of gel were taped with cyanoacrylate glue to create gripping spaces for pulling apart (1 x 1 cm). The tape ends were gripped with the pre-mounted grips. A Chatillon TCD2000 tester was used to apply a normal stress test to the rectangular gel shape until fracture, to determine the tensile strength. Peak force (N) and deflection at maximum load (mm) were measured to extend the gel until break. The effective surface area of the gel was 1 x 0.3 cm, and the original effective length of the gel was 1 cm. The tensile strength of the sealant gel was approximately 15.3 N/cm^2. A similar test was performed on a gel composition including a first cross-linkable component and a second cross-linkable component, in the absence of a hydrogel-forming component, and the observed tensile strength was approximately 5.1 N/cm^2.

Example 14: Peel Strength Test

[0271] In some embodiments, a mixed powder includes first and second cross-linkable components and a hydrogel-forming component, and is self-polymerizing as it dissolves in a physiological liquid such as blood or another body fluid. The material can tightly adhere to a tissue or another application site by covalent bonding. The mechanical strength of tissue adherence can be examined using a mechanical jig to pull a sealant matrix from a tissue such as skin. In this example, multiple tensile tests were run following formation of sealant matrix barriers as follows. A series of three component powders containing a first cross-linkable

component (pentaerythritol poly (ethylene glycol) ether tetra-succinimidyl glutarate) and a second cross-linkable component (pentaerythritol poly (ethylene glycol) ether tetra-thiol), and a cross-linked gelatin (FloSeal™) were prepared, by mixing the cross-linkable components and the cross-linked gelatin at three different concentrations (10%, 20%, and 30% of the cross-linkable component). About 0.40 g to about 0.45 g of the three component powder was added to about 0.6 ml of porcine plasma in a 3x1x0.3 cm plastic mold disposed on top of a chicken skin sample, and allowed to cure at room temperature for approximately 60 minutes. A sealant matrix barrier formed and tightly adhered to the skin. The formed sealant matrix barrier was glued to a plate that was clamped to a Chatillon TCD200 tester. Maximum peak force (N) was measured as skin was pulled from the sealant matrix barrier. An increase in adhering strength was observed to almost linearly correlate with an increase in concentration of the PEG mixture (first and second cross-linkable components). Results are as shown in **Table 4A**.

Table 4A

Conc. of PEG mixture	Skin	Speed, mm/min	Curing Time, min	Pulling side, cm	Force N
10%	chicken	12.7	80	1	2.00
10%	chicken	12.7	80	1	2.10
10%	chicken	12.7	80	1	1.70
					1.93 Avg.
					0.21 Std. Dev.
20%	chicken	12.7	60	1	3.24
20%	chicken	12.7	60	1	2.13
20%	chicken	12.7	60	1	3.41
20%	chicken	12.7	70	1	2.10
					2.72 Avg.
					0.71 Std. Dev.
30%	chicken	12.7	70	1	3.86
30%	chicken	12.7	70	1	7.86
30%	chicken	12.7	80	1	1.53
30%	chicken	12.7	80	1	2.65
30%	chicken	12.7	80	1	2.59
30%	chicken	12.7	80	1	3.83
30%	chicken	12.7	105	1	3.32
30%	chicken	12.7	107	1	3.00
					3.58 Avg.
					1.89 Std. Dev.

Example 15: Preparation of Fibrillar Collagen for Sponge Backing of Fused Pad

[0272] A first fibrillar collagen sample was prepared as follows. 40g of NaOH was dissolved in 450 cc H_2O at a temperature of 25°C. Approximately 50g of sliced bovine corium was added to the NaOH solution. The corium was stirred for 80 minutes. The NAOH solution was decanted and the corium was washed with H_2O. The corium was dissolved with 2M HCl to bring the pH in the range of 2.3 to 2.4. Stirring was continued for 18 hours. 1250 ml of thick collagen in solution (CIS) was titrated to pH 7.25 with 1M NaOH at 18°C. Collagen fiber was formed over a period of 10 hours, and filtered. 240 ml of was precipitated at pH 7.4, and cross-linked with 33 µl of 25% glutaraldehyde (GA) solution at 8°C for 23 hours. Fibrillar collagen was lyophilized using a Virtis Lyophilizer by a recipe cycle.

[0273] A second fibrillar collagen sample was prepared as follows. Fibrillar collagen was cross-linked using 240g of viscous solution (e.g. CIS). The solution was diluted by adding 60 cc of H_2O. The pH was raised to 9.2 by adding about 1.8 cc of 2M NaOH. The temperature of the solution was adjusted to 8°C, and 33 µl of 25% GA was added. The solution was stirred for 23 hours, and about 54 g of precipitated fibers were obtained. Fibrillar collagen was lyophilized using a Virtis Lyophilizer by a recipe cycle.

Example 16: De-Buffering the Hydrogel-Forming Component

[0274] In some embodiments, it may be desirable to remove phosphate salt from a hydrogel-forming component such as FloSeal™ so that the pH of the hydrogel-forming component can be easily influenced by the surrounding liquid. In-situ cross-linking of hydrogel-forming components can help a sealant matrix compound adhere to tissue following application. In some cases, the adhesion may be more effective at certain pH values. For example, some gelatin-based materials may undergo adhesion more readily at pH values lower than 6 or 7. FloSeal™ was washed with H_2O in a ratio of 1:50, and the slurry was pH adjusted or acidified with 0.01M HCl or 0.01M NaOH to a pH between 2 and 7. Wet gelatin cake was filtered and dried in a forced air oven at 32°C for 12 to 20 hours and lightly ground with mortar and pestle. Dried gelatin powder was added to a solution of mixed PEG for *in situ* cross-linking. A slurry was mixed for 30 seconds and immediately applied to the surface of weighing paper fully saturated with 25 mM of phosphate buffer at pH 7.4. Polymerization times were recorded, and the results are shown in **Table 5**.

Table 5

Sample	pH of FloSeal™	pH of buffer for PEG (A/B)	Time (minutes) gelation
1	7.6	6	3

2	7.6	6	5
3	6.0	6	30
4	6.5	6	20
5	4.0	6	90

Example 17: Preparation of PEG Cake

[0275] In one embodiment, 0.8g PEG-succinimide powder and 0.8g PEG-thiol powder were thoroughly mixed by shaking, and placed in a 100ml round bottom flask which was fully charged with N_2. The mixed powder was melted in a 40°C-50°C oil bath with gentle manual stirring for 30 minutes, and allowed to cool. A solid film was removed from the flask using a spatula. In another embodiment, a mixed powder of PEG-succinimide and PEG-thiol was dissolved in an acidic solution of collagen (e.g. 0.3%) or gelatin (e.g. 2%), and lyophilized. It is thought that the fibrillar collagen or gelatin may help to loosen the matrix and improve handling of the PEG cake.

[0276] In a comparative composition, 1.2g of collagen fiber was dissolved in 100 cc of pH 2 HCl, warmed in a 35°C water bath for 1 to 2 hours, and diluted with pH 2 HCl to achieve a 0.3% CIS product. 0.2g PEG-succinimide and 0.2g PEG-thiol were dissolved in 2 cc of the 0.3% CIS. The resulting mixture was poured into a tray, and lyophilized through a 22 hour cycle to produce a PEG cake. In yet another embodiment, 2g of gelatin was dissolved in 100 cc pH 2 HCl, in a water bath at 35°C. 4g of a two component PEG powder mixture was dissolved in 2 cc of the gelatin solution, and lyophilized to provide a PEG cake.

[0277] In a related embodiment, PEG cakes were prepared by lyophilizing mixed solutions of PEG-SG, PEG-SH, and collagen at pH 2.0. Animal studies were performed on abraded liver capsules in a heparinized porcine model. Two drops of 0.2M phosphate buffer (pH 9.0) were added to the liver surface, which was bleeding slowly. A piece of cake was placed on the site without any compression. At 5 and 10 minutes, the adhesion of each of the PEG cakes to the site were tested. It was observed that the activity of PEG-SG was not reduced during the preparation process, and that the PEG cakes adhered to the abraded liver tissue by covalent bonding. The composition and *in vivo* performance of the tested samples are summarized in **Table 6**.

Table 6						
Sample	Conc. of PEG-GS (%, w/v)	Conc. of PEG-SH (%, w/v)	Conc. of gelatin (%, w/v)	Conc. of CIS (%, w/v)	Mass % collagen in PEG after lyophilization	*In vivo* performance (adhesion)
1	20	20	2	0	1.0%	Excellent
2	20	20	0	0.29	1.5%	Excellent
3	20	20	0	0.52	2.6%	Good

Example 18: Pulverized PEG Cake Material

[0278] 400 mg premixed CoSeal™, 1 g FloSeal™ (e.g. pH 7.1 to 9.5; particle diameter 70 to 400 μm), and 2 to 3 cc of H_2O were combined into a mixed paste, and lyophilized under a 22 hour cycle to form a cake. As depicted in **FIG. 9**, the cake 900 was then cracked 910, crushed, and broken powder form 920, and placed in a syringe 930 (e.g. 5 cc or 10 cc syringe). The tip 940 of the syringe barrel was removed with a blade, the powdered mixture 920 was applied to an injury site 950, and sealant activity was observed *in situ*. Exemplary results are discussed in Examples 10-12. In another embodiment, cake were prepared from a three component slurry as described in **Table 7**.

Table 7				
Sample	Premixed Two-Component PEG	FloSeal™	H_2O	PEG %
1	360 mg	500 mg	2.3 cc	42%
2	200 mg	500 mg	1.2 cc	48%

[0279] Test results on exemplary formulations according to some embodiments revealed the following characteristics shown in **Table 8**.

Table 8				
Sample	FloSeal™ pH	Weight of (ratio) FloSeal™	Weight of Mixed PEG	Particle Diameter FloSeal™
1	9.2	5 g	2.5 g	294 μm
2	7.7	5 g	2.5 g	308 μm

Example 19: Preparation of Sealant Matrix Composition Fused Pads

[0280] PEG pads were prepared with melted CoSeal™ premixtures. Three component powders were prepared by mixing FloSeal™ powder of different pH values and premixed CoSeal™ (e.g. both PEG components in powder form) according to various weight ratios. Lyophilized collagen sponges were used as a back-up support pad to mount the melted three component mixture. In one embodiment, as depicted in **FIG. 10**, 0.5 to 1g of sealant matrix composition 1000 was placed on top of a 3X3cm^2 section of sponge 1010. The sponge and sealant matrix were baked in an oven at 60 to 70°C for 1 to 2 minutes, and allowed to cool in

a desiccator to minimize or prevent contact with the air. The sealant matrix powder was observed to form a coarse film and attach to the sponge to form a fused pad 1020. In related embodiments, several sponges were prepared, each having dimensions of 3X3X0.3cm^3. Some sponges were coated with a three component mixture of first and second cross-linkable components and a hydrogel-forming component. Some sponges were coated only with a two component mixture of first and second cross-linkable components. All fused pads were tested *in situ* on a liver lesion site. Results are shown in **Table 9**.

Table 9

Fused cake sponge sample	Formulations of three components				*In vivo* performance
	FloSeal™ pH	FloSeal™ wt. (g)	CoSeal™ wt. (g)	Wt. of three components mounted on sponge (g)	Bleeding flow
1	9	0.5	0.2	0.4	minimal or no seal
2	8	0.5	0.2	0.4	minimal or no seal
3	8	0.5	0.2	0.4	minimal or no seal
4	n/a	0	0.5	0.4	minimal or no seal
5	n/a	0	0.5	0.4	minimal or no seal
6	9	1	0.4	0.8	seal

[0281] In related embodiments, several powdered compositions were prepared. Some compositions included a three component mixture of first and second cross-linkable components and a hydrogel-forming component. Some compositions included only a two component mixture of first and second cross-linkable components. All compositions were tested *in situ* on a liver lesion site. Results are shown in **Table 10**.

Table 10

Sample	Formulations of three components				*In vivo* performance
	FloSeal™ pH	FloSeal™ wt. (g)	CoSeal™ wt. (g)	Wt. of three components applied to lesion (g)	Bleeding flow
1	9	0.5	0.2	0.4 to 0.5	minimal or no seal
2	8	0.5	0.2	0.4 to 0.5	minimal or no seal
3	9	0.5	0.2	0.4 to 0.5	minimal or no seal
4	n/a	0	0.5	0.4 to 0.5	minimal or no seal
5	n/a	0.01 lysine	0.5	0.4 to 0.5	minimal or no seal

Example 20: Effect of γ-Radiation on *In Vivo* Performance

[0282] Powdered sealant matrix compositions and sponge-mounted sealant matrix compositions were prepared and some were γ-radiated to determine the effects of γ-rays on *in vivo* performance. No effects were observed, as shown in **Table 11**.

Table 11					
Sponge Sample	Formulations of three components				*In vivo* performance
	FloSeal™ pH	FloSeal™ wt. (g)	CoSeal™ wt. (g)	Wt. of three components mounted on sponge (g)	Bleeding flow
1	9	0.5	0.2	0.7	seal
2	8	0.5	0.2	0.7	seal
3 (γ)	9	0.5	0.2	0.7	seal
4 (γ)	8	0.5	0.2	0.7	seal
5	9	0.5	0.2	0.7	seal
6	8	0.5	0.2	0.65	seal
7	8	0.5	0.2	0.6	seal
Powder Sample	Formulations of three components				*In vivo* performance
	FloSeal™ pH	FloSeal™ wt. (g)	CoSeal™ wt. (g)	Wt. of three components applied to lesion (g)	Bleeding flow
1	9	0.5	0.2	0.5	seal
2	8	0.5	0.2	0.5	seal
3 (γ)	9	0.5	0.2	0.5	seal
4 (γ)	8	0.5	0.2	0.5	seal

Example 21: Effect of pH on *In Vivo* Performance

[0283] *In vivo* studies were performed to evaluate the effect of pH values of a hydrogel-forming component, and the effect of manual application methods, on *in situ* cross-linking. A Floseal™ of pH 6.75 in a first sealant composition and a FloSeal™ of pH 9.5 in a second sealant composition were compared. In some cases, the sealant matrix composition was manually held against the lesion, and in other cases the sealant matrix composition was applied to or placed on the lesion without holding. The composition having Floseal™ of pH 6.75 appeared to provide about 10 to 30 seconds slower reaction time than the composition having Floseal™ of pH 9.5. Exemplary study results are shown in **Table 12**. It is thought that the pH of a hydrogel-forming component may play a role in the early stages of a cross-linking reaction. The pH of a hydrogel-forming component may effect the speed of gel formation in a wet environment (e.g. where bleeding is already occurring). In some cases, if cross-linking does not occur quickly enough, the sealant composition may be pushed away from the lesion site.

Table 12		
Powder	Formulations of three components	*In vivo* performance

Sample	FloSeal™ pH	FloSeal™ wt. (g)	CoSeal™ wt. (g)	Wt. of three components applied to lesion (g)	Bleeding flow	Application site/method
P	7	0.5	0.2	0.5	no seal	liver square (w/o holding)
P	9	0.5	0.2	0.5	seal	liver square (w/o holding)
P	7	0.5	0.2	0.5	seal	liver square (w/ holding)
P	9	0.5	0.2	0.5	seal	liver square (w/ holding)
P	7	0.5	0.2	0.5	seal	splenic vein (w/ holding)
P	9	0.5	0.2	0.5	seal	splenic vein (w/ holding)

Example 22: Use of SURGIFOAM™ as Hydrogel-Forming Component

[0284] Mixtures of powdered COH102 (pentaerythritol tetrakis-[1-(1'-oxo-5'succinylpentate)-2-poly(oxyethylene)glycol] ether), powdered COH206 (pentaerythritol tetrakis-[mercaptoethyl-poly(oxyethylene)glycol] ether), and SURGIFOAM™ Absorbable Gelatin Powder (Ethicon, Somerville, NJ) were blended at ratios of 1:1:2, 1:1:4, and 1:1:8 by weight and filled into modified 5 mL syringes. The resulting mixtures were substantially dry, free-flowing powders. For each composition, two grams were applied with gentle compression to a surgically created lesion (approximately 1 cm x 1 cm x 0.3 cm deep) on the liver of a pig. For each of the compositions, compression was removed after one minute. The COH102 and COH206 in each composition reacted with each other in the wet environment of the lesion, creating a cross-linked hydrogel that incorporated the SURGIFOAM™ powder and physically sealed the lesion site. No bleeding was observed from any of the sites treated with the compositions. After irrigating the treated lesions with saline solution 5 minutes after application, no rebleeding was observed. Examination of the treated sites two hours later also showed no bleeding.

Example 23: *In vivo* Performance of Sealant Matrix Composition with Clotting Agent

[0285] A sealant matrix composition powder was prepared, containing FloSeal™ and CoSeal™ (pre-mixed) in a 4:1 weight ratio. In some embodiments, this ratio provides a degree of cross-linking effective to achieve desired levels of chemical polymerization and adherence of the composition to tissue. Thrombin powder was added to the sealant matrix

composition powder at various concentrations. The resulting mixture was tested in an animal study that involved measuring bleeding scores in liver squares and comparing hemostatic efficiency of the resulting mixture with sealant matrix compositions that did not contain thrombin.

[0286] Testing materials included 0.1g of pentaerythritol tetrakis[merkaptoethylpoly(oxyethylene)]ether, 0.1 g of Pentaerythritol tetrakis[1-1'-oxo-5'-succinimidylpentanoate)-2-poly(oxoethylene)glycole]ether, 0.8 g of crosslinked gelatin particle (FloSeal™), and various concentrations (5k, 2.5k, 1.25k, and 0.625 k u/g) of thrombin. In a mixing experiment, the four components of the resulting mixture were mixed with a tumble mixer. In a reconstitution experiment, four ml of thrombin solution (1250 u/ml) was mixed with 0.8 g of FloSeal, and then freeze fried for 22 hrs. Then dried mixture was mixed with CoSeal™ powder using a tumbler mixer. Without being bound to any particular theory, it is thought that the reconstituted thrombin formulation contains thrombin molecules that have penetrated into the matrix of FloSeal™ so that thrombin may remain in the sealant matrix barrier to enhance hemostatic efficacy. In a pad experiment, a pad was prepared by mounting the resulting four component mixture (sealant matrix composition plus thrombin) on top of a Gelfoam sponge, melting the mixture, and allowing it to cool and solidify. The oven temperature was set at about 60°C to about 65°C for about one minute.

[0287] In an *in vivo* test, an animal was heparinized to activate clotting time to reach 3-5 times higher than base line. Formulations were examined on the bleeding space of liver square (1 cm x 1 cm x 0.2 cm) that was surgically produced on a porcine liver. The lesion was irrigated immediately after the 5 minute reading to remove excess powder. Treated lesions areas were scored at 1, 5, 10, and 30 minutes. Materials were polymerized upon the contact with blood then tightly adhered to the lesion. The sealant matrix barrier mechanically sealed the bleeding areas to act as a mechanical sealant by bonding to the tissues. In an *in vitro* test, thrombin was heated at about 60°C for 5 minutes and found to be fully active. In a prepared Gelfoam pad, it was found that thrombin activity was lost.

[0288] Results of an acute *in-vivo* evaluation are provided in **Table 13**. Bleeding from the lesions were scored from "0" as no bleeding to "4" as severe bleeding. Based on the observed bleeding scores here, all samples tested showed no bleeding. No significant advantage was observed from the addition of thrombin to the sealant matrix composition.

The use of thrombin did not show any benefits in primary hemostasis, although it may augment secondary hemostasis/clot formation and wound healing.

Table 13

Lot No.	Sealant Matrix Composition	Thrombin (unit/g) Mixed or Reconstituted	1'	5'	10'	20'
1	no thrombin	0	0	0	0	
2	with thrombin	625, mixed	0	0	0	0
3	with thrombin	2500, mixed	0	0	0	0
4	with thrombin	5000, mixed	0	0	0	0
5	with thrombin	1250, mixed	0	0	0	0
1	no thrombin	0	0	0	0	0
5	with thrombin	1250, mixed	abort			
5	with thrombin	1250, mixed	0	0	0	0
4	with thrombin	5000, mixed	0	0	0	0
4	with thrombin	5000, mixed	0	0	0	0
1	no thrombin	0	0	0	0	0
6	with thrombin	625, reconstituted	0	0	0	0
7	with thrombin	2500, reconstituted	abort			
7	with thrombin	2500, reconstituted	0	0	0	0
7	with thrombin	2500, reconstituted	0	0	0	0
8	no thrombin (sponge)	0	0	0	0	0
9	with thrombin (sponge)	2500, mixed	0	0	0	0

Example 24: Effect of PEG Concentration on Gel Strength

[0289] The effect of PEG concentration on gel strength is shown in **Table 14** and **FIG. 11**, according to one embodiment of the present invention. Tensile tests were run following the gel formation. Gels were prepared by allowing reaction of three components powder (e.g. sealant matrix composition that includes first and second cross-linkable components and a hydrogel-forming component) in plastic molds (3x 1x 0.3 cm). Porcine plasma (1 ml, Baxter animal number S-264) was added to a sealant matrix composition powder (0.60 – 0.65 g) to initiate gel formation then allowed to cure at room temperature for approximately 30 minutes. Both ends of the gel were taped with scotch tape using cyanoacrylate glue to create the gripping spaces for pulling apart (1 x 1 cm). From the tensile testing, Peak force (N) and deflection at maximum load (cm) were measured to extend the gel until the break. 1x 0.3 cm is the effective surface area. The original effective length of gel is 1.0 cm. Applying a normal stress to the rectangular shape of gel until it breaks by Chatillon TCD200 tester was

the determination factor of the tensile strength. Results of the test showed that a higher concentration of polymer can increase the strength of the sealant matrix composition gel.

Table 14

Sample Number	Material Tested	Effective Area, cm square	Speed mm/min	Curing time min	Force N	F/0.3cm2 F/0.1cm2
334-25-1	10% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.69	8.97
334-25-2	10% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.12	7.07
334-25-3	10% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.11	7.03
Ave.					**2.31**	**7.69**
Stdev.					0.33	1.11
334-25-4	20%PEG	1 x 0.3	12.7	55	3.80	12.67
334-25-5	20%PEG	1 x 0.3	12.7	60	3.93	13.10
334-25-6	20%PEG	1 x 0.3	12.7	55	3.47	11.57
334-25-7	20%PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.33	7.76
Ave.					**3.38**	**11.28**
Stdev.					0.73	2.43
316-80-1	30%,PEG	1 x 0.3	12.7	70	4.04	13.46
316-80-2	30%,PEG	1 x 0.3	12.7	60	4.55	15.17
316-80-3	30%,PEG	1 x 0.3	12.7	60	5.12	17.06
316-80-4	30%,PEG	1 x 0.3	12.7	60	4.68	15.60
316-80-5	30%,PEG	1 x 0.3	12.7	55	4.49	14.97
316-80-6	30%,PEG	1 x 0.3	12.7	60	4.52	15.07
Ave.					**4.57**	**15.68**
Stdev.					0.35	0.97

Example 25: Effect of PEG Concentration on Swelling Ratio

[0290] The effect of PEG concentration on swelling ratio is shown in **FIGS. 12, 13, and 14**, according to one embodiment of the present invention. Swelling studies were carried out for the characterization of sealant matrix composition gels. When in contact with an aqueous environment, the hydrophilic polymer swells to form a hydrogel. Once a gel is formed, water molecules diffuse freely through a rather loose network formed by swollen FloSeal™ particles. Upon further addition of water, COH102-COH206 contacts are broken and individual polymer molecules are dissolved in water. Sealant matrix composition gels were prepared by mixing CoSeal™ and FloSeal™ at four different concentrations (5%, 10%, 20%, and 30% w/w) of polymer and by reactions with the same amount of porcine plasma (1.7 ml/g powders). The gel was cured for 30 minutes and then allowed to swell in saline at room temperature. Periodically, buffer was drained and the weight of the remaining gel was determined. The change in the weight of gel was monitored. The swelling ratio, Q, was calculated from the following equation:

$$Q = W^*/W$$

where W* is the wet weight and W is the original weight. The swelling ratio increased with increasing of polymer concentration. Without being bound by any particular theory, the apparent decline in swell ratio may be interpreted as a loss of gel material, as the gel slowly eroded. The end of the experiment is scored as the time when the gel disintegrates into several small pieces or becomes so slimy and weak that it is impossible to decant the free buffer from the gel. Water continues to penetrate toward the core and finally gel is converted to a viscous solution of PEG and gelatin particles. It took about 2-3 weeks for all materials to fall apart (**FIG. 14**). It appears that percent CoSeal™ in a sealant matrix composition powder can have a profound impact on the stability of a sealant matrix composition gel. The dissolution rate of the sealant matrix composition gel varies depending on the crosslinking degree of polymers. Results showed that the higher concentration of CoSeal™ can cause a stronger gel stability and can also cause more swell. The relative persistence of such gel *in vitro* may be expected to be similar to that *in vivo*.

[0291] The above examples provide ample illustration that compositions according to the present invention can be effective sealants. The compositions can polymerize *in situ* with physiological liquid or blood, and can seal or adhere to tissue very tightly.

[0292] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example, for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims. All patents, publications, articles, books, and other references materials discussed herein are incorporated by reference for all purposes.

[0293] Example 26: Assessment of Hemostatic Properties In Animal Models of Certain Formulations

[0294] Formulation No. 334-77

[0295] One gram of PEG-A powder (Pentaerythritol tetrakis[merkaptoethylpoly-oxyethylene]ether, MW 10,000), 1g of PEG-B powder (Pentaerythritol tetrakis[1-1'-oxo-5'-succinimidylpentanoate-2-poly-oxoethyleneglycole]ether, MW 10,000), and 8 g of FloSeal™ were placed in a mixing bottle (50 ml size) and loaded into the Inversina Tumbler Mixer for mixing. Mixture of three components were blended for 10 minutes until fully mixed. Six syringes (5 ml size) were filled with about 1.5 g of the mixture.

[0296] Formulation No. 334-77-1

[0297] A 1.5 g sample of Formulation No. 334-77 was mounted on a piece of Gelfoam (3 x 4 cm^2, Compressed Gelfoam, Upjohn manufactured, NDC 0009-0353-01). Gelfoam topped with the sample was baked in a vacuum oven at 60-65°C for 1 min until the sample began to melt. The material was then allowed to cool and solidify. Two pieces of the resulting cake on Gelfoam were placed in a pouch inserted with desiccant and sealed.

[0298] Formulation No. 334-77-4

[0299] A sample of Formulation No. 334-77 was placed on a piece of collagen sponge and baked. Sponges were prepared by lightly crosslinking collagen fibers by glutaraldehyde solution (5k ppm) and by freeze-drying collagen solution (1.0%) using VirTis Genesis Freeze Dryers. A collagen pad (3 x 4 cm^2) was carefully layered with a 1.5g sample of Formulation No. 334-77, then heated in a vacuum oven at 60-65°C for 1 min until the sample began to melt. The material was then allowed to cool and solidify. Each resulting collagen pad was placed in a pouch inserted with desiccant and sealed.

[0300] Methods:

[0301] Surgical Procedures:

[0302] Animals (NZW rabbits, female, weight approximately 3 kg) were anesthetized and received intravenous heparinization at a dose of 4.000 IU/kg 30 minutes prior to partial liver resection.

[0303] Liver Resection Model:

[0304] A median laparotomy was performed and the left lobe of the liver exposed and clamped. Part of the left lateral liver lobe was resected. Oozing was controlled by application of the test item. Application and setting time was standardized not to exceed 300 seconds. The hemostatic clamp was removed five minutes later when primary hemostasis was expected to be achieved.

[0305] Liver Abrasion Model:

[0306] A median laparotomy was performed and the left lobe of the liver exposed. A superficial circular lesion with a diameter of 2cm and a depth of 2mm was abraded on the surface of the liver lobe. This was accomplished using a drilling machine with a grinding disc attachment (bore grinder PROXXON FBS 230/E; grit size P40, rotational speed

5.000/min). The resultant small vessel or capillary bleeding or oozing thus generated was treated with one of the formulations.

[0307] After allowing an observation period of 15 minutes, the left liver lobe was returned to its original position in the abdominal cavity. If hemostasis is achieved, the abdomen will be closed and the Omentum resected (Synthofil® 2/0). The muscle and skin incision will be sutured separately using Synthofil® 2/0 as interrupted sutures in a two-level manner.

[0308] After 24 hours, the animals were sacrificed in anesthesia by an overdose of Pentobarbital Natrium (approx. 320mg i.v./animal). After euthanization an autopsy was performed. The abdomen was visually inspected for the presence of blood and/or blood clots resulting from rebleeding. If present, blood and/or blood clots were swabbed using pre-weighed surgical swabs, and the weight determined. If no hemostasis was achieved, animals were sacrificed by an overdose of Pentobarbital Natrium (approx. 320mg i.v./animal) and only primary endpoints will be evaluated.

[0309] Results:

[0310] The present study was aimed to assess the hemostatic properties of formulations #334-77, #334-77-1 and #334-77-4). Two very harsh hemostasis models were used: (1) the liver resection and (2) the liver surface model in highly heparinized rabbits.

[0311] After applying formulation #334 - 77 powder onto the bleeding wound it was found helpful to press the formulation onto the wound surface to obtain hemostasis. It was difficult to achieve this pressure with a dry surgical latex glove, since the powder had more adherence to the glove than to the wound. However, application of pressure with a wet glove was easier. The formulation formed a tight membrane after it came into contact with the moisture of blood. After application it lead to hemostasis in many cases, even in the harsh models used in this example. If hemostasis was not completely achieved after the first application, and there was an oozing bleeding underneath the layer formed, it was difficult to adequately stop the bleeding simply by the application of more formulation #334-77. It may be difficult to restrict application of the formulation only to the place where it is needed to stop the bleeding as the powdered formulation can fall into the abdominal cavity and adhere to the abdominal cavity if sufficient care is not taken. Therefore, proper application of formulation #334-77 is helpful.

[0312] In contrast, formulation #344-77-4 could easily be applied in a layer of constant thickness over a large area of tissue and with sufficient pressure in order to obtain hemostasis. Formulation #344-77-4, with the native collagen pad backing, remained adherent to the liver lobe after application and acted as a hemostat and glue, gluing the pad onto the wound and the liver capsule. Such a biodegradable backing can add more efficacy to the powder component in achieving hemostasis. The biodegradable backing can also confer flexibility to the formulation, allowing the formulation to be bent over edges of a resection during application. Two animals were treated with this formulation, one in the surface model and one in the resection model. Acute hemostasis was obtained in both models. Only the animal treated in the surface model survived with no postsurgical bleedings for 24 h. The collagen fleece was still at the site of application after 24 h. The animal treated in the resection model bled overnight to death and the fleece was detached. A difference between the two experiments was that in the first the fleece was pressed in the dry state onto the wound and in the second pressure with a wet gauze swab was used. The findings are shown in **Table 15**.

Ani-mal	Experi-ment	**TABLE 15**
1	1a	**Liver resection model: (#334-77-1)** Left liver lobe. Application without clamping. During application the Gelfoam pad was brittle and stiff and could not be bent in dry state around the edges of the resection. Was pressed 2 min with a wetted gauze swab (0.9 % NaCl) on the resection surface and the intact liver capsule around the resection. The powder adhered firmly to the wound surface but not to the Gelfoam backing. Non-adhering powder was rinsed with 0.9 % NaCl. Bleeding was stopped with exception of one point on the edge of the resection were oozing bleeding was observed.
	1b	**Surface model: (#334-77-1)** Left median liver lobe. Application without clamping. Formulation #334-77-1 was pressed 2 min with a wetted gauze swab (0.9 % NaCl) on the wound surface. The Gelfoam backing was removed. The formulation was adhering to the wound. Bleeding was stopped.
2	2a	**Liver resection model: (#334-77)** Left lateral liver lobe. Formulation #334 - 77 was applied to the bleeding surface and pressed with the dry latex glove. The powder adhered more strongly to the glove as to the wound surface. The formulation layer was removed with the glove.
	2b	**Liver resection model: (#334-77)** Same left lateral liver lobe as in 2a. #334-77 was applied with the wet glove and pressed 10 s to the wound surface. No adherence of powder to the glove. A layer was formed over the wound surface. Oozing bleeding beneath the powder was observed.

	2c	**Liver resection model (#334-77)** Left median liver lobe, application with clamping. Formulation #334-77 was applied on the bloody surface and pressed on the surface with a metal foil. The clamp was released after 5 min. Slight oozing bleeding at the edge of the resection. It was tried to stop this bleeding by applying more formulation. Bleeding could not be stopped completely. The powder layer was removed. The layer formed a tight membrane but with only little adherence to the wound surface.
	2d	**Liver resection model: (#WR334-77)** Same liver lobe as in 2c, but a new cut was done in order to promote bleeding. Application after clamping the liver lobe. Formulation was pressed 2 min with the scalpel on the wound. Bleeding could not be stopped
3	3a	**Surface model: #WR334-77+ equine collagen pad.** #344-77 powder was spread on a thin layer of an equine collagen pad. Holes were punctured in the collagen pad with an injection needle from the side with the formulation layer. Some formulation pressed into the holes. The formulation layer was thinner than as in the formulation variants. The fleece was applied dry, without clamping the liver lobe. The fleece was pressed with the glove for 2 min. No bleeding was observed. The pad was removed. Good adherence to the liver capsule and less adherence to the wound surface was observed.

	3 b	**Surface model: Formulation-Collagen-Pad (#334-77-4)** Same wound as in 3a. The pad was applied in dry state and pressed for 2 min on the wound surface. The pad was more flexible (bendable) compared to the fleece with the Gelfoam backing. This was favorable for the ease of application. The formulation did not detach from the collagen pad. The whole formulation-collagen pad was adhering to the wound and liver capsule. No bleeding was observed). The collagen pad was wetted with 0.9 % NaCl and the rabbit closed. The animal survived 24 h than it was sacrificed. In the post mortem examination the fleece was on place and no bleeding occurred during 24 h.

100

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising:.

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable component cross-link to form a porous matrix having interstices, and wherein the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices.

2. The composition of claim 1, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

3. The composition of claim 1, wherein the first cross-linkable component comprises a multi-nucleophilic polyalkylene oxide having m nucleophilic groups, and the second cross-linkable component comprises a multi-electrophilic polyalkylene oxide having n electrophilic groups, wherein m and n are each greater than or equal to two, and wherein m+n is greater than or equal to five.

4. The composition of claim 3, wherein n is two, and wherein m is greater than or equal to three.

5. The composition of claim 4, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is tetrafunctionally activated.

6. The composition of claim 3, wherein m is two, and wherein n is greater than or equal to three.

7. The composition of claim 6, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is tetrafunctionally activated.

8. The composition of claim 3, wherein both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide are tetrafunctionally activated.

9. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of $-NH_2$, -SH, -H, $-PH_2$, and $-CO-NH-NH_2$.

10. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more primary amino groups.

11. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more thiol groups.

12. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is polyethylene glycol or a derivative thereof.

13. The composition of claim 12, wherein the polyethylene glycol further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of a primary amino group and a thiol group.

14. The composition of claim 3, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more electrophilic groups selected from the group consisting of $-CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, -N=C=O, $-SO_2CH=CH_2$, $-N(COCH)_2$, and $-S-S-(C_5H_4N)$.

15. The composition of claim 3, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more succinimidyl groups.

16. The composition of claim 3, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more maleimidyl groups.

17. The composition of claim 3, wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is a polyethylene glycol or a derivative thereof.

18. The composition of claim 3 further comprising a polysaccharide or a protein.

19. The composition of claim 3 further comprising a polysaccharide, wherein the polysaccharide is a glycosaminoglycan.

20. The composition of claim 19, wherein the glycosaminoglycan is selected from the group consisting of hyaluronic acid, chitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratin sulfate, keratosulfate, heparin, and derivatives thereof.

21. The composition of claim 3 further comprising a protein, wherein the protein is collagen or a derivative thereof.

22. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide or the multi-electrophilic polyalkylene oxide, or both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide, further comprise(s) a linking group.

23. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide is given by the formula:

polymer-Q^1-X_m

and wherein the multi-electrophilic polyalkylene oxide is given by the formula:

polymer-Q^2-Y_n

wherein X is an electrophilic group and Y is a nucleophilic group;

wherein m and n are each 2 to 4;

wherein $m+n \leq 5$;

wherein each of Q^1 and Q^2 are linking groups selected from the group consisting of -O-$(CH_2)_{n'}$-, -S-, -$(CH_2)_{n'}$-, -NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-CR^1H, and -O-R^2-CO-NH;

wherein n'=1 to 10;

wherein R^1 =-H, -CH_3, or -C_2H_5;

wherein R^2 =-CH_2- or -CO-NH-CH_2CH_2-; and

wherein Q^1 and Q^2 may be the same or different or may be absent.

24. The composition of claim 23, wherein Y is given by the formula:

-$CO_2N(COCH_2)_2$.

25. The composition of claim 23, wherein Y is given by the formula:

-$N(COCH)_2$.

26. The composition of claim 3, wherein the multi-nucleophilic polykylene oxide or the multi-electrophilic polyalkylene oxide or both the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprise(s) a biodegradable group.

27. The composition of claim 26, wherein the biodegradable group is selected from the group consisting of lactide, glycolide, ϵ-caprolactone, poly(α-hydroxy acid), poly(amino acid), and poly(anhydride).

28. The composition of claim 1, wherein the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a fragmented biocompatible hydrogel that comprises gelatin and will absorb water when delivered to a moist tissue target site, and wherein the hydrogel comprises subunits having sizes ranging from about 0.01 mm to about 5 mm when fully hydrated and has an equilibrium swell ranging from about 400% to about 5000%.

29. The composition of claim 28, wherein the hydrogel has an *in vivo* degradation time of less than one year.

30. The composition of any of claims 28 and 29, wherein the hydrogel is at least partially hydrated with an aqueous medium comprising an active agent.

31. The composition of claim 30, wherein the active agent is a clotting agent.

32. The composition of claim 31, wherein the clotting agent is thrombin.

33. A method for delivering an active agent to a patient, the method comprising administering to a target site on the patient an amount of the composition of claim 30.

34. A method for delivering a sealing agent to a patient, the method comprising administering to a bleeding target site an amount of the composition of claim 1 sufficient to inhibit bleeding.

35. A method for delivering thrombin to a patient, the method comprising administering to a bleeding target site an amount of the composition of claim 32 sufficient to inhibit bleeding.

36. A composition comprising a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic polyalkylene oxide, and a hydrogel-forming component, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises at least one primary amino group and at least one thiol group, and wherein under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross-linking.

37. A composition comprising a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic polyalkylene oxide, and a hydrogel-forming component, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more thiol groups and the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more electrophilic groups selected from the group consisting of succinimidyl groups and maleimidyl groups, and wherein under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross-linking.

38. A composition comprising a multi-nucleophilic polyalkylene oxide, a multi-electrophilic polyalkylene oxide, and a hydrogel-forming component, wherein the multi-nucleophilic polyalkylene oxide further comprises two or more nucleophilic groups selected from the group consisting of primary amino groups and thiol groups, and the multi-electrophilic polyalkylene oxide further comprises two or more succinimidyl groups, and wherein under reaction-enabling conditions the multi-nucleophilic polyalkylene oxide and multi-electrophilic polyalkylene oxide are capable of substantially immediate cross-linking.

39. A composition comprising a first polyethylene glycol comprising two or more thiol groups, a second polyethylene glycol comprising two or more succinimidyl groups or maleimidyl groups, and a hydrogel-forming component, wherein the sum of the thiol groups and the succinimidyl or maleimidyl groups is at least five, and wherein under reaction-enabling conditions the first polyethylene glycol and second polyethylene glycol are capable of substantially immediate cross-linking.

40. The composition of claim 39, wherein the first polyethylene glycol further comprises four thiol groups and the second polyethylene glycol further comprises four succinimidyl groups.

41. The composition of claim 39 further comprising a protein or a polysaccharide.

42. The composition of claim 39 further comprising a polysaccharide, wherein the polysaccharide is a glycosaminoglycan.

43. The composition of claim 42, wherein the glycosaminoglycan is selected from the group consisting of hyaluronic acid, chitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratin sulfate, keratosulfate, heparin, and derivatives thereof.

44. The composition of claim 39 further comprising a protein, wherein the protein is collagen or a derivative thereof.

45. A method for sealing a tissue tract, the method comprising at least partly filling a tissue tract with a composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days.

46. The method of claim 45, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second polymer comprises multiple electrophilic groups.

47. A method for inhibiting bleeding at a target site in a patient's body, the method comprising delivering a composition to the target site in an amount sufficient to inhibit bleeding, the composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days.

48. The method of claim 47, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

49. A method for delivering a bioactive substance to a target site in a patient's body, the method comprising delivering a composition in combination with the bioactive substance to the target site, the composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days.

50. The method of claim 49, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

51. A method as in claim 49, wherein the bioactive substance is a hemostatic agent.

52. A method as in claim 49, wherein the bioactive substance is thrombin.

53. A method for delivering a swellable composition to a target site in tissue, said method comprising applying the composition to the target site, the composition comprising:

a first cross-linkable component;

a second cross-linkable component that cross-links with the first cross-linkable component under reaction enabling conditions; and

a hydrogel-forming component;

wherein the first and second cross-linkable components cross-link to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices, the hydrogel comprising subunits having sizes ranging from about 0.05 mm to about 5 mm when fully hydrated, having an equilibrium swell ranging from about 400% to about 1300%, and degrading in the tissue tract after from about 1 to about 120 days, the composition being hydrated at less than its equilibrium swell upon application to the target site where it swells to an equilibrium swell value.

54. The method of claim 53, wherein the first cross-linkable component comprises multiple nucleophilic groups and the second cross-linkable component comprises multiple electrophilic groups.

55. The method of claim 53, wherein the target site is in tissue selected from the group consisting of muscle, skin, epithelial tissue, connective or supporting tissue, nerve tissue, ophthalmic and other sense organ tissue, vascular and cardiac tissue, gastrointestinal organs and tissue, pleura and other pulmonary tissue, kidney, endocrine glands, male and female reproductive organs, adipose tissue, liver, pancreas, lymph, cartilage, bone, oral tissue, and mucosal tissue, and spleen and other abdominal organs.

56. The method of claim 55, wherein the target site is a void region within the selected tissue.

57. The method of claim 56, wherein the void region is selected from the group consisting of tissue divots, tissue tracts, intravertebral spaces, and body cavities.

58. The method of claim 53, wherein the hydrogel has a degree of hydration in the range from 50% to 95% of the hydration at equilibrium swell.

59. The method of claim 53, wherein the hydrogel comprises a plasticizer.

60. The method of claim 59, wherein the plasticizer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, sorbitol, and glycerol.

61. The method of claim 59, wherein the plasticizer is present at from 0.1% by weight to 30% by weight of the composition of the hydrogel component.

62. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises a cross-linked protein hydrogel.

63. A method as in claim 62, wherein the protein is selected from the group consisting of gelatin, soluble collagen, albumin, hemoglobin, fibrogen, fibrin, casein, fibronectin, elastin, keratin, laminin, and derivatives and combinations thereof.

64. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises a cross-linked polysaccharide.

65. A method as in claim 64, wherein the polysaccharide is selected from the group consisting of glycosaminoglycans, starch derivatives, cellulose derivatives, hemicellulose derivatives, xylan, agarose, alginate, and chitosan and combinations thereof.

66. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises a cross-linked non-biologic polymer.

67. A method as in claim 66, wherein the cross-linked non-biologic polymer selected from the group consisting of polyacrylates, polymethacrylates, polyacrylamides, polyvinyl resins, polyactide-glycolides, polcaprolactones, polyoxyethlenes, and combinations thereof.

68. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises at least two components selected from the group consisting of cross-linked proteins, cross-linked polysaccharides, and cross-linked non-biologic polymers.

69. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises a hydrogel polymer and a hydrogel cross-linking agent, wherein the hydrogel

polymer and hydrogel cross-linking agent have been reacted under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

70. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises a molecular cross-linked hydrogel polymer that has been produced by irradiation of the hydrogel under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

71. A method as in any one of claims 45-61, wherein the hydrogel comprises a molecular cross-linked hydrogel that has been produced by reaction of monounsaturated and polyunsaturated hydrogel monomers under conditions which yield cross-linking of hydrogel polymer molecules.

72. A method of forming a three dimensional synthetic polymer matrix comprising the steps of:

providing a first cross-linkable component containing m nucleophilic groups and a second cross-linkable component containing n electrophilic groups, wherein the electrophilic groups react with the nucleophilic groups to form covalent bonds therewith, wherein m and n are each greater than or equal to two, and wherein m+n is greater than or equal to five;

combining the first cross-linkable component and the second cross-linkable component;

adding a hydrogel-forming component to the first cross-linkable component and the second cross-linkable component;

allowing the first cross-linkable component and the second cross-linkable component to become cross-linked to one another to form a three dimensional matrix.

73. The method of claim 72, further comprising contacting a first tissue surface and a second surface with the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel-forming component.

74. The method of claim 73, wherein the second surface is a native tissue surface.

75. The method of claim 73, wherein the second surface is a non-native tissue surface.

76. The method of claim 75, wherein the non-native tissue surface is a synthetic implant.

77. The method of claim 76, wherein the synthetic implant is selected from the group consisting of a donor cornea, an artificial blood vessel, a heart valve, an artificial organ, a bond prosthesis, an implantable lenticule, a vascular graft, a stent, and a stent/graft combination.

78. The method of claim 72, wherein the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel-forming component are each applied in powdered form at the first tissue surface.

79. The method of claim 72, wherein the first cross-linkable component, the second cross-linkable component, and the hydrogel-forming component are each applied as a powder in a single combined mixed powder formulation at the first tissue surface.

80. The method of claim 79, wherein the mixed powder formulation further comprises a protein or a polysaccharide.

81. The method of claim 72, wherein the first tissue surface is on or in a hard tissue or a soft tissue.

82. The method of claim 72, wherein the first tissue surface comprises, surrounds or is adjacent to a surgical site, and wherein the method further comprises the step of closing the surgical site.

83. The method of claim 72, wherein the mixed powder formulation further comprises collagen.

84. The method of claim 72, wherein the mixed powder formulation further comprises a biologically active agent.

85. A mixed powder composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form; and

a hydrogel-forming component in powdered form;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

86. The mixed powder composition of claim 85, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the first cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

87. The mixed powder composition of claim 85, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the second cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

88. The mixed powder composition of claim 85, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is in the range from about 45% to about 55%.

89. The mixed powder composition of claim 85, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is about 50%.

90. The mixed powder composition of claim 85, wherein a weight ratio between the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component is within a range from about 28% to about 42% w/w.

91. The mixed powder composition of claim 85, wherein a weight ratio between the first and second cross-linkable components and the hydrogel-forming component is within a range from about 20% to about 30% w/w.

92. The mixed powder composition of claim 91, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the first cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

93. The mixed powder composition of claim 91, wherein the first cross-linkable component added to the second cross-linkable component provides a combined cross-linkable component composition, and the second cross-linkable component is present at a concentration in the range of about 0.5 to about 20 percent by weight of the combined cross-linkable component composition.

94. The mixed powder composition of claim 91, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is in the range from about 45% to about 55%.

95. The mixed powder composition of claim 91, wherein a weight ratio of the first cross-linkable component to the second cross-linkable component is about 50%.

96. A kit comprising:

a container; and

a mixed powder composition disposed within the container, the composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form; and

a hydrogel-forming component in powdered form;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

97. The kit of claim 96, wherein the container comprises a syringe barrel and a syringe plunger.

98. The kit of claim 96, further comprising written instructions for applying the mixed powder composition to a bleeding target site in a patient.

99. The kit of claim 96, wherein the mixed powder further comprises an active agent.

100. The kit of claim 99, wherein the active agent comprises thrombin.

101. A kit comprising:

a collagen sponge; and

a mixed powder composition fixed with a surface of the sponge, the mixed powder composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form; and

a hydrogel-forming component in powdered form;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking.

102. A composition comprising:

a collagen sponge comprising native collagen fibers; and

a mixed powder composition fixed with a surface of the sponge, the mixed powder composition comprising:

a first cross-linkable component comprising multiple nucleophilic groups, the first cross-linkable component in powdered form and comprising about 10% of the mixed powder;

a second cross-linkable component comprising multiple electrophilic groups, the second cross-linkable component in powdered form and comprising about 10% of the mixed powder; and

a hydrogel-forming component in powdered form, comprising about 80% of the mixed powder;

wherein under reaction-enabling conditions the first and second cross-linkable components are capable of substantially immediate cross-linking to form a porous matrix having interstices, and the hydrogel-forming component is capable of being hydrated to form a hydrogel to fill at least some of the interstices.

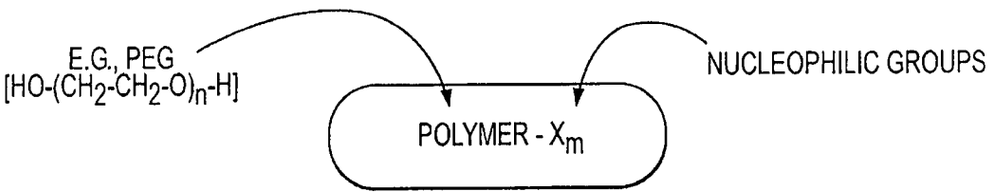

E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
NUCLEOPHILIC GROUPS
POLYMER - Xm

FIG.1

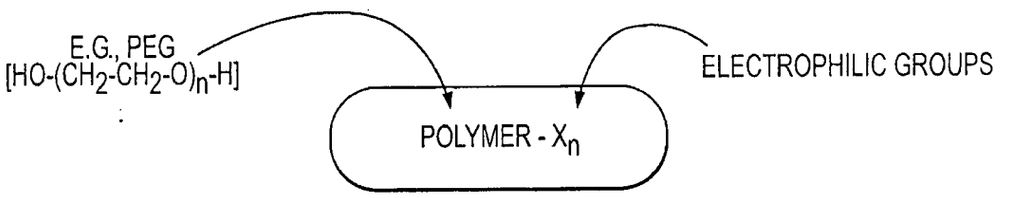

E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
ELECTROPHILIC GROUPS
POLYMER - Xn

FIG.2

SG-PEG: TETRAFUNCTIONALLY ACTIVATED PEG SUCCINIMIDYL GLUTARATE

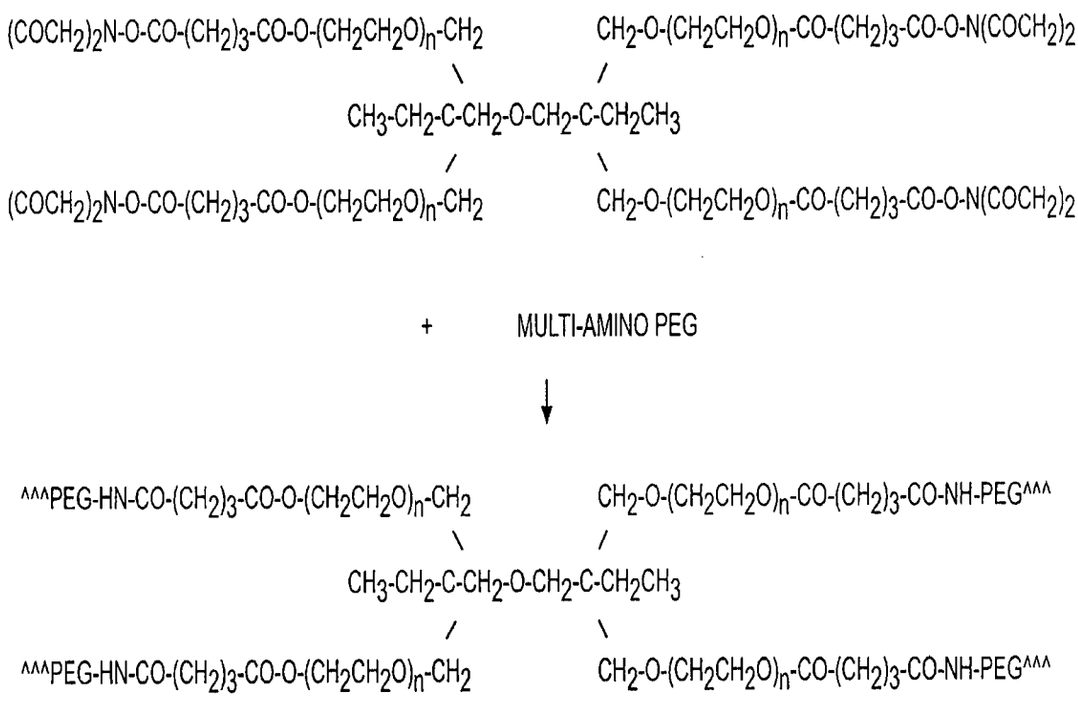


FIG.3

SG-PEG, M=3: TETRAFUNCTIONALLY
ACTIVATED PEG SUCCINIMIDYL BUTYLATE(ETHER LINKAGE)

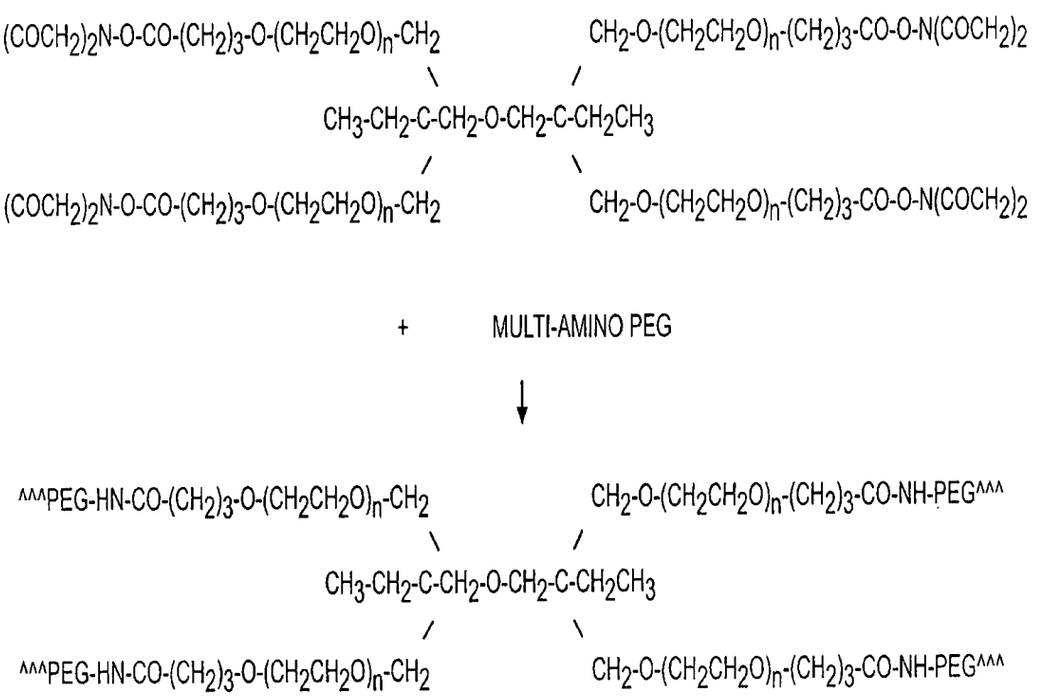


FIG.4

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

FIG.5

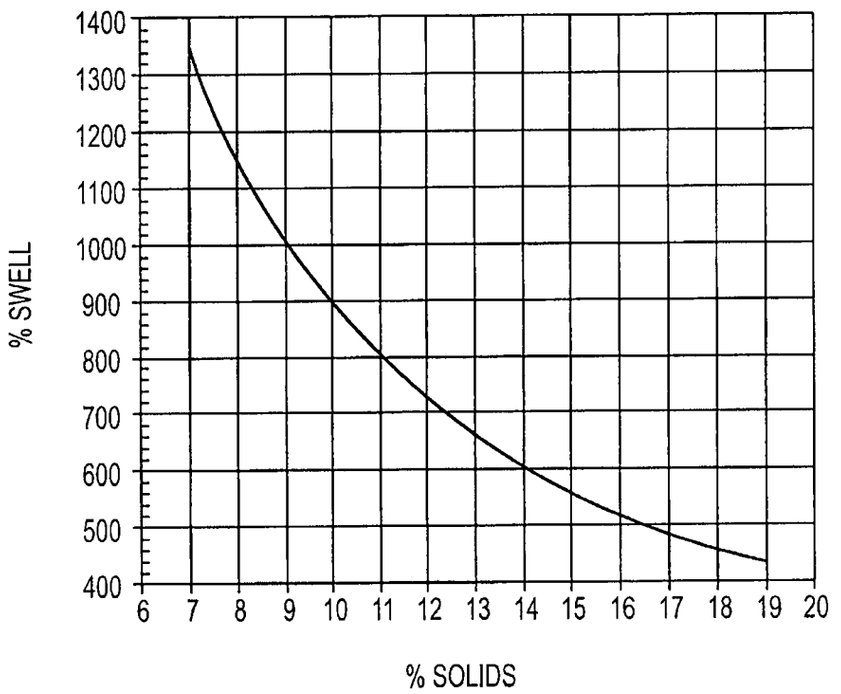


FIG.6

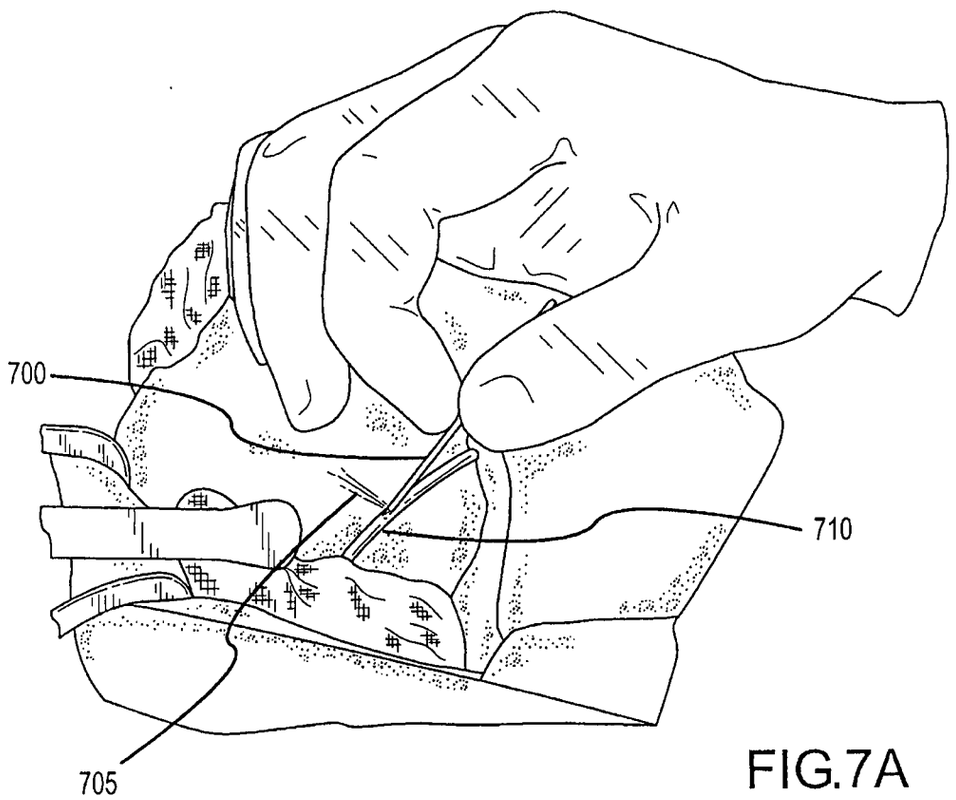


FIG.7A

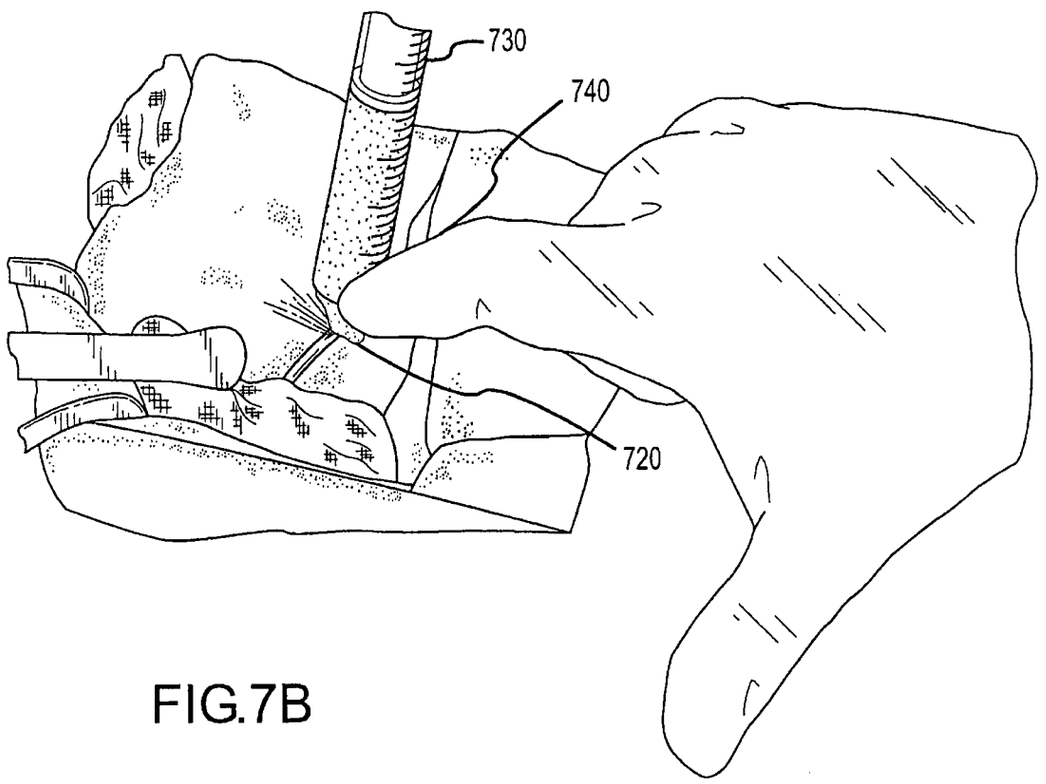


FIG.7B

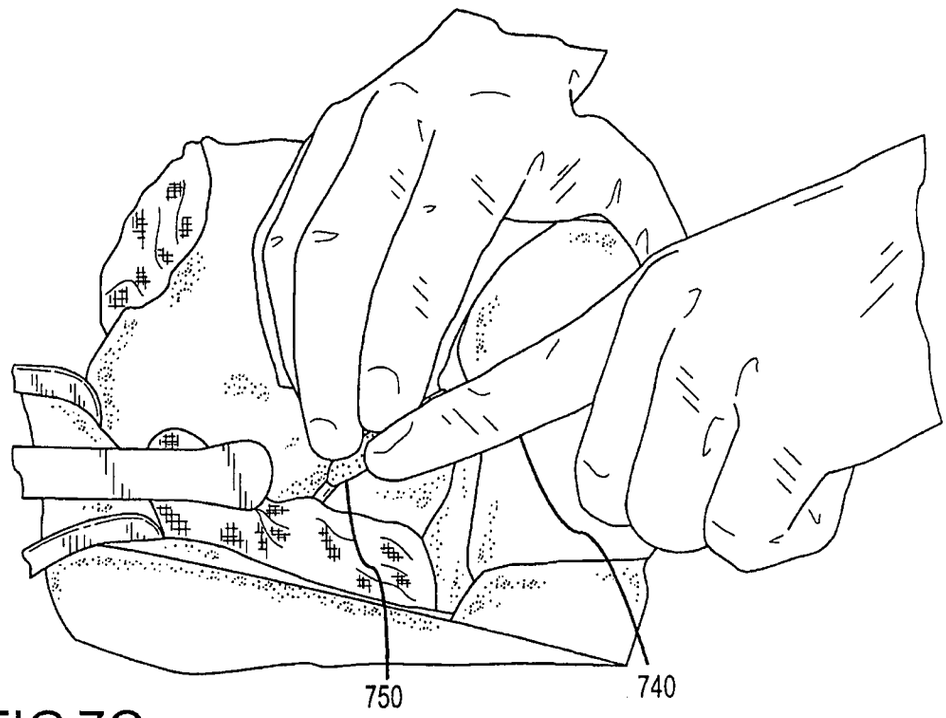


FIG.7C

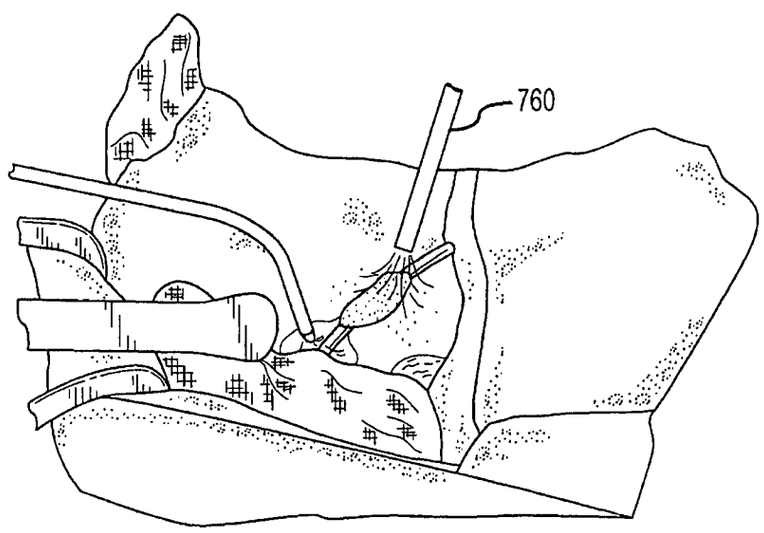


FIG.7D

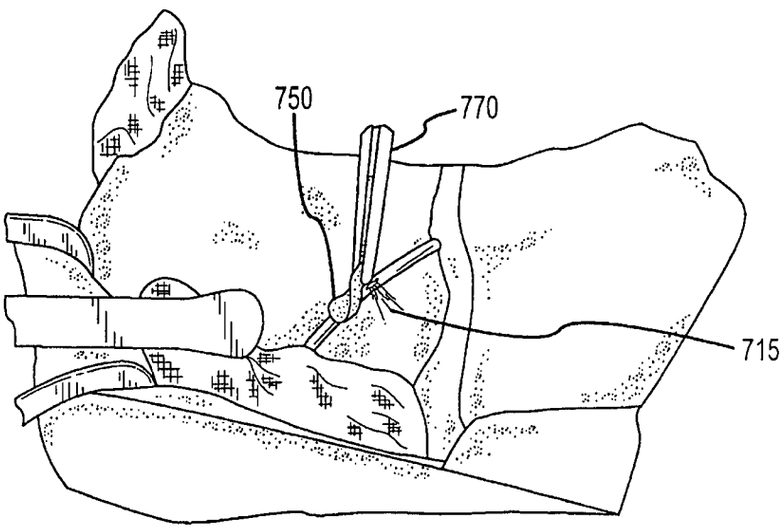


FIG.7E

124

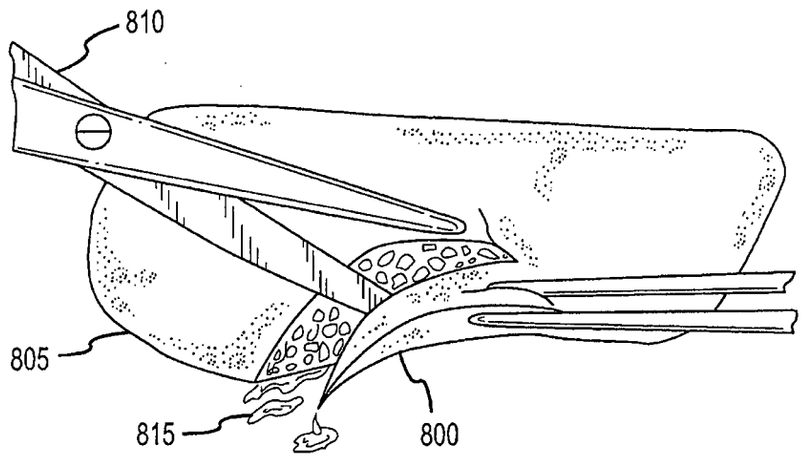


FIG.8A

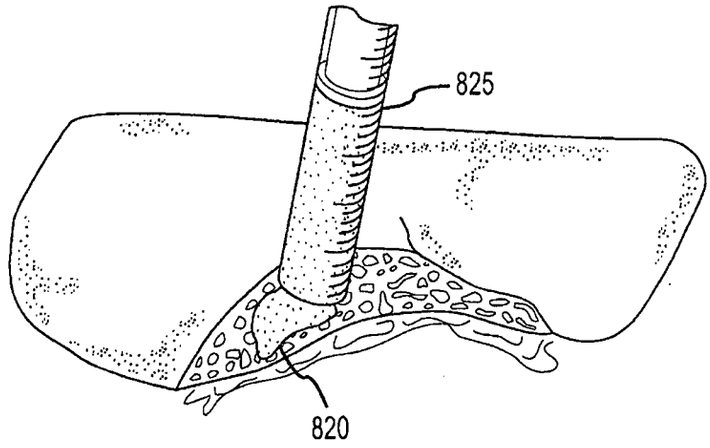


FIG.8B

122

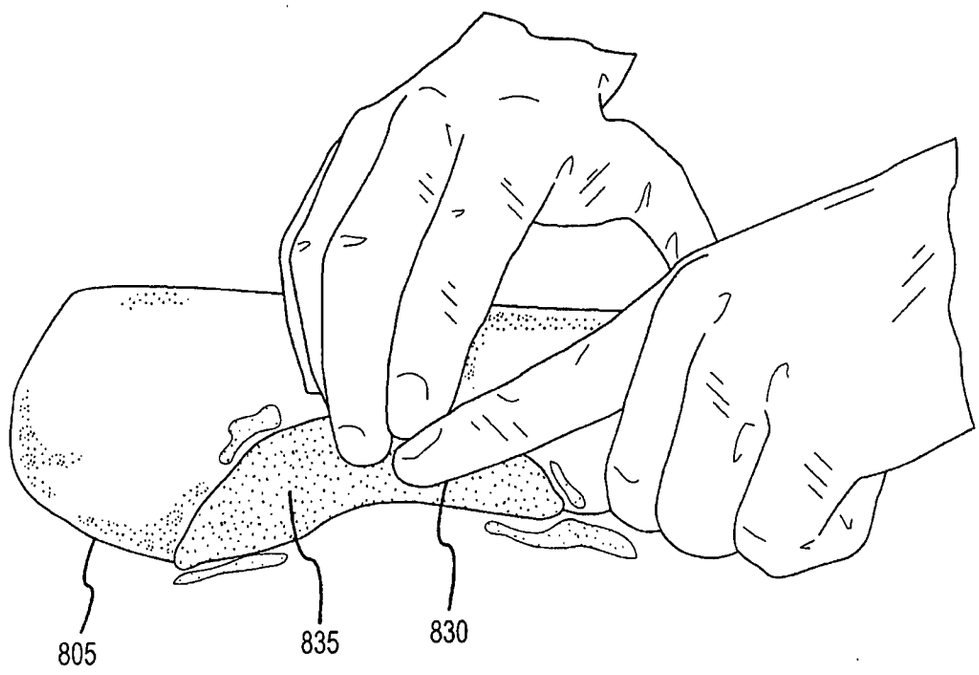


FIG.8C

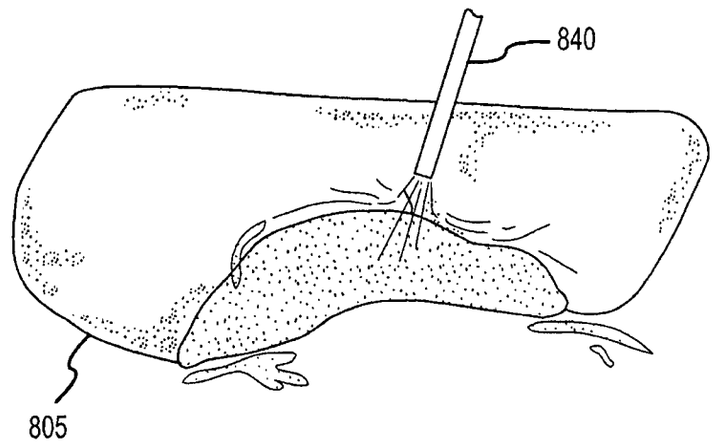


FIG.8D

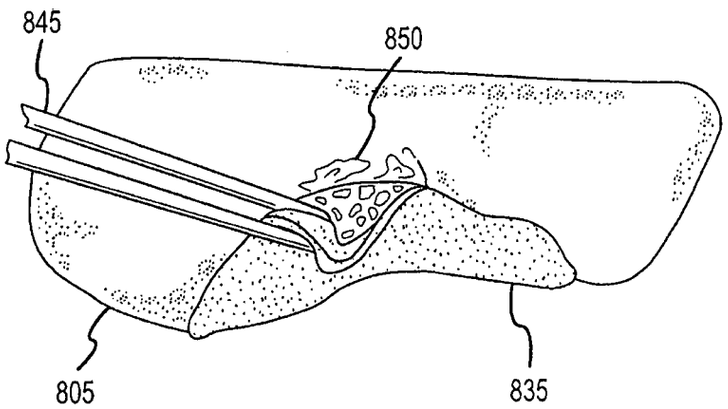


FIG.8E

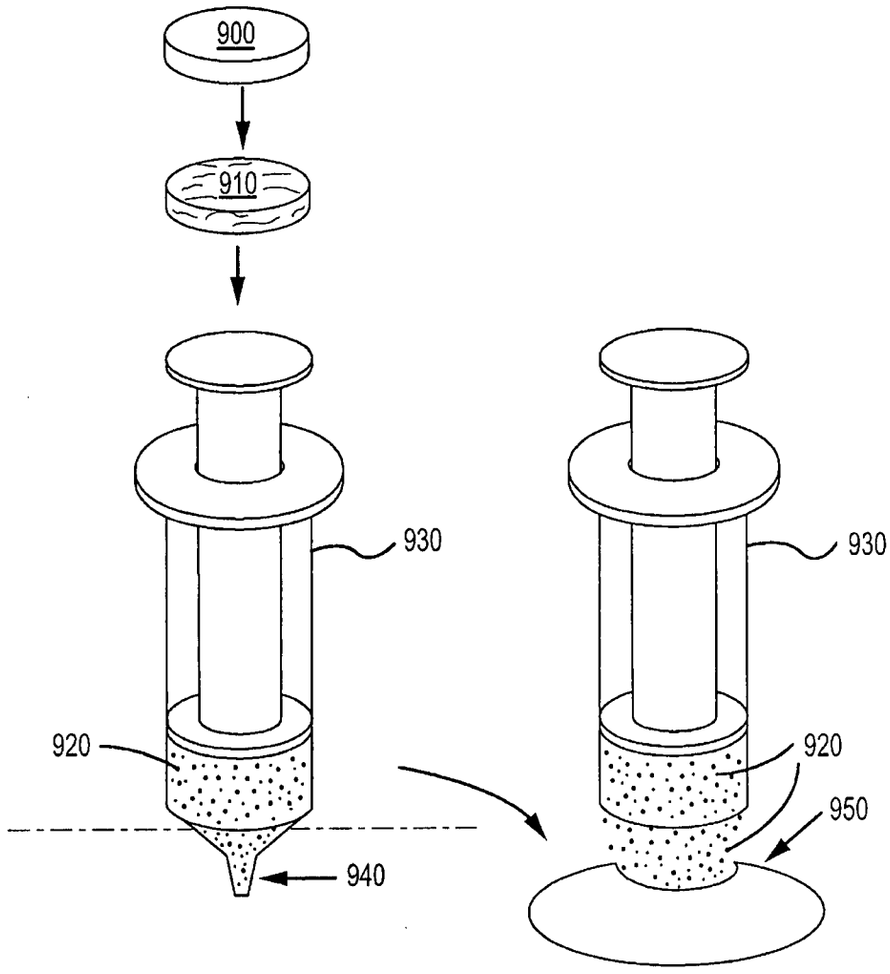


FIG.9

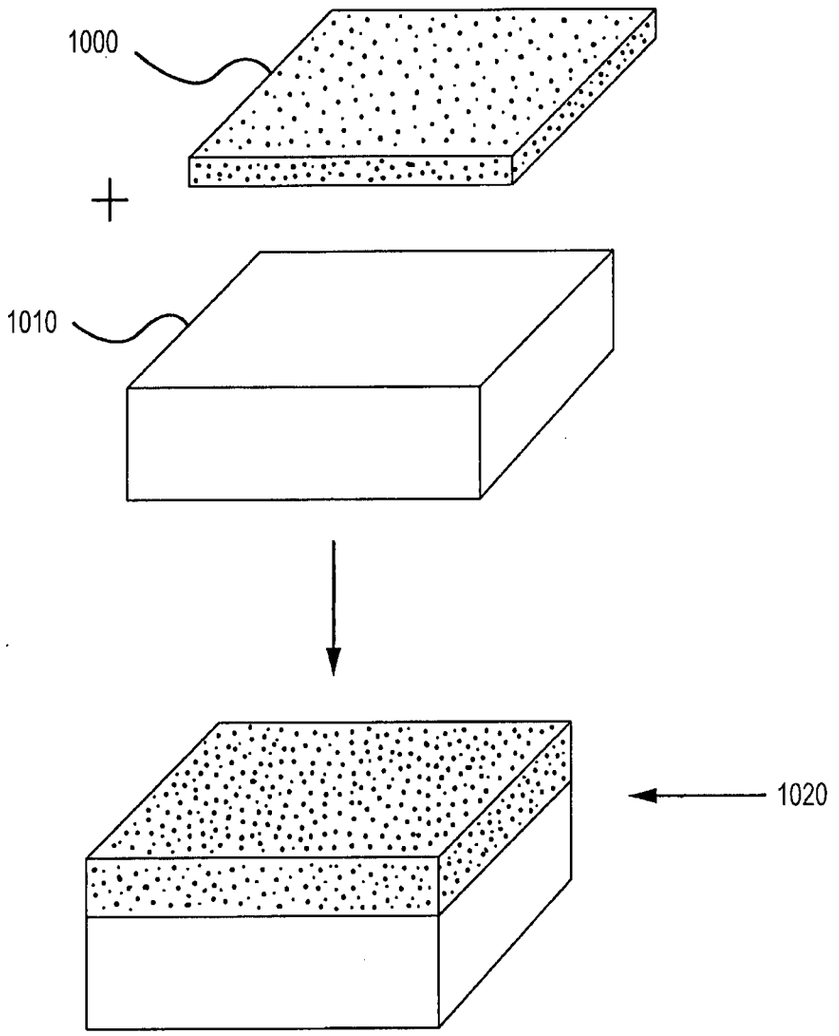


FIG.10

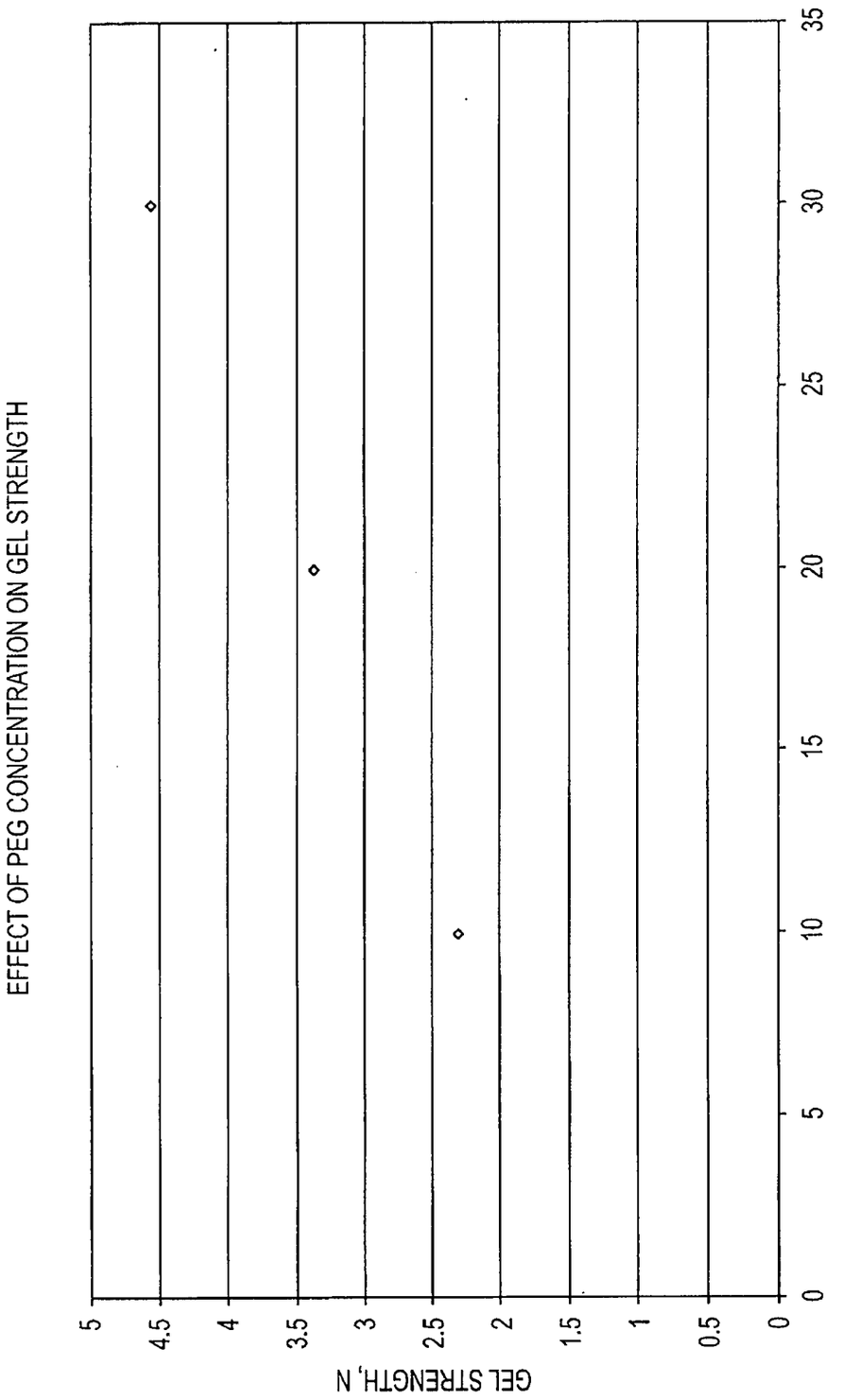

EFFECT OF PEG CONCENTRATION ON GEL STRENGTH
GEL STRENGTH, N
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
CONC. OF PEG, %

FIG.11

SAMPLE ID	PAN ID	DRY WT	30 sec.	0.6 hr 0.025 d	73 min 0.05 d	2 hr 0.08 d	17.4 hr 0.73 d	1 day	3.8 days	4.8 days	5.8 days	7.8 days	10.8 days	11.8 days	12.8 days	13.8 days	17.8 days
30%	1	1.49	1.59	2.13	2.38	2.70	4.41	4.67	5.63	6.02	6.13	6.53	7.09	7.02	6.61	6.52	5.00
.5+.5+.6g	2	1.61	1.68	2.14	2.36	2.62	4.27	4.53	5.51	5.86	6.03	6.39	6.93	6.98	6.87	6.73	4.91
	3	1.46	1.54	2.00	2.23	2.50	4.08	4.30	5.37	5.72	5.91	6.39	6.92	6.85	6.69	6.54	4.56
	AVG			2.09		2.61	4.25	4.50	5.50	5.86	6.02	6.44	6.98	6.95	6.72	6.60	4.83
	StDev			0.07		0.10	0.16	0.18	0.13	0.15	0.11	0.08	0.10	0.09	0.13		
	% rsd			3.53		3.96	3.81	4.08	2.39	2.57	1.78						
20%	1	1.48	1.63	2.26	2.54	2.88	4.22	4.33	5.04	5.21	5.08	5.08	5.11	5.32	5.02	5.07	3.76
.5+.5+.6g	2	1.50	1.71	2.36	2.70	3.03	4.38	4.51	5.09	5.24	5.18	5.06	5.10	5.03	4.84	4.75	3.29
	3	1.51	1.59	2.01	2.25	2.48	3.71	3.89	4.57	4.77	4.72	4.77	4.96	4.90	4.88	4.77	2.72
	AVG			2.21		2.80	4.10	4.24	4.90	5.07	4.99	4.97	5.06	5.08	4.92	4.86	3.25
	StDev			0.18		0.29	0.35	0.32	0.29	0.27	0.24	0.18	0.08	0.22	0.10		
	% rsd			7.94		10.31	8.55	7.48	5.88	5.25	4.82						
10%	1	1.68	1.91	2.73	3.02	3.48	4.54	4.32	4.68	4.80	4.70	4.49	4.52	4.33	4.06	3.93	2.89
.5+.5+.6g	2	1.53	2.01	2.60	2.88	3.22	3.75	3.76	4.11	4.10	3.97	3.38	3.49	3.34	3.24	2.99	2.02
	3	1.54	1.80	2.68	2.97	3.34	4.19	4.28	4.52	4.50	4.46	4.22	4.00	3.76	3.58	3.35	2.48
	AVG			2.67		3.35	4.16	4.12	4.44	4.47	4.37	4.03	4.00	3.81	3.63	3.42	2.46
	StDev			0.07		0.13	0.39	0.32	0.30	0.35	0.37	0.58	0.51	0.50	0.41		
	% rsd			2.51		3.95	9.45	7.66	6.71	7.77	8.51						
5%	1	1.49	1.83	2.57	2.70	3.05	3.58	3.30	3.71	3.85	3.69	3.30	3.06	2.79	2.70	2.41	1.05
.5+.5+.6g	2	1.44	2.01	2.73	2.93	3.18	3.78	3.68	3.85	3.99	3.83	3.23	3.07	2.66	2.69	2.52	1.14
	3	1.38	1.78	2.60	2.63	3.33	4.09	3.93	4.23	4.32	4.08	3.79	3.23	2.79	2.21	2.07	1.02
	AVG			2.64		3.19	3.81	3.64	3.93	4.05	3.87	3.44	3.12	2.74	2.53	2.33	1.07
	StDev			0.08		0.14	0.26	0.32	0.27	0.24	0.20	0.30	0.09	0.08	0.28		
	% rsd			3.16		4.31	6.76	8.82	6.93	5.89	5.18						

FIG.12

36 min	73 min	2 hr	17.4 hr	1 day	3.8 days	4.8 days	5.8 days	7.8 days	10.8 days	11.8 days	12.8 days	13.8 days	17.8 days
0.025d	0.005d	0.08d	0.73 d	1 d									
1.338	1.500	1.700	2.772	2.936	3.540	3.786	3.854	4.109	4.462	4.414984	4.154998	4.104045	3.145939
1.270	1.402	1.558	2.536	2.695	3.276	3.483	3.582	3.797	4.119	4.149548	4.081253	3.998871	2.919639
1.306	1.450	1.627	2.661	2.558	3.496	3.724	3.852	4.166	4.508	4.461564	4.360065	4.259805	2.972638
1.305	1.451	1.629	2.656	2.730	3.437	3.664	3.763	4.024	4.363	4.342032	4.198772	4.120907	3.012739
0.034	0.049	0.071	0.118	0.191	0.142	0.160	0.157	0.199	0.213	0.168315			
1.387	1.559	1.771	2.590	2.656	3.094	3.199	3.119	3.118	3.139	3.265	3.084	3.110	2.299098
1.377	1.577	1.774	2.561	2.635	2.977	3.065	3.026	2.961	2.981	2.938	2.830	2.777	1.921773
1.268	1.418	1.559	2.335	2.449	2.876	3.001	2.971	3.000	3.123	3.083	3.073	3.005	1.714088
1.344	1.518	1.701	2.495	2.80	2.982	3.088	3.039	3.026	3.081	3.095	2.996	2.964	1.978319
0.066	0.086	0.123	0.140	0.114	0.109	0.101	0.075	0.082	0.087	0.164	0.143	0.170	
1.426	1.577	1.820	2.370	2.259	2.446	2.506	2.456	2.346	2.360	2.265	2.119	2.052	1.510321
1.291	1.430	1.601	1.865	1.867	2.041	2.041	1.973	1.682	1.734	1.661	1.611	1.486	1.003033
1.489	1.650	1.854	2.326	2.376	2.513	2.501	2.475	2.342	2.221	2.090	1.991	1.859	1.376667
1.402	1.552	1.758	2.187	2.168	2.333	2.349	2.301	2.124	2.105	2.005	1.907	1.799	1.296674
0.101	0.112	0.137	0.280	0.266	0.255	0.267	0.284	0.382	0.329	0.311	0.265	0.288	
1.406	1.474	1.668	1.953	1.800	2.025	2.104	2.014	1.800	1.672	1.522	1.476	1.316	0.570789
1.356	1.456	1.580	1.877	1.829	1.909	1.982	1.900	1.604	1.524	1.320	1.336	1.252	0.563527
1.465	1.480	1.875	2.571	2.214	2.384	2.432	2.300	2.134	1.817	1.571	1.245	1.164	0.57336
1.409	1.470	1.708	2.133	1.947	2.106	2.173	2.071	1.846	1.671	1.471	1.352	1.244	0.569225
0.055	0.013	0.151	0.381	0.231	0.248	0.233	0.206	0.268	0.147	0.133	0.116	0.076	

FIG.13

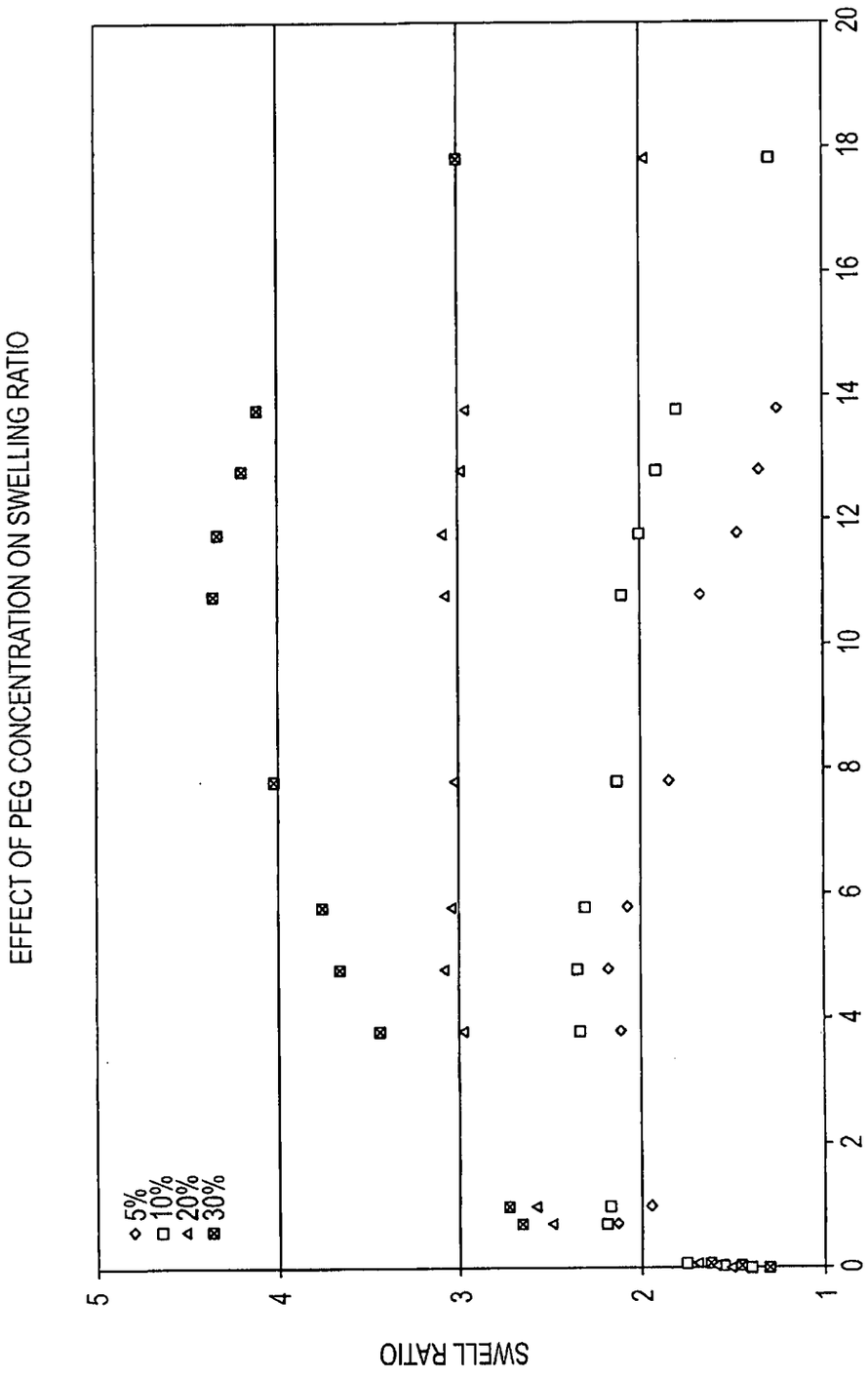

EFFECT OF PEG CONCENTRATION ON SWELLING RATIO
5%
10%
20%
30%
SWELL RATIO
TIME, DAYS
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
1
2
3
4
5

FIG.14

SELLADOR SECO DE ACCIÓN RÁPIDA Y MÉTODOS DE USO Y FABRICACIÓN

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Norteamericana Número 60/821,190 presentada el 2 de Agosto de 2006. La presente solicitud también está relacionada con las Patentes Norteamericanas Números 5,874,500, 6,063,061, 6,066,325, 6,166,130, y 6,458,889. Los contenidos de cada una de estas presentaciones están incorporados a la presente invención como referencia.

MANIFESTACIÓN DE LOS DERECHOS DE LAS INVENCIONES ELABORADAS DE ACUERDO CON LA INVESTIGACIÓN Y DESAROLLO PATROCINADA POR LA FEDERACIÓN

No aplicable

REFERENCIA A UN "LISTADO DE SECUENCIAS, UNA TABLA O UN APÉNDICE DE LISTADO DE PROGRAMA DE COMPUTADORA PRESENTADO EN UN DISCO COMPACTO

No aplicable

Antecedentes de la Invención

La Patente Norteamericana Número 5,162,430, presentada el 10 de Noviembre de 1992 de Rhee y asociados, describe conjugados de polímero sintético de colágeno preparados enlazando en forma covalente colágeno a polímeros hidrofílicos sintéticos tales como diversos derivados de polietilénglicol. La

(31)

Patente Norteamericana Número 5,324,775, presentada el 28 de Junio de 1994, de Rhee y asociados, describe varios polímeros de inserto, que ocurren naturalmente, biocompatibles (tales como polisacáridos) enlazados en forma covalentemente a polímeros de polietilénglicol hidrofílicos, no inmunogénicos, sintéticos. La Patente Norteamericana Número 5,328,955, presentada el 12 de Julio de 1994, de Rhee y asociados, describe varias formas activadas de polietilénglicol y varias ligaduras que se pueden utilizar para producir conjugados de polímeros sintéticos-colágeno que tienen un rango de propiedades físicas y químicas.

La serie número 08/403,358, presentada el 14 de Marzo de 1995, describe una composición de biomaterial reticulado que se prepara utilizando un agente de reticulación hidrofóbico o una mezcla de agentes de reticulación hidrofílicos e hidrofóbicos. Los agentes de reticulación hidrofóbicos pueden incluir cualquier polímero que contenga o pueden ser derivados químicamente para contener, dos o más grupos de succinimidilo.

La Patente Norteamericana Número 5,580,923, presentada el 3 de diciembre de 1996, de Yeung y asociados, describe una composición útil en la prevención de adiciones quirúrgicas que comprenden material de substrato y un agente de enlace anti-adhesión, en donde el material de substrato comprende colágeno y un agente de enlace que comprende

preferentemente al menos un grupo funcional reactivo al tejido y al menos un grupo funcional reactivo al substrato.

La Patente Norteamericana Número 5,614,587, presentada el 25 de Marzo de 1997, de Rhee y asociados, describe composiciones de bioadhesivo que comprenden colágeno reticulado utilizando un polímero hidrofílico o sintético activado en forma multifuncional, así como métodos para utilizar dichas composiciones para efectuar la adhesión entre una primera superficie y una segunda superficie, en donde al menos una de la primera y segunda superficies pueden ser una superficie de tejido inactivo.

La Publicación de Patente Japonesa Número 07090241 describe una composición utilizada para la adhesión temporal de un material de lente a un soporte, para montar el material en un aparato de maquinado, que comprende una mezcla de polietilénglicol, que tiene un peso molecular promedio dentro del rango de 1000-5000, y poli-N-vinilpirrolidona, que tiene un peso molecular promedio dentro del rango de 30,000-200,000.

West y Hubbell, Biomaterials (1995) 16:1153-1156, describe la prevención de adhesiones post-operatorias utilizando un hidrogel de diacrilato de ácido glicol-co-láctico de polietileno fotopolimerizado y un hidrogel de glicol-co-polipropilen glicol de polietileno reticulado físicamente, Poloxamer 407®.

Las Patentes Norteamericanas Números 5,672,336 y

133

5,196,185 describen un vendaje de curación que comprende un colágeno fibrilar de microparticulado que tiene un tamaño de partícula de 0.5-2.0 μm. Esta composición comprende generalmente una fase acuosa y puede no formar un hidrogel tal como se describe en la presente invención. La Patente Norteamericana Número 5,698,213 describe un hidrogel de poliéster alifático reticulado útil como un aparato quirúrgico absorbible y un vehículo de suministro de fármacos. La Patente Norteamericana Número 5,674,275, describe un adhesivo de hidrogel a base de acrilato o metacrilato. La Patente Norteamericana Número 5,306,501, describe un hidrogel termorreversible a base de polioxialquileno útil como un vehículo para suministro de fármacos.

Las Patentes Norteamericanas Números 4,925,677 y 5,041,292 describen un hidrogel que comprende un componente de proteína reticulado con un polisacárido o un mucopolisacárido y útil como un vehículo para suministro de fármacos.

Los polímeros para suministro de fármacos inyectables, biodegradables se describen en la Patente Norteamericana Número 5,384,333 y en la Publicación de Jeong y asociados. (1997) "Nature," 388:860-862. Los hidrogeles biodegradables para el suministro de fármacos liberados en forma controlada se describen en la Patente Norteamericana Número 4,925,677. Los sistemas de suministro de fármacos a base de colágeno

reabsorbible se describen en las Patentes Norteamericanas Números 4,347,234 y 4,291,013. Las películas biocompatibles a base de aminopolisacárido para el suministro de fármaco se describen en las Patentes Norteamericanas Números 5,300,494 y 4,946,870. Los transportadores solubles en agua para el suministro de taxol se describen en la Patente Norteamericana Número 5,648,506.

Los polímeros han sido utilizados como transportadores de agentes terapéuticos para efectuar una liberación localizada y sostenida (Langer, y asociados., Rev. Macro. Chem. Phys., C23 (1), 61, 1983; Controlled Drug Delivery, Vol. I y II, Brack, S.D., (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1983; Leong y asociados., Adv. Drag Delivery Review, 1:199, 1987). Estos sistemas de suministro de agente terapéutico simulan la infusión y ofrecen el potencial de una eficacia terapéuticamente mejorada y una toxicidad sistémica reducida.

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

135

polianhídridos (Leong, y asociados., Biomaterials, 7:364, 1986).

Las composiciones que contienen colágeno que han sido interrumpidas mecánicamente para alterar sus propiedades físicas se describen en las Patentes Norteamericanas Números 5,428,024; 5,352,715; y 5,204,382. Estas patentes se refieren generalmente a colágenos fibrilares e insolubles. En la Patente Norteamericana Número 4,803,075 se describe una composición de colágeno inyectable. En la Patente Norteamericana Número 5,516,532 se describe una composición de hueso/cartílago inyectable. Se puede suspender una matriz de suministro a base de colágeno que comprende partículas secas con un tamaño dentro del rango de 5 μm a 850 μm, en agua y tiene una densidad de carga de superficie particular la cual se describe en la Publicación de Patente WO 96/39159. Una preparación de colágeno que tiene un tamaño de partícula de 1 μm a 50 μm útil como un rocío de aerosol para formar un vendaje de curación se describe en la Patente Norteamericana Número No. 5,196,185 otras patentes que describen composiciones de colágeno incluyen las Patentes Norteamericanas Números 5,672,336 y 5,356,614. En la Publicación de Patente WO 96/06883 se describe un hidrogel no erosionable, polimérico que puede ser reticulado e inyectado mediante una jeringa.

Las solicitudes pendientes que se encuentran a continuación, asignadas al cesionario de la presente invención, contienen el asunto materia relacionado: Serie Norteamericana

136

Número 08/903,674, presentada el 31 de Julio de 1997; Serie Norteamericana Número 60/050,437, presentada el 18 de Junio de 1997; Serie Norteamericana Número 08/704,852, presentada el 27 de Agosto de 1996; Serie Norteamericana Número 08/673,710, presentada el 19 de Junio de 1996; Serie Norteamericana Número 60/011,898, presentada el 20 de Febrero de 1996; Serie Norteamericana Número 60/006,321, presentada el 7 de Noviembre de 1996; Serie Norteamericana Número 60/006,322, presentada el 7 de Noviembre de 1996; Serie Norteamericana Número 60/006,324, presentada el 7 de Noviembre de 1996; y Serie Norteamericana Número 08/481,712, presentada el 7 de Junio de 1995. Las descripciones totales de cada una de estas solicitudes están incorporadas a la presente invención como referencia. Cada publicación mencionada anteriormente y en la presente invención está incorporada como referencia en su totalidad a la misma. Existen una variedad de materiales adecuados para utilizarse como bioadhesivos para el aumento de tejido, para la prevención de adhesiones quirúrgicas, para recubrir superficies de implantes sintéticos; como matrices de suministro de fármaco, para aplicaciones oftálmicas y similares. Aún en muchos casos, el tiempo de ajuste de estos materiales puede ser menor al óptimo, mientras que para aplicaciones quirúrgicas y otras aplicaciones médicas, con frecuencia se prefiere un material de acción rápida. En otros casos, los materiales

normalmente disponibles pueden exhibir propiedades de expansión que son indeseables para ciertas aplicaciones quirúrgicas. Por lo tanto, lo que se necesita es un material de acción rápida, para utilizarse, por ejemplo, como un sellador de tejido para aplicaciones hemostáticas y/o de sellado de heridas. Puede ser deseable proporcionar materiales que exhiban propiedades de expansión mínimas.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona composiciones para lograr la hemostasis u otra contención de fluidos en un contexto *in vivo*. Las composiciones de la presente invención comprenden primeros y segundos componentes reticulables de al menos un componente que forma hidrogel, en una composición adecuada para aplicarse a un vertebrado para facilitar la contención de fluidos. Las composiciones incluyen materiales de acción rápida, para utilizarse, por ejemplo, como un sellador de tejido para aplicaciones hemostáticas y/o de sellado de heridas. Las composiciones exhiben propiedades de expansión mínimas.

En un primer aspecto, las modalidades de la presente invención proporcionan una composición que incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción, y un componente que forma un hidrogel. El primer y segundo componentes

reticulables, se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma el hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para eliminar al menos alguno de los intersticios. En algunos aspectos, el pH del componente que forma un hidrogel puede afectar un tiempo de reacción para formar una barrera de matriz de sellador. Por ejemplo, en algunas modalidades, una composición que incluye un componente que forma un hidrogel que un pH de 6.75, proporciona un tiempo de reacción más lento que una composición que incluye un componente que forma un hidrogel que tiene un pH de 9.5.

El primer componente reticulable puede incluir múltiples grupos nucleofílicos, y el segundo componente reticulable puede incluir múltiples grupos electrofílicos. En algunos aspectos, el primer componente reticulable incluye un óxido de polialquileno multi-nucleofílico que tiene m grupos nucleofílicos, y el segundo componente reticulable incluye un óxido de polialquileno multi-electrofílico que tiene n grupos electrofílicos, en donde m y n son cada uno mayores o iguales a dos, en donde m+n es mayor o igual a cinco. En algunos aspectos, n es dos y m es mayor o igual a 3. El óxido de polialquileno multi-nucleofílico puede ser tetrafuncionalmente activado. En algunos aspectos, m es dos, y n es mayo o igual a tres. El óxido de polialquileno multielectrofílico puede ser activado en forma tetrafuncional. En algunos casos, tanto el

óxido de polialquileno multinucleofílico como el óxido de polialquileno multielectrofílico son tetrafuncionalmente activados. El óxido de polialquileno multi-nucleofílico puede incluir dos o más grupos nucleofílicos, por ejemplo NH_2, -SH, -H, $-PH_2$ y/o $CO-NH-NH_2$. En algunos casos, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico incluye dos o más grupos amino primarios. En algunos casos, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico incluye dos o más grupos tiol. El óxido de polialquileno multi-nucleofílico puede ser polietilénglicol o un derivado del mismo. En algunos casos, el polietilénglicol incluye dos o más grupos nucleofílicos, los cuales pueden incluir un grupo amino primario y/o un grupo tiol. El óxido de polialquileno multi-electrofílico puede incluir dos o más grupos electrofílicos tales como $-CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, $-N=C=O$, $-SO_2CH=CH_2$, $-N(COCH)_2$, y/o $-S-S-(C_5H_4N)$. El óxido de polialquileno multi-electrofílico puede incluir dos o más grupos succinimidilo. El óxido de polialquileno multi-electrofílico puede incluir dos o más grupos maleimidilo. En algunos casos, el óxido de polialquileno multi-electrofílico puede ser un polietilénglicol o un derivado del mismo.

En algunos aspectos, la composición incluye un polisacárido o una proteína. El polisacárido puede ser un glicosaminoglicano, tal como ácido hialurónico, quitina, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina, sulfato C de condroitina, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina o un

derivado de los mismos. La proteína puede ser un colágeno o un derivado de los mismos. El óxido de polialquileno multi-nucleofílico o el óxido de polialquileno multi-electrofílico o tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico puede incluir un grupo de enlace. En algunos casos, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico puede proporcionarse a través de la fórmula: polimer-Q^1-X_m. El óxido de polialquileno multi-electrofílico puede proporcionarse a través de la fórmula: polimer-Q^2-Y_n. X puede ser un grupo electrofílico y Y puede ser un grupo nucleofílico, m y n cada uno pueden ser de 2 a 4, m+n puede ser ≤ 5, y cada uno de Q^1 y Q^2 pueden ser grupos de enlace tales como -O-$(CH_2)_{n'}$-, -S-, -$(CH_2)_{n'}$-, -NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-NH-$(CH_2)_{n'}$-, -O_2C-$(CH_2)_{n'}$, -O_2C-CR^1H, y/o -O-R^2-CO-NH. En algunos casos, n' puede ser de 1 a 10, R^1 puede ser -H, -CH_3, o -C_2H_5, R^2 puede ser -CH_2- o -CO-NH-CH_2CH_2-, y Q^1 y Q^2 pueden ser los mismos o diferentes o estar ausentes. En algunos aspectos Y puede ser -$CO_2N(COCH_2)_2$ o -$CO_2N(COCH_2)_2$. En algunos casos, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico o el óxido de polialquileno multi-nucleofílico, o tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico incluyen además un grupo biodegradable. El grupo biodegradable puede ser un láctido, glucólido, ϵ-caprolactona, poli(ácido α-hidroxi), poli(aminoácido) o poli(anhídrido). En algunos aspectos, el componente que forma

un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel biocompatible fragmentado que incluye gelatina y absorbe agua cuando se suministra a un sitio objetivo de tejido húmedo. El hidrogel puede ser incluir subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.01 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente y una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 5000%. En algunos casos, el hidrogel tiene un tiempo de degradación in vivo menor a un año. En algunos casos, el hidrogel es al menos parcialmente hidratado con un medio acuoso e incluye un agente activo, el cual puede incluir un agente de coagulación, tal como trombina.

En otro aspecto, las modalidades de la presente invención proporcionan un método para suministrar un agente activo a un paciente. El método puede incluir administrar a un sitio objetivo en el paciente, una cantidad de una composición tal como aquí se describe. En algunos aspectos, las modalidades incluyen un método para suministrar un agente sellado a un paciente. El método puede incluir administrar a un sitio objetivo de sangrado, una cantidad de composición tal como aquí se describe en una cantidad suficiente para inhibir el sangrado. En algunos aspectos, las modalidades incluyen un método para suministrar trombina a un paciente. El método puede incluir administrar a un sitio objetivo de sangrado una cantidad de una composición tal como aquí se describe en una cantidad

suficiente para inhibir el sangrado.

Aún en otro aspecto, las modalidades de la presente invención comprenden una composición que incluye un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico y un componente que forma un hidrogel. El óxido de polialquileno multi-nucleofílico puede incluir además al menos un grupo amino primario y al menos un grupo tiol. Bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico tiene la capacidad de reticulación substancialmente inmediata. Las modalidades comprenden composiciones en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico incluye dos o más grupos tiol y el óxido de polialquileno multi-electrofílico incluye dos o más grupos electrofílicos tales como un grupo succinimidilo y/o un grupo maleimidilo. Las modalidades también comprenden composiciones en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico incluye dos o más nucleofílico, tal como un grupo amino primario y/o grupos tiol. El óxido de polialquileno multi-electrofílico puede incluir dos o más grupos succinimidilo. En algunos casos, las modalidades comprenden composiciones que incluye un primer polietilénglicol que tiene dos o más grupos tiol, un segundo polietilénglicol que tiene dos o más grupos succinimidilo o grupos maleimidilo, y un componente que forma un hidrogel. La suma de los grupos tiol y los grupos succinimidilo o meleimidilo pueden ser al menos cinco, y bajo

condiciones que permiten la reacción, el primer polietilénglicol y el segundo polietilénglicol pueden tener la capacidad de reticulación substancialmente inmediata. En algunos casos, el primer polietilénglicol incluye cuatro grupos tiol, y el segundo polietilénglicol incluye cuatro grupos succinimidilo. En algunos casos, la composición incluye una proteína o un polisacárido. El polisacárido puede ser un glicosaminoglicano, tal como ácido hialurónico, quitina, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina, sulfato C de condroitina, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina o un derivado de los mismos. La proteína puede ser colágeno un derivado del mismo.

En otro aspecto, las modalidades de la presente invención incluyen un método para sellar un tracto de tejido. El método puede incluir llenar al menos parcialmente un tracto de tejido con una composición que incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción, y un componente que forma un hidrogel. El primer y segundo componentes reticulables pueden reticularse para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel puede tener la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios. En algunos casos, el hidrogel incluye subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm

cuando se hidratan completamente, que tienen una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y que se degradan en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días. En algunos casos, el primer componente reticulable incluye múltiples grupos nucleofílicos y el segundo polímero comprende múltiples grupos electrofílicos.

Aún en otro aspecto, las modalidades de la presente invención incluyen un método para inhibir el sangrado en un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente. El método puede incluir suministrar una composición al sitio objetivo en una cantidad suficiente para inhibir el sangrado, en donde la composición incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción, y un componente que forma un hidrogel. El primer y segundo componentes reticulables pueden reticularse para formar una matriz porosa que tiene intersticios y el componente que forma un hidrogel puede tener la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios. El hidrogel puede incluir subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, que tiene una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300% y que se

degradan en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días. El primer componente reticulable puede incluir múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable puede incluir múltiples grupos electrofílicos. En otro aspecto, las modalidades de la presente invención incluyen un método para suministrar una sustancia bioactiva a un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente. El método puede incluir suministrar una composición en combinación con la sustancia bioactiva al sitio objetivo, en donde la composición incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción, y un componente que forma un hidrogel. El primer y segundo componentes reticulables pueden reticularse para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel puede tener la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios. El hidrogel puede tener subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y pueden degradarse en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días. En algunos casos, el primer componente reticulable incluye

múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable incluye múltiples grupos electrofílicos. La substancia bioactiva puede ser un agente hemostático tal como trombina.

En otro aspecto, las modalidades de la presente invención incluyen un método para suministrar una composición expandible a un sitio objetivo en un tejido. El método puede incluir aplicar la composición al sitio objetivo, en donde la composición incluye un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable y se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción y un componente que forma un hidrogel. El primer y segundo componentes reticulables pueden reticularse para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel puede tener la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos alguno de los intersticios. El hidrogel puede incluir subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, que tienen una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y que se degradan en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días. La composición puede ser hidratada al menos en su expansión de equilibrio al momento de la aplicación al sitio objetivo, en donde se expande hasta un valor de expansión de equilibrio. En

algunos aspectos, el primer componente reticulable incluye múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable incluye múltiples grupos electrofílicos. En algunos aspectos, el sitio objetivo es un tejido que puede ser un músculo, piel, tejido epitelial, músculo liso, esquelético o cardiaco, tejido conectivo o de soporte, tejido nervioso, oftálmico y otro tejido de órganos de los sentidos, tejido vascular y cardiaco, órganos y tejidos gastrointestinales, pleura y otro tejido pulmonar, riñón, glándulas endócrinas, órganos reproductores femeninos y masculinos, tejido adiposo, hígado, páncreas, linfa, cartílagos, huesos, tejido oral y tejido mucosal y bazo y otros órganos abdominales. En algunos aspectos, el sitio objetivo incluye una región hueca dentro del tejido seleccionado tal como un trozo de tejido, tracto de tejido, espacio intravertebral o cavidad corporal. En algunos casos, el hidrogel tiene un grado de hidratación dentro del rango de 50% a 95% de la hidratación en la expansión de equilibrio. En algunos casos el hidrogel incluye un plastificante tal como polietilénglicol, sorbitol o glicerol. El plastificante puede estar presente en de 0.1% en peso hasta 30% en peso de la composición del componente de hidrogel. En algunos casos, el hidrogel incluye un hidrogel de proteína reticular. La proteína puede incluir gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, fibrogen, fibrina, caseína, fibronectina, elastina, queratina, laminina, y derivados y combinaciones de los

mismos. En algunos casos, el hidrogel incluye un polisacárido reticulado. El polisacárido puede incluir glicosaminoglicanos, derivados de almidón, derivados de celulosa, derivados de hemicelulosa, derivados de xilán, agarosa, alginato y quitosán y combinaciones de los mismos. En algunos casos, el hidrogel incluye un polímero no biológico reticulado. El polímero no biológico reticulado puede incluir poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, resinas de polivinilo, polilactida-glicólidos, polcaprolactonas, polioxietilenos, y combinaciones de los mismos. En algunos casos, el hidrogel incluye al menos dos componentes seleccionados de un grupo que incluye proteínas reticuladas, polisacáridos reticulados y polímeros no biológicos reticulados. El hidrogel puede incluir un polímero de hidrogel y un agente de reticulación de hidrogel. El polímero hidrogel y el agente de reticulación de hidrogel pueden haber sido reaccionados bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel. En algunos casos, el hidrogel incluye un polímero de hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante radiación de hidrogel bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel. En algunos casos, el hidrogel incluye un hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante la reacción de monómeros de hidrogel monoinsaturados y poliinsaturados bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel.

Aún en otro aspecto, las modalidades de la presente invención comprenden un método para formar una matriz de polímero sintético tridimensional. El método incluye proporcionar un primer componente reticulable que contiene m grupos nucleofílicos y un segundo componente reticulable que contiene n grupos electrofílicos. Los grupos electrofílicos reaccionan con los grupos nucleofílicos para formar enlaces covalentes entre ellos, m y n son cada uno mayores o iguales a dos, y m+n es mayor o igual a cinco. El método también incluye combinar el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable, agregar un componente que forma un hidrogel al primer componente reticulable y el segundo componente reticulable, y permitir que el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable queden reticulados uno con el otro para formar una matriz tridimensional. El método también puede incluir contactar una primera superficie de tejido y una segunda superficie de tejido con el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel. En algunos casos, la segunda superficie es una superficie de tejido nativo. En algunos casos, la segunda superficie es una superficie de tejido no nativo, tal como un implante sintético. El implante sintético puede ser una córnea de donante, un vaso sanguíneo artificial, una válvula de corazón, un órgano artificial, una prótesis de enlace, un lentículo implantable, un injerto vascular,

150

un stent o una combinación de stent/injerto. En algunos casos, el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable, y el componente que forma un hidrogel cada uno se aplican en forma pulverizada en la primera superficie de tejido. En algunos casos, el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel se aplican cada uno como un polvo en una formulación en polvo mezclada, combinada simple en la primera superficie de tejido. La formulación en polvo mezclada puede incluir una proteína y/o un polisacárido. La primera superficie de tejido puede estar en o dentro de un tejido duro o un tejido blando. La primera superficie de tejido puede incluir, estar rodeada o adyacente a un sitio quirúrgico. El método también puede incluir cerrar el sitio quirúrgico. En algunos casos, la formulación de polvo mezclado incluye colágeno. En algunos casos, la formulación de polvo mezclada incluye un agente biológicamente activo. En algunos aspectos, las modalidades de la presente invención comprenden una composición de polvo mezclada que incluye un primer componente reticulable en forma pulverizada que tiene múltiples grupos nucleofílicos, un segundo componente reticulable en forma pulverizada que tiene múltiples grupos electrofílicos y un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada. Bajo condiciones que permiten la reacción, el primer y segundo componente reticulable tiene la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

157

En un aspecto relacionado, el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada. El primer componente reticulable puede estar presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20 por ciento en peso de la composición de componente reticulable combinada. En algunos casos, el segundo componente reticulable puede presentarse en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20 por ciento en peso de la composición de componente reticulable combinada. Una proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable puede estar dentro del rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%. En forma relacionada, una proporción del primer componente reticulable al segundo componente reticulable puede ser de aproximadamente 50%. En algunos casos, una proporción en peso entre el primer y segundo componentes reticulables y el componente que forma un hidrogel puede estar dentro del rango de aproximadamente 28% hasta aproximadamente 42% p/p. En forma relacionada, una proporción en peso entre el primer y segundo componentes reticulables y el componente que forma un hidrogel puede estar dentro de un rango de aproximadamente 20% hasta aproximadamente 30% p/p. En algunos aspectos, el primer componente reticulable puede estar

presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20 por ciento en peso de la composición de componente reticulable combinada. En forma relacionada el segundo componente reticulable puede estar presente en una concentración dentro de un rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20 por ciento en peso de la composición de componente reticulable combinada. Una proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable puede estar dentro de un rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%. En forma similar, una proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable puede ser de aproximadamente 50%.

En otro aspecto, las modalidades de la presente invención proporcionan equipos de composición de matriz de sellado. Un equipo puede incluir, por ejemplo, un contenedor y una composición en polvo mezclada colocada dentro del contenedor. La composición puede incluir un primer componente reticulable que tiene múltiples grupos nucleofílicos y un segundo componente reticulable que tiene múltiples grupos electrofílicos. El primer componente reticulable, el segundo componente reticulable o ambos, pueden estar en forma pulverizada. El equipo también puede incluir un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada. Bajo condiciones que permiten la reacción, el primer y segundo componentes

153

reticulables pueden tener la capacidad de reticulación substancialmente inmediata. En algunos casos, el contenedor incluye un barril de jeringa y un émbolo de jeringa. Un equipo también puede incluir instrucciones escritas para aplicar la composición en polvo mezclada a un sitio objetivo de sangrado en un paciente. En algunos casos, el polvo mezclado incluye un agente activo. El agente activo puede incluir trombina. En otro aspecto, el equipo puede incluir una esponja de colágeno u otro soporte adecuado, y una composición de polvo mezclada fijada con una superficie de la esponja o soporte. La composición puede incluir un primer componente reticulable que tiene múltiples grupos nucleofílicos y un segundo componente reticulable que tiene múltiples grupos electrofílicos. El primer componente reticulable, el segundo componente reticulable, o ambos, pueden estar en forma pulverizada. El equipo también puede incluir un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada. Bajo condiciones que permiten la reacción, el primer y segundo componentes reticulables pueden tener la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

Para una comprensión total de la naturaleza y ventajas de la presente invención, se deberá hacer referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención incluye pero no se limita a:

154

Una composición que comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y en donde el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios.

La composición del párrafo 31, en donde el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

La composición del párrafo 31, en donde el primer componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico que tiene m grupos nucleofílicos, y el segundo componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-electrofílico que tiene n grupos electrofílicos, en donde m y n son cada uno mayores o iguales a dos, y en donde m+n es mayor o igual a cinco.

La composición del párrafo 33, en donde n es dos, y en donde m es mayor o igual a tres.

La composición del párrafo 34, en donde el óxido de

polialquileno multi-nucleofílico es tetrafuncionalmente activado.

La composición del párrafo 33, en donde m es dos, y en donde n es mayor o igual a tres.

La composición del párrafo 36, en donde el óxido de polialquileno multi-electrofílico es tetrafuncionalmente activado.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico son tetrafuncionalmente activados.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en NH_2, -SH, -H, $-PH_2$, y $-CO-NH-NH_2$.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos amino primarios.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos tiol.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es polietilénglicol o un derivado del mismo.

La composición del párrafo 42, en donde el polietilénglicol comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino primario y un grupo tiol.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos electrofílicos seleccionados del grupo que consiste en $CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, -N=C-O, $-SO_2CH=CH_2$, $N(COCH)_2$, y - S-S-(C_5H_4N).

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos succinimidilo.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende dos o más grupos maleimidilo.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-electrofílico es un polietilénglicol o un derivado del mismo.

La composición del párrafo 33, en donde comprende además un polisacárido o una proteína.

La composición del párrafo 33, en donde comprende además un polisacárido, en donde el polisacárido es un glicosaminoglicano.

La composición del párrafo 49, en donde el glicosaminoglicano es seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, quitina, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina, sulfato C de condroitina, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina y derivados de los mismos.

La composición del párrafo 33, en donde comprende

157

además una proteína, en donde la proteína es colágeno o un derivado del mismo.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico o el óxido de polialquileno multi-electrofílico, o tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico, comprenden en forma adicional un grupo de enlace.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es proporcionado por la fórmula:

polimer-Q^1-X_m

y en el óxido de polialquileno multi-electrofílico es proporcionado por la fórmula:

polimer-Q^2-Y_n

en donde X es un grupo electrofílico y Y es un grupo nucleofílico;

en donde m y n son cada uno 2 a 4;

en donde $m+n \leq 5$;

en donde cada uno de Q^1 y Q^2 son grupos de enlace seleccionados del grupo que consiste en $-O-(CH_2)_{n'}-$, -S-, $-(CH_2)_{n'}-$, $-NH-(CH_2)_{n'}-$, $-O_2C-NH-(CH_2)_{n'}-$, $-O_2C-(CH_2)_{n'}$, $-O_2C-CR^1H$, y/o $-O-R^2-CO-NH$;

en donde n'=1 a 10;

en donde R^1 =-H, $-CH_3$, o $-C_2H_5$;

en donde R^2=$-CH_2-$ o $-CO-NH-CH_2CH_2-$; y

en donde Q^1 y Q^2 pueden ser los mismos o diferentes o

pueden estar ausentes.

La composición del párrafo 53, en donde Y se proporciona a través de la fórmula:

$-CO_2N(COCH_2)_2$.

La composición del párrafo 53, en donde Y se proporciona a través de la fórmula:

$N(COCH_2)_2$.

La composición del párrafo 33, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico o el óxido de polialquileno multi-electrofílico o tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprenden además un grupo biodegradable.

La composición del párrafo 56, en donde el grupo biodegradable se selecciona del grupo que consiste en láctido, glicólido, ϵ-caprolactona, poli(ácido α-hidroxi), poli (aminoácido) y poli(anhídrido).

La composición del párrafo 31, en donde el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel biocompatible hidratado que comprende gelatina y absorberá agua cuando se suministre a un sitio objetivo de tejido húmedo, y en donde el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.01 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente y tiene una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta

159

aproximadamente 5000%.

La composición del párrafo 58, en donde el hidrogel tiene un tiempo de degradación in vivo menor a un año.

La composición con cualesquiera de los párrafos 58 y 59, en donde el hidrogel es al menos parcialmente hidratado con un medio acuoso que comprende un agente activo.

La composición del párrafo 60, en donde el agente activo es un agente de coagulación.

La composición del párrafo 61, en donde el agente de coagulación es trombina.

Un método para suministrar un agente activo a un paciente, en donde el método comprende administrar a un sitio objetivo en el paciente una cantidad de la composición del párrafo 60.

Un método para suministrar un agente de sellado a un paciente, en donde el método comprende administrar a un sitio objetivo de sangrado, una cantidad de la composición del párrafo 31, suficiente para inhibir el sangrado.

Un método para suministrar trombina a un paciente, en donde el método comprende administrar a un sitio objetivo de sangrado una cantidad de la composición del párrafo 62, suficiente para inhibir el sangrado.

Una composición que comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico, y un componente que forma un hidrogel, en donde el óxido de

polialquileno multi-nucleofílico comprende además al menos un grupo amino primario y al menos un grupo tiol, y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

Una composición que comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico y un componente que forma un hidrogel, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos tiol y el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos electrofílicos seleccionados del grupo que consiste en grupos succinimidilo y grupos maleimidilo, y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

Una composición que comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico y un componente que forma un hidrogel, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en grupos amino primarios y grupos tiol, y el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos succinimidilo y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido

de polialquileno multi-electrofílico tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

Una composición que comprende un primer polietilénglicol que comprende dos o más grupos tiol y un segundo polietilénglicol que comprende dos o más grupos succinimidilo o grupos maleimidilo, y un componente que forma un hidrogel, en donde la suma de los grupos tiol y los grupos succinimidilo y maleimidilo es al menos cinco, y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primer polietilénglicol y el segundo polietilénglicol tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

La composición del párrafo 61, en donde el primer polietilénglicol comprende además cuatro grupos tiol y el segundo polietilénglicol comprende además cuatro grupos succinimidilo.

La composición del párrafo 69, en donde comprende además una proteína o un polisacárido.

La composición del párrafo 69, en donde comprende además un polisacárido, en donde el polisacárido es un glicosaminoglicano.

La composición del párrafo 72, en donde el glicosaminoglicano es seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, quitina, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina, sulfato C de condroitina, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina y derivados de los mismos.

La composición del párrafo 69, en donde comprende además una proteína, en donde la proteína es colágeno o un derivado del mismo.

Un método para sellar un tracto de tejido, en donde el método comprende llenar al menos parcialmente un tracto de tejido con una composición que comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos alguno de los intersticios, en donde el hidrogel comprende subunidades que tiene tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días.

El método de párrafo 75, en donde el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo polímero comprende múltiples grupos electrofílicos.

163

Un método para inhibir el sangrado en un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente, en donde el método comprende suministrar una composición al sitio objetivo en una cantidad suficiente para inhibir el sangrado, en donde la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios, en donde el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días.

El método del párrafo 77, en donde el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

Un método para suministrar una sustancia bioactiva a un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente, en donde el método comprende suministrar una composición en combinación con la sustancia bioactiva al sitio objetivo, en donde la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios, en donde el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días.

El método del párrafo 79, en donde el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

El método del párrafo 79, en donde la sustancia bioactiva es un agente hemostático.

El método del párrafo 79, en donde la sustancia bioactiva es trombina.

Un método para suministrar una composición expandible a un sitio objetivo en el tejido, en donde el método comprende aplicar la composición al sitio objetivo, en donde la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel; y

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios, en donde el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300% y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días, siendo hidratada la composición en menos de su expansión de

166

equilibrio al momento de la aplicación al sitio objetivo, en donde se expande hasta un valor de expansión de equilibrio.

El método del párrafo 83, en donde el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

El método del párrafo 83, en donde el sitio objetivo es un tejido seleccionado del grupo que consiste en músculo, piel, tejido epitelial, tejido conectivo o de soporte, tejido de nervios, tejido oftálmico o de otros órganos de los sentidos, tejido vascular y cardiaco, órganos y tejido gastrointestinal, pleura y otro tejido pulmonar, riñón, glándulas endócrinas, órganos reproductores femeninos y masculinos, tejido adiposo, hígado, páncreas, linfa, cartílago, huesos, tejido oral y tejido mucosal y bazo y otros órganos abdominales.

El método del párrafo 85, en donde el sitio objetivo es una región hueca dentro del tejido seleccionado.

El método del párrafo 86, en donde la región hueca es seleccionada del grupo que consiste en trozos de tejido, tractos de tejido, espacios intravertebrales y cavidades corporales.

El método del párrafo 83, en donde el hidrogel tiene un grado de hidratación dentro del rango de 50% a 95% de la hidratación en la expansión en equilibrio.

El método del párrafo 83, en donde el hidrogel comprende un plastificante.

El método del párrafo 89, en donde el plastificador es seleccionado del grupo que consiste en polietilénglicol, sorbitol y glicerol.

El método del párrafo 89, en donde el plastificante está presente de 0.1% en peso a 30% en peso de la composición del componente de hidrogel.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende un hidrogel de proteína reticulado.

El método del párrafo 92, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, fibrogen, fibrina, caseína, fibronectina, elastina, queratina, laminina y derivados y combinaciones de los mismos.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende un polisacárido reticulado.

El método del párrafo 94, en donde el polisacárido es seleccionado del grupo que consiste en glicosaminoglicanos, derivados de almidón, derivados de celulosa, derivados de hemicelulosa, xilan, agarosa, alginato y quitosán y combinaciones de los mismos.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende un polímero no biológico reticulado.

El método del párrafo 96, en donde el polímero no

168

biológico reticulado es seleccionado del grupo que consiste en poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, resinas de polivinil, polilactida-glicólidos, policaprolactonas, polioxietlenos, y combinaciones de los mismos.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende al menos dos componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas reticuladas, polisacáridos reticulados, y polímeros no biológicos reticulados.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende un polímero de hidrogel y un agente de reticulación de hidrogel en donde el polímero de hidrogel y el agente de reticulación de hidrogel se han hecho reaccionar bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende un polímero de hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante radiación del hidrogel bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel.

El método con cualesquiera de los párrafos del 75 al 91, en donde el hidrogel comprende un hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante la reacción de monómeros de hidrogel monoinsaturados y poliinsaturados bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel.

169

Un método para formar una matriz de polímero sintética tridimensional que comprende los pasos de:

proporcionar un primer componente reticulable que contiene m grupos nucleofílicos y un segundo componente reticulable que contiene n grupos electrofílicos, en donde los grupos electrofílicos reaccionan con los grupos nucleofílicos para formar enlaces covalentes entre ellos, en donde m y n cada uno son mayores o iguales a dos, y en donde m+n es mayor o igual a cinco;

combinar el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable;

agregar un componente que forma un hidrogel al primer componente reticulable y al segundo componente reticulable;

permitir que el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable queden reticulados uno al otro para formar una matriz tridimensional.

El método del párrafo 102, que comprende además contactar una primera superficie de tejido y una segunda superficie con el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel.

El método del párrafo 103, en donde la segunda superficie es una superficie de tejido nativo.

El método del párrafo 103, en donde la segunda superficie es una superficie de tejido no nativo.

El método del párrafo 105, en donde la superficie de tejido

170

no nativo es un implante sintético.

El método del párrafo 106, en donde el implante sintético es seleccionado del grupo que consiste en una córnea de donante, un vaso sanguíneo artificial, una válvula de corazón, un órgano artificial, una prótesis de unión, un lentículo implantable, un injerto vascular, un stent, y una combinación de stent/injerto.

El método del párrafo 102, en donde el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel cada uno se aplica en forma pulverizada en la primera superficie de tejido.

El método del párrafo 102, en donde el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel se aplican cada uno como un polvo en una formulación en polvo mezclada combinada simple en la primera superficie de tejido.

El método del párrafo 109, en donde la formulación de polvo mezclada comprende además una proteína o un polisacárido.

El método del párrafo 102, en donde la primera superficie de tejido está en o dentro de un tejido duro o un tejido blando.

El método del párrafo 102, en donde la primera superficie de tejido comprende, rodea o está adyacente a un sitio quirúrgico, en donde el método comprende además el paso de cerrar el sitio quirúrgico.

El método del párrafo 102, en donde la formulación en polvo mezclada comprende además colágeno.

El método del párrafo 102, en donde la formulación en polvo mezclada comprende además un agente biológicamente activo.

Una composición de polvo mezclada que comprende:

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, en donde el primer componente reticulable está en forma pulverizada;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, en donde el segundo componente reticulable está en forma pulverizada; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primer y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

La composición en polvo mezclada del párrafo 115, en donde el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el primer componente reticulable está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta 20% en peso de la composición de componente reticulable.

La composición en polvo mezclada del párrafo 115, en

172

donde el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el segundo componente reticulable está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable combinada.

La composición en polvo mezclada del párrafo 115, en donde la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable está dentro del rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%.

La composición en polvo mezclada del párrafo 115, en donde la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable es de aproximadamente 50%.

La composición en polvo mezclada del párrafo 115, en donde la proporción en peso entre el primero y segundo componentes reticulables y el componente que forma un hidrogel está dentro de un rango de aproximadamente 28% hasta aproximadamente 42% p/p.

La composición en polvo mezclada del párrafo 115, en donde la proporción en peso entre el primero y segundo componentes reticulables y el componente que forma un hidrogel está dentro de un rango de aproximadamente 20% hasta aproximadamente 30% p/p.

La composición en polvo mezclada del párrafo 121, en

donde el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el primer componente reticulable está presente en una concentración dentro de un rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable combinada.

La composición en polvo mezclada del párrafo 121, en donde el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el segundo componente reticulable está presente en una concentración dentro de un rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable combinada.

La composición en polvo mezclada del párrafo 121, en donde la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable está dentro del rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%.

La composición en polvo mezclada del párrafo 121, en donde la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable es de aproximadamente 50%.

Un equipo que comprende:

un contenedor; y

una composición de polvo mezclada colocada dentro del contenedor, en donde la composición comprende:

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, en donde el primer componente reticulable está en forma pulverizada;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, en donde el segundo componente reticulable está en forma pulverizada; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

El equipo del párrafo 126, en donde el contenedor comprende un barril de jeringa y un émbolo de jeringa.

El equipo del párrafo 126, que comprende además instrucciones escritas para aplicar la composición de polvo mezclada a un sitio objetivo de sangrado en un paciente.

El equipo del párrafo 126, en donde el polvo mezclado comprende además un agente activo.

El equipo del párrafo 129, en donde el agente activo comprende trombina.

Un equipo que comprende:

una esponja de colágeno; y

una composición de polvo mezclada fijada con una superficie de la esponja, en donde la composición de polvo mezclada comprende:

175

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, en donde el primer componente reticulable está en forma pulverizada;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, en donde el segundo componente reticulable está en forma pulverizada; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

Una composición para la fabricación de un medicamento, en donde la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se retícula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primero y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y en donde el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos alguno de los intersticios.

La composición del párrafo 132, en donde el primer componente reticulable comprende múltiples grupos

nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

La composición del párrafo 133, en donde el primer componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico que tiene m grupos nucleofílicos, y el segundo componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-electrofílico que tiene n grupos electrofílicos, en donde m y n cada uno son mayores o igual a dos, y en donde m+n es mayor o igual a cinco.

La composición del párrafo 134, en donde n es dos, y en donde m es mayor o igual a tres.

La composición del párrafo 135, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es tetrafuncionalmente activado.

La composición del párrafo 134, en donde m es dos, y en donde n es mayor o igual a tres.

La composición del párrafo 137, en donde el óxido de polialquileno multi-electrofílico es tetrafuncionalmente activado.

La composición del párrafo 134, en donde tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico son tetrafuncionalmente activados.

La composición del párrafo 134, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en NH_2, -SH, -H, $-PH_2$ y $-CO-NH-NH_2$.

La composición del párrafo 134, en donde el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos amino primarios.

Una composición que comprende:

una esponja de colágeno que comprende fibras de colágeno nativas; y

una composición de polvo mezclada, fijada con una superficie de la esponja, en donde la composición de polvo mezclada comprende:

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, en donde el primer componente reticulable está en forma pulverizada y comprende aproximadamente 10% del polvo mezclado;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, en donde el segundo componente reticulable está en forma pulverizada y comprende aproximadamente 10% del polvo mezclado; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada, que comprende aproximadamente 80% del polvo mezclado;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para

formar un hidrogel para llenar al menos alguno de los intersticios.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1, ilustra un primer componente reticulable de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención.

La figura 2, ilustra un segundo componente reticulable de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención.

La figura 3, muestra la formación de una composición de matriz reticulada de un polímero hidrofílico de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención.

La figura 4, muestra la formación de una composición de matriz reticulada de un polímero hidrofóbico de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención.

La figura 5, ilustra una subunidad de componente que forma un hidrogel de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención.

La figura 6, ilustra la correlación entre el porcentaje de expansión y el porcentaje de sólidos de un gel polimérico reticulado fragmentado, útil como un componente que forma un hidrogel en una composición de sellado de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención.

Las figuras 7A a 7E, ilustran la aplicación de una composición de matriz de sellado para tratar una punción de arteria esplénica de acuerdo con modalidades de la presente invención.

Las figuras 8A a 8E, ilustran la aplicación de una composición de matriz de sellado para tratar una resección hepática de acuerdo con modalidades de la presente invención.

La figura 9, ilustra el procesamiento y empaque de una composición de matriz de sellado de acuerdo con modalidades de la presente invención.

La figura 10, ilustra el procesamiento y empaque de una composición de matriz de sellado de acuerdo con modalidades de la presente invención.

La figura 11, ilustra el efecto de la concentración PEG en la fuerza de gel, de acuerdo con modalidades de la presente invención.

La figura 12, ilustra el efecto de la concentración PEG en la proporción de expansión, de acuerdo con modalidades de la presente invención.

La figura 13, ilustra el efecto de la concentración PEG en la proporción de expansión, de acuerdo con modalidades de la presente invención.

La figura 14, ilustra el efecto de la concentración PEG en la proporción de expansión, de acuerdo con modalidades de la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

De acuerdo con algunas modalidades, la presente invención proporciona composiciones de matriz de sellado secas para lograr la hemostasis o la contención de fluidos en un

contexto *in vivo*, sellando una brecha o defecto de tejido. Las composiciones de algunas modalidades de la presente invención comprenden primeros y segundos componentes reticulables y al menos un componente que forma un hidrogel, en una composición seca adecuada para aplicar a un tejido de un vertebrado para facilitar la contención de fluidos. El primero y segundo componentes en las composiciones de la presente invención, reaccionan bajo condiciones *in vivo* para formar una matriz reticulada, en tanto el componente que forma un hidrogel absorbe rápidamente el fluido biológico que viene de la brecha del tejido, así como genera el refuerzo de la barrera de matriz de sellado física resultante formada como la reticulación del primero y segundo componentes. Tal como se describe en la presente solicitud, las "composiciones de matriz de sellado" pueden referirse a composiciones de la presente invención antes de aplicarse al sitio de tejido *in vivo*, y la "barrera de matriz de sellado" puede referirse a la barrera de matriz resultante después de que las composiciones de la presente invención contactan los fluidos biológicos y el primero y segundo componentes de reticulación para formar una matriz reticulada porosa que contiene el hidrogel. Las composiciones de matriz de sellado pueden producirse en una variedad de formatos, incluyendo polvos, pastas, almohadillas y similares. Las modalidades de pastas incluyen muestras en polvo de la composición de matriz de sellado que han sido calentadas u

181

horneadas para formar un cuerpo agregado. Las modalidades de almohadilla incluyen muestras de polvo de composición de matriz de sellado que han sido colocadas sobre una esponja tal como una esponja de colágeno u otro soporte, que posteriormente se hornea para crear un polvo solidificado que se fusiona a la esponja o soporte.

Aunque la presente invención puede utilizarse para contener fluidos biológicos sin sangre (por ejemplo, linfa o fluido espinal), la matriz de sellado formada a través de las composiciones de algunas modalidades de la presente invención, también puede ser denominada una "matriz hemostática", ya que este es un uso primario aquí descrito.

Además de proporcionar una rápida hemostasis y una barrera con alta adherencia a los tejidos circundantes, la matriz de sellado de algunas modalidades de la presente invención tiene varias ventajas con respecto a los materiales previamente descritos utilizados para lograr la hemostasis. Primero, la matriz de sellado de algunas modalidades de la presente invención pueden utilizarse bajo condiciones en donde la brecha del tejido está muy húmeda (por ejemplo, fluyendo o chorreando rápidamente los sangrados arteriales, tal como trauma abrasivo o agudo a un órgano interno). En comparación, muchas composiciones actualmente comercializadas para hemostasis, requieren un sitio relativamente seco para la adherencia adecuada de la composición y el mantenimiento de

la hemostasis. Por ejemplo, en algunos casos, ciertas mezclas PEG pueden colocarse en un sitio de sangrado rápidamente, sin embargo es probable que puedan ser deslavadas. En forma similar, en algunos casos ciertas composiciones de gelatina pueden hidratarse en un sitio de sangrado rápidamente, sin embargo es probable que puedan tener dificultad de permanecer en el sitio. De manera conveniente, se ha descubierto que las preparaciones que incluyen un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable, y un componente que forma un hidrogel pueden proporcionar un material que, en condiciones que permiten la reacción, permanece inmovilizado incluso cuando el sangrado substancial forma un material tipo coágulo mecánicamente estable para cortar el sangrado. Segundo, la matriz de sellado de algunas modalidades de la presente invención funciona sellando físicamente la brecha del tejido, sin depender de cualquier capacidad de coagulación endógena del vertebrado. Por lo tanto, la matriz de sellado puede utilizarse en vertebrados con la concentración de fibrinógeno en su sangre, o incluso con substitutos de sangre que no contienen fibrinógeno. Por ejemplo, cuando el primero y segundo componentes reticulables se combinan con un componente que forma un hidrogel y se aplican a una superficie de sangrado, puede ocurrir una interacción sinérgica entre los componentes reticulables y el componente que forma el hidrogel. De acuerdo con algunas modalidades, el primero y

183

segundo componentes reticulables pueden, en la presencia del componente que forma un hidrogel, reaccionar y reticularse en el sitio objetivo de sangrado para formar una estructura relativamente rígida. En forma relacionada, el componente que forma el hidrogel puede llenarse en la estructura relativamente rígida y transmitir la formación de un sello físico.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, las composiciones de matriz de sellado pueden prepararse mezclando un primer componente reticulable con un segundo componente reticulable y un componente que forma un hidrogel bajo condiciones en las cuales el primero y segundo componentes reticulables no se reticulan (por ejemplo, carecen de humedad, pH adecuado, temperatura, etc.). Al momento del contacto con el fluido biológico, o en otras condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel se hidrata para formar un hidrogel que llena al menos alguno de los intersticios. Opcionalmente, los componentes reticulables también pueden reticularse con el componente que forma un hidrogel y/o tejidos circundantes.

I. Componentes Reticulables de Matriz de Sellado

Con frecuencia, el primer componente reticulable contiene dos o más grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable contiene dos o más grupos electrofílicos con la

capacidad de enlace covalente con los grupos nucleofílicos en el primer componente reticulable. El primero y segundo componentes pueden reticularse para formar una matriz porosa. El primero y segundo componentes de ejemplo y las matrices porosas se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,874,500; 6,166,130; 6,312,725; 6,328,229 y 6,458,889; cuyos contenidos están incorporados a la presente invención como referencia.

El primero y segundo componentes son seleccionados normalmente para ser no inmunogénicos, y por lo tanto, pueden no requerir una "prueba en la piel" antes de comenzar el tratamiento. Además, estos componentes y el componente que forma un hidrogel pueden ser seleccionados para resistir la disociación enzimática mediante metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, colagenasa) para proporcionar una persistencia *in vivo* a largo plazo mayor a las composiciones de colágeno normalmente disponibles. Como alternativa, el primero y segundo componentes y los componentes que forman un hidrogel pueden seleccionarse para ser eliminados o reabsorbidos durante la curación de heridas con el objeto de evitar la formación de tejido fibroso alrededor de la matriz de sellado *in vivo*.

En una modalidad, el primer componente puede ser un polímero sintético que contenga múltiples grupos nucleofílicos (representados más adelante como "X") que pueden reaccionar

con un segundo componente de polímero sintético que contiene múltiples grupos electrofílicos (representados más adelante como "Y"), obteniendo como resultado una red de polímero enlazada en forma covalente, tal como sigue:

polímero-X_m + polímero-Y_n → polímero-Z-polímero

en donde

$m \geq 2$, $n \geq 2$ y $m + n \geq 5$;

X = $-NH_2$, -SH, -OH, $-PH_2$, $-CO-NH-NH_2$, etc., y pueden ser los mismos o diferentes;

Y = $-CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, -CHO, $-CHOCH_2$, -N=C=O, SO_2 $CH=CH_2$, $-N(COCH)_2$), $-S-S-(C_5H_4N)$, etc., y pueden ser los mismos o diferentes; y

Z = grupo funcional que resulta de la unión de un grupo nucleofílico (X) y un grupo electrofílico (Y).

Tal como se observó anteriormente, X y Y pueden ser los mismos o diferentes, por ejemplo, el primer componente puede tener dos diferentes grupos nucleofílicos y/o el segundo componente puede tener dos diferentes grupos electrofílicos. Un primer componente de polímero o primer componente reticulable de ejemplo se ilustra en la **figura 1**. Un segundo componente de polímero o segundo componente reticulable se ilustran en la **figura 2**.

El esqueleto del primero y segundo componentes de polímero puede ser un óxido de alquileno, particularmente, óxido de etileno, óxido de propileno y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de óxidos de alquileno difuncionales pueden representarse mediante:

X-polímero-X Y-polímero-Y

en donde X y Y son tal como se definió anteriormente, y el término "polímero" representa $-(CH_2CH_2O)_n-$ o $-(CH(CH_3)CH_2O)_n-$ o $-(CH_2CH_2O)_n-(CH(CH_3)CH_2O)_n-$.

El grupo funcional X ó Y se acopla comúnmente al esqueleto de polímero a través de un grupo de enlace (representado más adelante como "Q"), muchos de los cuales son conocidos o posibles. Aunque los componentes de la presente invención tienen dos o más grupos funcionales, los ejemplos que se encuentran más adelante muestran únicamente un grupo funcional y la reticulación resultante por simplicidad. Existen muchas formas de preparar los diversos polímeros funcionalizados, alguno de los cuales se describen a continuación:

polímero-Q^1-X + polímero-Q^2-Y $\rightarrow$ polímero-Q^1-Z-Q^2-polímero

en donde Q =	estructura completa =
$-O-(CH_2)_n-$	polímero-O-$(CH_2)_n$-X (o Y)
$-S-(CH_2)_n-$	polímero-S-$(CH_2)_n$-X (o Y)
$-NH-(CH_2)_n-$	polímero-NH-$(CH_2)_n$-X (o Y)
$-O_2C-NH-(CH_2)_n-$	polímero-O O_2C-NH-$(CH_2)_n$-X (o Y)
$-O_2C-(CH_2)_n-$	polímero-O_2C-$(CH_2)_n$-X (o Y)
$-O_2C-CR^1H-$	polímero-O_2C-CRH-X (o Y)
$-O-R^2-CO-NH-$	polímero-O-R-CO-NH-X (o Y)

en donde

n = 1-10 en cada caso;

R^1 = H, CH_3, C_2H_5, . . . C_pH_{2p+1};

R^2 = CH_2, CO-NH-CH_2CH_2.

187

Q^1 y Q^2 pueden ser los mismos o diferentes.

Por ejemplo, cuando $Q^2 = OCH_2CH_2$ (no existe Q_1 en este caso); Y = $-CO_2N(COCH_2)_2$; y X = $-NH_2$, -SH, o -OH, las reacciones y los grupos Z resultantes pueden ser como se indica a continuación:

polímero-NH_2 + polímero-$OCH_2CH_2CO_2$-$N(COCH_2)_2$ → -NH-OCH_2CH_2CO-polímero (amida)

polímero-SH + polímero-$OCH_2CH_2CO_2$-$N(COCH_2)_2$ → -S-OCH_2CH_2CO-polímero (tioéster)

polímero-OH + polímero-$OCH_2CH_2CO_2$-$N(COCH_2)_2$ → -O-OCH_2CH_2CO-polímero (éster)

Se puede insertar un grupo adicional, representado más adelante como "D", entre el polímero y el grupo de enlace para incrementar la degradación de la composición de polímero reticulada *in vivo*, por ejemplo, para utilizarse en aplicaciones de suministro de fármacos:

polímero-D-Q-X + polímero-D-Q-Y → polímero-D-Q-Z-Q-D-polímero-

Algunos grupos "D" biodegradables útiles incluyen, láctido, glucólido, ε-caprolactona, poli(ácido α-hidroxi), poli(aminoácidos), poli(anhídrido), y varios di-o tri-péptidos.

A. Primero y Segundo Componentes con Esqueletos de Polímero

Tal como se observó anteriormente, con el objeto de preparar las composiciones de la presente invención, es útil

proporcionar un primer componente de polímero que contiene dos o más grupos nucleofílicos, tal como grupos amino o grupos tiol primarios, y un segundo componente de polímero que contiene dos o más grupos electrofílicos con la capacidad de enlace covalente con los grupos nucleofílicos en el primer componente de polímero. El primero y segundo componentes de polímero pueden ser sintéticos.

Tal como se utiliza con respecto al primero y segundo componentes de polímero, el término "polímero" se refiere, entre otras cosas a polialquilos; di-, tri-, oligo- y poli-aminoácidos; y tri-, oligo-, o polisacáridos.

Tal como se utiliza con respecto al primero y segundo componentes de polímero, el término "polímero sintético" comprende polímeros que no ocurren naturalmente y que son producidos mediante síntesis química. Por lo tanto, las proteínas que ocurren naturalmente, tal como colágeno y polisacáridos que ocurren naturalmente, tal como ácido hialurónico pueden ser excluidos. El colágeno sintético y el ácido hialurónico sintético, y sus derivados, están incluidos. Los polímeros sintéticos que contienen ya sea grupos nucleofílicos o electrofílicos comprenden "polímeros sintéticos multifuncionalmente activados". El término "multifuncionalmente activado" (o simplemente, "activado") puede referirse a polímeros sintéticos los cuales tienen, o han sido químicamente modificados para tener, dos o más grupos nucleofílicos o

electrofílicos los cuales tienen la capacidad de reaccionar entre si (por ejemplo, los grupos nucleofílicos reaccionan con los grupos electrofílicos) para formar enlaces covalentes. Los tipos de polímeros sintéticos multifuncionalmente activados incluyen polímeros di-funcionalmente activados tetra-funcionalmente activados y ramificados-estrella.

Los polímeros sintéticos multifuncionalmente activados para utilizarse en la presente invención con frecuencia contienen al menos dos, o al menos tres, grupos funcionales con el objeto de formar una red reticulada tridimensional con polímeros sintéticos que contienen múltiples grupos nucleofílicos (por ejemplo, polímeros multi-nucleofílicos). En otras palabras, normalmente son al menos di-funcionalmente activados, tri-funcionalmente o tetra-funcionalmente activados. Si el primer polímero sintético es un polímero sintético di-funcionalmente activado, el segundo polímero sintético contiene normalmente tres o más grupos funcionales con el objeto de obtener una red reticulada tridimensional. Tanto el primero como el segundo componente de polímero puede contener al menos tres grupos funcionales.

B. Primer Componente de Polímero

El primer componente de polímero que contiene grupos nucleofílicos múltiples también son referidos en forma genérica en la presente invención como "polímeros multi-nucleofílicos". Para utilizarse en la presente invención, los polímeros multi-

190

nucleofílicos con frecuencia contienen al menos dos, o al menos tres, grupos nucleofílicos. Si se utiliza un polímero sintético que contiene únicamente dos grupos nucleofílicos, un polímero sintético que contiene tres o más grupos electrofílicos con frecuencia será utilizado con el objeto de obtener una red reticulada tridimensional.

Los polímeros multi-nucleofílicos para utilizarse en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen polímeros sintéticos que contienen, o han sido modificados para contener, múltiples grupos nucleofílicos tales como grupos amino y grupos tiol primarios. Dichos polímeros multi-nucleofílicos pueden incluir: (i) polipéptidos sintéticos que han sido sintetizados para contener dos o más grupos amino o grupos tiol primarios; y (ii) polietilénglicoles que han sido modificados para contener dos o más grupos amino o grupos tiol primarios. En general, la reacción de un grupo tiol con un grupo electrofílico tiende a proceder más lentamente que la reacción de un grupo amino primario con un grupo electrofílico.

Los polipéptidos multi-nucleofílicos pueden ser polipéptidos sintéticos que han sido sintetizados para incorporar aminoácidos que contienen grupos amino primarios (tal como lisina) y/o aminoácidos que contienen grupos tiol (tal como cisteína). Por ejemplo, el primer componente de polímero puede ser una dilisina, trilisina, cuatralisina, pentalisina o una dicisteína, tricisteína, cuatricisteína, pentacisteína u

oligopéptidos o polipéptidos que comprenden dos o más lisinas o cisteínas y otros aminoácidos (por ejemplo, glicina, alanina), preferentemente, aminoácidos no hidrofóbicos. La poli(lisina), un polímero producido en forma sintética de la lisina de aminoácido (145 MW), con frecuencia es utilizada. Las poli(lisina)s han sido preparadas para tener en cualquier lugar de 6 hasta aproximadamente 4,000 grupos amino primarios, que corresponden a pesos moleculares de aproximadamente 870 hasta aproximadamente 580,000. Las poli(lisina)s de diversos pesos moleculares están comercialmente disponibles en Peninsula Laboratories, Inc. (Belmont, California).

El polietilénglicol puede ser químicamente modificado para contener múltiples grupos amino o tiol primarios de acuerdo con los métodos que se establecen, por ejemplo, en el Capítulo 22 de la publicación Poli(etilénGlicol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. Milton Harris, ed., Plenum Press, N.Y. (1992). Los polietilénglicoles que han sido modificados para contener dos o más grupos amino primarios son referidos en la presente invención como "PEGs multi-amino". Los polietilénglicoles que han sido modificados para contener dos o más grupos tiol son referidos en la presente invención como "PEGs multi-tiol". Tal como se utiliza en la presente invención, el término "polietilénglicol(s)" incluye polietilénglicol(s) modificados o derivados.

Varias formas de un PEG multi-amino está comercialmente

disponible en Shearwater Polymers (Huntsville, Ala.) y en Texaco Chemical Company (Houston, Tex.) bajo el nombre de "Jeffamine". Los PEGs multi-amino útiles en la presente invención incluyen las diaminas Texaco's Jeffamine (serie "D") y triaminas (serie "T"), que contienen dos y tres grupos amino primarios por molécula, respectivamente.

Las poliaminas tales como etilénodiamina (H_2N-CH_2-CH_2-NH_2), tetrametilénodiamina (H_2N-$(CH_2)_4$-NH_2), pentametilénodiamina (cadaverina) (H_2N-$(CH_2)_5$-NH_2), hexametilénodiamina (H_2N-$(CH_2)_6$-NH_2), bis(2-hidroxietil)amina (HN-$(CH_2CH_2OH)_2$), bis(2)aminoetil)amina (HN-$(CH_2CH_2NH_2)_2$), y tris(2-aminoetil)amina (N-$(CH_2CH_2NH_2)_3$) también se pueden utilizar como el primer componente de polímero sintético que contiene múltiples grupos nucleofílicos.

C. Segundo Componente de Polímero

Los segundos componentes de polímero que contienen múltiples grupos electrofílicos también son referidos en la presente invención como "polímeros multi-electrofílicos". Para utilizarse en la presente invención, los polímeros multi-electrofílicos con frecuencia contienen al menos dos, o al menos tres, grupos electrofílicos con el objeto de formar una red reticulada tridimensional con polímeros multi-nucleófílicos.

Los polímeros multi-electrofílicos para utilizarse en las composiciones de la presente invención pueden ser polímeros que contienen dos o más grupos succinimidilo con la capacidad

de formar enlaces covalentes con grupos nucleofílicos en otras moléculas. Los grupos succinimidilo son altamente reactivos con materiales que contienen grupos amino ($-NH_2$) primarios, tales como PEG multi-amino, poli(lisina), o colágeno. Los grupos succinimidilo son ligeramente menos reactivos con materiales que contienen grupos tiol (-SH), tal como PEG multi-tiol o polipéptidos sintéticos que contiene múltiples residuos de cisteína.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "que contiene dos o más grupos succinimidilo" significa que comprende polímeros que son comercialmente disponibles que contienen dos o más grupos succinimidilo, así como los que son químicamente derivados para contener dos o más grupos succinimidilo. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "grupo succinimidilo" pretende comprender grupos sulfosuccinimidilo y otras variaciones del grupo succinimidilo "genérico". La presencia de la porción de sulfito de sodio o el grupo sulfosuccinimidilo sirve para incrementar la solubilidad del polímero.

D. Polímeros Hidrofílicos para Utilizarse como Primeros y Segundos Esqueletos de Componentes

Los polímeros hidrofílicos y en particular, varios polietilénglicoles, se pueden utilizar en el primero y segundo esqueletos de componentes de polímero de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención. Tal como se

utiliza en la presente invención, el término "PEG" comprende polímeros que tienen la estructura de repetición $(OCH_2CH_2)_n$.

Una estructura para una forma tetrafuncionalmente activada de PEG se muestra en la **figura 3**, ya que es un producto de reacción generalizado obtenido haciendo reaccionar un PEG tetrafuncionalmente activado con un PEG multi-amino. Tal como se ilustra en la figura, el grupo succinimidilo es una estructura de anillo de cinco miembros representada como $-N(COCH_2)_2$. En la **figura 3**, el símbolo ^^^ denota un enlace abierto.

Las modalidades incluyen la reacción de glutarato de succinimidilo de PEG tetrafuncionalmente activado, referidas en la presente invención como SG-PEG, con PEG multi-amino, y el producto de reacción obtenido de esta manera. Otra forma activada de PEG es referida como propionato de succinimidilo PEG (SE-PEG). Las modalidades incluyen SE-PEG tetrafuncionalmente activado y el producto de reacción obtenido haciéndolo reaccionar con un PEG multi-amino. En algunas modalidades, existen tres grupos CH_2 de repetición en cualquier lado del PEG. Las modalidades adicionales comprenden un conjugado que incluye una ligadura de "éter" la cual está menos sometida a hidrólisis. Esto es distinto al conjugado mostrado en la **figura 3**, en donde se proporciona una ligadura de éster. La ligadura de éster se somete a hidrólisis bajo condiciones fisiológicas. Otras formas funcionalmente activadas de

195

polietilénglicol se contemplan a través de las modalidades de la presente invención, ya que son los conjugados formados haciendo reaccionar los PEGs tetrafuncionalmente activados con un PEG multi-amino. En algunas modalidades, un conjugado incluye tanto una ligadura de éter como una de amida. Estas ligaduras son estables bajo condiciones fisiológicas.

Otra forma funcionalmente activada de PEG es referida como succinamida de succinimidilo PEG (SSA-PEG). Las modalidades incluyen la forma tetrafuncionalmente activada de este compuesto y el producto de reacción obtenido haciéndolo reaccionar con un PEG multi-amino. Estos y los compuestos relacionados se pueden utilizar en composiciones de acuerdo con las modalidades de la presente invención. Las modalidades también comprenden un conjugado que incluye una ligadura de "amida", la cual, igual que la ligadura de éter descrita previamente, está menos sujeta a hidrólisis y por consiguiente es más estable que una ligadura de éster. Aún otra forma activada de PEG se proporciona en una modalidad de compuesto referida como carbonato de succinimidilo PEG (SC-PEG). Las modalidades incluyen SC-PEG tetrafuncionalmente activado y el conjugado formado haciéndolo reaccionar con PEG multi-amino.

Tal como se describió anteriormente, los derivados de polietilénglicol activados para utilizarse en las modalidades de la presente invención, pueden contener grupos succinimidilo

196

como el grupo reactivo. Sin embargo, se pueden adherir los grupos de activación diferentes en sitios a lo largo de la longitud de la molécula PEG. Por ejemplo, PEG se puede derivar para formar aldehído de propión PEG funcionalmente activado (A-PEG). Las modalidades comprenden la forma tetrafuncionalmente activada, así como el conjugado formado mediante la reacción de A-PEG con PEG multi-amino. La ligadura puede ser referida como una ligadura $-(CH_2)_m-NH-$, en donde m = 1-10.

Aún otra forma del polietilénglicol activado es éter glicidílico PEG funcionalmente activado (E-PEG). Las modalidades comprenden el compuesto tetrafuncionalmente activado, así como el conjugado formado haciéndolo reaccionar con PEG multi-amino. Otro derivado activado de polietilénglicol es isocianato-PEG funcionalmente activado (I-PEG). Las modalidades incluyen el conjugado formado haciéndolo reaccionar con un PEG multi-amino. Otro derivado activado de polietilénglicol es vinilsulfona PEG funcionalmente activado (V-PEG). Las modalidades incluyen el conjugado formado haciéndolo reaccionar con PEG multi-amino.

Los polietilénglicoles multifuncionalmente activados para utilizarse en composiciones y otras modalidades de la presente invención pueden incluir polietilénglicoles que contienen grupos succinimidilo, tal como SG-PEG y SE-PEG, que pueden estar en una forma trifuncional o tetrafuncionalmente activada. Muchas

L97

de las formas activadas de polietilénglicol descritas anteriormente, ahora están comercialmente disponibles en Shearwater Polymers, Huntsville, Ala., y Union Carbide, South Charleston, W.Va.

E. Derivación del Primero y Segundo Componentes de Polímero para Contener Grupos Funcionales

Ciertos polímeros, tales como poliácidos, se pueden derivar para contener dos o más grupos funcionales, tales como grupos succinimidilo. Los poliácidos para utilizarse en la presente invención incluyen, sin limitación, ácido tricarboxílico a base de trimetilolpropano, ácido tetracarboxílico a base de di(trimetilolpropano), ácido heptanedioico, ácido actanedioico (ácido subérico) y ácido hexadecanedioico (ácido tapsico). Muchos de estos poliácidos están comercialmente disponibles en DuPont Chemical Company.

De acuerdo con un método general, los poliácidos pueden ser derivados en forma química para contener dos o más grupos succinimidilo mediante la reacción con una cantidad molar adecuada de N-hidroxisuccinimida (NHS) en la presencia de N,N'-diclorohexilcarbodiimida (DCC).

Los polialcoholes tales como trimetilolpropano y di(trimetilolpropano) se pueden convertir a una forma de ácido carboxílico utilizando varios métodos, posteriormente derivados en forma adicional mediante reacción con NHS en la presencia de DCC para producir polímeros trifuncionalmente y

148

tetrafuncionalmente activados, respectivamente, tal como se describe en la Solicitud Norteamericana Serie No. 08/403,358. Los poliácidos tales como ácido heptanedioico ($HOOC-(CH_2)_2-COOH$), ácido octanedioico ($HOOC-(CH_2)_2-COOH$) y ácido hexadecanedioico ($HOOC-(CH_2)_{14}-COOH$) son derivados mediante la adición de grupos succinimidilo para producir polímeros difuncionalmente activados.

Las poliaminas tales como etilénodiamina ($H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$), tetrametilénodiamina ($H_2N-(CH_2)_4-NH_2$), pentametilénodiamina (cadaverina) ($H_2N-(CH_2)_5-NH_2$), hexametilénodiamina ($H_2N-(CH_2)_6-NH_2$), bis(2-hidroxietil)amina ($HN-(CH_2CH_2OH)_2$), bis(2)aminoetil)amina ($HN-(CH_2CH_2NH_2)_2$), y tris(2-aminoetil)amina ($N-(CH_2CH_2NH_2)_3$) pueden ser derivados químicamente a poliácidos, los cuales posteriormente pueden ser derivados para contener dos o más grupos succinimidilo, haciéndolo reaccionar con las cantidades molares adecuadas de N-hidroxisuccinimida en la presencia de DCC, tal como se describe en la Solicitud Norteamericana Serie No. 08/403,358. Muchas de estas poliaminas están comercialmente disponibles en DuPont Chemical Company.

En algunas modalidades, un primer componente reticulable (por ejemplo, PEG multi-amino) está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable total, y el segundo componente

reticulable está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable total. Por ejemplo, una composición de componente reticulable final que tiene un peso total de 1 gramo (1000 miligramos) puede contener entre aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 miligramos del primer componente reticulable (por ejemplo, PEG multi-amino), y entre aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 miligramos del segundo componente reticulable.

En algunas modalidades, la proporción de peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable está dentro del rango de aproximadamente 20% hasta aproximadamente 80%. En modalidades relacionadas, esta proporción está dentro del rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%. En algunos casos, la proporción es de aproximadamente 50%. La proporción en peso se determina sobre las bases de una prueba de resistencia de gel. El primer componente reticulable y el segundo componente reticulable pueden tener el mismo peso molecular.

II. Componentes que Forman un Hidrogel para Utilizarse en la Composición de Matriz de Sellado

Los componentes que forman un hidrogel para utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden incluir geles reticulados moleculares biocompatibles, re-absorbibles e hidrogeles tal como se describe en las Patentes

200

Norteamericanas Nos. 4,640,834; 5,209,776; 5,292,362; 5,714,370; 6,063,061 y 6,066,325, las cuales están incorporadas a la presente invención como referencia. Los materiales elaborados a través de las técnicas descritas en estas patentes, están comercialmente disponibles bajo la marca comercial FLOSEAL de Baxter Healthcare Corporation, en un equipo para mezclar con una solución de trombina para utilizarse como un agente hemostático. Como alternativa, se pueden utilizar cualesquiera polímeros reticulados como componentes que forman un hidrogel en la presente invención. Por ejemplo, los alginatos, agarosas, gelatinas (por ejemplo, polvo SURGIFOAM™), u otros polímeros reticulados hidratables a base de carbohidrato o proteína, sintéticos, pueden ser utilizados. Las características primarias de los componentes que forman un hidrogel útil son biocompatibilidad, rápida absorción y retención de fluidos. Por lo tanto, aunque la poliacrilamida puede utilizarse como un componente que forma un hidrogel en la presente invención, puede ser menos preferido debido a su pobre biocompatibilidad en muchas aplicaciones internas. Con frecuencia, los polímeros reticulados hidratables para utilizarse como un componente que forma un hidrogel tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 70 hasta aproximadamente 300 micras, y un pH de aproximadamente 6.8 hasta aproximadamente 9.5. Los componentes que forman un hidrogel pueden proporcionar estabilidad mecánica para el

primero y segundo componentes reticulables, particularmente cuando una matriz de sellado se somete a fuerzas, presiones o diluciones.

En algunas modalidades, la proporción de peso entre el primero y segundo componentes reticulables, y el componente que forma un hidrogel, está dentro del rango de aproximadamente 28% hasta aproximadamente 42% p/p. En algunos casos, una composición puede contener una concentración de un primero y segundo componentes reticulables combinados que es de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 75% de la masa total de la composición, y una concentración del componente que forma un hidrogel que es de aproximadamente 95% hasta aproximadamente 25% de la masa total de la composición. En forma relacionada, una composición puede contener una concentración de primeros y segundos componentes reticulables combinados que es de aproximadamente 5% hasta aproximadamente 40% de la masa total de la composición, y una concentración del componente que forma un hidrogel que es de aproximadamente 95% hasta aproximadamente 60% de la masa total de la composición. En forma similar, una composición puede contener una concentración de primero y segundos componentes reticulables combinados que es de aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30% de la masa total de la composición, y una concentración de un componente que forma un hidrogel que

es de aproximadamente 90% hasta aproximadamente 70% de la masa total de la composición. Por ejemplo, una composición puede contener aproximadamente 20% del primero y segundo componentes reticulables combinados, y aproximadamente 80% del componente que forma un hidrogel. En algunas modalidades, una composición de primeros y segundos componentes reticulables combinados puede tener una proporción en peso fija de 50:50%, y la proporción p/p de la combinación de primeros y segundos componentes reticulables combinados al componente que forma un hidrogel puede ser dentro de un rango de aproximadamente 20% hasta aproximadamente 30%. La proporción p/p de la composición de primeros y segundos componentes reticulables combinados al componente que forma un hidrogel puede seleccionarse con base en una prueba de fuerza/adherencia del gel. El componente que forma un hidrogel puede actuar como un absorbente para proporcionar una superficie semi-seca para que se polimericen el primero y segundo componentes reticulables. Las modalidades de la presente invención comprenden equipos de composición de matriz de sellado secas que incluyen componentes reticulables y componentes que forman un hidrogel en cantidades de acuerdo con estas proporciones.

De acuerdo con algunas modalidades, el término "biocompatible" se refiere a materiales que cumplen con los

criterios del estándar # ISO 10993-1 promulgado por la Organización Internacional de Estandarización (NAMSA, Northwood, Ohio). De acuerdo con algunas modalidades, el término "re-absorbible" se refiere a composiciones que se degradan o solubilizan, cuando se colocan directamente en un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente (y no se protegen dentro de un aparato de implante tal como un implante de seno), durante un período de tiempo menor a un año, normalmente de 1 a 120 días. Los protocolos para medir la re-absorción y degradación son bien conocidos. De acuerdo con algunas modalidades, el término "reticulado molecular" se refiere a materiales que incluyen moléculas de polímero (por ejemplo, cadenas individuales) que se adhieren mediante puentes compuestos de ya sea un elemento, un grupo o un compuesto, en donde los átomos de esqueleto de las moléculas de polímero se unen mediante enlaces químicos primarios. La reticulación puede efectuarse en una variedad de formas, tal como se describirá con mayor detalle más adelante.

De acuerdo con algunas modalidades, el término "hidrogel" comprende composiciones que incluyen un coloidal acuoso de fase simple, en donde un polímero biológico o no biológico, tal como se define con mayor detalle más adelante, absorbe agua o un amortiguador acuoso. Un hidrogel puede contener múltiples sub-redes, en donde cada sub-red es un hidrogel reticulado molecular que tiene dimensiones que dependen del grado de

hidratación y están dentro de los rangos establecidos anteriormente. Con frecuencia, los hidrogeles tendrán poca o nada de agua libre, es decir, el agua no puede eliminarse del hidrogel mediante filtración simple.

El "porcentaje de expansión" se puede definir como el peso seco que es substraído del peso húmedo, dividido entre el peso seco y multiplicado por 100, en donde el peso húmedo se mide después de que un agente de humectación ha sido eliminado tan completamente como sea posible del exterior del material, por ejemplo, mediante filtración, y en donde el peso seco se mide después de la exposición a una temperatura elevada durante un tiempo suficiente para evaporar el agente de humectación, por ejemplo, 2 horas a una temperatura de 120°C.

La "expansión en equilibrio" puede definirse como el porcentaje de expansión en equilibrio después de que el material de polímero reticulado hidratable ha sido sumergido en un agente de humectación durante un período de tiempo suficiente para que el contenido de agua se vuelva constante, normalmente de 18 a 24 horas.

El "sitio objetivo" normalmente es la ubicación en la cual se suministrará la composición de matriz de sellado, normalmente una brecha o defecto de tejido. Con frecuencia, el sitio objetivo será el lugar de tejido de interés, pero en algunos casos la composición de matriz de sellado puede administrarse

o suministrarse a un lugar cercano a la ubicación de interés, por ejemplo, cuando el material se expande *in situ* para cubrir el lugar de interés.

Los polímeros reticulados hidratables para utilizarse en componentes que forman un hidrogel en al menos algunas modalidades de la presente invención se pueden formar a partir de polímeros biológicos y no biológicos. Los polímeros biológicos adecuados incluyen proteínas, tales como gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, caseína, fibrinógeno, fibrina, fibronectina, elastina, queratina, laminina, y derivados y combinaciones de los mismos. El colágeno no fibrilar soluble es similarmente adecuado. Las formulaciones de gelatina de ejemplo se establecen a continuación. Otros polímeros biológicos incluyen polisacáridos, tales como glucosaminoglucanos (por ejemplo, ácido hialurónico y sulfato de condroitina), derivados de almidón, xilan, derivados de celulosa, derivados de hemicelulosa, agarosa, alginato, chinostan y derivados y combinaciones de los mismos. Los polímeros no biológicos adecuados se pueden seleccionar para ser degradables a través de cualquiera de dos mecanismos, es decir, (1) rompimiento del esqueleto polimérico o (2) degradación de las cadenas laterales que dan como resultado solubilidad acuosa. Los polímeros no biológicos de ejemplo incluyen sintéticos, tales como poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, resinas de polivinilo, poliláctido-glucólidos,

policaprolactonas, polioxietilenos y derivados y combinaciones de los mismos.

Las moléculas de polímero reticulable hidratable para utilizarse en componentes que forman un hidrogel pueden ser reticulados en cualquier forma adecuada para formar un hidrogel acuoso. Por ejemplo, estas moléculas poliméricas pueden ser reticuladas utilizando agentes de reticulación bi- o poli-funcionales que se adhieren covalentemente a dos o más cadenas de moléculas de polímero. Los agentes de reticulación bifuncionales de ejemplo incluye aldehídos, epoxis, succinimidas, carbodiimidas, melaimidas, azidas, carbonatos, isocianatos, sulfona de divinilo, alcoholes, aminas, imidatos, anhídridos, haluros, silanos, diazoacetato, aziridinas y similares. Como alternativa, la reticulación se puede lograr utilizando oxidantes y otros agentes tales como periodatos, los cuales activan las cadenas laterales o porciones en el polímero, de modo que puedan reaccionar con otras cadenas laterales o porciones para formar enlaces de reticulación. Un método adicional de reticulación comprende exponer los polímeros a radiación, tal como radiación gama, para activar el polímero lateral para permitir reacciones de reticulación. También son adecuados métodos de reticulación deshidrotérmica. La reticulación deshidrotérmica de gelatina puede lograrse manteniéndola a una temperatura elevada, normalmente 120°C durante un período de al menos 8 horas. El incremento del

grado de reticulación, tal como se manifiesta en una disminución en porcentaje de expansión en equilibrio, se puede lograr elevando la temperatura de retención, extendiendo la duración del tiempo de retención, o una combinación de ambos. La operación bajo presión reducida puede acelerar la reacción de reticulación. Los métodos preferidos para reticular moléculas de gelatina se describen a continuación.

Los hidrogeles pueden incluir un plastificante para incrementar la maleabilidad, flexibilidad y el rango de degradación del hidrogel. El plastificante puede ser un alcohol, tal como polietilenglicol, sorbitol, o glicerol. Con frecuencia, el plastificante será polietilenglicol que tiene un peso molecular que fluctúa de 200 a 1000 D, o que tiene un peso molecular de aproximadamente 400 D. Los plastificantes pueden presentarse en el hidrogel de aproximadamente 0.1% en peso hasta aproximadamente 30% en peso, preferentemente de aproximadamente 1% en peso hasta 5% en peso de la composición de polímero. Los plastificantes pueden ser particularmente benéficos para utilizarse con hidrogeles que tienen un alto contenido de sólidos, normalmente superior 10% en peso de la composición (sin plastificante).

Los métodos de ejemplo para producir gelatinas reticuladas moleculares son los siguientes. La gelatina se obtiene y coloca en un amortiguador acuoso para formar un gel no reticulado, que tiene normalmente un contenido de sólidos

de aproximadamente 1% hasta aproximadamente 70% en peso, o de aproximadamente 3% hasta aproximadamente 10% en peso. La gelatina se retícula, normalmente mediante la exposición ya sea a glutaraldehído (por ejemplo, 0.01% a 0.05% p/p, durante la noche a una temperatura de 0°C a 15°C en un amortiguador acuoso), periodato de sodio (por ejemplo, 0.05 M, mantenido a una temperatura de 0°C a 8°C durante 48 horas) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ("EDC") (por ejemplo, 0.5% a 1.5% p/p, durante la noche a temperatura ambiente), o mediante exposición aproximadamente 0.3 a 3 megarads de radiación de rayos gamma o de electrones. Como alternativa, las partículas de gelatina se pueden suspender en un alcohol, tal como alcohol metílico o alcohol etílico en un contenido de sólidos de aproximadamente 1% hasta aproximadamente 70% en peso, o aproximadamente 3% hasta aproximadamente 10% en peso, y reticularse mediante exposición a un agente de reticulación normalmente glutaraldehído (por ejemplo, 0.01% a 0.1 % p/p, durante la noche a temperatura ambiente). En el caso de aldehídos, el pH normalmente se mantiene de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 11, o de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10. Cuando se retícula con glutaraldehído, las reticulaciones se forman a través de bases Schiff que pueden ser estabilizadas mediante reducción subsecuente, por ejemplo mediante tratamiento con borohidruro de sodio. Después de la

reticulación, los gránulos resultantes pueden ser lavados en agua y opcionalmente enjuagados en un alcohol, secados y re-suspendidos hasta un grado de hidratación deseado en un medio acuoso y que tenga un amortiguador y pH deseados. Los hidrogeles resultantes posteriormente pueden ser cargados en los aplicadores de la presente invención, tal como se describe con mayor detalle más adelante. Como alternativa, los hidrogeles pueden ser interrumpidos mecánicamente antes o después de la reticulación, el cual también se describe con mayor detalle más adelante.

Los métodos de ejemplo para producir composiciones de gel reticulados moleculares que tienen porcentajes de expansión de equilibrio dentro del rango de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, o de aproximadamente 600% hasta aproximadamente 950%, se indican a continuación. Se obtiene la gelatina y se coloca en un amortiguador acuoso (normalmente en un pH de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 17, en un pH entre aproximadamente 7 y aproximadamente 10) que contiene un agente de reticulación en solución (con frecuencia glutaraldehído, normalmente en una concentración de 0.01% a 0.1% p/p) para formar un gel, que normalmente tiene un contenido de sólidos de 1% a 70% en peso, normalmente de 3% a 10% en peso. El gel se mezcla bien y se mantiene durante la noche a una temperatura de 0° a 15°C conforme tiene lugar la reticulación. Posteriormente se enjuaga

210

tres veces con agua desionizada, dos veces con alcohol (preferentemente alcohol metílico, alcohol etílico, o alcohol isopropílico) y se deja secar a temperatura ambiente. Opcionalmente, el gel puede tratarse como el borohidruro de sodio para estabilizar en forma adicional la reticulación. En algunos casos, el componente que forma un hidrogel puede incluir una gelatina que tenga por ejemplo un gran número de residuos de glicina (por ejemplo, 1 en 3 ajustados cada tercer residuo), residuos de prolina y residuos de 4-hidroxiprolina. Una subunidad de gelatina de ejemplo se muestra en la figura 5. Las modalidades de gelatina incluyen moléculas que tienen una composición de aminoácido de: glicina 21 %, prolina 12 %, hidroxiprolina 12%, ácido glutámico 10%, alanina 9%, arginina 8%, ácido aspártico 6%, lisina 4%, serina 4%, leucina 3%, valina 2%, fenilalanina 2%, treonina 2%, isoleucina 1%, hidroxilisina 1%, metionina y histidina <1% y tirosina < 0.5%. La figura 6 ilustra la correlación entre el porcentaje de expansión y el porcentaje de sólidos de una modalidad de gel polimérico reticulado fragmentado útil como un componente que forma un hidrogel en una composición de sellado.

Los hidrogeles reticulados moleculares son preferentemente interrumpidos en forma mecánica en un proceso por lotes antes de utilizarse como un componente que forma un hidrogel. El propósito primario de este paso de interrupción mecánica es crear múltiples subunidades de

hidrogel que tienen un tamaño que aumenta la capacidad para llenar y empacar el espacio al cual será suministrado. Sin interrupción mecánica, los hidrogeles reticulados moleculares tendrán dificultad de adaptarse a y de llenar los espacios objetivos con formas irregulares que están siendo tratados. Al romper el hidrogel en su sub-unidades de tamaño más pequeño, los espacios pueden ser llenados en forma mucho más eficiente, reteniendo al mismo tiempo la integridad mecánica y la persistencia del hidrogel reticulado.

La reticulación molecular de las cadenas de polímero del hidrogel se puede llevar a cabo antes o después de su interrupción mecánica. Los hidrogeles pueden ser interrumpidos en forma mecánica en operaciones por lotes, tal como mezclado, siempre que la composición de hidrogel se rompa en subunidades que tengan un tamaño dentro del rango de 0.01 mm a 5.0 mm tal como se estableció anteriormente. Otros procesos de interrupción mecánica por lotes incluyen bombeo a través de un homogeinizador o mezclador o a través de una bomba que comprime, estira o corta el hidrogel a un nivel que excede una fractura que produce la tensión del hidrogel. En algunos casos, la extrusión de la composición polimérica origina que el hidrogel sea convertido de una red sustancialmente continua, por ejemplo, una red que abarca las dimensiones de la masa de hidrogel original, a una recolección de sub-redes o sub-unidades que tienen dimensiones desde los rangos

212

establecidos anteriormente.

En una modalidad actualmente preferida, el polímero reticulado hidratable puede ser preparado inicialmente (por ejemplo, secando con rocío) y/o ser interrumpido en forma mecánica antes de ser reticulado, con frecuencia normalmente antes de la hidratación para formar un hidrogel. El polímero reticulado hidratable puede proporcionarse como un sólido seco pulverizado o finamente dividido el cual puede ser interrumpido mediante molido adicional para proporcionar partículas que tengan un tamaño deseado, normalmente siendo confinadas de manera estrecha dentro de un pequeño rango. Además también se pueden llevar a cabo pasos de selección y modificación de tamaño, tal como cernido, clasificación de ciclona, etc. Para los materiales de gelatina de ejemplo descritos posteriormente, el tamaño de partículas seca está preferentemente dentro del rango de aproximadamente 0.01 mm hasta aproximadamente 1.5 mm, más preferentemente de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 1.0 mm. Una distribución de tamaño de partícula de ejemplo será tal que más de aproximadamente el 95% en peso de las partículas estén dentro del rango de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 0.7 mm. Los métodos para moler el material de partida de polimérico incluyen homogenización, molido, coacervación, triturado, triturado por chorro y similares. Los materiales de partida poliméricos pulverizados también pueden formarse mediante

secado con rocío. La distribución y tamaño de partícula puede ser controlada en forma adicional y refinada mediante técnicas convencionales tales como cernido, agregación, molido adicional y similares.

El sólido pulverizado seco posteriormente puede ser suspendido en un amortiguador acuoso, tal como se describe en cualquier parte en la presente invención, y reticulado. En otros casos, el polímero reticulado hidratable puede ser suspendido en un amortiguador acuoso, reticulado y posteriormente secado. El polímero seco, reticulado puede ser interrumpido, y el material interrumpido puede ser re-suspendido subsecuentemente en un amortiguador acuoso. En todos los casos, el material resultante comprende un hidrogel reticulado que tiene sub-redes separadas que tienen las dimensiones establecidas anteriormente.

Los polímeros reticulados hidratables útiles como componentes que forman un hidrogel, después de la interrupción mecánica, normalmente serán re-absorbibles, es decir, se biodegradan en el cuerpo el paciente, dentro de un período menor a un año, normalmente de 1 a 120 días, preferentemente 1 a 90 días, y más preferentemente 2 a 30 días después de su aplicación inicial. Se conocen técnicas para medir la longitud del tiempo requerido para la reabsorción.

III- Preparación y Uso de un Grupo de Modalidades de las Composiciones de Matriz de Sellado: Combinación de Matriz

Porosa y Polímero Reticulado Hidratable

Las composiciones de acuerdo con la presente invención comprenden un primer componente reticulable combinado con un segundo componente reticulable, los cuales tienen la capacidad de reticularse para formar una matriz porosa que tiene intersticios, lo cual se combina con un polímero reticulable hidratable que tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios. Se podrá apreciar que las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas para una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo cada una de las solicitudes descritas anteriormente con referencia a la alteración de (1) el primero y segundo componentes (por ejemplo, matriz porosa); y, (2) el polímero reticulable hidratable. Por ejemplo, dichas composiciones pueden actuar como un sellador mecánico para detener o inhibir el sangrado formando una barrera física rápida para la sangre. Por consiguiente, algunas modalidades de la presente invención pueden proporcionar resultados sin un efecto "hemostático" directo (por ejemplo, efecto bioquímico en la cascada de coagulación; que implica iniciadores de coagulación).

El componente que forma un hidrogel puede servir como un absorbente (por ejemplo, sangre y otros fluidos y tejidos). Al absorber la sangre, el componente que forma un hidrogel puede asegurar que se mantenga una mayor concentración el primero

y segundo componentes reticulables en un mismo sitio de tratamiento, y puede asegurar que se proporcione una superficie semi-seca para que el primero y segundo componentes reticulables se reticulen entre sí y en los tejidos de los alrededores. En algunas modalidades, el primero y segundo componentes se pueden reticular al mismo tiempo que el componente que forma un hidrogel está absorbiendo sangre. Esta absorción y reticulación pueden ocurrir en unos cuantos segundos, y la barrera de matriz de sellado resultante puede alcanzar una fuerza total en de 30 minutos a una hora.

Generalmente, las composiciones e matriz de sellado están "secas", aunque puede estar presente algún contenido de unidad mínimo, por ejemplo, en el componente que forma un hidrogel. En algunos casos, es posible pre-hidratar parcialmente el polímero reticulable hidratable antes de la aplicación, aunque puede ser necesario hacer esto con un pH mayor al pH fisiológico, o bajo otras condiciones las cuales evitarán que el primero y segundos componentes se reticulen antes de la aplicación al sitio objetivo. Con frecuencia las composiciones de matriz de sellado serán pulverizadas o tendrán forma de pasta fusionada.

Las concentraciones del primer componente y el segundo componente utilizados para preparar las composiciones de matriz de sellado variarán dependiendo de un número de factores, e incluyen los tipos y pesos moleculares de los

componentes reticulables particulares utilizados y la aplicación de uso final deseada. En algunas modalidades, la proporción del peso el primero y segundo componentes a los componentes que forman un hidrogel fluctúa de 10 - 50% p/p, 15-45% p/p, 20-42% p/p, 30 - 40% p/p y 28 hasta aproximadamente 42 % p/p. En algunas modalidades, los tamaño de partícula para el primer y segundo polímeros pueden fluctuar de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 90 micras. En algunas modalidades, los tamaño de partículas para el polímero reticulado hidratable puede fluctuar de aproximadamente 250 hasta aproximadamente 400 micras.

En algunas modalidades, el primero y segundo componentes pueden proporcionarse como un particulado seco o en forma de polvo. En esta forma el primero y segundo componentes pueden mezclarse juntos, y pueden mezclarse en forma adicional con el componente que forma un hidrogel, también en un particulado seco o forma de polvo. La mezcla de los componentes puede lograrse a través de cualquier medio de mezcla mecánico, tal como mezclando con cuchillas de molido. La composición de matriz de sellado en polvo seca resultante posteriormente puede ser empacada en varios contenedores, por ejemplo, cajas, envolturas, jarras y similares. El mezclado y el llenado se pueden realizar bajo condiciones asépticas, o la composición de matriz de sellado puede esterilizarse después del empaque, por ejemplo mediante radiación gamma. Las

modalidades de polvo seco de la presente invención, posteriormente están listas para utilizarse. El primero y segundos polímeros reticulables reaccionarán para reticular bajo condiciones fisiológicas (pH de sangre) y de modo que la composición de matriz de sellado de tres componente de la composición puede ser aplicada directamente en el sitio deseado en forma seca para sellar algún defecto de tejido, siempre que esté presente suficiente fluido de hidratación en el cuerpo. Por lo tanto, la composición de matriz de sellado pulverizada simplemente puede sr vertida en y dentro del sitio objetivo con defecto de tejido, y mantenido en su lugar (por ejemplo, con una almohadilla de gasa o guante quirúrgico) hasta que se forme la barrera de matriz de sellado. Esto es particularmente útil y conveniente en situaciones de trauma (por ejemplo, en una lugar de emergencia o en un campo de batalla) en donde son deseables productos listos para utilizarse que puedan ser usados con varios tamaños de defecto de tejido.

En otras modalidades, el primero y segundo componentes y el componente que forma un hidrogel puede ser inmovilizados sobre un soporte, o sobre una parte de apoyo, formando una "almohadilla de matriz de sellado". En estas modalidades, se proporciona un soporte, tal como una esponja de colágeno, y posteriormente la composición de matriz de sellado se fija en el soporte para utilizarse. Debido a que las composiciones de matriz de sellado se unen fácilmente con los tejidos, materiales

orgánicos, y materiales sintéticos, estas modalidades pueden ser convenientes en cuanto a que se puede utilizar un soporte manejado de manera más fácil para aplicar la composición de matriz de sellado. Debido al hecho de que se requiere una cantidad relativamente pequeña de composición de matriz de sellado para crear una barrera de matriz de sellado efectiva, se puede fijar al soporte una capa relativamente delgada de composición de matriz de sellado. Por ejemplo, en los ejemplos que se establecen más adelante, únicamente aproximadamente 0.5 - 1.0 g de la composición de matriz de sellado fijada en la superficie creo una almohadilla de 3cm x 3cm con propiedades hemostáticas muy buenas. Tal como lo podrán los expertos en las técnicas quirúrgicas, estas modalidades son deseables en situaciones en donde se anticipa el tamaño del defecto de tejido, y cuando se desean características de manejo mejoradas en comparación con un polvo. Igual que las modalidades de polvo seco, las modalidades de almohadilla de matriz de sellado de las composiciones de matriz de sellado pueden aplicarse directamente al defecto del tejido y sin preparación adicional, prensando la parte de la composición de la matriz de sellado de la almohadilla contra el defecto del tejido hasta que se reticulen los componentes reticulables.

El soporte para las modalidades de la almohadilla de matriz de sellado en la presente invención puede ser cualquier material biocompatible. Aunque se describe con detalle en la

presente invención soportes de colágeno, se pueden utilizar otros materiales para soporte. Por ejemplo, se pueden utilizar otros materiales de soporte de proteína o polisacárido, los cuales sean biocompatibles. Estos materiales de soporte pueden degradarse en aproximadamente el mismo rango *in vivo* que la barrera de matriz de sellado, o pueden degradarse en diferentes rangos de la barrera de matriz de sellado. Las esponjas de colágeno y su preparación son conocidas en las técnicas quirúrgicas, y la preparación y manejo del colágeno se describe completamente más adelante. De igual manera, se pueden utilizar esponjas preparadas de fibrina. Los materiales a base de carbohidratos tales como celulosa (para aplicaciones externas) o quitosán, también pueden ser utilizados. Además, se pueden utilizar polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables. Los expertos en la técnicas quirúrgicas reconocerán que se pueden utilizar otras formas además de esponjas, para soportes en las modalidades de almohadilla de matriz de sellado de la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar una hoja o película de colágeno u otros materiales. Además, el soporte puede tomar cualquier forma útil, tal como conos, hemisferios, varillas, cuñas, y similares, con el objeto de proporcionar una almohadilla que se aproxime más cercanamente a la forma del defecto de tejido. Por ejemplo, una almohadilla de matriz de sellado que utiliza una esponja de colágeno en forma de cono como un soporte, puede

ser útil para tratar una herida de bala de pistola. Normalmente, dichos soportes actuarán como un componente estructural o mecánico. Los soportes pueden tener cierto grado de porosidad, para permitir que la sangre u otros líquidos sean filtrados en el soporte y tengan un contacto incrementado con las composiciones. Dichas construcciones pueden tener un factor de expansión de aproximadamente 1.3X hasta aproximadamente 1.5X, y posteriormente pueden ser ideales para aplicaciones quirúrgicas. Por ejemplo, las composiciones soportadas por esponja pueden utilizarse en neurocirugía para sellar la dura, en donde una expansión excesiva puede imponer una presión no deseada en el cerebro. En general, los soportes deben lo suficientemente flexibles para adaptarse a un defecto de tejido típico, y deben tener buenas propiedades de manejo dentro del contexto quirúrgico.

Las composiciones de matriz de sellado pueden ser inmovilizadas en el soporte a través de una variedad de formas. En algunas modalidades descritas más adelante, es suficiente un calor suaves pata inmovilizar las composiciones de matriz de sellado pulverizadas que contienen primeros y segundos componentes de PEG de 4-brazos, y un componente que forma un hidrogel de gelatina reticulada. En estas modalidades, la composición de matriz de sellado pulverizada se coloca sobre una esponja de colágeno, y se calienta a una temperatura de 60-70°C durante aproximadamente 1-2 minutos. La matriz de

polvo seco se derrite ligeramente con este calor, fijándola a la superficie de la esponja de colágeno. Como alternativa, la composición de matriz de sellado puede fijarse al soporte utilizando agentes de enlace, u otros excipientes conocidos en las técnicas farmacéuticas. En general, la técnica utilizada para fijar la composición de matriz de sellado al soporte dependerán del primer y segundo componentes y del componente que forma un hidrogel de la composición de matriz de sellado. El método utilizado para fijar la composición de matriz de sellado sobre el soporte no debe disminuir de manera apreciable la capacidad del primero y segundo componentes para reticularse cuando se expone a condiciones fisiológicas, o disminuir la capacidad que tiene el componente que forma un hidrogel para absorber fluidos biológicos.

En otras modalidades, la composición de matriz de sellado puede formarse en una hoja o película sin un soporte. Dicha formación de la composición de matriz de sellado puede lograrse utilizando los métodos descritos anteriormente para fijar una composición de matriz de sellado a un soporte para las modalidades de almohadilla de matriz de sellado.

IV. Adición de Componente Adicionales en la Composición de Matriz de Sellado

En modalidades adicionales de la presente invención, los componentes diferentes al primer y segundo componentes reticulables y al componente que forma un hidrogel, pueden

agregarse a las composiciones de matriz de sellado de la presente invención. En general, estos componente adicionales pueden mezclarse con el primero y segundos componentes que forman un hidrogel en forma seca. Los componentes adicionales pueden agregar una resistencia mecánica adicional, o mejorar de otra manera el desempeño de las composiciones de matriz de sellado de la presente invención para aplicaciones particulares. Por ejemplo, debido a que es menos opaco y menos pegajoso que el colágeno no fibrilar. El colágeno fibrilar algunas veces puede ser menos preferido para utilizarse en composiciones de bioadhesivo. Sin embargo, tal como se describe en la Patente Norteamericana No. 5,614,587, el colágeno fibrilar, o mezclas de colágeno no fibrilar y fibrilar, puede preferirse para utilizarse en composiciones de adhesivo proyectadas para resistencia *in vivo* a largo plazo. Se pueden incorporar varios derivados de glucosaminoglican desacilados y/o desulfatados en la composición en una forma similar a la descrita anteriormente para el colágeno.

Las proteínas que ocurren naturalmente, tal como colágeno, y derivados de varios polisacáridos que ocurren naturalmente, tales como glucosaminoglicanos, se pueden incorporar en la barrera de matriz de sellado y cuando el primero y segundo componentes de la presente invención reaccionan bajo condiciones fisiológicas para reticulación. Cuando estos otros componentes también contienen grupos

funcionales que reaccionarán con los grupos funcionales de los polímeros sintéticos, su presencia durante la reticulación del primero y segundo componentes en el sitio objetivo dará como resultado la formación de una matriz de polímero que ocurre naturalmente de polímero sintético reticulado. En particular, cuando el polímero que ocurre naturalmente (proteína o polisacárido) también contienen grupos nucleofílicos tales como grupos amino primarios, los grupos electrofílicos en el segundo componente reticulable reaccionarán con los grupos amino primarios en estos componentes, así como los grupos nucleofílicos en el primer componente reticulable, para originar que estos otros componentes se vuelvan parte de la barrera matriz de sellado.

En general, los glucosaminoglicanos son derivados normalmente en forma química, mediante des-acetilación, desulfatación, o ambos, con el objeto de contener grupos amino primario disponibles para reacción con los grupos electrofílicos en el segundo componente reticulable. Los glucosaminoglicanos que se pueden derivar de acuerdo con cualquiera de, o ambos de los métodos antes mencionados incluyen los siguientes: ácido hialurónico, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina (sulfato de dermatan), sulfato C de condroitina, quitina (puede ser derivada a quitosan), sulfato de queratán, queratosulfato, y heparina. La derivación de glucosaminoglicanos mediante desacilación y/o desulfatación y

enlace covalente de los derivados de glucosaminoglican resultantes con polímeros hidrofílicos sintéticos, se describen con mayor detalle en la Patente Norteamericana No. 5,510,418, permitida, comúnmente asignada, cuyos contenidos están incorporados a la presente invención como referencia.

En forma similar, los grupos electrofílicos en el segundo componente reticulable pueden reaccionar con grupos amino primarios en residuos de lisina o grupos tiol en residuos de cisteína de ciertas proteínas que ocurren naturalmente. Las proteínas con alto contenido de lisina tales como colágeno y sus derivados son especialmente reactivas con grupos electrofílicos en polímero sintéticos. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "colágeno" pretende comprender colágeno de cualquier tipo, de cualquier fuente, incluyendo pero sin limitarse a colágeno extraído de tejido o producido en forma recombinante, análogos de colágeno, derivados de colágeno, colágenos modificados, y colágenos desnaturalizados tales como gelatina. El enlace covalente de colágeno a polímeros hidrofílicos sintéticos se describen con detalle en la Patente Norteamericana No. 5,162,430, comúnmente asignada, presentara el 10 de noviembre de 1992, de Rhee y asociados.

En general, el colágeno de cualquier fuente puede ser utilizado en las composiciones de la presente invención, por ejemplo, el colágeno puede ser extraído y purificado de fuentes humanas u otros mamíferos, tal como corium de bovino o

porcino o placenta humana, o pueden ser producida en forma recombinante o de otra manera. La preparación de colágeno sustancialmente no antigénico, purificado en solución de piel de bovino, es bien conocida en la técnica. La Patente Norteamericana No. 5,428,022, presentada el 27 de junio de1995, de Palefsky y asociados, describe métodos para extraer y purificar colágeno procedente de la placenta humana. La Patente Norteamericana No. 5,667,839 describe métodos para producir colágeno humano recombinante en la leche de animales transgénicos, incluyendo vacas transgénicas. El término "colágeno" o "material de colágeno" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a todas las formas de colágeno, incluyendo aquellas que han sido procesadas o modificadas de otra manera.

El colágeno de cualquier tipo, incluyendo pero sin limitarse a los tipos I, II, III, IV, o cualquier combinación de los mismos, se puede utilizar en las composiciones de la presente invención, aunque el tipo I es con frecuencia el preferido. Se puede utilizar ya sea colágeno que contiene atelopéptido o telopéptido; sin embargo, cuando se utiliza colágeno procedente de una fuente xenogeneica, tal como colágeno de bovino, se prefiere frecuentemente el colágeno de atelopéptido, debido a su inmunogenicidad reducida en comparación con el colágeno que contiene telopéptido.

El colágeno que no ha sido reticulado previamente a

226

través de métodos tales como calor, radiación o agentes de reticulación químicos, se puede utilizar en las composiciones de la presente invención, y se puede utilizar también colágeno previamente reticulado. El colágeno fibrilar de telopéptido no reticulado, está comercialmente disponible en Collagen Corporation (Palo Alto, Calif.) en concentraciones de colágeno de 35 mg/ml y 65 mg/ml bajo el nombre comercial de Zyderm® I Collagen y Zyderm II Collagen, respectivamente. El colágeno fibrilar de atelopéptido reticulado de glutaraldehído, está comercialmente disponible en Collagen Corporation en una concentración de colágeno de 35 mg/ml bajo el nombre comercial de Zyplast® Collagen. Los colágenos para utilizarse en la presente invención, generalmente están en forma de polvo liofilizado seco.

Debido a su consistencia pegajosa, el colágeno no fibrilar generalmente se utiliza en composiciones de la presente invención que están proyectadas para utilizarse como bioadhesivos. El término "colágeno no fibrilar" comprende cualquier material de colágeno modificado o no modificado que esté en una forma sustancialmente no fibrilar con un pH de 7, tal como se indica mediante claridad óptica de una suspensión acuosa del colágeno.

El colágeno que ya está en forma fibrilar, se puede utilizar en las composiciones de la presente invención. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "colágeno no fibrilar"

-227

pretende comprender tipos de colágeno que son no fibrilares en forma nativa, así como colágeno que ha sido químicamente modificado, de modo que tenga forma no fibrilar con un pH neutral o aproximadamente neutral. Los tipos de colágeno que son no fibrilares (o microfibrilares) en su forma nativa, incluyen los tipos IV, VI, y VII.

Los colágenos modificados en forma química que están en forma no fibrilar con un pH neutral, incluyen colágeno succinilado y colágeno metilado, ambos de los cuales se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en la Patente Norteamericana No. 4,164,559, presentada el 14 de agosto de 1979, de Miyata y asociados, la cual está incorporada en su totalidad a la presente invención como referencia. Debido a su adhesividad inherente, el colágeno metilado normalmente se utiliza en composiciones de bioadhesivo, tal como se describe en la Patente Norteamericana No. 5,614,587.

Los colágenos para utilizarse en las composiciones de matriz de sellado de la presente invención, pueden comenzar en forma fibrilar, posteriormente convertirse a no fibrilares mediante la adición de uno o más agentes de desensamble de fibra. El agente de desensamble de fibra normalmente se encuentra en una cantidad suficiente para ser al colágeno sustancialmente no fibrilar en un pH de 7, tal como se describió anteriormente. Los agentes de desensamble de fibra para utilizarse en la presente invención incluyen, sin limitación,

228

varios alcoholes biocompatibles, aminoácidos, sales inorgánicas y carbohidratos, siendo los alcoholes biocompatibles los particularmente preferidos. Los alcoholes biocompatibles preferidos incluyen glicerol y propilenglicol. En algunos casos, los alcoholes no biocompatibles tales como etanol, metanol, e isopropanol, pueden no ser deseables para utilizarse en el primero y segundo polímeros de la presente invención, debido a sus efectos potencialmente perjudiciales en el cuerpo del paciente que los recibe. Los ejemplos de aminoácidos incluyen arginina. Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen cloruro de sodio y cloruro de potasio. Aunque los carbohidratos, tales como varios azúcares, incluyendo sacarosa, pueden utilizarse en la práctica de la presente invención, no son tan preferidos como otros tipos de agentes de desensamble de fibra, debido a que pueden tener efectos citotóxicos *in vivo*.

Para utilizarse en la adhesión de tejido, además de sellado, puede ser deseable incorporar proteínas tales como albúmina, fibrina o fibrinógeno en la composición de matriz de sellado para promover la adhesión celular. Además, la introducción de hidrocoloidales tales como carboximetilcelulosa puede promover la adhesión de tejido y/o capacidad de expansión.

Las composiciones de matriz de sellado de la presente invención también pueden comprender uno o más agentes o compuestos biológicamente activos adicionales. En una

PATENTE DE INVENCIÓN

09-20987

TOMO: 2/2

modalidad, los agentes biológicamente activos tales como derivados de taxol, pueden ser agregados a la composición de matriz de sellado para evitar la adhesión en el sitio de defecto de tejido. En otras modalidades, se pueden agregar agentes biológicamente activos, tales como agentes antibióticos o antimicrobianos a la matriz de sellado para utilizarse, por ejemplo, en situaciones de curación de heridas inducidas por trauma (por ejemplo, heridas de cuchillo o bala), en donde los organismos patógenos pueden haber ingresado al sitio de defecto del tejido o herida. En otras modalidades, los agentes biológicamente activos tales como factores de crecimiento se pueden suministrar desde la composición hasta un sitio de tejido local con el objeto de facilitar la curación y regeneración de tejido. En modalidades adicionales, los agentes de coagulación de sangre, tales como trombina, se pueden agregar para mejorar en forma adicional el sellado y regeneración de tejido activando la cascada de coagulación. Los componentes bioactivos de ejemplo incluyen pero no se limitan a proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, y moléculas biológicamente activas orgánicas e inorgánicas tales como enzimas, antibióticos, agentes anti-neoplásticos, agentes bacteriostáticos, agentes anti-formación de adhesión (tal como derivados de taxol), agentes bacteriocidas, agentes anti-virales, agentes hemostáticos, anestésicos locales, agentes anti-inflamatorios, hormonas, agentes anti-angiogénicos,

230

anticuerpos, neurotransmisores, fármacos físico activos, fármacos que afectan los órganos reproductores y oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos anti-sentido. El término "agente biológicamente activo" o "agente activo" tal como se utiliza en la presente invención, comprende moléculas orgánicas e inorgánicas que ejercen efectos biológicos *in vivo*. Los ejemplos de agentes activos incluyen, sin limitación enzimas, antagonistas o agonistas de receptor, hormonas, factores de crecimiento, médula ósea autógena, antibióticos, agentes anti-formación de adhesión, agentes antimicrobianos, otros agentes farmacéuticos y anticuerpos. El término "agente activo" también pretende comprender combinaciones o mezclas de dos o más agentes activos, tal como se definió anteriormente.

Dichos componentes bioactivos normalmente estarán presentes en concentraciones relativamente bajas, normalmente debajo de 10% en peso de las composiciones, usualmente debajo de 5% en peso, y con frecuencia debajo de 1% en peso. Se pueden combinar dos o más agentes activos en una sola composición y/o se pueden utilizar dos o más composiciones para suministrar diferentes componentes activos, en donde los componentes pueden actuar en el sitio de suministro. Los agentes hemostáticos de ejemplo incluyen trombina, fibrinógeno y factores de coagulación. Se pueden agregar agentes hemostáticos, tipo trombina, en concentraciones que fluctúan,

por ejemplo de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 10,000 Unidades de trombina por ml de hidrogel, o de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 Unidades de trombina por ml de hidrogel.

La primera y segunda composiciones de polímero reticuladas también se pueden preparar para contener varios agentes de generación de imágenes tal como yodo o sulfato de bario, o fluoro, con el objeto de ayudar a la visualización de las composiciones después de la administración mediante rayos X, o ^{19}F-MRI, respectivamente.

Los agentes activos preferidos para utilizarse en las composiciones de la presente invención incluyen factores de crecimiento, tales como factores de transformación de crecimiento (TGFs), factores de crecimiento y fibroblasto (FGFs), factores de crecimiento derivados de plaqueta (PDGFs), factores de crecimiento de epidermis (EGFs), péptidos activados de tejido conectivo (CTAPs), factores osteogénicos y análogos, fragmentos y derivados biológicamente activos, de dichos factores de crecimiento. Los elementos de la familia del supergen del factor de transformación de crecimiento (TGF), los cuales son proteínas reguladoras multi-funcionales, son particularmente preferidos. Los miembros de la familia del supergen TGF incluyen factores de transformación de crecimiento beta (por ejemplo, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3); proteína morfogenéticas de huesos (por ejemplo, BMP-1, BMP-

2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); factores de crecimiento de enlace de heparina (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF)); inhibinas (por ejemplo, Inhibina A, Inhibina B); factores de diferenciación de crecimiento (por ejemplo, GDF-1); y Activinas (por ejemplo, Activina A, Activina B, Activina AB).

Los factores de crecimiento pueden ser aislados de fuentes nativas o naturales, tales como de células de mamífero, o pueden prepararse en forma sintética, tal como mediante técnicas de ADN recombinante, o a través de diversos procesos químicos. Además, se pueden utilizar análogos, fragmentos o derivados de estos factores, siempre que exhiban al menos algunas de las actividades biológicas de la molécula nativa. Por ejemplo, los análogos pueden prepararse mediante la expresión de genes alterados mediante mutagénesis específica del sitio u otras técnicas de construcción genética.

Los agentes biológicamente activos pueden ser incorporados en la composición de matriz de sellado mediante mezcla en adiciones. En una modalidad, los agentes activos pueden mezclarse en composiciones de matriz de sellado pulverizada en una forma seca o liofilizada. En otra modalidad, esta mezcla en adiciones puede fijarse sobre el soporte sólido tal como colágeno, tal como se describió anteriormente para las

composiciones de matriz de sellado. En otras modalidades, los agentes pueden incorporarse en las composiciones de matriz de sellado, tal como se describió anteriormente, enlazando estos agentes con los grupos funcionales en el primero o segundo componentes de polímeros sintético. Los procesos para enlazar en forma covalente agentes biológicamente activos, tales como factores de crecimiento utilizando polietilénglicoles activados funcionalmente se describen en la Patente Norteamericana No. 5,162,430, comúnmente asignada presentada el 10 de noviembre de 1992, de Rhee y asociados. Dichas composiciones incluyen preferentemente ligaduras que pueden ser fácilmente biodegradadas, por ejemplo como resultado de degradación enzimática, dando como resultado la liberación del agente activo en el tejido objetivo, en donde ejercerá su efecto terapéutico deseado.

Un método simple para incorporar agentes biológicamente activos que contienen grupos nucleofílicos en la composición de polímero reticulado, implica mezclar el agente activo con el primer componente, segundo componente y el componente que forma un hidrogel antes de su administración en un estado seco. Al momento de la aplicación de la composición de matriz de sellado al defecto de tejido y al momento del contacto con el fluido biológico, el agente biológicamente activo reaccionará con el segundo componente y será reticulado en la matriz reticulada porosa del primer y segundo componentes, conforme

el componente que forma un hidrogel absorbe el fluido biológico. Este procedimiento dará como resultado el enlace covalente del enlace del agente activo a la parte de matriz del componente de polímero reticulado de la barrera de matriz de sellado que se forma, produciendo una composición de liberación sostenida altamente efectiva.

El tipo y cantidad de agente utilizado dependerá, entre otros factores, del sitio y condición particular que serán tratados y la actividad biológica y farmacocinéticas del agente activo seleccionado.

V. Uso de Composiciones de Matriz de Sellado como Bioadhesivos

Las composiciones de matriz de sellado de la presente invención son generalmente adhesivas y se unen fuertemente a tejidos, ya que los grupos electrofílicos del segundo componente reticulable reaccionarán con los grupos nucleofílicos de colágeno en el tejido del sitio objetivo. Algunas composiciones de matriz porosa de la presente invención pueden tener una adhesividad inusualmente alta. Por lo tanto, además de utilizarse como una matriz de barrera para hemostásis, las composiciones de matriz de sellados de la presente invención son útiles como bioadhesivos para unir tejidos mojados o húmedos bajo condiciones fisiológicas. Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "bioadhesivo", "adhesivo biológico", y "adhesivo quirúrgico" se

pueden utilizar de manera intercambiable para comprender composiciones biocompatibles con la capacidad de efectuar una adhesión temporal o permanente entre las superficie de los dos tejidos nativos, o entre una superficie de tejido nativo y una superficie de tejido no nativo o una superficie de un implante sintético. En un método general para efectuar la adhesión de una primera superficie a una segunda superficie, la composición de matriz de sellado (por ejemplo, en forma de lámina o polvo seco) se aplica a una primera superficie. La primera superficie posteriormente se pone en contacto con la segunda superficie, preferentemente en forma inmediata para efectuar la adhesión entre las dos superficies. Al menos una de la primera y segunda superficie es preferentemente una superficie de tejido nativo. Cuando se utiliza un componente que forma un hidrogel, mecánicamente estable en la composición, tal como la gelatina reticulada utilizada en los ejemplo, la matriz porosa resultante exhibe una fuerza mecánica incrementada en forma opuesta a una composición que contiene el primero y segundo componentes reticulables solos. Por lo tanto, la fuerza de adhesión entre las dos superficies de tejido también se incrementa, ya que la capa de la matriz porosa entre los tejidos es menos probable que se separa en forma interna bajo tensiones mecánicas fisiológicas.

Las dos superficies pueden mantenerse juntas manualmente, o utilizando otros medios adecuados, en tanto

que la reacción de reticulación está procediendo hasta su término. La reticulación normalmente se completa de 5 a 60 minutos después de aplica la composición de matriz de sellado. Sin embargo, el tiempo requerido para completar la reticulación, depende de un número de factores, incluyendo los tipos y pesos moleculares del primero y segundo componentes reticulables y más particularmente, las concentraciones efectivas de los dos componentes en el sitio objetivo (por ejemplo, las concentraciones mayores dan como resultado tiempos de reticulación más rápidos).

Al menos una de las primeras y segundas superficies es preferentemente una superficie de tejido nativo. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "tejido nativo" comprende tejidos biológicos que son nativos para el cuerpo del paciente específico que está siendo tratado. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "tejido nativo" comprende tejidos biológicos que han sido elevados o eliminados de una parte del cuerpo de un paciente para implante a otra parte del cuerpo del mismo paciente (tal como autoinjertos de hueso, autoinjertos de partes de la piel, etc.). Por ejemplo, las composiciones de algunas modalidades de la presente invención se pueden utilizar para adherir una pieza de piel de una parte del cuerpo del paciente a otra parte del cuerpo, como en el caso de una víctima de quemadura.

La otra superficie puede ser una superficie de tejido

237

nativa, una superficie de tejido no nativo o una superficie de un implante sintético. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "tejido no nativo" comprende tejidos biológicos que han sido eliminados del cuerpo de un paciente donante (quien puede ser de la misma especie o una especie diferente a la del paciente receptor) para implantarse en el cuerpo de un paciente receptor (por ejemplo, trasplante de tejido y órgano). Por ejemplo, las composiciones de polímero reticulada de la presente invención se pueden utilizar para fijar una válvula de corazón de xenoinjerto en el corazón de un paciente y sellada alrededor de la válvula del corazón para evitar la filtración.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "implante sintético" comprende cualquier material biocompatible proyectado para implantarse en el cuerpo de un paciente no comprendido en las definiciones anteriores en cuanto a tejido nativo y tejido no nativo. Los implantes científicos incluyen, por ejemplo, vasos sanguíneos artificiales, válvulas cardiacas, órganos artificiales, prótesis de huesos, lenticulos implantables, injertos vasculares, stens y combinaciones de stent/injerto, etc.

VI. Uso de Composiciones de Matriz de Sellado para Evitar Adhesiones

Otro uso de las composiciones de sellado de la presente invención, es recubrir los tejidos con el objeto de prevenir la formación de adhesiones después de cirugía o lesión u órganos internos. En un método general para recubrir tejidos para evitar

238

la formación de adhesiones después de cirugía, el primero y segundo polímero sintéticos se mezclan con el polímero reticulable hidratable o se mezclan previamente, posteriormente se aplica una capa delgada de la mezcla de reacción a los tejidos que comprenden, rodean y/o están adyacentes al sitio quirúrgico antes de que haya ocurrido la reticulación sustancial entre los grupos nucleofílicos en el primer polímero sintético y los grupos electrofílicos en el segundo polímero sintético. La aplicación de la mezcla de reacción al sitio de tejido puede ser mediante extrusión, rociado, cepillado, salpicado (tal como se describió anteriormente) para composiciones en polvo, colocando una película o lámina delgada de la composición de matriz de sellado sobre el tejido, o mediante otros medios convenientes.

Después de la aplicación de la mezcla de reacción al sitio quirúrgico, se permite que continúe la reticulación in situ antes del cierre de la incisión quirúrgica. Una vez que la reticulación ha llegado al equilibrio, los tejidos que se han puesto en contacto con los tejidos recubiertos no se pegarán a los tejidos recubiertos. En este punto de tiempo, el sitio quirúrgico puede cerrarse utilizando medios convencionales (suturas, etc).

En general, las composiciones que completan la reticulación en un período de tiempo relativamente corto (por ejemplo, 5 a 15 minutos después de la mezcla del primer polímero sintético y el segundo polímero sintético) puede

preferirse para utilizarse en la prevención de adhesiones quirúrgicas, de modo que el sitio quirúrgico pueda ser cerrado relativamente rápido al término del procedimiento quirúrgico. Además, se prefiere que un polímero reticulado hidratable con una fuera mecánica relativamente alta sea utilizada en las composiciones, tal como la gelatina reticulada utilizada en los ejemplos, para incrementar la estabilidad mecánica del recubrimiento.

Los siguientes ejemplos describen la producción y caracterización de un primer componente reticulable con un segundo componente reticulable y un componente que forma un hidrogel, para formar composiciones de matriz de sellado, y establecidas para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo elaborar las modalidades preferidas de los conjugados, composiciones y aparatos, y no pretenden limitar el alcance en lo que a los inventores se refiere como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, peso molecular, etc.) aunque pueden abarcar algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las parte están en peso, el peso molecular es el peso molecular de peso promedio, la temperatura está en grados Centígrados, y la presión está en o es casi presión atmosférica.

290

VII. Ejemplos

Ejemplo 1: Primera y Segunda Composiciones de Componentes para utilizarse en una Matriz de Sellado: Preparación de Composiciones PEG Multi-amino reticuladas

Se prepararon las siguientes soluciones de reserva de diversos PEGs di-amino: Diez (10) gramos de Jeffamina ED-2001 (obtenido en Texaco Chemical Company, Houston, Tex.) se disolvieron en 9 ml de agua. Diez (10) gramos de Jeffamina ED-4000 (también obtenido en Texaco Chemical Company) se disolvieron en 9 ml de agua. 0.1 gramos de PEG di-amino (3400 MW, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.) se disolvieron en 300 µl de agua. Cada una de las tres soluciones PEG di-amino preparadas anteriormente, se mezcló con soluciones acuosas de SC-PEG trifuncionalmente activadas (TSC-PEG, 5000 MW, también obtenida en Shearwater Polymers) tal como se establece en la tabla 1 que se encuentra a continuación.

Tabla 1

Preparación de Composiciones de Polímero Reticulado	
PEG di-amino	TSC-PEG + Solvente Acuoso
50 µl	0 mg + 50 µl agua
50 µl	10 mg + 50 µl PBS
50 µl	10 mg + 100 µl PBS
250 µl	50 mg + 500 µl PBS

Las soluciones de PEG de di-amino y TSC-PEG se mezclaron utilizando un mezclado de jeringa a jeringa. Cada uno de los materiales se extruyó de la jeringa y se dejó ajustar

durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Cada uno de los materiales formó un gel. En general, los geles se volvieron más blandos con el contenido de agua en incremento; los geles que contienen la mínima cantidad de solvente acuoso (agua o PBS) fueron los más firmes.

Ejemplo 2: Primera y Segunda Composiciones de Componentes para utilizarse en una Matriz de Sellado: Preparación de Composiciones de Poli(lisina) Reticulada

Diez (10) miligramos de bromhidrato de poli-L-lisina (8,000 MW, obtenido en Peninsula Laboratories, Belmont, Calif.) en 0.1 ml de amortiguador de fosfato (0.2M, pH=6.6) se mezcló con 10 mg de SE-PEG tetrafuncionalmente activado (10,000 MW, obtenido en Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.) en 0.1 ml PBS. La composición formó un gel blando casi inmediatamente.

Ejemplo 3: Primera y Segunda Composiciones de Componentes para utilizarse en una Matriz de Sellado: Efecto of pH en la Formación de Gel de Formulaciones de PEG Tetra-amino/SE-PEG Tetra

Los geles que comprenden varias concentraciones de PEG tetra-amino y SE-PEG tetra en un pH de 6, 7, y 8 se prepararon el platos de peltre. Después del mezclado del PEG tetra-amino y SE-PEG tetra, los platos se inclinaron en forma repetida; el tiempo de gelatinización se consideró como el punto en el cual se originó que la formulación fluyera. El efecto del pH en el tiempo de gelatinización de diversas formulaciones PEG tetra-

242

amino/SE-PEG tetra a temperatura ambiente se muestra en la tabla 2, que se encuentra a continuación.

Tabla 2

Efecto del pH en la Formación de Gel de Formulaciones PEG Tetra-amino/SE-PEG Tetra

PEG Tetra-amino (mg/ml)	SE-PEG Tetra Conc. (mg/ml)	pH	Tiempo de gelatinización
20	20	6	>90.0 min.
20	20	7	20.0 min.
20	20	8	1.4 min.
50	50	6	24.0 min.
50	50	7	3.5 min.
50	50	8	10.0 seg.
100	100	6	9.0 min.
100	100	7	47.0 seg.
100	100	8	10.0 seg.
200	200	6	2.0 min.
200	200.	7	9.0 seg
200	200	8	5.0 seg.

El tiempo requerido para la formación de gel disminuyó con el pH en incremento y las concentraciones PEG tetra-amino y SE-PEG tetra en incremento.

Ejemplo 4: Evaluación de Materiales de Componente que Forman un Hidrogel y Métodos de Reticulación y Medida de Porcentaje de Expansión.

Las partículas de gelatina se dejaron expandir en un amortiguador acuoso (por ejemplo, 0.2 M fosfato de sodio, pH 9.2) que contiene un agente de reticulación (por ejemplo, 0.005 a 0.5% en peso de glutaraldehído). La mezcla de reacción se mantuvo refrigerada durante la noche y posteriormente se enjuagó tres veces con agua desionizada, dos veces con alcohol etílico, y se dejó secar a temperatura ambiente. La gelatina reticulada, seca se re-suspendió en un amortiguador

243

acuoso en una baja concentración de sólidos (2-3%) a temperatura ambiente durante un período de tiempo fijo. El amortiguador estuvo en un exceso sustancial de la concentración necesaria para expansión de equilibrio y se presentaron dos fases (una fase de hidrogel y un amortiguador). La suspensión que contiene el hidrogel húmedo se filtró posteriormente aplicando vacío en una membrana de filtro de corte nominal de 0.8 μm (Millipore, Bedford, Mass.). Después de la eliminación del amortiguador extraño, el peso combinado del gel húmedo retenido y la membrana de filtro húmeda fue registrado. El hidrogel y la membrana posteriormente se secaron a una temperatura de aproximadamente 120°C durante al menos dos horas, y el peso combinado del residuo de hidrogel seco y la membrana de filtro seca fue registrado. También se realizaron varias medidas de muestras de la membrana de filtro húmedo sin residuo de hidrogel y la membrana de filtro seco sin hidrogel, y se utilizaron para deducir el peso neto del hidrogel húmedo y el hidrogel seco. Posteriormente se calculó el "porcentaje de expansión" como se indica a continuación:

Porcentaje de expansión = 100 X [(peso húmero de hidrogel – peso seco de hidrogel)/peso seco de hidrogel].

Se llevaron a cabo medidas de expansión al menos por triplicado y se promediaron para una muestra determinada de gelatina. El valor de porcentaje de expansión para muestras re-

suspendidas en el amortiguador durante de 18 a 24 horas antes de medir el peso húmedo, se definió como la "expansión de equilibrio".

Los materiales de gelatina reticulada resultantes mostraron valores de expansión de equilibrio dentro del rango de 400% a 1300%. El grado de expansión de equilibrio dependió del método y grado de reticulación.

Ejemplo 5: Componentes que Forman un Hidrogel para Utilizarse en la Matriz de Sellado: Producto Polimérico Reticulado Hidratable, Fragmentado Compuesto de Gelatina Reticulada Utilizando EDC

La gelatina (Atlantic Gelatin, General Foods Corp., Woburn, Mass.) se dejó disolver en agua destilada en un contenido de sólidos de 1 a 10% (p/p) (más preferentemente 8%) a una temperatura de 70°C. Posteriormente se agregó 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma, St. Louis, Mo.) en 0.2% a 3.5% (o 0.2% a 0.3%). El hidrogel resultante formado durante la agitación se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. El hidrogel se secó utilizando sistema seco por congelación Freezone 12 (Labconco, Mo.) y se molió finamente utilizando un mezclador Waring Blender modelo No. 31BC91 (VWR, Willard, Ohio). La composición polimérica seca se cargó posteriormente en jeringas y se equilibró con un amortiguador. La expansión en equilibrio se determinó para ser de al menos 1000%. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Gelatina (mg)	EDC	Expansión (%)
500 (8%)	13.5 mg (0.25%)	1080
500 (8%)	13.5 mg (0.25%)	1126
100 (7.4%)	0.945 mg (0.35%)	1620
100 (7.4%)	9.45 mg (3.5%)	1777

Ejemplo 6: Componentes que Forman un Hidrogel para Utilizarse en una Matriz de Sellado: Producto Polimérico Reticulado Hidratable, Fragmentado Compuesto de Gelatina y Acido Poli(L)Glutámico, Reticulado Utilizando EDC

Se dejó disolver gelatina (Atlantic Gelatin, General Foods Corp., Woburn, Mass.) en agua destilada en un contenido de sólidos de 1 a 10% (p/p) (más preferentemente 6 a 8%) a una temperatura de 70°C. Posteriormente se agregaron de 0 a 10% (p/p) (más preferentemente 2-5%) ácido Poli(L) glutámico (PLGA) (Sigma, St. Louis, Mo.) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma) en 0.2 a 3.5% (o 0.2 a 0.4%). El hidrogel resultante formado en la agitación se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. El hidrogel se dejó expandir en solución salina en exceso durante un período de tiempo fijo (por ejemplo 20 horas). El hidrogel se filtró posteriormente aplicando vacío en una membrana de filtro (Millipore, Bedford, Mass.). Se determinó la expansión de equilibrio para ser de al menos el 1500%. Los resultados se muestran en la tabla 4.

246

Tabla 4

Gelatina (mg)	PLGA (mg)	EDC	Expansión (%)
375 (6%)	125 (2%)	13.5 mg (.25%)	1510
375 (6%)	125 (2%)	13.5 mg (.25%)	1596
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2535
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2591
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2548
250 (4%)	250 (4%)	13.5 mg (.25%)	2526
200 (3.2%)	300 (4.8%)	13.5 mg (.25%)	2747
200 (3.2%)	300 (4.8%)	13.5 mg (.25%)	2677
200 (3.2%)	300 (4.8%)	13.5 mg (.25%)	2669
150 (2.4%)	350 (5.6%)	13.5 mg (.25%)	3258
150 (2.4%)	350 (5.6%)	13.5 mg (.25%)	3434
150 (2.4%)	350 (5.6%)	13.5 mg (.25%)	3275
75 (5.5%)	25 (1.9%)	0.945 mg (0.35%)	2437
50 (3.7%)	50 (3.7%)	0.945 mg (0.35%)	2616
25 (1.9%)	75 (5.5%)	0.945 mg (0.35%)	5383
75 (5.5%)	25 (1.9%)	9.45 mg (3.5%)	1976
50 (3.7%)	50 (3.7%)	9.45 mg (3.5%)	2925
25 (1.9%)	75 (5.5%)	9.45 mg (3.5%)	4798

Ejemplo 7: Componentes que Forman un Hidrogel para Utilizarse en la Matriz de Sellado: Producción de un Hidrogel Polimérico Reticulado Hidratable Fragmentado

Se agitó Corium de bovino (Spears Co. PA) en una solución de hidróxido de sodio acuoso (Spectrum Chemical Co., CA) (0.1 M a 1.5 M, ó 0.4 a 1.2M) durante un período de una a 18 horas (o de una a cuatro horas) a una temperatura de 2°C a 30°C (preferentemente 22°C a 30°C). Posteriormente la pasta de "corium" se neutralizó utilizando un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico (Spectrum Chemical Co., CA.) y la fase de líquido neutralizada

se separó posteriormente del "corium" insoluble mediante filtración a través de un cernidor. Posteriormente el "corium" se lavó con agua no pirogénica y un alcohol tal como alcohol isopropílico (Spectrum Chemical Co., CA.). Después de tres a doce lavados, se suspendió el "corium" en agua no pirogénica y posteriormente el "corium", la pasta de agua se calentó a una temperatura de 50°C a 90°C preferentemente 60°C a 80°C, para gelatinizar en forma térmica el "corium". Durante el ciclo de gelatinización, se ajustó el pH del coreo, la pasta de agua y se controló de pH 3 a pH 11, o pH 7 a pH 9. Asimismo, el "corium" insoluble en la pasta, puede ser interrumpido mediante agitación y/o homogenización. La interrupción puede ocurrir antes o después del ciclo de gelatinización térmico. La gelatinización térmica se llevó a cabo durante de una a seis horas. Después de la gelatinización, la pasta se aclaró mediante filtración. La pasta de gelatina se le extrajo el agua secando en aire a una temperatura de 15°C a 40°C, preferentemente 20°C a 35°C. La gelatina seca, en donde seco, implica un contenido de humedad menor al 20% en peso, se interrumpió posteriormente mediante molido.

Se agregó gelatina seca a una solución acuosa fría (temperatura de 5°C a 15°C) que contiene glutaraldehído (Amresco hie, OH.) en 0.0025% a 0.075% en peso y en un pH de entre 7 y 10. La concentración de gelatina en esta solución fue de entre 1% y 10% en peso. El glutaraldehído retícula los

gránulos de gelatina durante un período de una a 18 horas después de lo cual la gelatina se separa de la fase acuosa mediante filtración o descimentación. Las partículas de gelatina se agregaron posteriormente a una solución acuosa que contiene 0.00833% a 0.0667% en peso de borohidruro de sodio (Spectrum Chemical Co., CA.) con la concentración de gelatina estando nuevamente entre 1% y 10% en peso y estando el pH entre 7 y 12, o entre 7 a 9. Después de una a seis horas, la gelatina reticulada se separó de la fase acuosa mediante filtración o sedimentación. Posteriormente la gelatina se puede re-suspender en agua no pirogénica con la concentración de gelatina estando entre 1% y 10% en peso para eliminar la reticulación residual y los agentes de reducción, seguido de separación de la fase acuosa mediante filtración o sedimentación. La recolección final de la gelatina reticulada se realizó en una malla de filtro o cernidor, y a la gelatina se le proporcionó un enjuagado final con agua no pirogénica. La gelatina reticulada, húmeda se colocó posteriormente en una cámara de secado a una temperatura de 15°C a 40°C. La gelatina reticulada, seca (por ejemplo, gelatina reticulada con un contenido de humedad debajo de 20% en peso) se eliminó de la cámara de secado y posteriormente se molió utilizando un molino de molido, mecánico para producir un polvo con una distribución de tamaño de partícula típica de 0.020 mm a 2.000 mm.

Ejemplo 8: Polvo de Sellado Hemostático Seco, de Acción Rápida

Se preparó un polvo de sellado hemostático seco de acción rápida, combinando un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable, y un componente que forma un hidrogel. El primer polímero reticulable (PEG-A) fue un polvo de PEG-succinimidilo, el segundo polímero reticulable (PEG-B) fue un polvo de PEG-tiol, y el componente que forma un hidrogel fue un polvo de gelatina reticulada.

Ejemplo 9: Almohadilla de Sellado Seco de Acción Rápida

Se preparó una almohadilla de sellado seco de acción rápida, combinando un primer componente reticulable, un segundo componente reticulable, y un componente que forma un hidrogel. La composición resultante, una composición de matriz de sellado pulverizada, se colocó en una esponja de colágeno liofilizada, y se calentó a una temperatura de 60-70°C durante aproximadamente 1 a 2 minutos. La matriz de polvo seca se derritió ligeramente con este calor, fijándola a la superficie de la esponja de matriz, formando de esta manera una almohadilla de matriz de sellado. Como alternativa, la composición de matriz de sellado se puede fijar al soporte utilizando agentes de enlace, u otros excipientes conocidos en las técnicas farmacéuticas. En general, la técnica utilizada para aplicar a la composición de matriz de sellado al soporte puede depender del primero y segundo componentes, y el componente que forma un

hidrogel de la composición de matriz sellado. Las modalidades de la almohadilla de matriz del sellado de la presente invención proporcionan un formato conveniente a través del cual las composiciones de matriz de sellado pueden ser manejadas y suministradas a un sitio quirúrgico a través de una esponja u otro medio de soporte.

Ejemplo 10: Polvo de Sellado para Tratar Función de Arteria Esplénica

Las figuras 7A a 7E ilustran la aplicación de una composición de matriz de sellado para tratar una función de arteria esplénica de acuerdo con modalidades de la presente invención. El cerdo fue heparinizado hasta aproximadamente 3X la línea de base. Tal como se ilustra en la figura 7A, se indujo en forma quirúrgica una función de arteria esplénica en un cerdo con una agua 700 de 8g. Después de la punción, se observó un sangrado en exceso 705 de la arteria 710. Tal como se muestra en las figuras 7B y 7C, se aplicaron aproximadamente 700 mg de la composición de matriz de polvo de sellado 720 al sitio de punción a través de una jeringa 730, y se comprimieron suavemente, y se colocaron contar el sitio durante dos minutos utilizando un dedo con guante 740. El polvo de sellado formó un coágulo 750 el cual se observó que detuvo en forma adecuada el sangrado. El sitio fue irrigado en 5 minutos posteriores a la aplicación con un aparato de irrigación 760, tal como se ilustra en la figura 7D, y se lavó una

composición de polvo en exceso. Cuando el coágulo se sujetó con fórceps, pareció adherirse muy bien al tejido y tuvo una buena integridad. Tal como se muestra en la figura 7E, el coágulo 750 se eliminó el 44 minutos posteriores a la aplicación, desprendiendo con fórceps 770, y se observó un sangrado reanudado 715.

Ejemplo 11: Polvo de Sellado Para Tratar Resección Hepática

Las figuras 8A a 8E ilustran la aplicación de una composición de matriz de sellado para tratar una resección hepática de acuerdo con modalidades de la presente invención. Se heparinizó un cerdo aproximadamente a la línea de base 3X. Tal como se muestra en la figura 8A, la punta 800, o borde, del lóbulo medio del hígado 805, se re-seccionó en el cerdo utilizando tijeras 810. Después de la resección, se observó un sangrado excesivo 815 procedente del sitio. Tal como se ilustra en la figura 8B, se aplicaron al sitio aproximadamente 6 ml (2 g) de una composición de matriz de sellado 820, y se mantuvo en su lugar con la punta de una jeringa 825 durante 2 minutos. Tal como se muestra en la figura 8C, se puede utilizar un dedo con guante para comprimir o retener el polvo contra al lesión. Se observó que el polvo de sellado formó un coágulo 835 el cual detuvo en forma adecuada el sangrado. El sitio se irrigó a los 8 minutos posteriores de la aplicación con un aparato de irrigación 840, tal como se ilustra en la figura. 8D. Cuando se

252

sujetó el coágulo con fórceps, pareció adherirse muy bien al tejido y tuvo una buena integridad. El coágulo 835 fue eliminado a los 28 minutos posteriores a la aplicación, mediante desprendimiento con fórceps 845, y se observó la reanudación del sangrado 850.

Ejemplo 12: Polvo de Sellado para Tratar Lesión Esplénica

Se indujo quirúrgicamente una lesión esplénica en un cerdo con una función de tejido para biopsia de 6 mm, y el centro del tejido se eliminó con tijeras. El cerdo se heparinizó aproximadamente a la línea de base 2.5X. Después de la función del tejido, se observó un sangrado excesivo procedente del vaso. Se aplicaron a la función aproximadamente 700 mg (2 ml) de un polvo de composición matriz de sellado, utilizando el borde de una jeringa de 12 ml. No se utilizó el compresor para retener el material en su lugar. Se observó que el polvo de sellado formó un coágulo el cual detuvo en forma adecuada el sangrado. El sitio se irrigó a los 4 minutos posteriores a la aplicación. Cuando el coágulo se sujeto con fórceps, pareció adherirse muy bien al tejido y tuvo una buena integridad. El coágulo se eliminó a los 25 minutos posteriores a la aplicación, mediante desprendimiento, y se observó la ranuración del sangrado.

Ejemplo 13: Prueba de Tensión Mecánica

Se preparó la barrera de matriz de sellado haciendo reaccionar de 0.60 a 0.65 g de un polvo de composición matriz

de sellado con 1 ml de plasma de porcino en un molde de plástico. La mezcla se dejo curar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Ambos extremos de un bloque de gel de 3 x 1 x 0.3 cm se taparon con un pegamento de cianoacrilato para crear espacios de sujeción para la separación (1 x 1 cm). Los extremos de la cinta fueron sujetados con los sujetadores montados previamente. Se utilizó un probador Chatillon TCD2000 para aplicar una prueba de tensión normal a la forma del gel rectangular hasta la fractura, para determinar la fuerza de tensión. Se midieron la fuerza pico (N) y la deflexión en la carga máxima (mm) para extender el gel hasta que se rompiera. El área de superficie efectiva del gel fue de 1 x 0.3 cm, y la longitud efectiva original del gel fue de 1 cm. La resistencia a la tensión del gel de sellado fue de aproximadamente 15.3 N/cm^2. Se llevó a cabo una prueba similar en una composición de gel que incluye un primer componente reticulable y un segundo componente reticulable, en la ausencia de un componente que forma un hidrogel, y la resistencia a la tensión observada fue de aproximadamente 5.1 N/cm^2.

Ejemplo 14: Prueba de Resistencia al Desprendimiento

En algunas modalidades, un polvo mezclado incluye un primer y segundo componentes reticulables y un componente que forma un hidrogel, y se auto-polimeriza conforme se disuelve en un líquido fisiológico tal como sangre u otro fluido

corporal. El material puede adherirse en forma ajustada a un tejido u otro tipo de aplicación mediante enlace covalente. La fuerza mecánica de la adherencia del tejido puede revisarse utilizando una guía mecánica para extraer una matriz de sellado de un tejido tal como la piel. En este ejemplo, se corrieron múltiples prueba de tensión después de la formación de barreras de la matriz de sellado como se indica a continuación. Se preparó una serie de tres polvos componentes que contienen un primer componente reticulable (glutarato de tetra-succinimidilo de éter de poli (etilenglicol) de pentaeritritol) y un segundo componente reticulable (tetra-tiol de éter de poli (etilenglicol) de pentaeritritol), y una gelatina reticulada (FloSeal™), mezclando los componentes reticulables y la gelatina reticulada en tres diferentes concentraciones (10%, 20%, y 30% del componente reticulable). Se agregaron de aproximadamente 0.40 g hasta aproximadamente 0.45 g del polvo de tres componentes aproximadamente 0.6 ml del plasma de porcino en un molde de plástico de 3x1x0.3 cm colocado en la parte superior de una muestra de piel de pollo, y se dejó curar a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos. Se formó una barrera de matriz de sellado y se adhirió fuertemente a la piel. La barrera de matriz de sellado formada se pegó a una placa que se sujeto a un probador Chatillon TCD200. Se midió la fuerza de pico máxima (N) conforme la piel se extrajo de la barrera de matriz de sellado. Un incremento en

la resistencia de adhesión fue observado para correlacionarse casi linealmente con un incremento en concentración de la mezcla PEG (primero y segundo componentes reticulables). Los resultados se muestran en la tabla 4A.

Tabla 4A

Concentración de mezcla	Piel	Velocidad mm/min.	Tiempo de curación min.	Parte de extracción, cm	Fuerza N
10%	Pollo	12.7	80	1	2.00
10%	Pollo	12.7	80	1	2.10
10%	Pollo	12.7	80	1	1.70
					1.93 promedio
					0.21 desviación estándar
20%	Pollo	12.7	60	1	3.24
20%	Pollo	12.7	60	1	2.13
20%	Pollo	12.7	60	1	3.41
20%	Pollo	12.7	70	1	2.10
					2.72 promedio
					0.7 desviación estándar
30%	Pollo	12.7	70	1	3.86
30%	Pollo	12.7	70	1	7.86
30%	Pollo	12.7	80	1	1.53
30%	Pollo	12.7	80	1	2.65
30%	Pollo	12.7	80	1	2.59
30%	Pollo	12.7	80	1	3.83
30%	Pollo	12.7	105	1	3.32
30%	Pollo	12.7	107	1	3.00
					3.58 promedio
					1.89 desviación estándar

Ejemplo 15: Preparación de Colágeno Fibrilar para Soporte de Esponja de Almohadilla Fusionada

Se preparó una primera muestra de colágeno fibrilar como se indica a continuación. Se disolvieron 40 g de NaOH en 450 cc H_2O a una temperatura de 25^{0}C. Se agregaron

aproximadamente 50 g de corium de bovino rebanado a la solución NaOH. El corium se agitó durante 80 minutos. La solución NAOH se decantó y el corium se lavó con H_2O. El corium se disolvió con 2M HCl para llevar el pH a un rango de 2.3 a 2.4. Se continuó con la agitación durante 18 horas. Se trituraron 1250 ml de colágeno grueso en solución (CIS) en un pH de 7.25 con 1M NaOH a una temperatura de 18^0C. Se formó una fibra de colágeno durante un período de 10 horas y se filtró. Se precipitaron 240 ml con un pH de 7.4, y se reticularon con 33 μl de una solución de glutaraldehído al 25% (GA) a una temperatura de 8^0C durante 23 horas. Se liofilizó el colágeno fibrilar utilizando un liofilizador Virtis mediante un ciclo de recetario.

Se preparó como se indica a continuación una muestra de un segundo colágeno fibrilar. El colágeno fibrilar se reticuló utilizando 240 g de una solución viscosa (por ejemplo, CIS). La solución s diluyó agregando 60 cc de H_2O. El pH se elevó a 9.2 agregando aproximadamente 1.8 cc de 2M NaOH. La temperatura de la solución se ajustó a 8^0C, y se agregaron 33 μl de 25% GA. La solución se agitó durante 23 horas, y se obtuvieron aproximadamente 54 g de las fibras precipitadas. El colágeno fibrilar se liofilizó utilizando un liofilizador Virtis mediante un ciclo de recetario.

Ejemplo 16: Des-Amortiguación del Componente que forma un Hidrogel

257

En algunas modalidades, es deseable eliminar la sal de fosfato de un componente que forma un hidrogel tal como FloSeal™ de modo que el pH del componente que forma un hidrogel pueda ser influenciado fácilmente por el líquido circundante. La reticulación *in situ* de los componentes que forman un hidrogel pueden ayudar a que un compuesto de matriz de sellado se adhiera al tejido después de la aplicación. En algunos casos, la adhesión puede ser más efectiva en ciertos valores de pH. Por ejemplo, algunos materiales a base de gelatina pueden pasar por adhesión más rápidamente en valores de pH menores a 6 ó 7. Se lavó FloSeal™ con H_2O en una proporción de 1:50, y la pasta tuvo un pH ajustado o se acidificó con 0.01M HCl ó 0.01M NaOH a un pH entre 2 y 7. La pasta de gelatina húmeda se filtró y se secó en un horno de aire forzado a una temperatura de 32^0C durante de 12 a 20 horas y se molió ligeramente con un mortero y martillo. Se agregó un polvo de gelatina seco a una solución de PEG mezclado para la reticulación *in situ*. Se mezcló una pasta durante 30 segundos y se aplicó inmediatamente a la superficie de un papel de pesado saturado completamente con 25 mM de amortiguador de fosfato en un pH 7.4. Se registraron los tiempos de polimerización, y los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Muestra	pH de FloSeal™	PH de amortiguador para PEG (A/B)	Tiempo de gelatinización (minutos)
1	7.6	6	3
2	7.6	6	5
3	6.0	6	30
4	6.5	6	20
5	4.0	6	90

Ejemplo 17: Preparación de la Pasta PEG

En una modalidad, se mezclaron completamente mediante agitación 0.8 g de polvo de PEG-succinimida y 0.8g de polvo de PEG-tiol, y se colocaron en un frasco de fondo redondo de 100 ml el cual se cargó completamente con N_2. El polvo mezclado se derritió en un baño de aceite a una temperatura de 40°C-50°C con agitación manual suave durante 30 minutos, y se dejó enfriar. Se eliminó una película sólida del frasco utilizando una espátula. En otra modalidad, se disolvió un polvo mezclado de PEG-succinimida y PEG-tiol en una solución ácido de colágeno (por ejemplo, 0.3%) o gelatina (por ejemplo, 2%), y se liofilizó. Se considera que el colágeno fibrilar o la gelatina pueden ayudar a aflojar la matriz y mejorar el manejo de la pasta PEG.

En una composición comparativa, se disolvieron 1.2 g de fibra de colágeno en 100 cc con un pH 2 de HCl, se templó en un baño con agua a una temperatura de 35^{0}C durante 1 a 2 horas, y se diluyó pH 2 HCl para lograr un producto CIS al 0.3%. Se disolvieron 0.2g PEG-succinimida y 0.2g PEG-tiol en 2 cc del CIS al 0.3%. La mezcla resultante se vertió en una charola, y se liofilizó a través de un ciclo de 22 horas para

producir una pasta PEG. En otra modalidad, se disolvieron 2 g de gelatina en 100 cc pH 2 HCl, en un baño de agua a una temperatura de 35^{0}C. Se disolvieron 4 g de una mezcla de polvo PEG de dos componentes en 2 cc de la solución de gelatina, y se liofilizó para proporcionar una pasta PEG.

En una modalidad relacionada, las pastas PEG se prepararon liofilizando soluciones mezcladas de PEG-SG, PEG-SH, y colágeno con un pH de 2.0. Se llevaron a cabo estudios en animales en cápsulas de hígado con abrasión en un modelo de porcino heparinizado. Se agregaron dos gotas de amortiguador de fosfato 0.2M (pH 9.0) a la superficie del hígado, la cual estuvo sangrando ligeramente. Se colocó una pieza de la pasta en el sitio sin compresión alguna. A los 5 y 10 minutos, se probó la adhesión de cada una de las pastas PEG al sitio. Se observó que la actividad de PEG-SG no fue reducida durante el proceso de preparación, y que las pastas PEG se adhirieron al tejido de hígado con abrasión mediante enlace covalente. La composición y desempeño i*n vivo* de las muestras probadas se resumen en la tabla 6.

Tabla 6

Muestra	Concentración de PEG-GC (%, p/v)	Concentración de PEG-SH (%, p/v)	Concentración de gelatina (%, p/v)	Concentración de CIS (%, p/v)	% de colágeno en la masa en PEG después de liofilización	Desempeño *in vivo* (adhesión)
1	20	20	2	0	1.0%	Excelente
2	20	20	0	029	1.5%	Excelente
3	20	20	0	0.52	2.6%	Bueno

Ejemplo 18: Material de Pasta PEG Pulverizado

Se combinaron 400 mg de CoSeal™ premezclado, 1 g

FloSeal™ (por ejemplo, pH 7.1 a 9.5; diámetro de partícula 70 a 400 μm), y 2 a 3 cc de H_2O en una pasta mezclada, y se liofilizaron bajo un ciclo de 22 horas hasta formar una pasta. Tal como se ilustra la figura 9, la pasta 900 se rompió posteriormente 910, se trituró y se rompió en forma de polvo 920, y se colocó en una jeringa 930 (por ejemplo, jeringa de 5 cc o 10 cc). La punta 940 del barril de la jeringa se eliminó con una cuchilla, la mezcla pulverizada 920 se aplicó a un sitio de lesión 950, y se observó actividad de sellado *in situ*. Los resultados de ejemplo se describen en los Ejemplos 10-12. En otra modalidad, la pasta se preparó a partir de una pasta de tres componentes tal como se describe en la tabla 7.

Tabla 7

Muestra	PEG de dos componentes pre-mezclados	FloSeal™	H_2O	PEG %
1	360 mg	500 mg	2.3 cc	42%
2	200 mg	500 mg	1.2 cc	48%

Los resultados de prueba y las formulaciones de ejemplo de acuerdo con algunas modalidades, revelaron las siguientes características mostradas en la tabla 8.

Tabla 8

Muestra	pH de FloSeal™	Peso de FloSeal™ (proporción)	Peso de PEG mezclado	Diámetro de partícula de FloSeal™
1	9.2	500 mg	2.5 g	294 µm
2	7.7	500 mg	2.5 g	308 µm

Ejemplo 19: Preparación de Almohadillas Fusionadas de la Composición de Matriz de Sellado

Se prepararon almohadillas PEG con pre-mezclas fundidas

261

de CoSeal™. Se prepararon polvos de tres componentes mezclando el polvo FloSeal™ con diferentes valores de pH y CoSeal™ mezclados previamente (por ejemplo, ambos componentes PEG en forma de polvo) de acuerdo con diversas proporciones de peso. Se utilizaron esponjas de colágeno liofilizado como una almohadilla de soporte para montar la mezcla de tres componentes fundidos. En una modalidad tal como se ilustra en la figura 10, se colocaron de 0.5 a 1 g de una composición de matriz de sellado 1000 en la parte superior de una esponja de $3X3cm^2$ 1010. La esponja y la matriz de sellado se hornearon en un horno a una temperatura de 60 a 70^0C durante 1 a 2 minutos, y se dejaron enfriar en un disecador para minimizar o evitar el contacto con el aire. Se observó que el polvo de la matriz del sellado forma una película gruesa y se adhiere a la esponja para formar una almohadilla fusionada 1020. En modalidades relacionadas, se prepararon diversas esponjas, teniendo cada una dimensiones de $3X3X0.3cm^3$. Se recubrieron algunas esponjas con una mezcla de tres componentes de un primero y segundo componentes reticulables y un componente que forma un hidrogel. Algunas esponjas se recubrieron únicamente con una mezcla de dos componentes del primero y segundo componente reticulables. Todas las almohadilla fusionadas se probaron *in situ* en un sitio de lesión de hígado. Los resultados de muestran en la tabla 9.

262

Tabla 9

Muestra de esponja de pasta fusionada	Formulaciones de tres componentes				Desempeño *in vivo*
	pH de FloSeal™	FloSeal™ peso.(g)	CoSeal™ peso.(g)	Peso de tres componentes montados en la esponja (g)	Flujo de sangrado
1	9	0.5	0.2	0.4	Mínimo o sin sello
2	8	0.5	0.2	0.4	Mínimo o sin sello
3	8	0.5	0.2	0.4	Mínimo o sin sello
4	n/a	0	0.5	0.4	Mínimo o sin sello
5	n/a	0	0.5	0.4	Mínimo o sin sello
6	9	1	0.4	0.4	Sello

En modalidades relacionadas, se prepararon varias composiciones pulverizadas. Algunas composiciones incluyeron una mezcla de tres componentes del primero y segundo componentes reticulables, y un componente que forma un hidrogel. Algunas composiciones incluyeron únicamente una mezcla de dos componente del primero y segundo componentes reticulables. Todas las composiciones se probaron *in situ* en un sitio de lesión hepática. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Muestra	Formulaciones de tres componentes				Desempeño *in vivo*
	pH de FloSeal™	FloSeal™ peso.(g)	CoSeal™ peso.(g)	Peso de los tres componentes aplicados a la lesión (g)	Flujo de sangrado
1	9	0.5	0.2	0.4 a 0.5	Mínimo o sin sello
2	8	0.5	0.2	0.4 a 0.5	Mínimo o sin sello
3	9	0.5	0.2	0.4 a 0.5	Mínimo o sin sello
4	n/a	0.	0.5	0.4 a 0.5	Mínimo o sin sello
5	n/a	0.01 de lisina	0.5	0.4 a 0.5	Mínimo o sin sello

Ejemplo 20: Efecto de Radiación-*γ* en Desempeño *In Vivo*

Se prepararon composiciones de matriz de sellado pulverizadas y composiciones de matriz de sellado montadas en esponja y algunas fueron radiadas con *γ* para determinar los

263

efectos de los rayos-*y* en el desempeño *in vivo*. No se observaron efectos, tal como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11

Muestra de esponja	Formulaciones de tres componentes				Desempeño *in vivo*
	pH de FloSeal™	FloSeal™ peso.(g)	CoSeal™ peso.(g)	Peso de los tres componentes montados en la esponja (g)	Flujo de sangrado
1	9	0.5	0.2	0.7	Sello
2	8	0.5	0.2	0.7	Sello
3 (*y*)	9	0.5	0.2	0.7	Sello
4 (*y*)	8	0.5	0.2	0.7	Sello
5	9	0.5	0.2	0.7	Sello
6	8	0.5	0.2	0.65	Sello
7	8	0.5	0.2	0.6	Sello
Muestra de polvo	Formulaciones de tres componentes				Desempeño *in vivo*
	pH de FloSeal™	Flujo de sangrado	CoSeal™ peso.(g)	Peso de los tres componentes aplicados a la lesión (g)	Flujo de sangrado
1		0.5	0.2	0.5	Sello
2		0.5	0.2	0.5	Sello
3 (*y*)		0.5	0.2	0.5	Sello
4 (*y*)		0.5	0.2	0.5	Sello

Ejemplo 21: Efecto de pH en Desempeño *In Vivo*

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* para evaluar el efecto de los valores de pH de un componente que forma un hidrogel, y el efecto en los métodos de aplicación manual, en reticulación *in situ*. Se compararon un Floseal™ con un pH de 6.75 en una composición de sellado final, y un FloSeal™ con un pH de 9.5 en una segunda composición de sellado. En algunos casos, la composición de matriz de sellado se mantuvo manualmente contra la lesión, y en otros casos, la composición de matriz de sellado se aplicó a o se colocó en la lesión sin retención. La composición que tiene Floseal™ con un pH de 6.75 pareció proporcionar un tiempo de reacción más lento de aproximadamente de 10 a 30 segundos que la composición que

264

tiene Floseal™ con un pH de 9.5. Los resultados de estudio de ejemplo se muestran en la tabla 12. Se considera que el pH del componente que forma un hidrogel puede desempeñar un papel importante en las etapas tempranas de una reacción de reticulación. El pH de un componente que forma hidrogel puede afectar la velocidad de la formación de gel en un ambiente húmedo (por ejemplo cuando el sangrado ya está ocurriendo). En algunos casos, si no ocurre lo suficientemente rápido la reticulación, la composición de sellado puede empujarse fuera del ciclo de lesión.

Tabla 12

Muestra de polvo	Formulaciones de tres componentes				Desempeño *in vivo*	
	pH de FloSeal™	FloSeal™ peso.(g)	CoSeal™ peso.(g)	Peso de tres componentes aplicados a la lesión (g)	Flujo de sangrado	Sitio de aplicación/método
P	7	0.5	0.2	0.5	No sello	Cuadro de hígado (c/s retención)
P	9	0.5	0.2	0.5	Sello	Cuadro de hígado (c/s retención)
P	7	0.5	0.2	0.5	Sello	Cuadro de hígado (c/s retención)
P	9	0.5	0.2	0.5	Sello	Cuadro de hígado (c/s retención)
P	7	0.5	0.2	0.5	Sello	Vena esplénica (c/s retención)
P	9	0.5	0.2	0.5	Sello	Vena esplénica (c/s retención)

Ejemplo 22: Uso de SURGIFOAM™ en la Forma de un Componente que Forma Hidrogel

Se combinaron mezclas de COH102 pulverizado (éter de tetraquis-[1-(1'-oxo-5'succinilpentato)-2-poli(oxietileno)glicol] de pentaeritritol), COH206 pulverizado (éter de tetraquis-[mercaptoetil-poli(oxietileno)glicol] de pentaeritritol), y polvo de gelatina SURGIFOAM™ Absorbable Gelatin (Ethicon, Somerville, NJ) en proporciones de 1:1:2, 1:1:4, y 1:1:8 en peso y se llenaron en jeringas de 5 ml modificadas. Las mezclas resultantes fueron polvos de flujo libre, sustancialmente secos. Para cada composición. Se aplicaron dos gramos con compresión suave a una lesión creada en forma quirúrgica (aproximadamente 1 cm x 1 cm x 0.3 cm de profundidad) en el hígado de un cerdo. Para cada una de las composiciones, se eliminó la compresión después de un minuto. El COH102 y COH206 en cada composición reaccionaron entre sí en el ambiente húmedo de la lesión, creando un hidrogel reticulado que incorporó el polvo SURGIFOAM™ y selló físicamente el sitio de lesión. No se observó sangrado procedente de cualesquiera de los sitios tratados con las composiciones. Después de irrigar las lesiones tratadas con solución salina 5 minutos después de la aplicación, se observó un nuevo sangrado. La revisión de los sitios tratados dos horas después tampoco mostró un nuevo sangrado.

Ejemplo 23: Desempeño *In vivo* de la Composición de Matriz de Sellado con Agente de Coagulación

Se preparó un polvo de composición de matriz de sellado

que contiene FloSeal™ y CoSeal™ (pre-mezclados) en una proporción en peso de 4:1. En algunas modalidades, esta proporción proporciona un grado de reticulación efectivo para lograr niveles deseados de polimerización química y adherencia de la composición al tejido. Se agregó polvo de trombina al polvo de la composición de matriz de sellado en diversas concentraciones.

La mezcla resultante se probó en un estudio animal que implicó medir las calificaciones de sangrado en los cuadros de hígado y comparar la eficiencia hemostática de la mezcla resultante con composiciones de matriz de sellado que no contenían trombina.

Los materiales de prueba incluyeron 0.1 g de tetraquis[mercaptoetilpoli(oxietileno)éter de pentaeritritol, 0.1 g tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato)-2-poli(oxoetileno)glicol]éter de pentaeritritol, 0.8 g de partículas de gelatina reticulada (FloSeal™), y varias concentraciones (5 k, 2.5 k, 1.25 k, y 0.625 k u/g de trombina. En un experimento de mezclado, los cuatro componentes de la mezcla resultante se mezclaron con un mezclador de rebote. En un experimento de reconstitución, se mezclaron cuatro ml de solución de trombina (1250 u/ml) con 0.8 g de FloSeal y posteriormente se secaron por congelación durante 22 horas. La mezcla seca se mezcló con un polvo de CoSeal™ utilizando un mezclador de rebote. Sin limitarse a alguna teoría en particular, se considera

que la formulación de trombina reconstituida contiene moléculas de trombina que han penetrado en la matriz de FloSeal™, de modo que la trombina puede permanecer en la barrera de la matriz de sellado para aumentar la eficacia hemostática. En un experimento de almohadilla, se preparó una almohadilla montando la mezcla de cuatro componentes resultante (composición de matriz de sellado más trombina) en la parte superior de una esponja Gelfoam, fundiendo la mezcla, y permitiendo que se enfríe y solidifique. La temperatura del horno se ajustó de aproximadamente 60°C a aproximadamente 65°C durante aproximadamente un minuto.

En una prueba *in vivo*, se heparinizó un animal para activar el tiempo de coagulación para alcanzar 3 a 5 veces más que la línea de base. Las formulaciones se revisaron en el espacio de sangrado del cuadro de hígado (1 cm x 1 cm x 0.2 cm), que fue producido quirúrgicamente en un hígado de porcino. La lesión se irrigó inmediatamente después de una lectura de 5 minutos, para eliminar el polvo en exceso. Las áreas de lesiones tratadas se calificaron a los 1, 5, 10 y 30 minutos. Los materiales se polimerizaron al contacto con sangre, posteriormente se adhirieron fuertemente a la lesión. La barrera de la matriz de sellado, selló en forma mecánica las áreas con sangrado para actuar como un sellador mecánico, uniéndose a los tejidos. En una prueba *in vitro*, se calentó trombina a una temperatura de aproximadamente 60°C durante

5 minutos y se encontró como completamente activa. En una almohadilla Gelfoam preparada, se descubrió que se perdió la actividad de trombina.

En la tabla 13 se proporciona el resultado de una evaluación *in vivo* aguda. El sangrado de las lesiones se calificó a partir de "0" como sin sangrado, hasta "4" como sangrado severo. Con base en las calificaciones de sangrado aquí observadas, todas las muestras probadas mostraron no sangrado. No se observó una ventaja significativa a partir de la adición de trombina hasta la composición de la matriz de sellado. El uso de trombina no mostró beneficio alguno en la hemostasis primaria, aunque puede aumentar la hemostasis secundaria/formación de coágulo y curar la herida.

Tabla 13

Lote número	Composición de matriz de sellado	Trombina (unidad/g) Mezclada o reconstituida	1'	5'	10'	20'
1	no trombina	0	0	0	0	
2	con trombina	625, mezclado	0	0	0	0
3	con trombina	2500, mezclado	0	0	0	0
4	con trombina	5000, mezclado	0	0	0	0
5	con trombina	1250, mezclado	0	0	0	0
1	con trombina	0	0	0	0	0
5	con trombina	1250, mezclado	aborto			
5	con trombina	1250, mezclado	0	0	0	0
4	con trombina	5000, mezclado	0	0	0	0
4	con trombina	5000, mezclado	0	0	0	0
1	no trombina	0	0	0	0	0
6	con trombina	625, reconstituido	0	0	0	0
7	con trombina	2500, reconstituido	aborto			
7	con trombina	2500, reconstituido	0	0	0	0
7	con trombina	2500, reconstituido	0	0	0	0
8	no trombina (esponja)	0	0	0	0	0
9	no trombina (esponja)	2500, mezclado	0	0	0	0

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

El efecto de la concentración PEG en la resistencia del gel se muestra en la tabla 14 y en la figura 11, de acuerdo con una modalidad de la presente invención. Se corrieron pruebas de tensión después de la formación del gel. Se prepararon geles permitiendo la reacción del polvo de tres componentes (por ejemplo composición de matriz de sellado que incluye primeros y segundos componentes reticulables y un componente que forma un hidrogel) en moldes de plástico (3x 1x 0.3 cm). Se agregó plasma de porcino (1 ml, animal Baxter número S-264) a un polvo de composición de matriz de sellado (0.60 - 0.65 g) para iniciar la formación del gel, posteriormente se dejó curar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Ambos extremos del gel se taparon con una cinta scotch utilizando pegamento de cianoacrilato para crear los espacios de sujeción para la extracción (1 x 1 cm). A partir de las pruebas de tensión, se midió la fuerza pico (N) y la deflexión en carga máxima (cm) para extender el gel hasta el rompimiento. 1 x 0.3 cm es el área de superficie efectiva. La longitud efectiva original del gel es de 1.0 cm. El aplicar una tensión normal a la forma rectangular del gel hasta que se rompa a través del probador Chatillon TCD200, fue el factor determinante de la resistencia a la tensión. Los resultados de la prueba mostraron que una concentración mayor de polímero puede incrementar la resistencia del gel de la composición de matriz de sellado.

Tabla 14

Número de muestra	Material probado	Area efectiva, centímetro cuadrado	Velocidad mm/min	Tiempo de curación min	Fuerza min	F/0.3cm2 F/0.1cm2
334-25-1	10% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.69	8.977
334-25-2	10% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.12	7.07
334-25-3	10% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.11	7.03
Promedio						
Desviación estándar					2.31	7.69
					0.33	1.11
334-25-4	20% PEG	1 x 0.3	12.7	55	3.80	12.67
334-25-5	20% PEG	1 x 0.3	12.7	60	3.93	13.10
334-25-6	20% PEG	1 x 0.3	12.7	55	3.47	11.57
334-25-7	20% PEG	1 x 0.3	12.7	60	2.33	7.76
Promedio					3.38	11.28
Desviación estándar					0.73	2.43
316-80-1	30% PEG	1 x 0.3	12.7	70	4.04	13.46
316-80-2	30% PEG	1 x 0.3	12.7	60	4.55	15.17
316-80-3	30% PEG	1 x 0.3	12.7	60	5.12	17.06
316-80-4	30% PEG	1 x 0.3	12.7	60	4.68	15.60
316-80-5	30% PEG	1 x 0.3	12.7	55	4.49	14.97
316-80-6	30% PEG	1 x 0.3	12.7	60	4.52	15.07
Promedio					4.57	15.68
Desviación estándar					0.35	0.97

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

El efecto de la concentración PEG en la proporción de expansión se muestra en las figuras 12, 13 y 14, de acuerdo con una modalidad de la presente invención. Se llevaron a cabo estudios de expansión para la caracterización de los geles de la composición de matriz de sellado. Cuando se pone en contacto con un ambiente acuoso, el polímero hidrofílico se expande para formar un gel. Una vez que se forma el gel, las moléculas de agua se difunden libremente a través de una red más bien suelta formada mediante partículas FloSeal™ expandidas. Al momento de la adición adicional de agua, los contactos

COH102-COH206 se rompen y las moléculas de polímero individual se disuelven en agua. Los geles de la composición de matriz de sellado se prepararon mezclando CoSeal™ y FloSeal™ en cuatro diferentes concentraciones (5%, 10%, 20% y 30% p/p) de polímero y mediante reacciones con la misma cantidad de plasma de porcino (1.7 mg/g polvos). El gel se curó durante 30 minutos y posteriormente se dejó expandido en solución salina a temperatura ambiente. Se drenó periódicamente el amortiguador y se determinó el peso del gel restante. El cambio en el peso del gel fue monitoreado. La proporción de expansión Q, se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$Q = W^*/W$$

en donde W* es el peso húmedo y W es el peso original. La proporción de expansión incrementó con el incremento de concentración de polímero. Sin pretender limitarse a alguna teoría en particular, la disminución aparente en la proporción de peso puede ser interpretada como una pérdida de material de gel, conforme se erosiona lentamente el gel. El final del experimento se calificó como el tiempo cuando se desintegra el gel en varias pequeñas piezas o se vuelve muy viscoso y débil, por lo cual es imposible decantar el amortiguador libre del gel. El agua continua penetrando hacia el centro y finalmente el gel es convertido a una solución viscosa de PEG y partículas de gelatina. Tomó de aproximadamente 2 a 3 semanas para que

todos los materiales se separaran (figura 14). Parece que el porcentaje de CoSeal™ en el polvo de la composición de matriz de sellado puede tener un impacto profundo en la estabilidad de un gel de composición de matriz de sellado. El rango de disolución del gel de composición de matriz de sellado varía dependiendo de grado de reticulación de los polímeros. Los resultados mostraron que entre más alta es la concentración de CoSeal™, se puede originar una mayor estabilidad del gel y también se puede originar más expansión. La persistencia relativa de dicho gel *in vitro* puede esperarse que sea similar a la que se obtiene *in vivo*.

Los ejemplos anteriores proporcionan una amplia ilustración de que las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden ser selladores efectivos. Las composiciones se pueden polimerizar *in situ* con un líquido fisiológico o sangre, y pueden sellarse o adherirse al tejido en forma muy estrecha.

Aunque la presente invención ha sido descrita con cierto detalle a manera de ilustración y ejemplo, con propósito de claridad y comprensión, será obvio que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las patentes, publicaciones, artículos, libros y otros materiales de referencia aquí mencionados, están incorporados para todos los propósitos a la presente invención como referencia.

Ejemplo 26: Evaluación de propiedades hemostáticas en modelos animales de ciertas formulaciones

Formulación No. 334-77

Se colocó un gramo de polvo PEG (tetraquis[mercaptoetilpoli-oxietileno]éter de pentaeritritol, MW 10,000), 1g de polvo PEG-B (tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinmidilpentanoato-2-poli-oxoetilenglicol]éter de pentaeritritol, MW 10,000), y 8 g de FloSeal™ en una botella de mezclado (tamaño de 50 ml) y se cargaron en el mezclador Inversina Tumbler Mixer para el mezclado. La mezcla de los tres componentes se mezcló durante 10 minutos hasta que quedó completamente mezclada. Se llenaron seis jeringas (tamaño 5 ml) con aproximadamente 1.5 g de la mezcla.

Formulación No. 334-77-1

Se montó una muestra de 1.5 g de la formulación No. 334-77 en una pieza de Gelfoam (3 x 4 cm^2, Compressed, Gelfoam, fabricado por Upjohn, NDC 0009-0353-01). El Gelfoam tapado con la muestra se horneó en un horno de vacío a una temperatura de 60-65°C durante 1 minuto hasta que la muestra comenzó a derretirse. Posteriormente el material se dejó enfriar y solidificar. Se colocaron dos piezas de la pasta resultante en Gelfoam en una cavidad insertada con disecante y se sellaron.

Formulación No. 334-77-4

Se colocó una muestra de la formulación No. 334-77 en

una pieza de la esponja de colágeno y se horneó. Las esponjas se prepararon reticulando ligeramente las fibras de colágeno mediante una solución de glutaraldehído (5k ppm) y secando por congelación una solución de colágeno (1.0%) utilizando secadores VirTis Genesis Freeze. Se elaboró en capas cuidadosamente una almohadilla de colágeno (3 x 4 cm^2) con una muestra de 1.5 g de la formulación No. 334-77, posteriormente se calentó en un horno de vacío a una temperatura de 60-65°C durante 1 minuto hasta que la muestra comenzó a derretirse. Posteriormente el material se dejó enfriar y solidificar. Cada almohadilla de colágeno resultante se colocó en una cavidad insertada con un disecante y se selló.

Métodos:

Procedimientos quirúrgicos:

Animales (conejos NZW, hembras, con pesos de aproximadamente 3 kg) se anestesiaron y recibieron heparinización intravenosa en una dosis de 4.000 IU/kg 30 minutos antes de la resección parcial del hígado.

Modelo de resección de hígado:

Se llevó a cabo una laparotomía media y el lóbulo izquierdo del hígado se expuso y se sujetó. La parte del lóbulo del hígado lateral izquierdo fue reseccionada. Se controló el flujo mediante aplicación del producto de prueba. Se estandarizó el tiempo de aplicación y ajuste para que no excediera de 300 segundos. Se eliminó la sujeción hemostática

cinco minutos después, cuando se esperó obtener la hemostasis primaria.

Modelo de abrasión de hígado:

Se llevó a cabo una laparotomía media y se expuso el lóbulo izquierdo del hígado. Se provocó la abrasión de una lesión circular superficial con un diámetro de 2 cm y una profundidad de 2 mm en la superficie del lóbulo del hígado. Esto se logró utilizando una máquina de perforación con un aditamento de disto de molido (molino de perforación PROXXON FBS 230/E; tamaño de grit P40, velocidad de rotación 5.000/min). Se trató el sangrado o oozing del vaso o capilaridad pequeño resultante, con una de las formulaciones.

Después de permitir un periodo de observación de 15 minutos, se regresó el lóbulo del hígado izquierdo a su posición original en la cavidad abdominal. Si se logró la hemostasis, el abdomen será cerrado y se resecciona el Omentum (Synthofil® 2/0). La incisión del músculo y de la piel serán suturadas por separado utilizando Synthofil® 2/0 en la forma de suturas interrumpidas en una forma de dos niveles.

Después de 24 horas, los animales fueron sacrificados en anestesia a través de una sobredosis de Pentobarbital Natrium (aproximadamente 320 mg i.v./animal). Después de la eutanización, se llevó a cabo una autopsia. El abdomen se inspeccionó visualmente con respecto a la presencia de sangre y/o coágulos de sangre que resulten del nuevo sangrado. Si

están presentes, la sangre y/o coágulos de sangre son escobillados utilizando escobillas quirúrgicas pesadas previamente, y se determina el peso. Si no se logra la hemostasis, los animales son sacrificados a través de una sobredosis de Pentobarbital Natrium (aproximadamente 320 mg i.v./animal) y se evaluará únicamente los puntos de extremo primarios.

Resultados:

Este estudio tuvo el objeto de evaluar las propiedades hemostáticas de las formulaciones #334-77, #334-77 y #334-77-4). Se utilizaron dos modelos de hemostasis muy severa: (1) la resección de hígado y (2) el modelo de superficie de hígado en conejos altamente heparinizados.

Después de aplicar el polvo de la formulación #334-77 sobre la herida sangrante, se descubrió que es de ayuda presionar la formulación sobre la superficie de la herida para obtener la hemostasis. Fue difícil lograr esta presión con un guante de látex quirúrgico seco, ya que el polvo tenía más adherencia a un guante que a la herida. Sin embargo, la aplicación de presión con un guante húmedo fue más fácil. La formulación formó una membrana ajustada después de que estuvo en contacto con la humedad de la sangre. Después de la aplicación se llegó a la hemostasis en muchos casos, incluso en modelos severos utilizados en este ejemplo. Si la hemostasis no fue lograda completamente después de la primera aplicación,

277

hubo un sangrado fluyendo debajo de la capa formada, fue difícil detener en forma adecuada el sangrado mediante la aplicación simplemente de más de la formulación #334-77. Puede ser difícil restringir la aplicación de la formulación únicamente al lugar en donde es necesario detener el sangrado, ya que la formulación pulverizada puede caer dentro de la cavidad abdominal y adherirse a la cavidad abdominal si no se tiene el cuidado necesario. Por consiguiente, es útil la aplicación adecuada de la formulación #334-77.

En contraste, la formulación #344-77-4 puede ser aplicada fácilmente en una capa de grosor constante sobre un área de tejido grande y con suficiente presión con el objeto de obtener la hemostasis. La formulación #344-77-4, con el soporte de almohadilla de colágeno nativo, permaneció adherida al lóbulo del hígado después de la aplicación y actúo como un hemostato y pegamento, pegando la almohadilla sobre la herida y la cápsula del hígado. Dicho soporte biodegradable puede aplicar más eficacia al componente pulverizado para lograr la hemostasis. El soporte biodegradable también puede conferir flexibilidad a la formulación, permitiendo que la formulación se doble sobre los bordes de la resección durante la aplicación. Se trataron dos animales con esta formulación, uno en el modelo de superficie y uno en el modelo de resección. Se obtuvo la hemostasis aguda en ambos modelos. Únicamente el animal tratado en el modelo de superficie sobrevivió sin sangrados

postquirúrgicos durante 24 horas. El forro de colágeno aún permaneció en el sitio de aplicación después de 24 horas. El animal tratado en el modelo de resección sangró durante la noche hasta morirse y se separó el forro. Una diferencia entre los dos experimentos, fue que en el primero, el forro fue presionado en el estado seco sobre la herida y en el segundo se utilizó una presión con una escobilla de gasa húmeda. Los descubrimientos se muestran en la tabla 15.

Animal	Experi-mento	**Tabla 15**
1	1a	**Modelo de resección de hígado: (#334-77-1)** Lóbulo izquierdo del hígado. Aplicación sin sujeción. Durante la aplicación la almohadilla Gelfoam fue quebradiza y rígida y no se pudo flexionar en el estado seco alrededor de los bordes de la resección. Se presionó 2 minutos con un algodón de gasa humedecida (0.9% NaCl) en la superficie de la resección y la cápsula de hígado intacta alrededor de la resección. El polvo se adhirió firmemente a la superficie de la herida pero no al soporte de Gelfoam. El polvo no adherente se enjuagó con 0.9% NaCl. Se observó la detención del sangrado con la excepción de un punto en el borde de la resección que tuvo flujo de sangrado.
	1b	**Modelo de superficie: (#334-7-1-)** Lóbulo de hígado medio izquierdo. Aplicación sin sujeción. La formulación #334-77-1 se presionó 2 minutos con un algodón de gasa humedecido (0.9% NaCl) sobre la superficie de la herida. Se eliminó el soporte Gelfoam. La formulación se adhirió a la herida. Se detuvo el sangrado.
2	2a	**Modelo de resección de hígado: (#334-7)** Lóbulo de hígado lateral izquierdo 2a. La formulación #334-77 se aplicó a la superficie sangrante y se presionó con el guante de látex seco. El polvo se adhirió más fuertemente al guante que a la superficie de la herida. La capa de la formulación se eliminó con el guante.
	2b	**Modelo de resección de hígado: (#334-7)** El mismo lóbulo del hígado lateral izquierdo como en 2a. Se aplicó #334-77 con el guante húmedo y se presionó 10 segundos en la superficie de la herida. No hubo adherencia del polvo al guante. Se formó una capa sobre la superficie de la herida. Se observó un flujo de sangrado debajo del polvo.
	2c	**Modelo de resección de hígado (#334-7)** Lóbulo de hígado medio izquierdo, aplicación con sujeción. Se aplicó la formulación #334-77 sobre la superficie de sangrado y se presionó sobre la superficie con una lámina de metal. Se liberó la sujeción después de 5 minutos. Ligero flujo de sangrado en el borde de la resección. Se intentó detener este sangrado aplicando más formulación. El sangrado no se pudo detener totalmente. Se eliminó la capa de polvo. La capa formó una membrana rígida pero únicamente con poca adherencia a la superficie de la herida

279

	2d	**Modelo de resección de hígado: (#WR334-77)** Mismo lóbulo de hígado que en 2c, pero se realizó un nuevo corto con el objeto de promover el sangrado. Aplicación después de sujetar el lóbulo del hígado. La formulación se presionó dos minutos con el bisturí en la herida. El sangrado no se pudo detener.
3	3a	**Modelo de superficie: #WR334-77 + almohadilla de colágeno de equino** Se dispersó polvo #334-77 en una capa delgada de una almohadilla de colágeno de equino. Se perforaron agujeros en la almohadilla de colágeno con una aguja de inyección desde la parte lateral con la capa de la formulación. Parte de la formulación se presionó sobre los agujeros. La capa de la formulación fue más delgada que en las variantes de la formulación. Se aplicó seco el forro, sin sujetar el lóbulo del hígado. El forro se presionó con el guante durante 2 minutos. No se observó sangrado. La almohadilla se eliminó. Se observó una buena adherencia a la cápsula del hígado y menos adherencia a la superficie de la herida.
	3b	**Modelo de superficie: Formulación-colágeno-almohadilla (#334-7-4)** Misma herida que en 3a. La almohadilla se aplicó en el estado seco y se presionó durante 2 minutos sobre la superficie de la herida. La almohadilla fue más flexible (flexionable) en comparación con el forro con el soporte de Gelfoam. Esto fue favorable para facilitar la aplicación. La formulación no se separó de la almohadilla de colágeno. Toda la almohadilla de colágeno-formulación se adhirió a la herida y a la cápsula de hígado. No ese observó sangrado). La almohadilla de colágeno se humedeció con 0.9% NaCl y se cerró el conejo. El animal sobrevivió 24 horas y posteriormente se sacrificó. En la revisión post mortem, el forro estuvo en el lugar y no ocurrió sangrado durante 24 horas.

280

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y en donde el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios.

2. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

3. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el primer componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico que tiene m grupos nucleofílicos, y el segundo componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-electrofílico que tiene n grupos electrofílicos, caracterizada porque m y n son cada uno mayores o iguales a dos, y en donde m+n es mayor o igual a cinco.

281

4. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque n es dos, y en donde m es mayor o igual a tres.

5. La composición tal como se describe en la reivindicación 4, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es tetrafuncionalmente activado.

6. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque m es dos, y en donde n es mayor o igual a tres.

7. La composición tal como se describe en la reivindicación 6, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-electrofílico es tetrafuncionalmente activado.

8. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico son tetrafuncionalmente activados.

9. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en NH_2, -SH, -H, $-PH_2$, y $-CO-NH-NH_2$.

10. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos amino primarios.

282

11. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos tiol.

12. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es polietilénglicol o un derivado del mismo.

13. La composición tal como se describe en la reivindicación 12, caracterizada porque el polietilénglicol comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino primario y un grupo tiol.

14. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos electrofílicos seleccionados del grupo que consiste en $CO_2N(COCH_2)_2$, $-CO_2H$, $-CHO$, $-CHOCH_2$, $-N=C-O$, $-SO_2CH=CH_2$, $N(COCH)_2$, y $-S-S-(C_5H_4N)$.

15. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos succinimidilo.

16. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende dos o más grupos maleimidilo.

17. La composición tal como se describe en la

283

reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-electrofílico es un polietilénglicol o un derivado del mismo.

18. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque comprende además un polisacárido o una proteína.

19. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque comprende además un polisacárido, caracterizada porque el polisacárido es un glicosaminoglicano.

20. La composición tal como se describe en la reivindicación 19, caracterizada porque el glicosaminoglicano es seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, quitina, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina, sulfato C de condroitina, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina y derivados de los mismos.

21. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque comprende además una proteína, caracterizada porque la proteína es colágeno o un derivado del mismo.

22. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico o el óxido de polialquileno multi-electrofílico, o tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico, comprenden en forma

adicional un grupo de enlace.

23. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es proporcionado por la fórmula:

polimer-Q^1-X_m

y en el óxido de polialquileno multi-electrofílico es proporcionado por la fórmula:

polimer-Q^2-Y_n

en donde X es un grupo electrofílico y Y es un grupo nucleofílico;

en donde m y n son cada uno 2 a 4;

en donde $m+n \leq 5$;

en donde cada uno de Q^1 y Q^2 son grupos de enlace seleccionados del grupo que consiste en $-O-(CH_2)_{n'}-$, -S-, $-(CH_2)_{n'}-$, $-NH-(CH_2)_{n'}-$, $-O_2C-NH-(CH_2)_{n'}-$, $-O_2C-(CH_2)_{n'}$, $-O_2C-CR^1H$, y/o $-O-R^2-CO-NH$;

en donde n'=1 a 10;

en donde R^1 =-H, $-CH_3$, o $-C_2H_5$;

en donde R^2=$-CH_2-$ o $-CO-NH-CH_2CH_2-$; y

en donde Q^1 y Q^2 pueden ser los mismos o diferentes o pueden estar ausentes.

24. La composición tal como se describe en la reivindicación 23, caracterizada porque Y se proporciona a través de la fórmula:

$-CO_2N(COCH_2)_2$.

285

25. La composición tal como se describe en la reivindicación 23, caracterizada porque Y se proporciona a través de la fórmula:

$N(COCH_2)_2$.

26. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico o el óxido de polialquileno multi-electrofílico o tanto el óxido de polialquileno multi-nucleofílico como el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprenden además un grupo biodegradable.

27. La composición tal como se describe en la reivindicación 26, caracterizada porque el grupo biodegradable se selecciona del grupo que consiste en láctido, glicólido, ϵ-caprolactona, poli(ácido α-hidroxi), poli (aminoácido) y poli(anhídrido).

28. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel biocompatible hidratado que comprende gelatina y absorberá agua cuando se suministre a un sitio objetivo de tejido húmedo, y en donde el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.01 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente y tiene una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 5000%.

286

29. La composición tal como se describe en la reivindicación 28, caracterizada porque el hidrogel tiene un tiempo de degradación in vivo menor a un año.

30. La composición con cualesquiera de los párrafos 28 y 29, caracterizada porque el hidrogel es al menos parcialmente hidratado con un medio acuoso que comprende un agente activo.

31. La composición tal como se describe en la reivindicación 30, caracterizada porque el agente activo es un agente de coagulación.

32. La composición tal como se describe en la reivindicación 31, caracterizada porque el agente de coagulación es trombina.

33. Un método para suministrar un agente activo a un paciente, caracterizado porque el método comprende administrar a un sitio objetivo en el paciente una cantidad de la composición tal como se describe en la reivindicación 30.

34. Un método para suministrar un agente de sellado a un paciente, caracterizado porque el método comprende administrar a un sitio objetivo de sangrado, una cantidad de la composición tal como se describe en la reivindicación 1, suficiente para inhibir el sangrado.

35. Un método para suministrar trombina a un paciente, caracterizado porque el método comprende administrar a un sitio objetivo de sangrado una cantidad de la composición tal

como se describe en la reivindicación 32, suficiente para inhibir el sangrado.

36. Una composición que comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico, y un componente que forma un hidrogel, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además al menos un grupo amino primario y al menos un grupo tiol, y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

37. Una composición que comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico y un componente que forma un hidrogel, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos tiol y el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos electrofílicos seleccionados del grupo que consiste en grupos succinimidilo y grupos maleimidilo, y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

38. Una composición que comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico, un óxido de polialquileno multi-electrofílico y un componente que forma un hidrogel,

caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en grupos amino primarios y grupos tiol, y el óxido de polialquileno multi-electrofílico comprende además dos o más grupos succinimidilo y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

39. Una composición que comprende un primer polietilénglicol que comprende dos o más grupos tiol y un segundo polietilénglicol que comprende dos o más grupos succinimidilo o grupos maleimidilo, y un componente que forma un hidrogel, caracterizada porque la suma de los grupos tiol y los grupos succinimidilo y maleimidilo es al menos cinco, y en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primer polietilénglicol y el segundo polietilénglicol tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

40. La composición tal como se describe en la reivindicación 39, caracterizada porque el primer polietilénglicol comprende además cuatro grupos tiol y el segundo polietilénglicol comprende además cuatro grupos succinimidilo.

41. La composición tal como se describe en la reivindicación 39, caracterizada porque comprende además una proteína o un polisacárido.

289

42. La composición tal como se describe en la reivindicación 39, caracterizada porque comprende además un polisacárido, caracterizada porque el polisacárido es un glicosaminoglicano.

43. La composición tal como se describe en la reivindicación 42, caracterizada porque el glicosaminoglicano es seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, quitina, sulfato A de condroitina, sulfato B de condroitina, sulfato C de condroitina, sulfato de queratina, queratosulfato, heparina y derivados de los mismos.

44. La composición tal como se describe en la reivindicación 39, caracterizada porque comprende además una proteína, caracterizada porque la proteína es colágeno o un derivado del mismo.

45. Un método para sellar un tracto de tejido, caracterizado porque el método comprende llenar al menos parcialmente un tracto de tejido con una composición que comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y

290

el componente que forma hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos alguno de los intersticios, caracterizada porque el hidrogel comprende subunidades que tiene tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días.

46. El método tal como se describe 75, caracterizado porque el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo polímero comprende múltiples grupos electrofílicos.

47. Un método para inhibir el sangrado en un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente, caracterizado porque el método comprende suministrar una composición al sitio objetivo en una cantidad suficiente para inhibir el sangrado, caracterizada porque la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se

reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios, caracterizada porque el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días.

48. El método tal como se describe en la reivindicación 47, caracterizado porque el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

49. Un método para suministrar una sustancia bioactiva a un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente, caracterizada porque el método comprende suministrar una composición en combinación con la sustancia bioactiva al sitio objetivo, caracterizada porque la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel;

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios, caracterizada porque el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300%, y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días.

50. El método tal como se describe en la reivindicación 49, caracterizado porque el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

51. El método tal como se describe en la reivindicación 49, caracterizado porque la sustancia bioactiva es un agente hemostático.

52. El método tal como se describe en la reivindicación 49, caracterizado porque la sustancia bioactiva es trombina.

53. Un método para suministrar una composición expandible a un sitio objetivo en el tejido, caracterizado porque

293

el método comprende aplicar la composición al sitio objetivo, caracterizada porque la composición comprende:

un primer componente reticulable;

un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y

un componente que forma un hidrogel; y

en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de hidratarse para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios, caracterizada porque el hidrogel comprende subunidades que tienen tamaños que fluctúan de aproximadamente 0.05 mm hasta aproximadamente 5 mm cuando se hidratan completamente, teniendo una expansión de equilibrio que fluctúa de aproximadamente 400% hasta aproximadamente 1300% y degradándose en el tracto de tejido después de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 días, siendo hidratada la composición en menos de su expansión de equilibrio al momento de la aplicación al sitio objetivo, caracterizada porque se expande hasta un valor de expansión de equilibrio.

54. El método tal como se describe en la reivindicación 53, caracterizado porque el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo

componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

55. El método tal como se describe en la reivindicación 53, caracterizado porque el sitio objetivo es un tejido seleccionado del grupo que consiste en músculo, piel, tejido epitelial, tejido conectivo o de soporte, tejido de nervios, tejido oftálmico o de otros órganos de los sentidos, tejido vascular y cardiaco, órganos y tejido gastrointestinal, pleura y otro tejido pulmonar, riñón, glándulas endócrinas, órganos reproductores femeninos y masculinos, tejido adiposo, hígado, páncreas, linfa, cartílago, huesos, tejido oral y tejido mucosal y bazo y otros órganos abdominales.

56. El método tal como se describe en la reivindicación 55, caracterizado porque el sitio objetivo es una región hueca dentro del tejido seleccionado.

57. El método tal como se describe en la reivindicación 56, caracterizado porque la región hueca es seleccionada del grupo que consiste en trozos de tejido, tractos de tejido, espacios intravertebrales y cavidades corporales.

58. El método tal como se describe en la reivindicación 53, caracterizado porque el hidrogel tiene un grado de hidratación dentro del rango de 50% a 95% de la hidratación en la expansión en equilibrio.

59. El método tal como se describe en la reivindicación 53, caracterizado porque el hidrogel comprende un plastificante.

295

60. El método tal como se describe en la reivindicación 59, caracterizado porque el plastificador es seleccionado del grupo que consiste en polietilénglicol, sorbitol y glicerol.

61. El método tal como se describe en la reivindicación 59, caracterizado porque el plastificante está presente de 0.1% en peso a 30% en peso de la composición del componente de hidrogel.

62. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende un hidrogel de proteína reticulado.

63. El método tal como se describe en la reivindicación 62, caracterizado porque la proteína se selecciona del grupo que consiste en gelatina, colágeno soluble, albúmina, hemoglobina, fibrogen, fibrina, caseína, fibronectina, elastina, queratina, laminina y derivados y combinaciones de los mismos.

64. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende un polisacárido reticulado.

65. El método tal como se describe en la reivindicación 64, caracterizado porque el polisacárido es seleccionado del grupo que consiste en glicosaminoglicanos, derivados de almidón, derivados de celulosa, derivados de hemicelulosa, xilan, agarosa, alginato y quitosán y combinaciones de los mismos.

66. El método tal como se describe en cualesquiera de

las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende un polímero no biológico reticulado.

67. El método tal como se describe en la reivindicación 66, caracterizado porque el polímero no biológico reticulado es seleccionado del grupo que consiste en poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, resinas de polivinil, polilactida-glicólidos, policaprolactonas, polioxietlenos, y combinaciones de los mismos.

68. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende al menos dos componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas reticuladas, polisacáridos reticulados, y polímeros no biológicos reticulados.

69. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende un polímero de hidrogel y un agente de reticulación de hidrogel en donde el polímero de hidrogel y el agente de reticulación de hidrogel se han hecho reaccionar bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel.

70. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende un polímero de hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante radiación del hidrogel bajo condiciones que producen la reticulación de las

297

moléculas de polímero de hidrogel.

71. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 45 a la 61, caracterizado porque el hidrogel comprende un hidrogel reticulado molecular que ha sido producido mediante la reacción de monómeros de hidrogel monoinsaturados y poliinsaturados bajo condiciones que producen la reticulación de las moléculas de polímero de hidrogel.

72. Un método para formar una matriz de polímero sintética tridimensional que comprende los pasos de:

proporcionar un primer componente reticulable que contiene m grupos nucleofílicos y un segundo componente reticulable que contiene n grupos electrofílicos, caracterizada porque los grupos electrofílicos reaccionan con los grupos nucleofílicos para formar enlaces covalentes entre ellos, caracterizada porque m y n cada uno son mayores o iguales a dos, y en donde m+n es mayor o igual a cinco;

combinar el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable;

agregar un componente que forma un hidrogel al primer componente reticulable y al segundo componente reticulable;

permitir que el primer componente reticulable y el segundo componente reticulable queden reticulados uno al otro para formar una matriz tridimensional.

73. El método tal como se describe en la reivindicación

298

72, caracterizado porque comprende además contactar una primera superficie de tejido y una segunda superficie con el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel.

74. El método tal como se describe en la reivindicación 73, caracterizado porque la segunda superficie es una superficie de tejido nativo.

75. El método tal como se describe en la reivindicación 73, caracterizado porque la segunda superficie es una superficie de tejido no nativo.

76. El método tal como se describe en la reivindicación 75, caracterizado porque la superficie de tejido no nativo es un implante sintético.

77. El método tal como se describe en la reivindicación 76, caracterizado porque el implante sintético es seleccionado del grupo que consiste en una córnea de donante, un vaso sanguíneo artificial, una válvula de corazón, un órgano artificial, una prótesis de unión, un lentículo implantable, un injerto vascular, un stent, y una combinación de stent/injerto.

78. El método tal como se describe en la reivindicación 72, caracterizado porque el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel cada uno se aplica en forma pulverizada en la primera superficie de tejido.

79. El método tal como se describe en la reivindicación

799

72, caracterizado porque el primer componente reticulable, el segundo componente reticulable y el componente que forma un hidrogel se aplican cada uno como un polvo en una formulación en polvo mezclada combinada simple en la primera superficie de tejido.

80. El método tal como se describe en la reivindicación 79, caracterizado porque la formulación de polvo mezclada comprende además una proteína o un polisacárido.

81. El método tal como se describe en la reivindicación 72, caracterizado porque la primera superficie de tejido está en o dentro de un tejido duro o un tejido blando.

82. El método tal como se describe en la reivindicación 72, caracterizado porque la primera superficie de tejido comprende, rodea o está adyacente a un sitio quirúrgico, caracterizada porque el método comprende además el paso de cerrar el sitio quirúrgico.

83. El método tal como se describe en la reivindicación 72, caracterizado porque la formulación en polvo mezclada comprende además colágeno.

84. El método tal como se describe en la reivindicación 72, caracterizado porque la formulación en polvo mezclada comprende además un agente biológicamente activo.

85. Una composición de polvo mezclada que comprende:

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, caracterizada porque el primer

300

componente reticulable está en forma pulverizada;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, caracterizada porque el segundo componente reticulable está en forma pulverizada; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primer y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

86. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 85, caracterizada porque el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el primer componente reticulable está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta 20% en peso de la composición de componente reticulable.

87. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 85, caracterizada porque el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el segundo componente reticulable está presente en una concentración dentro del rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable combinada.

301

88. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 85, caracterizada porque la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable está dentro del rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%.

89. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 85, caracterizada porque la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable es de aproximadamente 50%.

90. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 85, caracterizada porque la proporción en peso entre el primero y segundo componentes reticulables y el componente que forma un hidrogel está dentro de un rango de aproximadamente 28% hasta aproximadamente 42% p/p.

91. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 85, caracterizada porque la proporción en peso entre el primero y segundo componentes reticulables y el componente que forma un hidrogel está dentro de un rango de aproximadamente 20% hasta aproximadamente 30% p/p.

92. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 91, caracterizada porque el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente

302

reticulable combinada, y el primer componente reticulable está presente en una concentración dentro de un rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable combinada.

93. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 91, caracterizada porque el primer componente reticulable agregado al segundo componente reticulable proporciona una composición de componente reticulable combinada, y el segundo componente reticulable está presente en una concentración dentro de un rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 20% en peso de la composición de componente reticulable combinada.

94. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 91, caracterizada porque la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable está dentro del rango de aproximadamente 45% hasta aproximadamente 55%.

95. La composición en polvo mezclada tal como se describe en la reivindicación 91, caracterizada porque la proporción en peso del primer componente reticulable al segundo componente reticulable es de aproximadamente 50%.

96. Un equipo que comprende:

un contenedor; y

una composición de polvo mezclada colocada dentro del contenedor, caracterizada porque la composición comprende:

303

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, caracterizada porque el primer componente reticulable está en forma pulverizada;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, caracterizada porque el segundo componente reticulable está en forma pulverizada; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

97. El equipo tal como se describe en la reivindicación 96, caracterizado porque el contenedor comprende un barril de jeringa y un émbolo de jeringa.

98. El equipo tal como se describe en la reivindicación 96, caracterizado porque comprende además instrucciones escritas para aplicar la composición de polvo mezclada a un sitio objetivo de sangrado en un paciente.

99. El equipo tal como se describe en la reivindicación 96, caracterizado porque el polvo mezclado comprende además un agente activo.

100. El equipo tal como se describe en la reivindicación 99, caracterizado porque el agente activo comprende trombina.

101. Un equipo que comprende:

una esponja de colágeno; y

una composición de polvo mezclada fijada con una superficie de la esponja, caracterizada porque la composición de polvo mezclada comprende:

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, caracterizada porque el primer componente reticulable está en forma pulverizada;

un segundo componente reticulable que comprende múltiples grupos electrofílicos, caracterizada porque el segundo componente reticulable está en forma pulverizada; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata.

102. Una composición que comprende:

una esponja de colágeno que comprende fibras de colágeno nativas; y

una composición de polvo mezclada, fijada con una superficie de la esponja, caracterizada porque la composición de polvo mezclada comprende:

un primer componente reticulable que comprende múltiples grupos nucleofílicos, caracterizada porque el primer componente reticulable está en forma pulverizada y comprende aproximadamente 10% del polvo mezclado;

un segundo componente reticulable que comprende

múltiples grupos electrofílicos, caracterizada porque el segundo componente reticulable está en forma pulverizada y comprende aproximadamente 10% del polvo mezclado; y

un componente que forma un hidrogel en forma pulverizada, que comprende aproximadamente 80% del polvo mezclado;

en donde bajo condiciones que permiten la reacción, el primero y segundo componentes reticulables tienen la capacidad de reticulación substancialmente inmediata para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos alguno de los intersticios.

306

RESUMEN

Se proporcionan composiciones, métodos y equipos para aplicaciones de sellado. Las composiciones se preparan combinando un primer componente entrelazable con un segundo componente entrelazable para formar una matriz porosa teniendo intersticios, y combinando la matriz porosa con un componente de formación de hidrogel para llenar por lo menos algo de los intersticios. Las composiciones exhiben propiedades de hinchamiento mínimas.

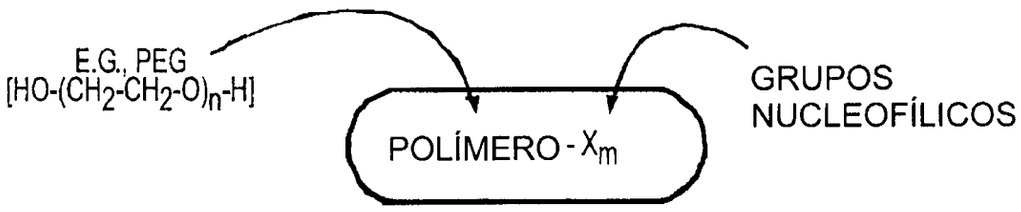

E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
POLÍMERO - Xm
GRUPOS
NUCLEOFÍLICOS

FIG. 1

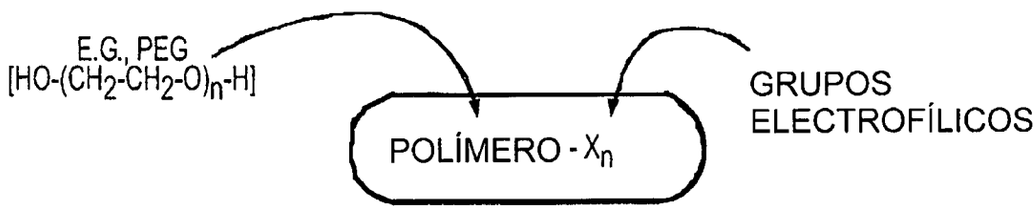

E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
POLÍMERO - Xn
GRUPOS
ELECTROFÍLICOS

FIG. 2

SG-PEG: GLUTARATO DE SUCCINIDIMIDILO DE PEG
TETRAFUNCIONALMENTE ACTIVADO

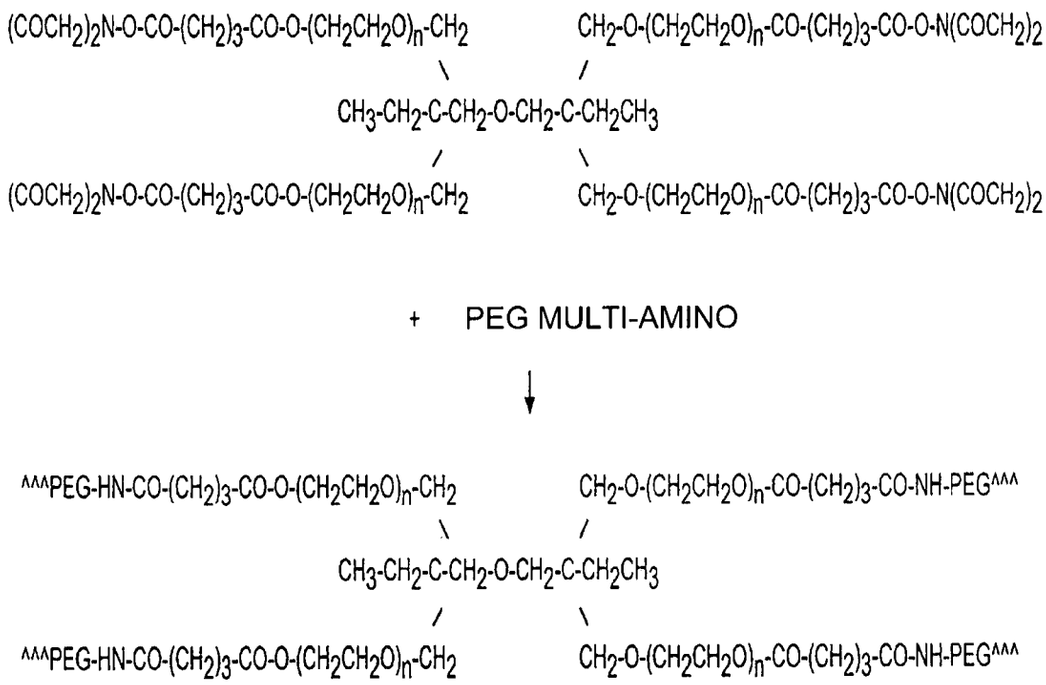


FIG. 3

309

SG-PEG, M=3: BUTILATO DE SUCCINIMIDILO PEG
TETRAFUNCIONALMENTE ACTIVADO (LIGADURA DE ÉTER)

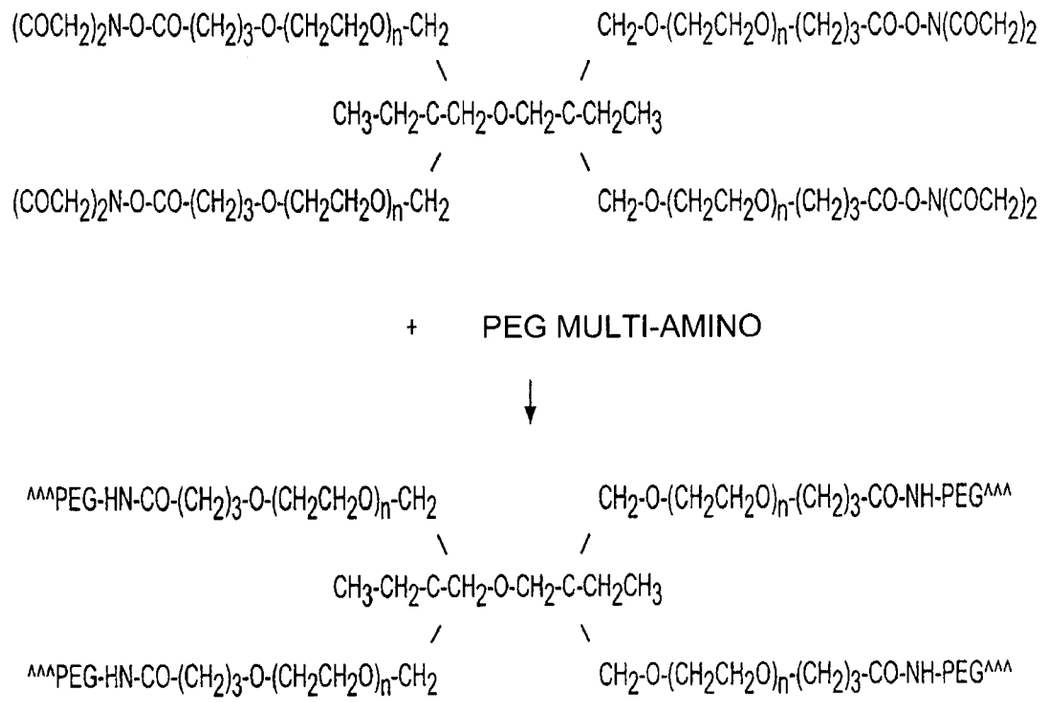


FIG. 4

310

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

FIG. 5

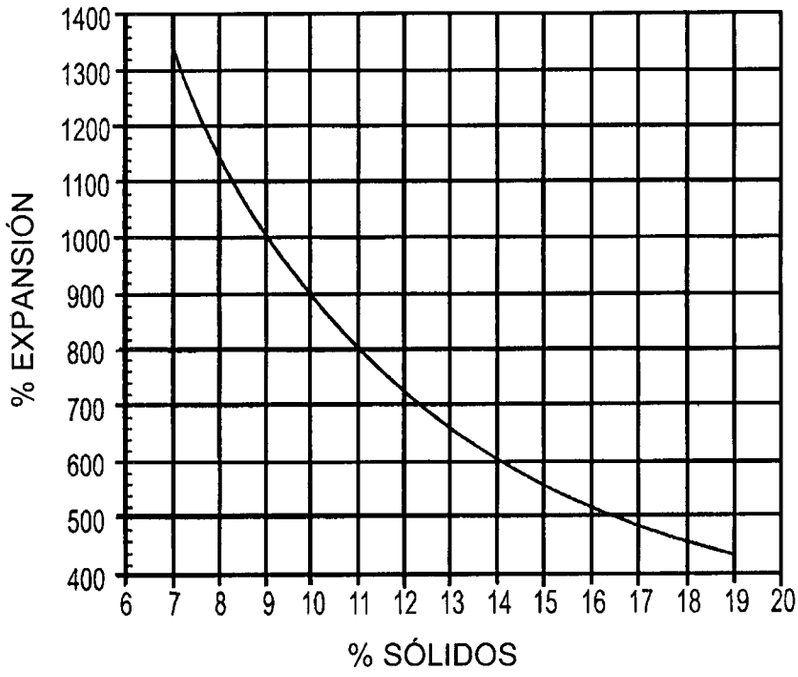


FIG. 6

311

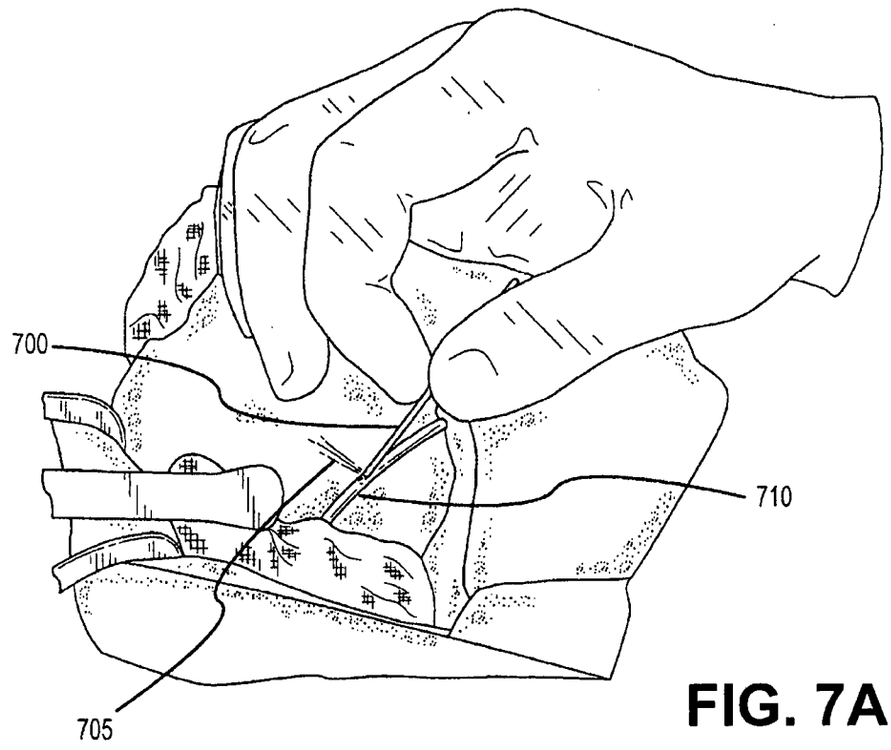


FIG. 7A

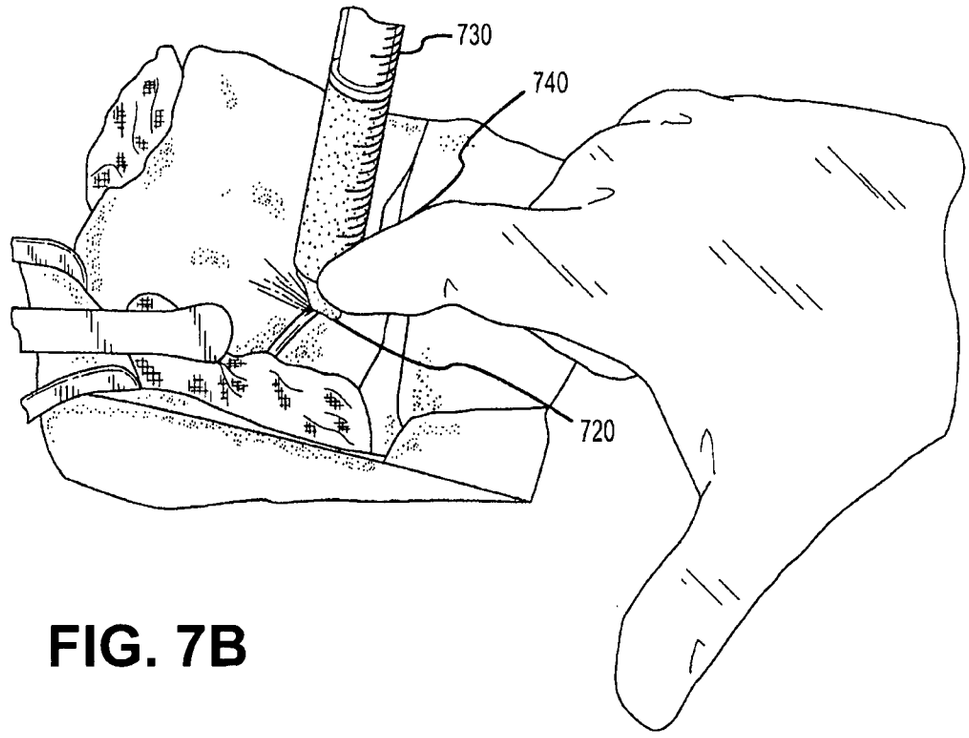


FIG. 7B

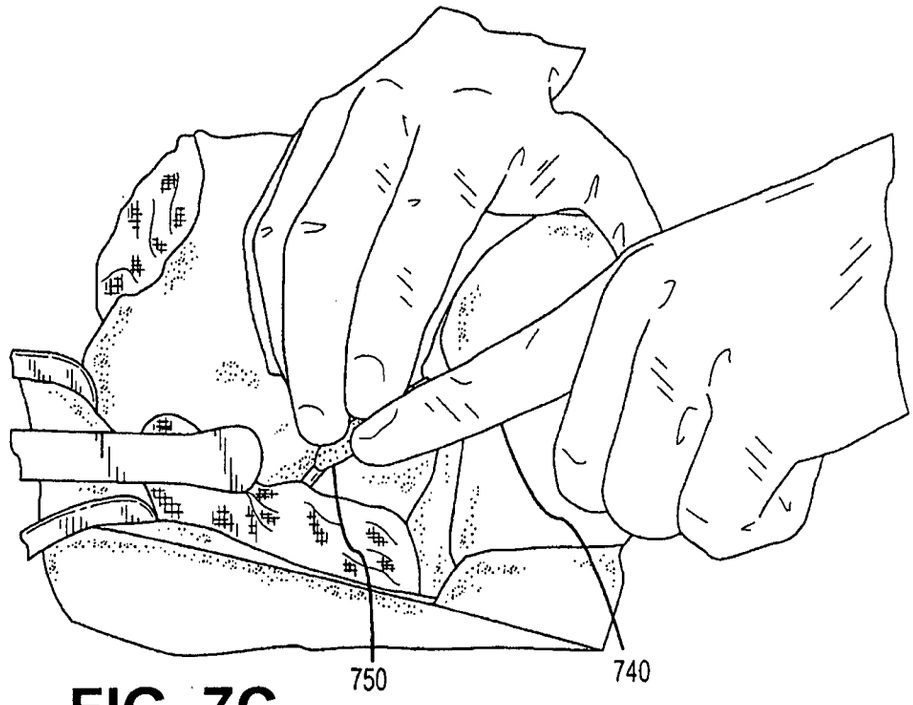


FIG. 7C

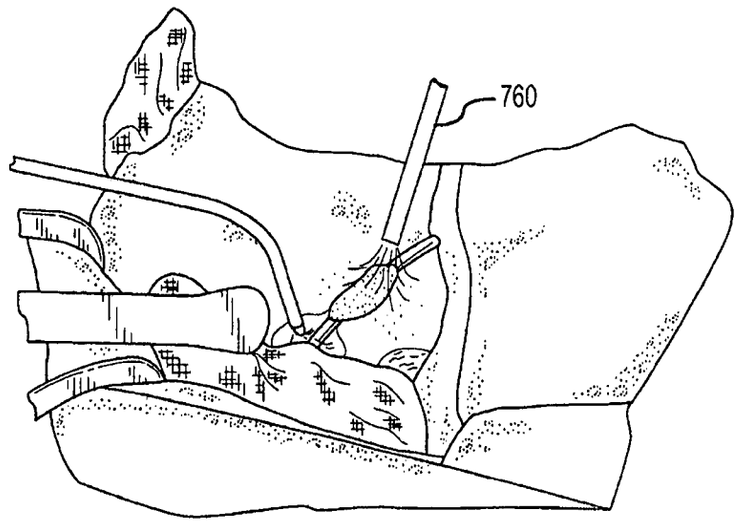


FIG. 7D

313

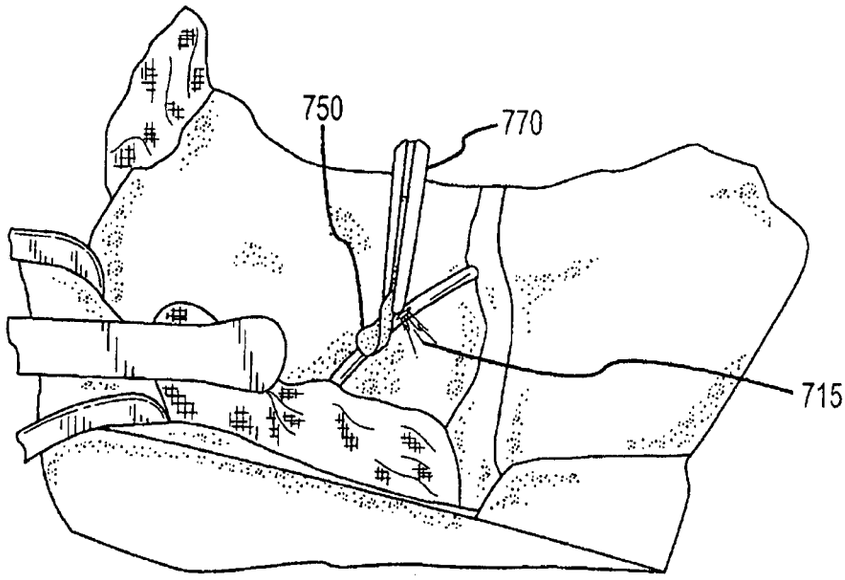


FIG. 7E

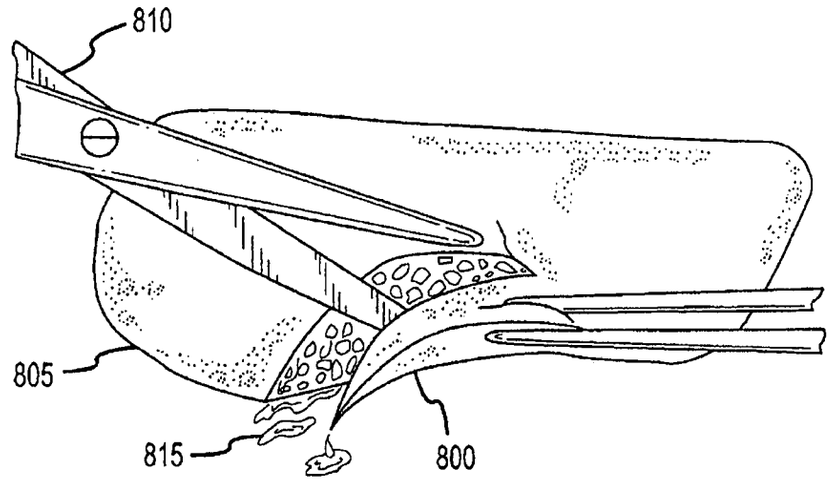


FIG. 8A

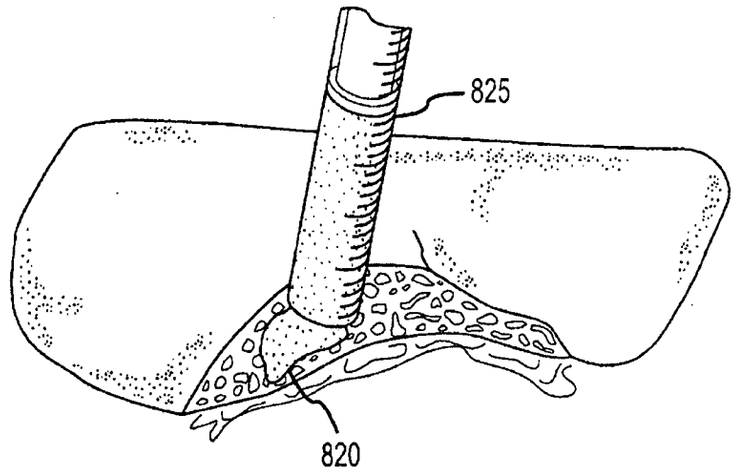


FIG. 8B

315

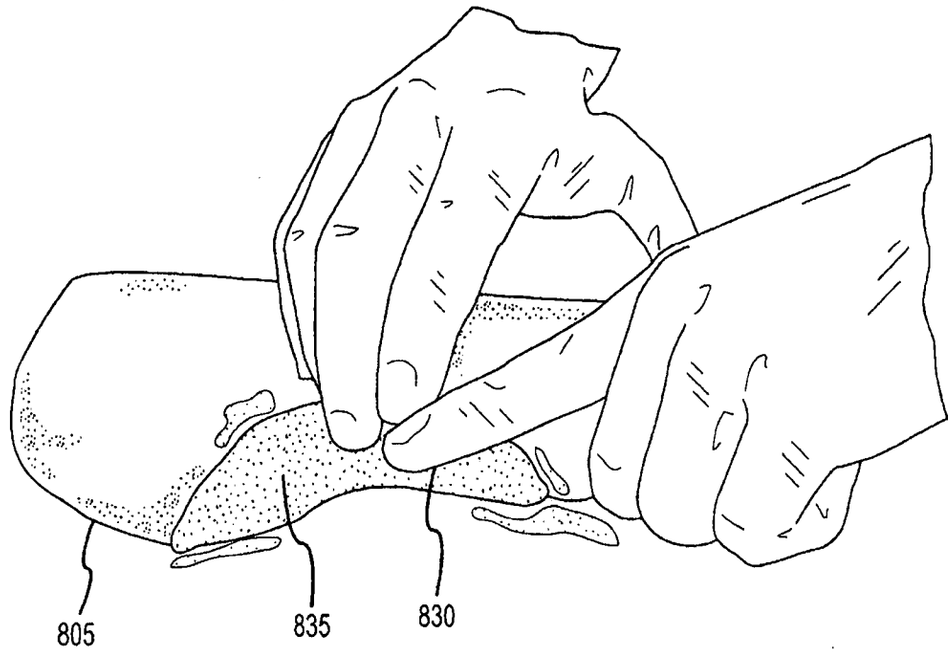


FIG. 8C

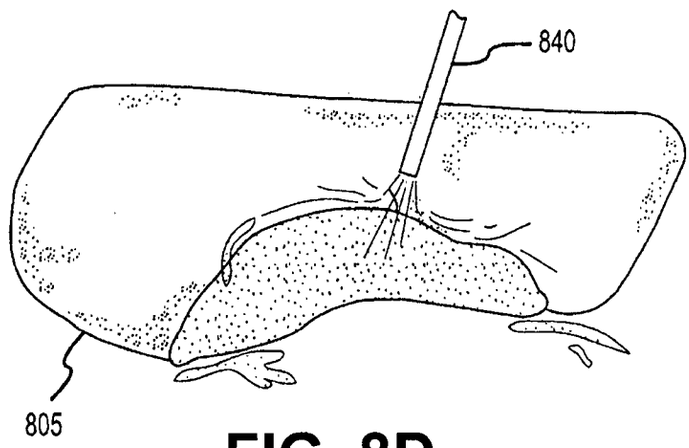


FIG. 8D

316

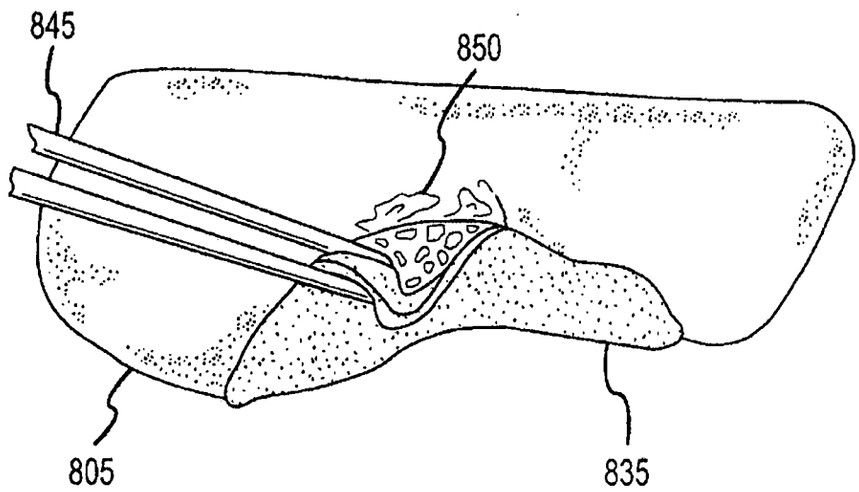


FIG. 8E

317

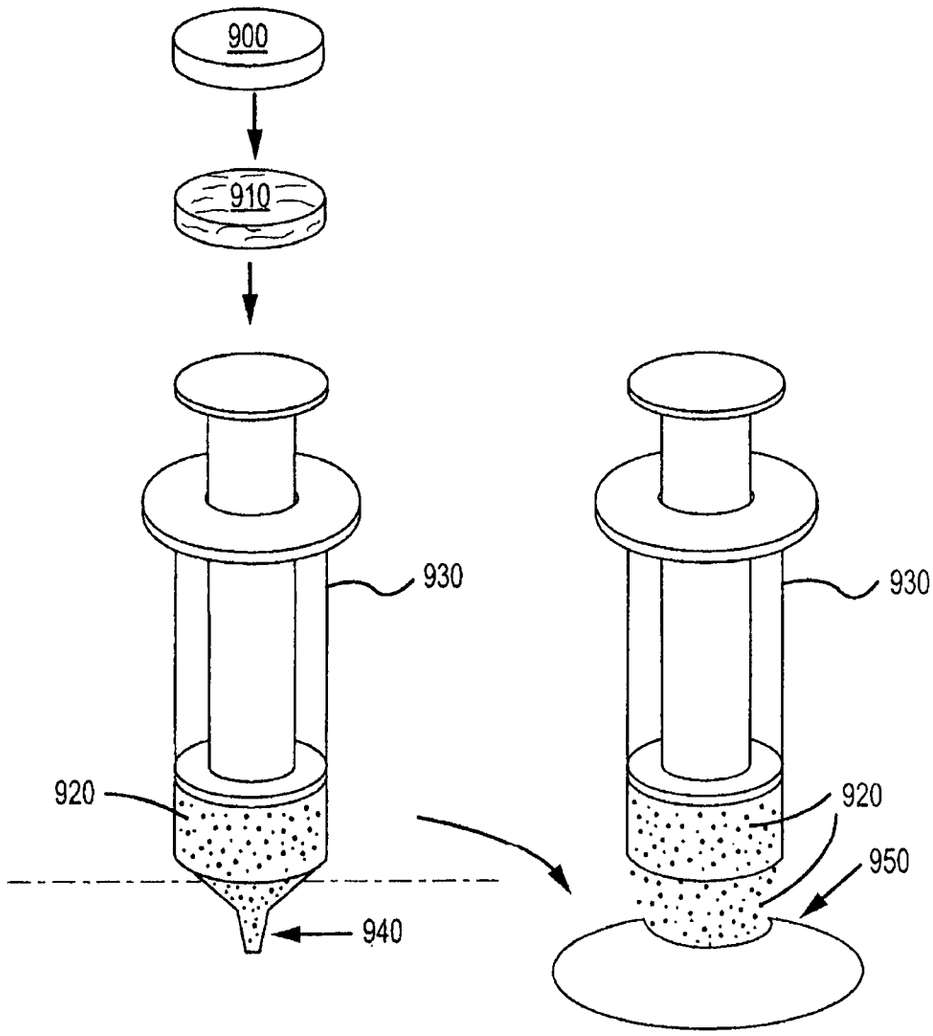


FIG. 9

3A

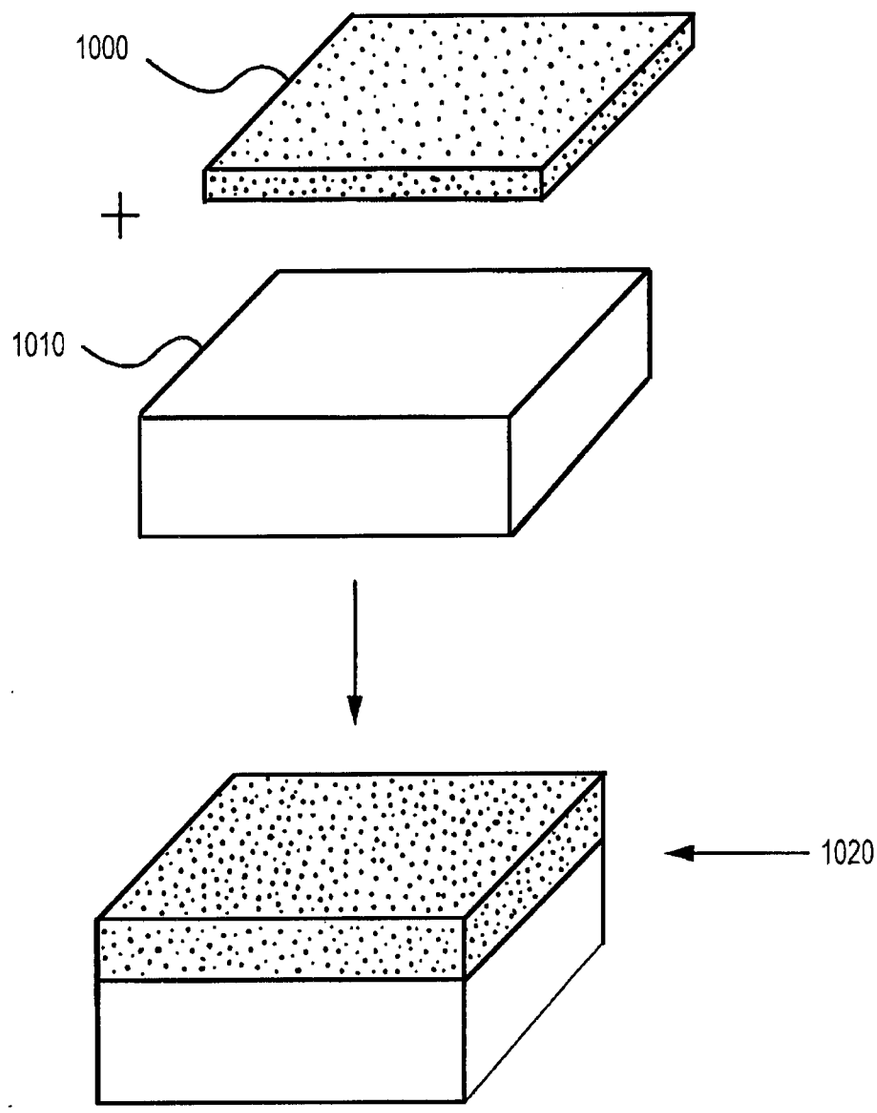


FIG.10

319

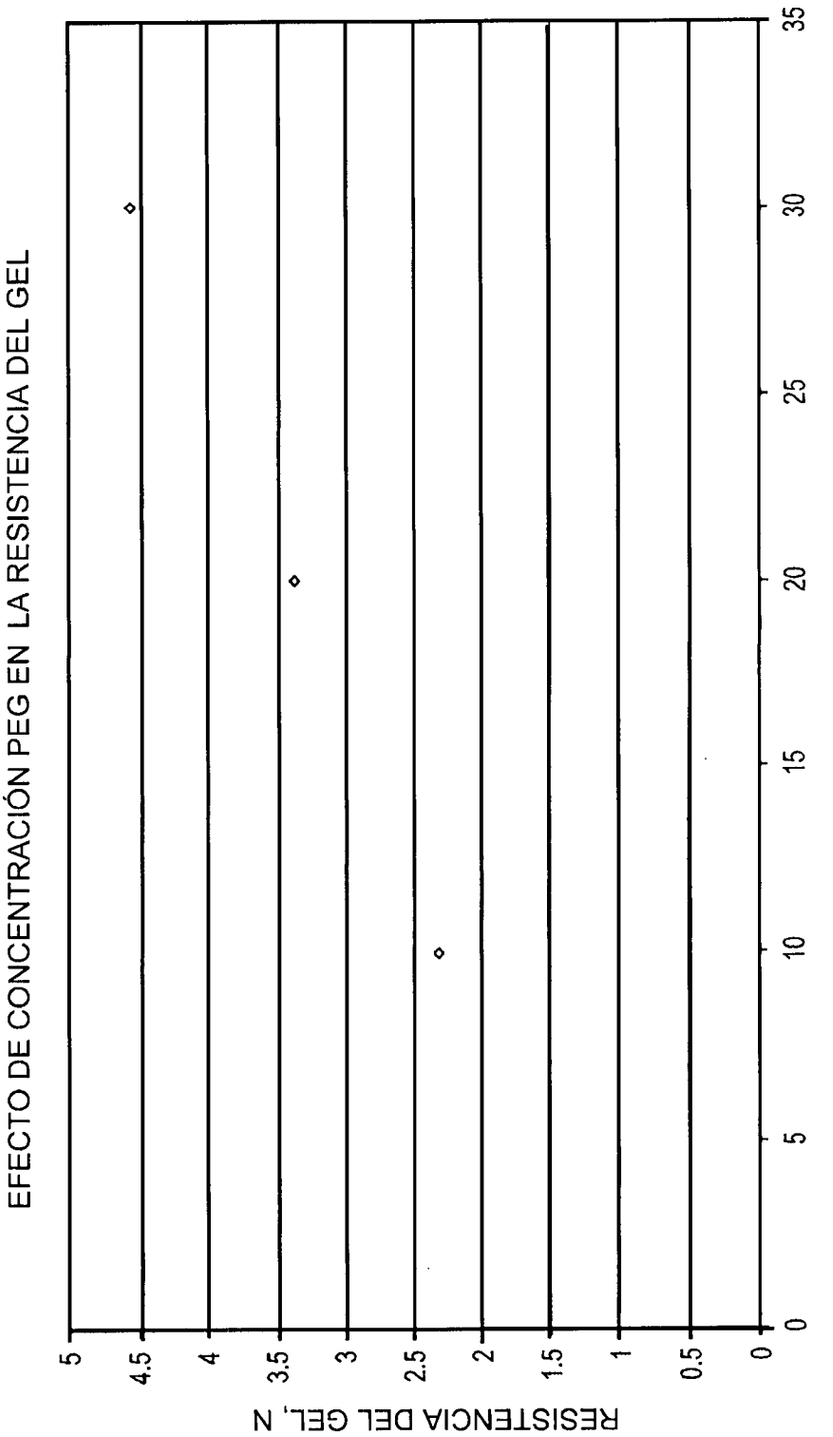

EFECTO DE CONCENTRACIÓN PEG EN LA RESISTENCIA DEL GEL
RESISTENCIA DEL GEL, N
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
0
5
10
15
20
25
30
35
CONCENTRACIÓN DE PEG, %

FIG. 11

ID MUESTRA	ID PAN	PESO SECO	30seg.	0.6 hr 0.025 d	73 min 0.05 d	2 hr 0.08 d	17.4 hr 0.73 d	1día	3.8 días	4.8 días	5.8 días	7.8 días	10.8 días	11.8 días	12.8 días	13.8 días	17.8 días
30%	1	1.49	1.59	2.13	2.38	2.70	4.41	4.67	5.63	6.02	6.13	6.53	7.09	7.02	6.61	6.52	5.00
.5+.5+.6g	2	1.61	1.68	2.14	2.36	2.62	4.27	4.53	5.51	5.86	6.03	6.39	6.93	6.98	6.87	6.73	4.91
	3	1.46	1.54	2.00	2.23	2.50	4.08	4.30	5.37	5.72	5.91	6.39	6.92	6.85	6.69	6.54	4.56
	Promedio			2.09		2.61	4.25	4.50	5.50	5.86	6.02	6.44	6.98	6.95	6.72	6.60	4.83
	Desviación Estándar			0.07		0.10	0.16	0.18	0.13	0.15	0.11	0.08	0.10	0.09	0.13		
	% rsd			3.53		3.96	3.81	4.08	2.39	2.57	1.78						
20%	1	1.48	1.63	2.26	2.54	2.88	4.22	4.33	5.04	5.21	5.08	5.08	5.11	5.32	5.02	5.07	3.76
.5+.5+.6g	2	1.50	1.71	2.36	2.70	3.03	4.38	4.51	5.09	5.24	5.18	5.06	5.10	5.03	4.84	4.75	3.29
	3	1.51	1.59	2.01	2.25	2.48	3.71	3.89	4.57	4.77	4.72	4.77	4.96	4.90	4.88	4.77	2.72
	Promedio			2.21		2.80	4.10	4.24	4.90	5.07	4.99	4.97	5.06	5.08	4.92	4.86	3.25
	Desviación Estándar			0.18		0.29	0.35	0.32	0.29	0.27	0.24	0.18	0.08	0.22	0.10		
	% rsd			7.94		10.31	8.55	7.48	5.88	5.25	4.82						
10%	1	1.68	1.91	2.73	3.02	3.48	4.54	4.32	4.68	4.80	4.70	4.49	4.52	4.33	4.06	3.93	2.89
.5+.5+.6g	2	1.53	2.01	2.60	2.88	3.22	3.75	3.76	4.11	4.10	3.97	3.38	3.49	3.34	3.24	2.99	2.02
	3	1.54	1.80	2.68	2.97	3.34	4.19	4.28	4.52	4.50	4.46	4.22	4.00	3.76	3.58	3.35	2.48
	Promedio			2.67		3.35	4.16	4.12	4.44	4.47	4.37	4.03	4.00	3.81	3.63	3.42	2.46
	Desviación Estándar			0.07		0.13	0.39	0.32	0.30	0.35	0.37	0.58	0.51	0.50	0.41		
	% rsd			2.51		3.95	9.45	7.66	6.71	7.77	8.51						
5%	1	1.49	1.83	2.57	2.70	3.05	3.58	3.30	3.71	3.85	3.69	3.30	3.06	2.79	2.70	2.41	1.05
.5+.5+.6g	2	1.44	2.01	2.73	2.93	3.18	3.78	3.68	3.85	3.99	3.83	3.23	3.07	2.66	2.69	2.52	1.14
	3	1.38	1.78	2.60	2.63	3.33	4.09	3.93	4.23	4.32	4.08	3.79	3.23	2.79	2.21	2.07	1.02
	Promedio			2.64		3.19	3.81	3.64	3.93	4.05	3.87	3.44	3.12	2.74	2.53	2.33	1.07
	Desviación Estándar			0.08		0.14	0.26	0.32	0.27	0.24	0.20	0.30	0.09	0.08	0.28		
	% rsd			3.16		4.31	6.76	8.82	6.93	5.89	5.18						

FIG. 12

36 min	73 min	2 hr	17.4 hr	1 día	3.8días	4.8días	5.8días	7.8días	10.8días	11.8días	12.8días	13.8días	17.8días
0.025d	0.005d	0.08d	0.73 d	1 d									
1.338	1.500	1.700	2.772	2.936	3.540	3.786	3.854	4.109	4.462	4.414984	4.154998	4.104045	3.145939
1.270	1.402	1.558	2.536	2.695	3.276	3.483	3.582	3.797	4.119	4.149548	4.081253	3.998871	2.919639
1.306	1.450	1.627	2.661	2.558	3.496	3.724	3.852	4.166	4.508	4.461564	4.360065	4.259805	2.972638
1.305	1.451	1.629	2.656	2.730	3.437	3.664	3.763	4.024	4.363	4.342032	4.198772	4.120907	3.012739
0.034	0.049	0.071	0.118	0.191	0.142	0.160	0.157	0.199	0.213	0.168315			
1.387	1.559	1.771	2.590	2.656	3.094	3.199	3.119	3.118	3.139	3.265	3.084	3.110	2.299098
1.377	1.577	1.774	2.561	2.635	2.977	3.065	3.026	2.961	2.981	2.938	2.830	2.777	1.921773
1.268	1.418	1.559	2.335	2.449	2.876	3.001	2.971	3.000	3.123	3.083	3.073	3.005	1.714088
1.344	1.518	1.701	2.495	2.80	2.982	3.088	3.039	3.026	3.081	3.095	2.996	2.964	1.978319
0.066	0.086	0.123	0.140	0.114	0.109	0.101	0.075	0.082	0.087	0.164	0.143	0.170	
1.426	1.577	1.820	2.370	2.259	2.446	2.506	2.456	2.346	2.360	2.265	2.119	2.052	1.510321
1.291	1.430	1.601	1.865	1.867	2.041	2.041	1.973	1.682	1.734	1.661	1.611	1.486	1.003033
1.489	1.650	1.854	2.326	2.376	2.513	2.501	2.475	2.342	2.221	2.090	1.991	1.859	1.376667
1.402	1.552	1.758	2.187	2.168	2.333	2.349	2.301	2.124	2.105	2.005	1.907	1.799	1.296674
0.101	0.112	0.137	0.280	0.266	0.255	0.267	0.284	0.382	0.329	0.311	0.265	0.288	
1.406	1.474	1.668	1.953	1.800	2.025	2.104	2.014	1.800	1.672	1.522	1.476	1.316	0.570789
1.356	1.456	1.580	1.877	1.829	1.909	1.982	1.900	1.604	1.524	1.320	1.336	1.252	0.563527
1.465	1.480	1.875	2.571	2.214	2.384	2.432	2.300	2.134	1.817	1.571	1.245	1.164	0.57336
1.409	1.470	1.708	2.133	1.947	2.106	2.173	2.071	1.846	1.671	1.471	1.352	1.244	0.569225
0.055	0.013	0.151	0.381	0.231	0.248	0.233	0.206	0.268	0.147	0.133	0.116	0.076	

FIG. 13

322

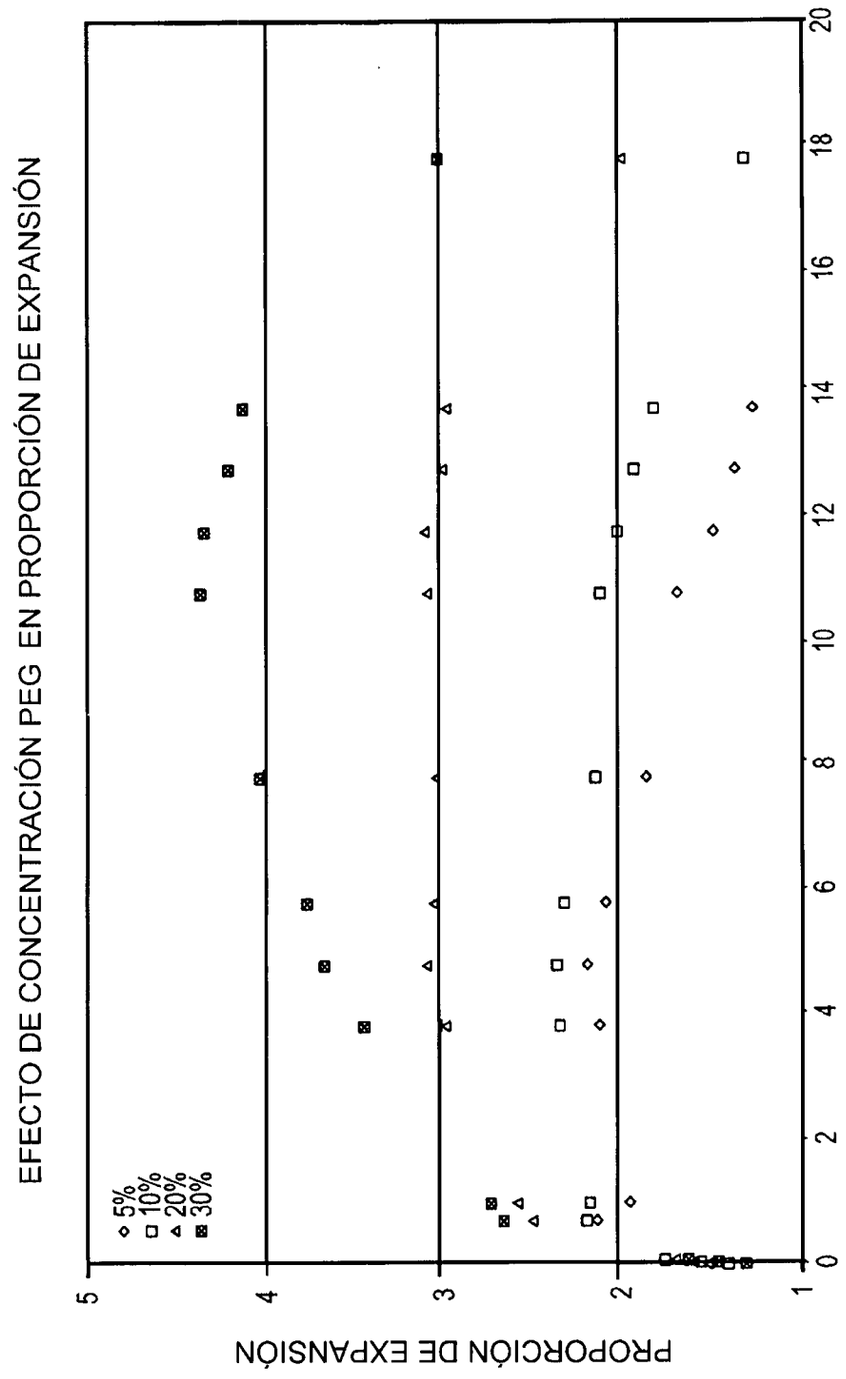

EFECTO DE CONCENTRACIÓN PEG EN PROPORCIÓN DE EXPANSIÓN
5%
10%
20%
30%
PROPORCIÓN DE EXPANSIÓN
TIEMPO, DÍAS
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
1
2
3
4
5

FIG. 14

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País***
60/821,190 **02/08/2006** **US**

(51) Int Cl: **A61L 024/000**

(71)Solicitante(s) **BAXTER INTERNATIONAL, INC. Y BAXTER HEALTHCARE S.A.**

(72) Inventor(es) **WOONZA, M. RHEE Y OTROS**

(74) Apoderado: **EMILIO FERRERO**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 02/03/2009
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 01/08/2007
No. de solicitud PCT/US2007/074984

(87) Publicación internacional
Fecha: 07/02/2008
N° publicación: ***WO 2008/016983 A2***

(54) Titulo: **SELLADOR SECO DE ACCIÓN RÁPIDA Y MÉTODOS DE USO Y FABRICACIÓN**

Reivindicación(es):

1. Una composición que comprende:
un primer componente reticulable;
un segundo componente reticulable que se reticula con el primer componente reticulable bajo condiciones que permiten la reacción; y
un componente que forma un hidrogel;
en donde el primer y segundo componentes reticulables se reticulan para formar una matriz porosa que tiene intersticios, y en donde el componente que forma un hidrogel tiene la capacidad de ser hidratado para formar un hidrogel para llenar al menos algunos de los intersticios.

2. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el primer componente reticulable comprende múltiples grupos nucleofílicos y el segundo componente reticulable comprende múltiples grupos electrofílicos.

3. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el primer componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-nucleofílico que tiene m grupos nucleofílicos, y el segundo componente reticulable comprende un óxido de polialquileno multi-electrofílico que tiene n grupos electrofílicos, caracterizada porque m y n son cada uno mayores o iguales a dos, y en donde m+n es mayor o igual a cinco.

4. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque n es dos, y en donde m es mayor o igual a tres.

5. La composición tal como se describe en la reivindicación 4, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es tetrafuncionalmente activado.

6. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque m es dos, y en donde n es mayor o igual a tres.

7. La composición tal como se describe en la reivindicación 6, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-electrofílico es tetrafuncionalmente activado.

8. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico y el óxido de polialquileno multi-electrofílico son tetrafuncionalmente activados.

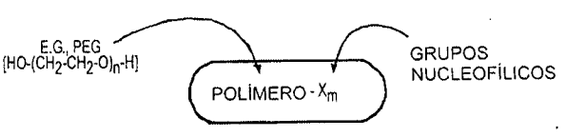
9. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en NH_2, -SH, -H, $-PH_2$, y $-CO-NH-NH_2$.

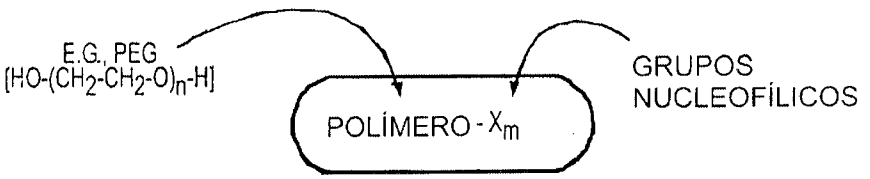
10. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos amino primarios.

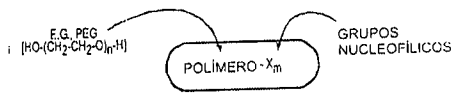
11. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico comprende además dos o más grupos tiol.

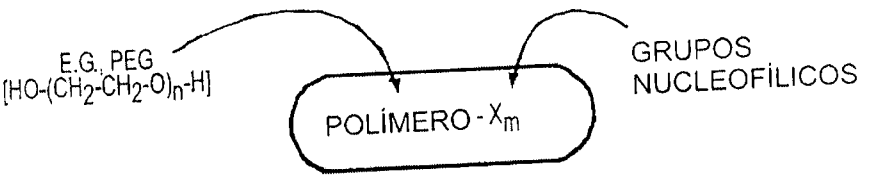
12. La composición tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el óxido de polialquileno multi-nucleofílico es polietilénglicol o un derivado del mismo.

13. La composición tal como se describe en la reivindicación 12, caracterizada porque el polietilénglicol comprende además dos o más grupos nucleofílicos seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino primario y un grupo tiol.




E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
POLÍMERO - Xm
GRUPOS
NUCLEOFÍLICOS


E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
POLÍMERO - Xm
GRUPOS
NUCLEOFÍLICOS


E.G., PEG
[HO-(CH2-CH2-O)n-H]
POLÍMERO - Xm
GRUPOS
NUCLEOFÍLICOS

325

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 9 - 525
FECHA : ENERO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-020987- -00000-0000
Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA			470	06/01/2009	35,596,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
[redacted]	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANT	872,000.00
		TOTAL : $	872,000.00

SON: OCHOCIENTOS SETENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

[redacted]

Radio 13936-841-024-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

326

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 14,846
FECHA : FEBRERO 24 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-020987- -00000-0000

Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

***** C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	19779034	23/02/2009	69,870,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	688,000.00
		TOTAL : $	688,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Odo 13936-841-024-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

327

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 14,815
FECHA : FEBRERO 24 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-020987- -00000-0000

Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	19779034	23/02/2009	69,870,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	8 PROC. DE DEPOSITO DE NOMBRES Y EN	491,000.00
		TOTAL : $	491,000.00

SON: CUATROCIENTOS NOVENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cobro 13936-841-024-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

328

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 14,816
FECHA : FEBRERO 24 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-020987- -00000-0000
Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	19779034	23/02/2009	69,870,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	8 PROC. DE DEPOSITO DE NOMBRES Y EN	491,000.00
		TOTAL : $	491,000.00

SON: CUATROCIENTOS NOVENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cdo 13936 841-024-3

329

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001760(

No. 09-020987- -00000-0000

Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 95,225
FECHA : DICIEMBRE 9 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218955	09/12/2008	45,848,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	93 TASA ANUAL MANTENIMIENTO MODELO D	155,000.00
		TOTAL : $	155,000.00

SON: CIENTO CINCUENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Odo 13936-811-024-3

330

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 545
FECHA : ENERO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-020987- -00000-0000
Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
[redacted] CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA			536	06/01/2009	3,643,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTR	12,000.00
			TOTAL : $	12,000.00

SON: DOCE MIL PESOS

[redacted]SABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Ofo 13936-841-024-3

331

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-020987- -00000-0000
Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 12,703
: FEBRERO 16 DE 2009

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19779093	16/02/2009	16,385,000.00

C O N C E P T O

	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL : $	5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

Colo 13930-841-024-3

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

332

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-020987- -00000-0000
Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 332

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 12,693
: FEBRERO 16 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19779093	16/02/2009	16,385,000.00

***** C O N C E P T O *****

T.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL : $	1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

Odo 13936-891-024-3

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-020987- -00000-0000

Fecha: 2009-03-02 16:48:08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 332

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Sandra Rodriguez
Firma Responsable

Fecha Mayo 2. 09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
BAXTER INTERNATIONAL INC
BAXTER HEALTHCARE S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	9 20987
	Solicitud internacional	PCT/US2007/074984
	Fecha inicio fase nacional	02/03/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3171

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continua en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 20987

DORIS ELENA POLO CORDOBA
Jefe de la división de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 MAR. 2009
adpall