

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 274 746**

51 Int. Cl.:

A61L 31/04 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2001** **E 06075900 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 1695724**

54 Título: **Material de fibrina y procedimiento de producción y uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (100.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US

72 Inventor/es:

DELMOTTE, YVES y
DIORIO, JAMES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 274 746 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Material de fibrina y procedimiento de producción y uso del mismo

Campo técnico

5 Esta invención proporciona un material de hidrogel de fibrina, y particularmente un hidrogel de fibrina útil como vehículo de administración de fármacos y para la prevención de la adhesión postquirúrgica.

Antecedentes de la técnica

10 Uno de los principales problemas de la cirugía intraabdominal es evitar las adhesiones postoperatorias. Es bien conocido que las adhesiones contribuyen al dolor, la inmovilidad, el retraso en la curación de las heridas, y en particular a una obstrucción intestinal que incluso puede ser potencialmente mortal. En el campo de la cirugía ginecológica, las adhesiones postquirúrgicas que implican a los órganos reproductores femeninos pueden dar como resultado una infertilidad.

15 Cada procedimiento quirúrgico produce necesariamente varias formas de traumatismo en las que la cavidad abdominal u otra cavidad humana es abierta para una inspección. Fisiológicamente, el proceso de cierre de la herida comienza entonces cuando cesa la hemorragia tras la formación de un coágulo hemostático en los lugares en los que se han lesionado los vasos sanguíneos. El coágulo, que inicialmente comprende fundamentalmente plaquetas, es solidificado mediante una red de fibrina, resultante de la activación de una cascada enzimática que implica la trombina, el factor XIII y el calcio. Las etapas adicionales conducentes al cierre de la herida son la retracción del coágulo hemostático, la invasión de diversos tipos celulares que incluyen fibroblastos en el área de la herida, y finalmente la lisis de la red de fibrina. Se cree que las adhesiones comienzan a formarse cuando el coágulo de
20 fibrina que cubre una herida entra en contacto con una superficie hemorrágica adyacente y el nuevo tejido conectivo producido por los fibroblastos une las dos superficies entre sí.

Los problemas asociados con las adhesiones requieren a menudo un procedimiento operativo adicional para la eliminación/el lisado de las adhesiones, denominado adhesiolisis, que, al igual que en la primera operación, principalmente presenta el riesgo de la formación de adhesiones adicionales.

25 Consecuentemente, la prevención de la formación de una adhesión es médicamente importante. Entre las diferentes metodologías para la prevención de la formación de una adhesión, una implica el uso de materiales como barrera física o biomecánica para la separación o el aislamiento de los tejidos traumatizados durante el proceso de curación. Se han usado materiales tanto sintéticos como naturales como barrera frente a la formación de una adhesión. Los implantes inertes permanentes como las membranas quirúrgicas de Gore Tex® que consisten en
30 politetrafluoroetileno (PTFE) expandido requieren generalmente un segundo procedimiento operativo para retirarlas, mientras que otras, tales como las membranas quirúrgicas de celulosa regenerada oxidada son biodegradables, pero se cree que desencadenan una respuesta inflamatoria que finalmente da lugar a la formación de una adhesión (A. F. Haney y E. Doty, Fertility and Sterility, 60, 550-558, 1993).

35 Los sellantes y los pegamentos de fibrina son bien conocidos en la materia para su uso en la hemostasia, el sellado de tejidos y la curación de heridas, y han estado disponibles comercialmente durante más de una década. El uso para la antiadhesión y en vehículos de administración de fármacos en procedimientos quirúrgicos del glaucoma es un ejemplo. Los pegamentos de fibrina mimetizan la última etapa de la cascada de la coagulación, y habitualmente se comercializan en forma de kits que comprenden dos componentes principales. El primer componente es una solución que comprende fibrinógeno con o sin factor XIII, mientras que el segundo componente es una solución de
40 calcio y trombina. Después de mezclar los componentes, el fibrinógeno es escindido proteolíticamente por la trombina y por lo tanto convertido en monómeros de fibrina. El Factor XIII también es escindido por la trombina en su forma activada (FXIIIa). El FXIIIa reticula los monómeros de fibrina para formar una red tridimensional denominada comúnmente "gel de fibrina".

45 Como se divulga en la solicitud de patente PCT publicada de titularidad compartida, el documento WO 96/22115, puede usarse un material laminar autosoportable de un material de fibrina reticulado como barrera biomecánica en el tratamiento de lesiones traumáticas interiores, particularmente para la prevención de la formación de una adhesión como una complicación postoperatoria. La solicitud '115 desvela la mezcla de una solución que contiene trombina y calcio con una solución que contiene fibrinógeno y el Factor XIII. Mediante el uso de unas elevadas concentraciones de trombina para catalizar la conversión del fibrinógeno en fibrina, se averiguó que el material de fibrina resultante
50 era lo suficientemente rígido como para ser autosoportable y tener un tamaño de poro lo suficientemente pequeño para impedir la entrada de fibroblastos, que causa la formación de adhesiones. El material de fibrina resultante, sin embargo, no retenía agua con facilidad. De hecho, el agua podía ser fácilmente expulsada del material de fibrina al comprimir el material con la mano. Por lo tanto, este tipo de material de fibrina clásico no podría ser usado para administrar fármacos a una zona con una herida al ser reabsorbido por el cuerpo durante el proceso fibrinolítico.

55 El documento WO98/02098 desvela un material de fibrina reticulado para la prevención de la adhesión de un tejido. Esta invención supera estos y otros inconvenientes de los dispositivos de la técnica anterior. La fibrina del hidrogel tiene una estructura compacta constituida por delgadas fibras definidas por un pequeño tamaño de poro. El agua es

atrapada en el "volumen vacío" de la estructura. El "volumen vacío" es pequeño, regular y está homogéneamente distribuido a lo largo de la totalidad del material de la película. El agua no puede abandonar la estructura de la película debido a su energía interior, y es liberada de la estructura de fibrina dependiendo de la tasa fibrinolítica del biopolímero. La liberación de un fármaco incorporado en el agua o en un tampón es regulada por difusión pasiva, y depende del peso molecular, de la solubilidad y del proceso fibrinolítico.

La eliminación del calcio del proceso de formación de una estructura de fibrina no produce asociaciones laterales de protofibrillas. La ausencia de asociaciones de protofibrillas se corresponde con un elevado número de delgadas fibras por unidad de volumen, confiriendo así un tamaño de poro compacto a la estructura de fibrina. Este tamaño de poro compacto permite que el agua quede atrapada en el "volumen vacío."

10 **Sumario de la invención**

Un primer aspecto de la invención proporciona un material de hidrogel de fibrina que comprende: un material de fibrina formado en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno, material de fibrina que tiene un contenido en agua de al menos el 90 % en peso del material y retiene al menos aproximadamente un 80 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos, y está sustancialmente exento de reticulación.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un material de fibrina de múltiples capas que comprende: una capa de pegamento de fibrina; y una capa del material de hidrogel de fibrina del primer aspecto de la invención.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un material de fibrina de múltiples capas que comprende: una capa de pegamento de fibrina; y una capa del material de hidrogel de fibrina del primer aspecto de la invención, que es una capa de hidrogel de fibrina terapéutico.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un material de fibrina de múltiples capas que comprende: una capa de película de fibrina; y una capa del material de hidrogel de fibrina del primer aspecto de la invención.

Un quinto aspecto de la invención proporciona el material de hidrogel de fibrina del primer aspecto de la invención o el material de fibrina de múltiples capas de cualquiera del segundo hasta el cuarto aspecto de la invención, para su uso en medicina.

Un sexto aspecto de la invención proporciona un uso de un primer material de fibrina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un segundo material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener un 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos, y está sustancialmente exento de reticulación, y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina va a ser aplicado en una superficie, y el segundo material de fibrina va a ser aplicado al primer material de fibrina.

Un séptimo aspecto de la invención proporciona un uso de un segundo material de fibrina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un primer material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener un 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos, y está sustancialmente exento de reticulación, y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina va a ser aplicado en una superficie, y el segundo material de fibrina va a ser aplicado al primer material de fibrina.

Un octavo aspecto de la invención proporciona un primer material de fibrina para su uso en el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un segundo material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener un 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos, y está sustancialmente exento de reticulación, y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina es para su uso mediante su aplicación a una superficie, y el segundo material de fibrina va a ser aplicado al primer material de fibrina.

Un noveno aspecto de la invención proporciona un segundo material de fibrina para su uso en el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un primer material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener un 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos, y está sustancialmente exento de reticulación, y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina va a ser aplicado en una superficie, y el segundo material de fibrina es para su uso mediante su aplicación al primer material de fibrina.

Otras ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes tras la lectura de la siguiente descripción de los dibujos y de la descripción detallada de la invención.

5 En una realización en particular, el primer aspecto de esta invención proporciona un dispositivo médico para la prevención de la formación de una adhesión postquirúrgica y para la liberación controlada de fármacos en seres humanos y en especies no humanas. El dispositivo comprende un material de hidrogel de fibrina que tiene un contenido en agua de al menos aproximadamente un 90 % en peso del hidrogel. El hidrogel de fibrina tiene un tamaño de poro en el intervalo de menos de 1 micrón, y preferentemente menor de 0,1 μm tiene una transparencia de menos de aproximadamente 1,0 AUFS, más preferentemente de menos de aproximadamente 0,8 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm. El hidrogel de fibrina está sustancialmente exento de reticulación.

10 En una realización en particular, el segundo, el tercer o el cuarto aspecto de la presente invención proporciona adicionalmente un material de fibrina de múltiples capas para su aplicación en un tejido animal. Las características de cada capa están determinadas por las concentraciones de los constituyentes y por la presencia de calcio y del Factor XIII. En una forma preferida, además de un hidrogel de fibrina, el material o la película incluye una capa de un pegamento de fibrina. La capa del pegamento de fibrina tiene un tamaño de poro en el intervalo de menos de 2 y 10 micrones. En otra realización, el hidrogel de fibrina incluye una capa de una película de fibrina clásica. La capa de película de fibrina clásica tiene un tamaño de poro en el intervalo de entre 0,1 y 10 micrones y está reticulada.

20 En otra realización, una capa del material de fibrina de múltiples capas es un material de hidrogel de fibrina terapéutico que tiene un contenido en agua de al menos el 92,5 % en peso del hidrogel y mediante lo cual el hidrogel tiene un 90 % de agua tras una compresión mediante una fuerza de entre 1 y 14 psi. La capa de hidrogel de fibrina terapéutico del material de fibrina de múltiples capas retiene de forma liberable un diluyente mediante lo cual el diluyente comprende un agente terapéutico. La capa de hidrogel de fibrina terapéutico del material de fibrina de múltiples capas tiene un tamaño de poro en el intervalo de entre 0,1 y 1 micrones, y tiene una claridad de óptica de menos de aproximadamente 1,0 AUFS, más preferentemente menor de aproximadamente 0,50 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm. La capa del hidrogel de fibrina está sustancialmente exenta de reticulación. En una realización de la capa de hidrogel de fibrina terapéutico del material de fibrina de múltiples capas, el agente terapéutico retenido de forma liberable comprende un compuesto farmacéutico. En otra realización de la capa de hidrogel de fibrina terapéutico del material de fibrina de múltiples capas, el agente terapéutico retenido de forma liberable comprende células vivas, tales como condrocitos. Asimismo, se contemplan también otros tipos de células.

30 **Descripción detallada de la invención**

Aunque esta invención es susceptible de ser realizada en muchas formas diferentes, en los dibujos se muestra, y en el presente documento se describirá de forma detallada, una realización preferida de la invención con la comprensión de que la presente divulgación debe ser considerada como una ejemplificación de los principios de la invención y no pretende limitar el amplio aspecto de la invención a las realizaciones ilustradas.

35 Una forma preferida de la presente invención proporciona un material de hidrogel de fibrina autosoportado y biodegradable que se obtiene mediante la mezcla de soluciones de fibrinógeno y de trombina diluidas con un soluto que inhibe la acción del calcio sobre el fibrinógeno en un medio con una elevada fuerza iónica, ambas exentas de calcio. La técnica anterior desvela que el calcio es un componente crítico en la formación de un material de fibrina. El material de hidrogel resultante tiene unas fibras delgadas y un tamaño de poro pequeño, y es adecuado para su uso como una barrera antiadhesión.

I. Material de hidrogel de fibrina

45 Preferiblemente, el material de hidrogel de fibrina para aplicaciones antiadhesión tendrá un tamaño de poro de entre 1- 5 micrones, y más preferentemente de entre 0,1- 3. El material de hidrogel de fibrina preferentemente también retiene agua fácilmente tras una compresión. Preferiblemente el hidrogel debe retener un 80 - 90 % de su contenido en agua tras la compresión del material con una fuerza de entre 1- 14 psi.

El material de hidrogel tiene un módulo de elasticidad lo suficientemente alto como para ser autosoportado. Por autosoportado queremos decir un material de hidrogel de fibrina de 5 cm de largo por 5 cm de ancho por 5 mm de espesor puede ser sostenido por un extremo sin que el segundo extremo se desvíe hacia abajo con respecto al extremo sostenido más de 10 grados.

50 También es deseable que el hidrogel de fibrina sea relativamente ópticamente transparente, y en una forma preferida, debería tener una densidad tóxica medida con un espectrofotómetro a 800 nm de entre 0,1-0,2, más preferentemente de entre 0,1-0,5, y lo más preferentemente de entre 0,1-0,4. Como puede observarse en la Figura 1, el hidrogel de fibrina tiene una red de fibras 10 que debería tener un diámetro medio, en una forma preferida, de menos de aproximadamente 5,0 micrones, más preferentemente de menos de aproximadamente 2,0 micrones y lo más preferentemente de menos de aproximadamente 1,0 micrones, o cualquier intervalo o combinación de intervalos entre los mismos.

En una forma preferida de la invención, un hidrogel de fibrina es un material monocapa. La presente invención también proporciona un material de fibrina de múltiples capas que comprende dos o más capas.

5 En las realizaciones preferidas, el espesor del material de barrera de fibrina es de al menos 200 μm cuando la barrera está en un estado húmedo. Preferiblemente, el espesor es de aproximadamente 50 μm , y lo más preferentemente de hasta 10.000 μm , aunque se cree que incluso un material con un espesor de menos de 100 μm puede ser adecuado para los fines de la invención.

10 El material de hidrogel también debe ser susceptible de ser reabsorbido por el cuerpo o ser biorreabsorbible. Preferiblemente, dependiendo de la concentración de fibrinógeno y de la cantidad de aplicada, un hidrogel de fibrina de 3 cm x 3 cm x 1 cm el hidrogel será reabsorbido por el cuerpo en su totalidad en 14 días, más preferentemente en 10 días y lo más preferentemente en 5 días.

15 El hidrogel de fibrina puede distinguirse del clásico material de fibrina de varias formas. En primer lugar, el hidrogel de fibrina puede conseguir un tamaño de poro menor que el del material de fibrina clásico con la misma concentración de trombina. El hidrogel de fibrina tiene un tamaño de poro más compacto independientemente de la concentración de trombina usada. Esto tiene una ventaja sobre los materiales de fibrina clásicos, ya que el proceso fibrinolítico se mantiene o se aumenta por encima de los niveles fisiológicos.

Los materiales de fibrina clásicos utilizan grandes cantidades de calcio, obstaculizando así el proceso fibrinolítico. El proceso fibrinolítico es ralentizado por la presencia de reticulaciones gamma-gamma en el material de fibrina, que son causadas por la presencia de un exceso de calcio. El menor nivel de calcio del material de hidrogel de fibrina inhibe la reticulación, permitiendo así una degradación más rápida del material de hidrogel de fibrina.

20 El mayor tiempo requerido para la degradación de los materiales de fibrina clásicos también puede dar como resultado un mayor grado de adhesión. Se cree que las cualidades antiadhesión del hidrogel de fibrina son el resultado del contenido en trombina. El contenido en trombina del hidrogel de fibrina permite una mayor tasa fibrinolítica que los materiales de fibrina clásicos.

25 Otra distinción es la capacidad del hidrogel de fibrina para retener agua bajo fuerzas de compresión. El grado de retención de agua del hidrogel de fibrina supera con creces la retención de agua de los materiales de fibrina clásicos. Este factor de permeabilidad es una importante distinción entre el hidrogel de fibrina de la presente invención y los materiales de fibrina clásicos. La lenta tasa de liberación de agua por parte del material de hidrogel de fibrina permite que el hidrogel actúe como lubricante mediante la liberación de agua, aumentando adicionalmente sus propiedades antiadhesión.

30 II. Procedimiento para la formación de un hidrogel de fibrina

Los presentes inventores han averiguado que puede formarse un material de hidrogel de fibrina en ausencia de una solución que contenga calcio y en ausencia de una solución que contenga el Factor XIII, que previamente se consideraban en la materia unos componentes esenciales. En una forma preferida de la invención se obtiene un hidrogel de fibrina mediante la admisión de una solución que contiene fibrinógeno con una solución que contiene trombina. La solución de fibrinógeno debería tener entre 1,5 - 100 mg/ml, más preferentemente entre 3 - 70 mg/ml y lo más preferentemente 45 mg/ml de fibrinógeno disuelto en una solución que contiene unos componentes capaces de quelatar el calcio. El componente quelante también debería ser no tóxico, y en una forma preferida de la invención es una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con unos niveles fisiológicamente aceptables. El agente quelante también debería ser un antagonista de la reacción de transamidación del fibrinopéptido a entre 5 UI-300 UI.

45 También, al contrario que las enseñanzas de la técnica anterior, la concentración de trombina de los componentes mezclados no determina el tamaño de poro del material de hidrogel de fibrina. Como se analizará a continuación y según se muestra en las Figuras 1-5, se formaron materiales de hidrogel de fibrina que tienen relativamente el mismo tamaño de poro independientemente del uso de unas concentraciones de trombina de entre 1 UI y 300 UI. Se averiguó que la concentración de trombina todavía controlaba la tasa de formación de un hidrogel de fibrina.

50 Es bien conocido que la mezcla de una primera solución que contiene fibrinógeno con Factor XIII y de una segunda solución de trombina con calcio dará como resultado la formación de un material de fibrina con una pronunciada asociación lateral y una considerable reticulación entre sus gruesas fibras. También es bien conocido que la trombina actúa como una proteasa que escindirá el fibrinopéptido A y B de la molécula de fibrinógeno y lo convertirá en fibrina. Los fibrinopéptidos de las especies de vertebrados tienen supuestamente una gran carga negativa neta. La presencia de éstos y de otros grupos cargados negativamente en los fibrinopéptidos son probablemente los actores que mantienen separado el fibrinógeno. Su liberación por parte de la trombina proporciona a los monómeros de fibrina un patrón diferente de superficie-carga, conduciendo a su agregación específica. En particular, la eliminación de los fibrinopéptidos cambia la carga neta de la unidad globular central desde -8 hasta +5. Cada una de las unidades globulares terminales tiene una carga neta de -4. Por lo tanto, las interacciones electrostáticas entre las unidades globulares terminal y central probablemente estabilizan la estructura de la fibrina.

También se sabe que los iones de calcio juegan un importante papel en la disociación de la subunidad A del Factor XIII de la subunidad B del Factor XIII cuando el Factor XIII se convierte en su forma activada, el Factor XIIIa. Adicionalmente, se sabe que el Factor XIIIa es crítico en la reticulación de los monómeros de fibrina. También se sabe que la anchura de las fibras que comprenden el material de fibrina puede ser reducida aumentando el pH y la fuerza iónica de los diluyentes.

Mediante la eliminación (quelación) de los iones de calcio unidos al fibrinógeno, los inventores han sido capaces de modificar la estructura de la fibrina para obtener realizaciones adicionales del hidrogel de fibrina. Consecuentemente, la presente invención usa una solución capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno. En una forma preferida de la invención, una solución tampón de fosfato que tiene una concentración similar a los niveles fisiológicamente aceptables. Los inventores sugieren que las modificaciones estructurales resultantes del hidrogel de fibrina se producen como resultado de un "efecto de carga" que altera las anteriormente mencionadas interacciones electrostáticas entre las unidades globulares terminal y central, inhibiendo así la asociación lateral de la fibrina. En algunas formas de realización adicionales del hidrogel de fibrina, la modificación de la concentración del Factor XIII usado en la síntesis de la fibrina altera las características de reticulación del material final de fibrina. Por lo tanto, en algunas realizaciones adicionales de la invención, los inventores han desarrollado un hidrogel de fibrina que puede ser sintetizado con unas bajas concentraciones de trombina y según las especificaciones del usuario final relativas a la asociación lateral y el espesor de la fibra de la estructura resultante del hidrogel de fibrina.

Durante la formación de un hidrogel de fibrina, es deseable que la totalidad del fibrinógeno sea convertido en fibrina, ya que las cantidades residuales de fibrinógeno pueden conducir a la formación de una adhesión tras la reacción con la trombina presente en el cuerpo. Consecuentemente, en algunas realizaciones adicionales más de la presente invención, el hidrogel de fibrina comprende adicionalmente menos del 5 % en peso de fibrinógeno, preferentemente menos del 4 % en peso de fibrinógeno, preferentemente menos del 3 % en peso de fibrinógeno, preferentemente menos del 2 % en peso de fibrinógeno, y lo más preferentemente menos del 1 % en peso de fibrinógeno, en términos del peso seco total del fibrinógeno más la fibrina cada vez. Con el fin de determinar el contenido en fibrina y en fibrinógeno de la película de fibrina, pueden usarse los procedimientos de SDS-PAGE (electroforesis en gel con SDS).

Los dispositivos médicos mostrados en la Figura 6 y como se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos de titularidad compartida nº 5.989.215 pueden usarse por vía tópica, en cirugías abiertas (por ejemplo, laparotomías) o en cirugías mínimamente invasivas (por ejemplo, cirugías laparoscópicas). Por supuesto, existen otros tipos de cirugías abiertas y de cirugías mínimamente invasivas, como apreciará el experto habitual en la materia. El dispositivo médico 20 puede usarse para formar el material de hidrogel de fibrina en el interior y en el exterior del cuerpo animal.

La presente invención proporciona un proceso para preparar una matriz o una película autosoportada de hidrogel de fibrina en el exterior del cuerpo que comprende las etapas de:

- (a) mezclar una corriente de una primera solución que contiene fibrinógeno disuelto en PBS con una corriente de una segunda solución de PBS que contiene trombina;
- (b) aplicar la mezcla obtenida sobre un soporte sólido o mezclar los componentes del soporte sólido; y
- (c) incubar la mezcla para formar la matriz de hidrogel.

Con objeto de obtener una mezcla lo más homogénea posible (y por lo tanto, un producto final homogéneo) en la etapa (a) se mezcla una corriente de una primera solución que contiene fibrinógeno con una corriente de una segunda solución que contiene trombina mediante la administración simultánea de los componentes. También es posible administrar un componente en una superficie, seguido del otro componente. Preferiblemente, se mezclan volúmenes iguales de la primera y de la segunda solución. En el caso de que deban mezclarse volúmenes diferentes de la primera y de la segunda solución, en la materia se sabe que deben tomarse medidas con el fin de garantizar que se obtenga una mezcla homogénea.

Mediante el uso del dispositivo de administración mencionado anteriormente, la mezcla resultante se extiende en la superficie de un soporte sólido, por ejemplo, una placa de Petri o similares, que es inclinada para cubrir la totalidad de la superficie todo lo posible antes de que comience la formación del material de hidrogel de fibrina.

Con el fin de preparar un hidrogel de fibrina sobre un tejido de mamífero, los inventores proponen un proceso que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una primera solución tampón de fosfato que contiene fibrinógeno;
- (b) proporcionar una segunda solución tampón de fosfato que contiene trombina;
- (c) mezclar la primera solución y la segunda solución antes o después de colocar la mezcla en un tejido animal;
- (d) y obtener un material de hidrogel de fibrina con una estructura compacta y un tamaño de poro pequeño, adecuado para la prevención de la adhesión postquirúrgica.

Las soluciones de fibrinógeno y de trombina pueden mezclarse inicialmente en un dispositivo de administración, o ser atomizadas con un pulverizador y mezcladas mientras están en forma de gotitas pulverizadas mientras están en

el aire o tras un primer contacto con la superficie del tejido, o administradas a través de un catéter multilumen.

El hidrogel de fibrina puede formarse mediante la utilización de los constituyentes de un kit. Una realización preferida del kit de hidrogel de fibrina incluye:

- 5 (a) un vial de proteínas que incluye fibrinógeno;
 (b) un vial de trombina;
 (c) un vial de solución tampón de fosfato que sirve como diluyente; y
 (d) un aparato apropiado de mezcla auxiliar y aplicación que incluye, pero no se limita a, jeringas y catéteres.

10 Una realización adicional del kit de hidrogel de fibrina incluye un vial que contiene el cóctel de proteínas en el que el contenido en proteína no es menor de 30 mg/ml. Otra realización adicional del kit de hidrogel de fibrina incluye un vial que contiene el cóctel de proteínas en el que el contenido en Factor XIII varía entre 0 UI/ml y 80 UI/ml. Una realización adicional más del kit de hidrogel de fibrina incluye un vial que contiene trombina, en el que la concentración de trombina varía entre 0,1 UI/ml y 1000 UI/ml. En otra realización preferida más del kit de hidrogel de fibrina, los constituyentes suministrados están preformulados para asegurar que cuando se mezclen el hidrogel conseguido tenga una estructura homogénea con unos tamaños de poro compactos adecuados para que actúe como una profilaxis en la formación de una adhesión.

15 Otra realización preferida del kit de hidrogel de fibrina incluye los constituyentes preformulados, suministrados para asegurar que cuando se mezclen el hidrogel conseguido tenga una estructura homogénea con unos tamaños de poro compactos adecuados para que actúe como una profilaxis en la formación de una adhesión y como un sistema de administración de fármacos. Puede observarse la ausencia de adhesión con un fibrinógeno exento de FXIII o un componente de acción similar. El kit de hidrogel de fibrina incluye un vial de fibrinógeno mezclado con trombina inactiva, un vial de un tampón adecuado, un dispositivo auxiliar equipado con fibra óptica para fotoactivar la trombina, y el suministro de luz. En otra realización preferida del kit de hidrogel de fibrina, el fibrinógeno, la trombina inactiva, el tampón adecuado y un auxiliar están, todos, en un dispositivo de administración. La Figura 7 ilustra otra realización preferida en la que un cartucho presurizado aloja fibrinógeno y trombina en forma de polvo en bolsas individuales. El cartucho puede ser desenroscado para permitir la rehidratación del fibrinógeno y de la trombina. Un aumento en la presión permite que ambos componentes sean pulverizados a través de un sistema de tubos dobles o a través de canales concéntricos. Otra realización preferida, la Figura 8, utiliza un sistema de doble jeringa con unos volúmenes de menos de 100, 50, 20 ml cada uno, más preferentemente de menos de 20 ml cada uno, y lo más preferentemente de menos de 10 ml cada uno, pero mayores de 3,0 ml. Este sistema de jeringa doble está equipado con una conexión en Y para incorporar un tubo. Dichos dispositivos pueden ser usados en aplicaciones veterinarias. En otra realización preferida, el material de hidrogel de fibrina puede ser fabricado en artículos seleccionados entre el grupo que consiste en películas, tubos y pellas. Estos materiales de hidrogel de fibrina puede ser fabricados en artículos usando las técnicas seleccionadas entre el grupo de extrusión, moldeo y termoformado. Estos materiales de hidrogel de fibrina pueden ser esterilizados a una temperatura inferior a 0 °C mediante radiación gamma, almacenados a una temperatura inferior a 0 °C, y usados a demanda. La estabilización con radiación gamma es por debajo de - 25 °C, a una dosis de al menos 25 kGy. En otra realización preferida más del kit de hidrogel de fibrina, el vial del diluyente contiene una solución tampón de fosfato. En otra realización preferida del kit de hidrogel de fibrina, el vial del diluyente contiene un tampón con una elevada fuerza iónica capaz de capturar el calcio unido al fibrinógeno. Otras soluciones adecuadas incluyen; citrato de sodio, citrato de potasio, EDTA, EGTA, soluciones de cloruro, soluciones de fosfato u otras soluciones de iones que tienen una fuerte afinidad por el calcio. El fibrinógeno, la trombina y otras proteínas tales como la fibronectina y el FXIII pueden proceder de un único donante, de múltiples donantes, de donantes agrupados, de la fracción I de Cohn o ser recombinante. En otra realización preferida del kit de hidrogel de fibrina, el vial del diluyente contiene un tampón capaz de quelar el calcio exógeno.

III. Hidrogel de fibrina terapéutico

45 La presente invención también proporciona un hidrogel de fibrina que retiene de forma liberable un diluyente o un agente terapéutico. El agente terapéutico es retenido en los poros del material de hidrogel, y cuando se coloca en el cuerpo de un mamífero es liberado con el tiempo según se reabsorbe el hidrogel de fibrina en el cuerpo.

50 El (los) agente(s) terapéutico(s) que se contempla que sea(n) retenido(s) de forma liberable por la capa de hidrogel terapéutico comprende(n), pero no se limita(n) a, compuestos farmacéuticos, antibióticos, agentes fibrinolíticos y modificadores de la respuesta biológica, en particular citocinas y promotores de la reparación de heridas, preferentemente en una cantidad de hasta el 1 % en peso en términos del peso seco total de la fibrina más el fibrinógeno. Debido a las propiedades quimiotácticas de la trombina, se prefiere una baja concentración de trombina con el fin de la antiadhesión. Sin embargo, pueden ser necesarias unas mayores concentraciones de trombina para acelerar el tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación se llevó a cabo con un dispositivo semiautomatizado BFT II de Dade Behring con fibrinógeno a 25 mg/ml con unas concentraciones variables de trombina de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 y 10,0 UI/ml. Se usó PBS como diluyente para el fibrinógeno y la trombina. Los tiempos de coagulación se recogen en la siguiente tabla.

Concentración de fibrinógeno	Concentración de trombina	Tiempo de coagulación (segundos)
25 mg/ml	0,5 UI/ml	430
25 mg/ml	1,0 UI/ml	237
25 mg/ml	2,5 UI/ml	83
25 mg/ml	5,0 UI/ml	37
25 mg/ml	10,0 UI/ml	20

5 Algunos ejemplos de agentes fibrinolíticos incluyen t-PA, μ -PA, estreptocinasa, estafilocinasa, plasminógeno y similares. Estos compuestos favorecen la fibrinólisis, y por lo tanto pueden usarse para controlar la tasa de degradación de la película de fibrina *in vivo*. Se entiende que el término "*modificadores de la respuesta biológica*" se refiere a las sustancias que están implicadas en la modificación de una respuesta biológica, tales como la reparación de heridas, de una forma que potencie el efecto terapéutico deseado. Algunos ejemplos incluyen citocinas, factores de crecimiento, y similares. Debido a sus intrínsecas propiedades mecánicas, la película de fibrina de la invención no requiere ningún agente de reticulación adicional que pueda ejercer un efecto tóxico en el cuerpo humano o animal.

10 Debido a su elevado nivel de dilución, es posible que el hidrogel de fibrina atrape y libere agua. Esto es útil para la hidratación de los tejidos o como lubricante para ayudar en las propiedades antiadhesivas del hidrogel de fibrina.

El agente terapéutico puede ser incorporado en el material de hidrogel de fibrina durante la formación del hidrogel. El agente terapéutico puede ser soluble en agua o insoluble en agua, un anticuerpo, un agente antimicrobiano, un agente para mejorar la biocompatibilidad, proteínas, compuestos antiinflamatorios, compuestos reductores del rechazo de un injerto, células vivas, inhibidores del crecimiento celular, un agente estimulante de las células endoteliales, antibióticos, antisépticos, analgésicos, antineoplásicos, polipéptidos, inhibidores de la proteasa, vitaminas, citocinas, citotoxinas, minerales, interferones, hormonas, polisacáridos, material genético, factores de crecimiento, factores de crecimiento celular, sustancias contra el colesterol, analgésicos, colágenos, células estromales, células osteoprogenitoras, polilactato, alginato, ácidos grasos C₂-C₂₄, y mezclas de los mismos. La administración del agente terapéutico regulada por una o ambas de la difusión pasiva y la tasa fibrinolítica. El agente terapéutico puede ser disuelto en una o en ambas soluciones de trombina o de fibrinógeno. El agente terapéutico es retenido por el material de hidrogel según se forma a partir de la solución mezclada.

15

20

IV. Película de hidrogel de fibrina de múltiples capas

La presente invención también proporciona una capa múltiple de una película de hidrogel de fibrina. El hidrogel de fibrina puede incluir una única capa adicional o múltiples capas adicionales de pegamento de fibrina, una película de fibrina clásica, un hidrogel de fibrina, una película del hidrogel de fibrina terapéutico y capas de otros materiales sintéticos o naturales, tales como alginato, poliláctico, glicólico, silicio y compuestos hialurónicos. La presente invención contempla este material unido a la superficie de polímeros sintéticos mediante la modificación biomecánica de la superficie o la alteración de otro modo de la retención física de la superficie. Adicionalmente, una premezcla parcial de los componentes en la interfase entre las capas puede permitir que se produzca el pegado. Adicionalmente, también se contempla la unión al colágeno o a otro material orgánico. El colágeno y otros materiales orgánicos tienen una afinidad química por las proteínas tales como el fibrinógeno y la fibronectina. La presente invención contempla la selección de cualquier combinación de los anteriores componentes y su conexión entre sí en diferentes órdenes basándose en la función deseada del material de la película. La presente invención contempla adicionalmente la selección de los espesores individuales de las capas individuales y del espesor global de la película basándose en su función prevista. Lo siguiente es un conjunto de ejemplos no limitantes de películas con múltiples capas. La presente invención no debe estar limitada a estos ejemplos de realizaciones.

25

30

35

La presente invención proporciona una película de fibrina con múltiples capas que tiene una primera capa de un hidrogel de fibrina o hidrogel terapéutico, y una segunda capa de una película de fibrina clásica. La película de fibrina "clásica" se obtiene mezclando una solución que contiene trombina y calcio con una solución que contiene fibrinógeno y Factor XIII, según se divulga con detalle en la Solicitud PCT WO 96/22115. La primera y la segunda capa se adhieren con facilidad entre sí. Durante el proceso de conversión, la propiedad adhesiva del fibrinógeno está presente, y puede permitir que las capas se peguen entre sí. Si se añade demasiado tarde el fibrinógeno, el material de fibrina obtenido ya no es adhesivo, dando por lo tanto como resultado la posibilidad de un deslaminado. La presente invención contempla que la retención mecánica pueda aumentarse realizando perforaciones en la primera capa en la que puede penetrar el pegamento de fibrina y adherirse a las capas.

40

45

La presente invención también proporciona una película de tres capas que tiene una primera capa de un hidrogel de fibrina, una capa interior de pegamento de fibrina y una capa exterior de un material de hidrogel terapéutico. Otra película de tres capas incluye una capa interior y exterior de pegamento de fibrina en las superficies opuestas de una capa de material de hidrogel de fibrina. Preferiblemente, el pegamento de fibrina se obtiene mezclando la

50

solución que contiene fibrinógeno con un volumen igual de una solución que contiene trombina. La solución que contiene fibrinógeno contiene fibrinógeno y factor XIII (0,1 - 40 UI/ml). La concentración de fibrinógeno es expresada en forma de la concentración de proteínas totales (preferentemente a entre aproximadamente 3 -140 mg/l y más preferentemente a entre 30-110 mg/ml) y el porcentaje de proteína coagulable en la misma.

- 5 También se prefiere que la solución de fibrinógeno tenga una viscosidad que permita que la solución sea pulverizada, y preferentemente pulverizada usando las presiones generadas mediante el uso de una jeringa de accionamiento manual. La solución de fibrinógeno debería tener una viscosidad de menos de 20 centipoises, más preferentemente menor de 10 centipoises, y lo más preferentemente de entre 1-5 centipoises, o cualquier combinación o subcombinación de intervalos entre las mismas. La solución que contiene trombina debería tener una concentración de trombina menor de 10000 UI de trombina. El pegamento de fibrina se ha elaborado preferentemente mezclando dicha solución que contiene fibrinógeno con un volumen igual de una solución que contiene trombina de al menos 50 UI de trombina, preferentemente de al menos 150 UI de trombina, y lo más preferentemente de al menos 300 UI de trombina

- 15 Otro ejemplo más de una película con múltiples capas incluye las capas apiladas en el orden de la clásica película de fibrina/hidrogel/hidrogel terapéutico/hidrogel/película de fibrina clásica. En este caso, la administración del agente terapéutico en el hidrogel terapéutico puede estar retardada por el tiempo que tardan las capas exteriores en ser reabsorbidas por el cuerpo. Por lo tanto, la presente invención proporciona la construcción, en la estructura de la película en múltiples capas, de las secuencias por esquemas de administración temporal según se desee.

Otras realizaciones contempladas incluyen:

- 20 1. Una estructura de múltiples capas formada por una capa superficial de material de hidrogel y una capa inferior de membrana. La membrana puede ser tejido o fibrina.
 2. Una estructura de múltiples capas formada por una capa superficial de fibrina clásica y una capa inferior de material de hidrogel.
 25 3. Una estructura de múltiples capas formada por capas exteriores de fibrina clásica y una capa interior de material de hidrogel.
 4. Una estructura de múltiples capas formada por una capa superficial de material de hidrogel y una capa interior de material de esponja de fibrina.
 5. Una estructura de múltiples capas formada por capas exteriores de material de hidrogel y una capa interior de membrana.
 30 6. Microesferas de material de hidrogel de entre 0,1 mm y 3 mm.
 7. Un material de hidrogel moldeado anatómicamente.

La presente invención también proporciona un proceso para preparar un material de fibrina de múltiples capas. Uno de dichos procesos para la preparación de un material de fibrina de múltiples capas incluye las etapas de:

- (1) proporcionar una capa de base de hidrogel de fibrina, que comprende las etapas de:
- 35 (a) proporcionar una primera solución tampón que contiene fibrinógeno;
 (b) proporcionar una segunda solución tampón que contiene trombina;
 (c) proporcionar los constituyentes adicionales bien en la primera o bien en la segunda solución tampón, según sea necesario para una preparación específica;
 (c) mezclar la primera solución, la segunda solución y cualquier solución adicional en una superficie tal como una placa de Petri o un tejido;
 40 (d) y obtener una capa de fibrina con una estructura deseada y un tamaño de poro deseado adecuada para su fin previsto.
- (2) proporcionar una capa adicional mediante la repetición de las etapas 1 (a) hasta 1 (d) en la que la mezcla se produce en la capa o capas formadas más tempranamente;
- 45 (3) proporcionar capas adicionales, si se desea, mediante la repetición de la etapa 2;
 (4) proporcionar una capa final mediante la repetición de las etapas 1 (a) hasta 1 (d).

- La presente invención también proporciona un hidrogel de fibrina que retiene una mayor proporción de agua que los materiales de fibrina disponibles actualmente. El mayor grado de retención de agua es particularmente beneficioso para el uso terapéutico del hidrogel. La retención de agua es necesaria para el control de la concentración de los agentes terapéuticos contenidos en el hidrogel de fibrina, así como para la eficaz liberación de estos agentes terapéuticos y aditivos.
- 50

- Se probó la capacidad de los hidrogeles de fibrina de retener agua mientras están sometidos a fuerzas de compresión, y se comparó con la capacidad de retención de agua de un material de fibrina clásico. En particular, se aplicó una compresión mediante una centrifugación de los materiales a diversas velocidades de rotación, y se midió la cantidad de agua retenida. Una centrifuga refrigerada (Sorvall RT 6000B) rotó los hidrogeles de fibrina a diferentes velocidades:
- 55

- 1000 rpm durante 30 min que se corresponde con 156 G

- 2000 rpm durante 30 min que se corresponde con 625 G
- 3000 rpm durante 30 min que se corresponde con 1428 G

Se usó un filtro de tipo Amicon "centricon 30", que se corresponde con un corte de membrana de 30000 y se caracteriza por un tiempo de rotación máximo de 30 min y por soportar una fuerza G máxima de 5000 G. El filtro Amicon está formado por dos unidades. La unidad superior contiene el propio componente del filtro y puede ser unida a la segunda unidad del filtro Amicon. La segunda unidad, o inferior, es la copa del fondo. La copa del fondo permite la recolección del agua que es expulsada desde el material de fibrina depositado en el filtro de la unidad superior. El agua recogida en la copa del fondo se usaba para medir la cantidad de agua liberada por los materiales de fibrina a las diversas velocidades de rotación. Una vez separadas las soluciones de fibrinógeno y de trombina, se aplicó un volumen de aproximadamente 1 ml de fibrina al filtro. Se requiere un dispositivo de mezcla apropiado para que la mezcla de fibrinógeno y trombina sea completa y homogénea.

La parte superior y la inferior se pesan por separado antes de la deposición del material de fibrina y después de cada etapa de centrifugación. Se calcula un factor de corrección con objeto de considerar que se ha distribuido 1 g de fibrina en el filtro.

Se llevaron a cabo experimentos individuales para probar los efectos de los diluyentes. Las etapas del procedimiento de cada experimento fueron como sigue:

- 1) el filtro y la copa del fondo del filtro Amicon se pesan por separado, después se pone en el filtro el material de fibrina obtenido mediante la mezcla de cada solución de fibrinógeno con una solución de 20 UI/ml de trombina. Se calcula un factor de corrección con objeto de considerar que se ha distribuido 1 g de fibrina en el filtro. El filtro se centrifuga a 1000 rpm durante 30 minutos. Al final del ciclo de centrifugación, se extrae cuidadosamente la copa del fondo, se pesa y se registra.
- 2) la copa del fondo se conecta al filtro y se centrifuga a 2000 rpm durante 30 minutos, al final del ciclo, la copa del fondo se pesa y se registra el valor acumulado.
- 3) de nuevo, se conecta la copa del fondo al filtro y se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos, y la copa del fondo se pesa al final del ciclo.

En el primer experimento, el vial de fibrinógeno fue reconstituido con 3,5 ml de agua destilada para obtener una concentración final de 100 mg/ml de fibrinógeno. Se llevaron a cabo diluciones del fibrinógeno en agua con objeto de obtener respectivamente:

- una dilución a 1:2 (50 mg/ml) en agua
- una dilución a 1:4 (25 mg/ml) en agua
- una dilución a 1:6 (16,6 mg/ml) en agua
- una dilución a 1:8 (12,5 mg/ml) en agua

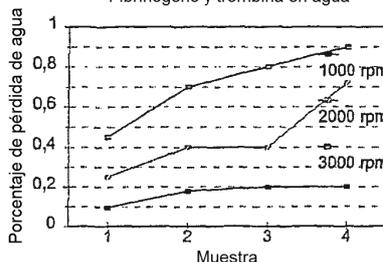
La trombina (Baxter Hyland) fue reconstituida con 3,5 ml de CaCl_2 40 mmol con objeto de obtener una concentración de 300 UI/ml. Se realiza una dilución con CaCl_2 para obtener una concentración de trombina de 20 UI/ml.

Las soluciones de fibrinógeno se mezclaron después con un volumen igual de trombina (20 UI/ml) para obtener una concentración final de "fibrinógeno" respectivamente de:

- la muestra 1: diluida a 1:4 (25 mg/ml)
- la muestra 2: diluida a 1:8 (12,5 mg/ml)
- la muestra 3: diluida a 1:12 (8,3 mg/ml)
- la muestra 4: diluida a 1:16 (6,25 mg/ml)

Para la muestra 1, la pérdida de agua era del 9,5 %, del 25 % y del 45 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. La muestra 2 mostró una pérdida de agua del 18 %, del 40 % y del 70 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. La pérdida de agua en la muestra 3 era del 20 %, del 40 % y del 80 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. La muestra 4 expresó una pérdida de agua del 20 %, del 72 % y del 90 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. Véase la siguiente Tabla 1.

Tabla 1
Fibrinógeno y trombina en agua



El segundo experimento era una comparación de la retención de agua entre la fibrina obtenida mediante la mezcla de fibrinógeno y de trombina respectivamente reconstituida y diluida en PBS y fibrinógeno reconstituido y diluido en PBS con trombina reconstituida y diluida en cloruro de calcio 40 mmol.

5 En estas comparaciones se reconstituyó un vial de fibrinógeno con 3,5 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato a pH = 7,2) hasta alcanzar una concentración final de 100 mg/ml de fibrinógeno.

Se realizaron diluciones a partir de este vial con objeto de obtener unas concentraciones de fibrinógeno de:

- la muestra 1 a 1:2 (50 mg/ml) en PBS
- la muestra 2 a 1:4 (25 mg/ml) en PBS
- la muestra 3 a 1:6 (16,6 mg/ml) en PBS
- 10 - la muestra 4 a 1:8 (12,5 mg/ml) en PBS

En el experimento 2 A, se reconstituyó la trombina (Baxter Hyland) con 3,5 ml de PBS con objeto de obtener una concentración de 300 UI/ml. Se llevó a cabo una dilución con PBS para obtener una concentración de trombina de 20 UI/ml.

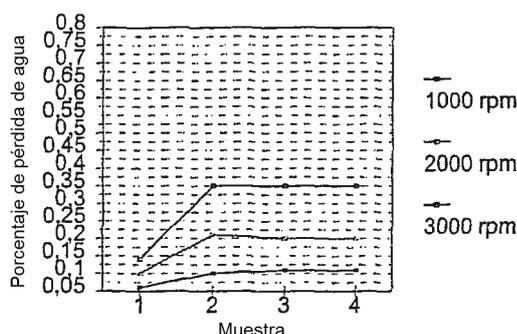
15 En el experimento B, se reconstituyó la trombina (Baxter Hyland) con 3,5 ml de CaCl₂ 40 mmol (cloruro de calcio) con objeto de obtener una concentración de 300 UI/ml. Se llevó a cabo una dilución con CaCl₂ para obtener una concentración de trombina de 20 UI/ml.

Después, las soluciones de fibrinógeno se mezclaron con un volumen igual de trombina (20 UI/ml), dando como resultado unas concentraciones finales para el fibrinógeno de:

- la muestra 1: diluida a 1:4 (25 mg/ml) en PBS
- 20 - la muestra 2: diluida a 1:8 (12,5 mg/ml) en PBS
- la muestra 3: diluida a 1:12 (8,3 mg/ml) en PBS
- la muestra 4: diluida a 1:16 (6,25 mg/ml) en PBS

25 Para el experimento 2 A, la muestra 1 expresó una pérdida de agua que era del 6 %, del 10 % y del 14 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. La muestra 2 mostró una pérdida de agua del 10 %, del 21 % y del 35 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. La pérdida de agua en las muestras 3 y 4 era prácticamente idéntica al 11 %, al 20 % y al 35 % a 1000, 2000 y 3000 rpm respectivamente. Véase la siguiente Tabla 2A.

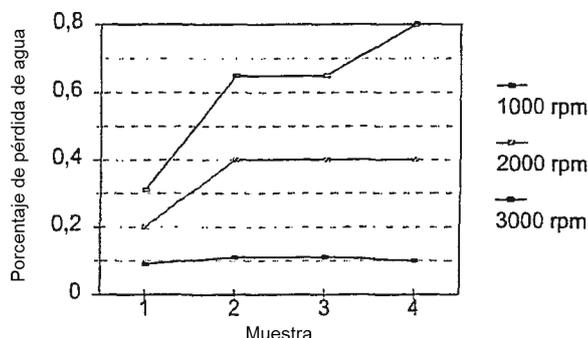
Tabla 2A
Diluyente de PBS para el fibrinógeno y la trombina



30 La introducción de calcio en la formulación de fibrina a través del diluyente usado para las diluciones de la trombina en el experimento 2 B afectó directamente a la retención de agua. La pérdida de agua no era significativa a 1000 rpm para las muestras, pero las pérdidas de agua aumentaron significativamente hasta aproximadamente el 40 % a 2000 rpm para las muestras 2 hasta 4. A 3000 rpm, la pérdida de agua aumentó hasta aproximadamente el 65 % para las muestras 2 y 3. Se registró una pérdida de agua del 80 % para la muestra 4, similar al resultado obtenido para la fibrina descrito en el experimento 1, a 3000 rpm. Los resultados de estos experimentos apoyan la hipótesis de que las estructuras de fibrina esencialmente exentas de iones de calcio son también más compactas y tienen una mayor resistencia a la pérdida de agua frente a fuerzas de compresión. Véase la siguiente Tabla 2B.

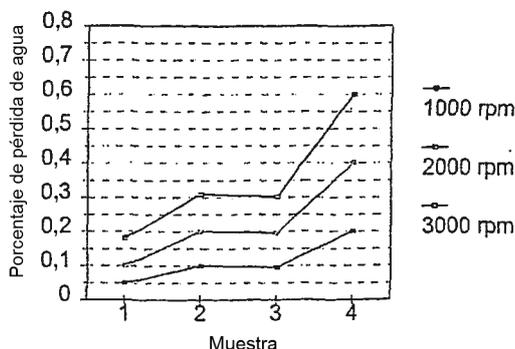
35

Tabla 2B: Diluyente de PBS para el fibrinógeno
CaCl₂ para la trombina (20 UI)



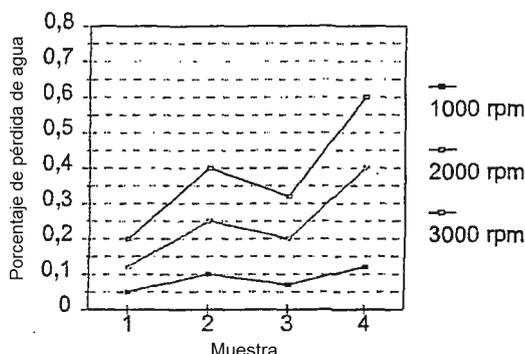
5 Como un medio para verificar el papel del fosfato como agente complejante de los iones de calcio que quedan en las moléculas de fibrinógeno, se llevaron a cabo reproducciones del anterior experimento con PBS sustituyendo el EDTA por PBS en un ensayo, y el citrato de potasio por PBS en un segundo ensayo. Los patrones de pérdida de agua de ambos ensayos con EDTA y con citrato de potasio eran coherentes con los resultados del experimento que utiliza PBS como agente de reconstitución. Véanse las siguientes Tablas 3A y 3B. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el calcio que queda en el fibrinógeno reacciona con los iones de fosfato impidiendo la asociación colateral de las protofibrillas, produciendo una estructura de fibrina compacta más resistente a la pérdida de agua que las estructuras de fibrina que retienen calcio.

Tabla 3A
Fibrinógeno (EDTA 50 nM)



10

Tabla 3B: Citrato de potasio como diluyente
para el fibrinógeno y la trombina



Se llevó a cabo otro experimento para determinar el impacto del FXIII presente en la formulación sobre la capacidad de compactación del material de fibrina obtenido con PBS como diluyente, tanto para el fibrinógeno como para la trombina. En este experimento se reconstituyó un vial de fibrinógeno (Tisseel de Baxter Hyland-Immuno lote

ES 2 274 746 T3

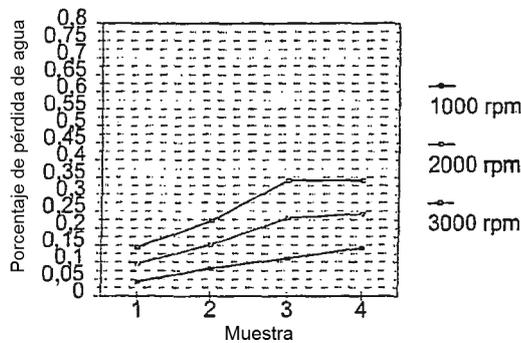
P5488797D) con 4,0 ml de PBS (dilución a 1:2) hasta alcanzar una concentración final de 50 mg/ml de fibrinógeno.

A partir de este vial se llevan a cabo diluciones con objeto de obtener una concentración de fibrinógeno respectivamente de:

- 5
- dilución a 1:2 (50 mg/ml) en PBS
 - dilución a 1:4 (25 mg/ml) en PBS
 - dilución a 1:6 (16,6 mg/ml) en PBS
 - dilución a 1:8 (12,5 mg/ml) en PBS

10 Se reconstituyó la trombina (Baxter Hyland) con 3,5 ml de PBS con objeto de obtener una concentración de 300 UI/ml. Se llevó a cabo una dilución con PBS para obtener una concentración de trombina de 20 UI/ml. Los resultados de este experimento demuestran que no hay ninguna diferencia entre el sellante de fibrina de Baxter que contiene FXIII (experimento 2) y el Baxter Hyland-Immuno exento de FXIII cuando se someten a la prueba de compactación. Los resultados obtenidos de las pruebas de compactación muestran el mismo comportamiento para el sellante exento de FXIII. Véase la siguiente Tabla 4.

Tabla 4: PBS como diluyente para el fibrinógeno
(sin FXIII) y la trombina a 20 UI



15 A continuación, una tabla que resume los datos de la retención de agua.

Tabla 5

Muestra nº	Experimento nº	% de pérdida de agua a 1000 rpm	% de pérdida de agua a 2000 rpm	% de pérdida de agua a 3000 rpm
1	1	9,5	25	45
1	2A	6	10	14
1	2B	no significativa	40	65
1	4	4,2	9,4	14,3
2	1	18	40	70
2	2A	10	21	35
2	2B	no significativa	40	65
2	4	no significativa	15	22
3	1	20	40	80
3	2A	11	20	35
3	2B	no significativa	40	65
3	4	no significativa	23	34
4	1	20	72	90
4	2A	11	20	35
4	2B	no significativa	-	80
4	4	14	24	34

Se ha postulado que la fuerza iónica de la trombina regula el tamaño de poro de la estructura del coágulo de fibrina. Mediante el uso de soluciones de trombina con una elevada fuerza iónica se puede conseguir un coágulo de fibrina que tiene un tamaño de poro menor que con soluciones de una menor concentración de trombina. El presente ejemplo muestra un procedimiento para la fabricación de un material de coágulo de fibrina en el que la concentración no gobierna el tamaño de poro del coágulo de fibrina. Como se ha establecido anteriormente, mediante el uso de un agente quelante para unirse al calcio, la concentración de calcio no afecta al tamaño de poro. Incluso cuando se usa una concentración de trombina de 4 UI/ml y una concentración de trombina de 250 UI/ml, el material de fibrina resultante tenía sustancialmente el mismo tamaño de poro. La fuerza iónica se midió con un osmómetro y se correlacionó con la medición de la turbidez a 800 nm con un espectrofotómetro. La observación de la estructura reticular de la muestra se llevó a cabo mediante una microscopía electrónica de barrido. La siguiente Tabla 6 resume la correlación entre la osmolaridad final de las muestras de fibrina y sus respectivas densidades ópticas. Los resultados de este experimento ilustran que la fuerza iónica, según se ha demostrado a través de la osmolaridad, no regula la estructura del coágulo de fibrina.

Los materiales de fibrina clásicos obtenidos mediante el uso de agua (0 mosm) como diluyente para el fibrinógeno y de CaCl₂ para la trombina (4 UI/ml), por ejemplo, tienen una osmolaridad final de 539 mosm. Esto es el resultado del fibrinógeno reconstituido con agua a una concentración de 90 mg/ml (610 mosm) combinado con trombina reconstituida con CaCl₂ a una concentración del kit de 4 UI/ml (468 mosm). El material de fibrina clásico resultante es de color blanco opaco, con una densidad óptica de 2,8 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm.

Los materiales de fibrina producidos con PBS (286 mosm) tienen una osmolaridad final de 445 mosm. Esto es el resultado del fibrinógeno reconstituido y diluido con PBS a una concentración de 25 mg/ml (588 mosm) combinado con trombina reconstituida y diluida con PBS a una concentración de 10 UI/ml (315 mosm). El material de fibrina resultante es ópticamente transparente con una densidad su óptica de 0,5 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm.

Los materiales de fibrina producidos con un tampón de citrato a 0,033 M (100 mosm) tienen una osmolaridad final de 224 mosm. Esto es el resultado del fibrinógeno reconstituido y diluido con citrato a una concentración de 50 mg/ml (336 mosm) combinado con trombina reconstituida y diluida con citrato a una concentración de 20 UI/ml (112 mosm). El material de fibrina resultante es ópticamente transparente con una densidad óptica de 0,45 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm. El material de hidrogel de fibrina de este experimento es transparente y está formado por fibras delgadas con una fuerza iónica de menos de 300 mosm, que se considera que es el nivel fisiológico. La fibrina obtenida mediante la mezcla de fibrinógeno a 12,5 mg/ml con trombina a 10 UI sigue siendo transparente (0,8 AUFS) con una osmolaridad de 167 mosm.

Los materiales de fibrina producidos con un tampón de citrato a 0,066 M (190 mosm) tienen una osmolaridad final de 317 mosm. Esto es el resultado del fibrinógeno reconstituido y diluido con citrato a una concentración de 50 mg/ml (435 mosm) combinado con trombina reconstituida y diluida con citrato a una concentración de 20 UI/ml (200 mosm). El material de fibrina resultante es ópticamente transparente con una densidad óptica de 0,23 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm. El material de hidrogel de fibrina de este experimento también es transparente y está formado por fibras delgadas con una fuerza iónica de menos de 300 mosm, que se considera que es el nivel fisiológico. La fibrina obtenida mediante la mezcla de fibrinógeno a 12,5 mg/ml con trombina a 10 UI sigue siendo transparente (0,5 AUFS) con una osmolaridad de 260 mosm.

Tabla 6

Tampón	Osmolaridad final del material de fibrina (mosm)	Densidad óptica (AUFS a 800 nm)
Agua (CaCl ₂)	539	2,8
PBS	451	0,255
Citrato (0,033 M)	224	0,45
Citrato (0,066 M)	317	0,23

Los tampones también juegan un papel activo en la permeabilidad, el diámetro de la fibra y la proporción entre masa y longitud del material de fibrina. Pueden observarse diferencias significativas entre PBS y NaCl (0,15 M). Estos tampones tienen la misma osmolaridad, pero sus efectos sobre los materiales de fibrina son notablemente diferentes. Véase la siguiente Tabla 7. Para una concentración de trombina de 2 UI/ml reconstituida con NaCl a 0,15 M, la permeabilidad de la fibrina es de $30,6 \times 10^{-12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de 136×10^{-12} a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. El uso de PBS como tampón proporciona una permeabilidad de la fibrina de $6,9 \times 10^{-12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de $39,5 \times 10^{-12}$ a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. Este experimento muestra que el material de fibrina que utiliza PBS como tampón es casi cinco veces menos permeable que los materiales de fibrina clásicos, y por lo tanto capaz de retener más agua. El diámetro de las fibras también se ve afectado por el tampón seleccionado. Para una concentración de trombina de 2 UI/ml diluida con NaCl a 0,15 M, las fibras tienen un diámetro de 0,107 μm a una concentración de fibrinógeno de

25 mg/ml, y de 0,14 μm a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. El uso de PBS como tampón produce unas fibras con un diámetro de 0,051 μm a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de 0,075 μm a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. Adicionalmente, la proporción entre masa y longitud también se ve afectada por el tampón seleccionado para reconstituir el fibrinógeno y la trombina. A una concentración de trombina de 2 UI/ml tamponada con NaCl a 0,15 M, la proporción entre masa y longitud es de $8,1 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de $13,9 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. El uso de PBS como tampón produce unas fibras con una proporción entre masa y longitud de $1,83 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de $4,03 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml, una reducción de cuatro veces con NaCl a 0,15 M.

Para una concentración de trombina de 250 UI/ml (Tabla 8) diluida con NaCl a 0,15 M, la permeabilidad de la fibrina es de $14,24 \times 10^{-12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de $47,7 \times 10^{-12}$ a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. El uso de PBS como tampón produce una permeabilidad de la fibrina de $8,9 \times 10^{-12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de 41×10^{-12} a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. Este experimento muestra que el material de fibrina que utiliza PBS como tampón es menos permeable que los materiales de fibrina clásicos, y por lo tanto capaz de retener más agua. El diámetro de las fibras también se ve afectado por el tampón seleccionado. Para una concentración de trombina de 250 UI/ml diluida con NaCl a 0,15 M, las fibras tienen un diámetro de 0,073 μm a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de 0,083 μm a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. El uso de PBS como tampón produce fibras con un diámetro de 0,057 μm a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de 0,077 μm a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. Adicionalmente, la proporción entre masa y longitud también se ve afectada por el tampón seleccionado para reconstituir el fibrinógeno y la trombina. A una concentración de trombina de 250 UI/ml tamponada con NaCl a 0,15 M, la proporción entre masa y longitud es de $3,78 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de $4,83 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml. El uso de PBS como tampón produce unas fibras con una proporción entre masa y longitud de $2,36 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 25 mg/ml, y de $4,24 \times 10^{12}$ a una concentración de fibrinógeno de 12,5 mg/ml.

Estos experimentos ilustran que el tipo de tampón usado afecta de forma diferente al factor de permeabilidad, según se muestra para NaCl y PBS (Tablas 7 y 8). Estos experimentos muestran que la concentración de trombina tampoco tiene ningún efecto sobre el factor de permeabilidad, el diámetro de la fibra y la proporción entre masa y longitud cuando el tampón es PBS y no NaCl. El PBS es una mezcla formada por NaCl 0,13 M (800 mg/l), KCL (20 mg/l), Na_2HPO_4 anhidro (115 mg/l) y KH_2PO_4 . Por lo tanto, el tampón de PBS contiene NaCl a una molaridad cercana a la del tampón de NaCl 0,015 M descrito en las Tablas 7 y 8. Como muestran los datos, el fosfato es por lo tanto el agente complejante del calcio endógeno. Las tablas que resumen estos experimentos son las siguientes Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 7 – Trombina a 2 UI/ml

Tampón	Concentración de fibrinógeno	Permeabilidad (K_s)	Diámetro de la fibra μm	Proporción entre masa y longitud
NaCl 0,15 M	25 mg/ml	$30,6 \times 10^{-12}$	0,107	$8,1 \times 10^{12}$
PBS	25 mg/ml	$6,9 \times 10^{-12}$	0,051	$1,83 \times 10^{12}$
NaCl 0,15 M	12,5 mg/ml	136×10^{-12}	0,14	$13,9 \times 10^{12}$
PBS	12,5 mg/ml	$39,5 \times 10^{-12}$	0,075	$4,03 \times 10^{12}$

Tabla 8 – Trombina a 250 UI/ml

Tampón	Concentración de fibrinógeno	Permeabilidad (K_s)	Diámetro de la fibra μm	Proporción entre masa y longitud
NaCl 0,15 M	25 mg/ml	$14,24 \times 10^{-12}$	0,073	$3,78 \times 10^{12}$
PBS	25 mg/ml	$8,9 \times 10^{-12}$	0,057	$2,36 \times 10^{12}$
NaCl 0,15 M	12,5 mg/ml	$47,7 \times 10^{-12}$	0,083	$4,83 \times 10^{12}$
PBS	12,5 mg/ml	41×10^{-12}	0,077	$4,24 \times 10^{12}$

Cálculo de la permeabilidad (K_s):

$$\frac{\text{caudal (ml/s)} \times \text{tiempo hasta la coagulación} \times \text{viscosidad (10}^2\text{)}}{\text{presión} \times \text{área superficial del coágulo}}$$

Cálculo del diámetro de la fibra:

$$D^2 = 44,1 \times K_s \times \text{concentración de fibrinógeno (X}^{1,3736}\text{)}$$

Cálculo de la proporción entre masa y longitud:

$$\mu = \pi \times D^2 \times C / 4X, \text{ en la que } C = 4,36 \text{ g/cm}^3$$

en la que C = 4,36 g/cm³

5 El papel del PBS como agente complejante también puede observarse mediante estudios de electroforesis en gel de los materiales de fibrina. Cuando se aplica una corriente eléctrica a una electroforesis en gel de SDS-poliacrilimida que contiene un material de hidrogel de fibrina preparado con PBS, se observa poco o ningún efecto de banda, mientras que puede observarse una banda de fibronectina. Esto muestra que el PBS compleja el calcio, por lo que el calcio no está disponible para asociarse colateralmente con la fibrina a través de una reticulación. Los materiales de fibrina clásicos muestran una fuerte banda característica gamma-gamma y ninguna banda de fibronectina, cuando se preparan con agua o con NaCl como tampón. El tampón de NaCl con una molaridad de 0,15 no puede bloquear la acción del calcio. La incapacidad del tampón de NaCl para bloquear la acción del calcio permite que el calcio juegue su papel tradicional en la asociación colateral con la fibrina, permitiendo así que la trombina afecte al tamaño de poro del material de fibrina. Al actuar como agente complejante del calcio endógeno, el PBS elimina sustancialmente la capacidad de la trombina para afectar al tamaño de poro. La siguiente Figura 9 ilustra el material de fibrina clásico en una electroforesis en gel. La siguiente Figura 10 ilustra el material de hidrogel de fibrina en una electroforesis en gel.

20 También se ha determinado que los materiales de hidrogel de fibrina contienen propiedades antiadhesivas. Las siguientes Tablas 9 y 10 ilustran las propiedades antiadhesivas de los materiales de hidrogel de fibrina. La Tabla 9 muestra los resultados de un modelo de estudio comparativo en ratas. El ciego y la pared parietal interfacial fueron lo suficientemente erosionados como para causar una hemorragia. Las superficies hemorrágicas fueron cauterizadas para detener la hemorragia en las superficies lesionadas tanto en los animales de control como en los del ensayo. Se formaron dos tipos de materiales de hidrogel de fibrina entre la superficie lesionada. La película de fibrina 1 (FF1) difiere de la película de fibrina 2 (FF2) en que la FF2 fue comprimida para que liberara un poco de agua. Los resultados demuestran que las heridas tratadas tanto con el material de hidrogel de fibrina normal (FF1) como con el material de hidrogel de fibrina comprimido (FF2) no tienen adhesiones entre la superficie del ciego y la superficie parietal. El grupo de control de la Tabla 9 no tenía material de hidrogel de fibrina aplicado, dando como resultado adhesiones de nivel 3 (las más graves) entre la superficie del ciego y la superficie parietal.

30 La Tabla 10 muestra las propiedades antiadhesión del material de pegamento del hidrogel de fibrina. Este material de hidrogel polimeriza en el cuerpo del animal tras su aplicación mediante el uso de un dispositivo de aplicación tal como el que se muestra en la Figura 6. El pegamento del hidrogel de fibrina se aplicó directamente en la herida de la superficie del ciego, así como en la superficie parietal. Todos los animales que recibieron este tratamiento con el pegamento del hidrogel de fibrina estaban exentos de adhesión. En un segundo ensayo se posicionó un material de hidrogel de fibrina premoldeado entre las superficies lesionadas. El uso de un material de hidrogel de fibrina premoldeado también mostró unas significativas propiedades antiadhesión.

35 Tabla 9

Animal	Producto aplicado	Resultado
Rata de control 1	Ninguno	Adhesión (nivel 3)
Rata de control 2	Ninguno	Adhesión (nivel 3)
Rata de control 3	Ninguno	Adhesión (nivel 3)
Rata de control 4	Ninguno	Adhesión (nivel 3)
Rata 1	FF1	No hay adhesión
Rata 2	FF1	No hay adhesión
Rata 3	FF2	No hay adhesión
Rata 4	FF2	No hay adhesión

Tabla 10

Tipo de grupo	Número de individuos	Concentración de trombina	Resultado
Control	5	-	Adhesión (nivel 3)
Película de fibrina de hidrogel premoldeado	5	100 UI/ml	20 % de adhesión
Pegamento de fibrina de hidrogel	5	100 UI/ml	0 % de adhesión

REIVINDICACIONES

1. Un material de hidrogel de fibrina que comprende:
un material de fibrina formado en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno, material de fibrina que tiene un contenido en agua de al menos el 90 % en peso del material y retiene al menos aproximadamente el 80 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos y está sustancialmente exento de reticulación.
2. El hidrogel de la Reivindicación 1 en el que el hidrogel tiene un tamaño de poro en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 5,0 μm .
3. El material de la Reivindicación 1 en el que el material se produce usando una solución de trombina esencialmente exenta de calcio.
4. El material de la Reivindicación 1 que tiene una claridad óptica de menos de aproximadamente 1,0 AUFS cuando se mide con un espectrofotómetro a 800 nm.
5. El material de la Reivindicación 1 sustancialmente exento de reticulación gamma-gamma, según se determina a través de una electroforesis en gel.
6. El material de la Reivindicación 1 que tiene propiedades antiadhesivas.
7. Un material de fibrina de múltiples capas que comprende:
una capa de pegamento de fibrina; y
una capa del material de hidrogel de fibrina de la Reivindicación 1.
8. Un material de fibrina de múltiples capas que comprende:
una capa de pegamento de fibrina; y
una capa del material de hidrogel de fibrina de la Reivindicación 1, que es una capa de hidrogel de fibrina terapéutico.
9. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 8 que comprende adicionalmente:
una capa de película de fibrina; en el que la capa del pegamento de fibrina une la capa de película de fibrina a la capa de hidrogel de fibrina terapéutico.
10. Un material de fibrina de múltiples capas que comprende:
una capa de película de fibrina; y
una capa del material de hidrogel de fibrina de la Reivindicación 1.
11. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 7 u 8 en el que la capa del pegamento de fibrina tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 10 μm .
12. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 7 que incluye adicionalmente una capa de fibrina y que está sustancialmente reticulado.
13. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 7 o 10 en el que la capa del hidrogel de fibrina tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 5 μm .
14. El material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 7, 9 o 10 en el que el material de fibrina de múltiples capas tiene propiedades antiadhesivas.
15. El material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 7, 8 o 9 en el que la capa del hidrogel retiene de forma liberable un agente terapéutico.
16. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 10 que incluye adicionalmente una capa de hidrogel de fibrina terapéutico.
17. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 16 en el que la capa del hidrogel terapéutico retiene de forma liberable un agente terapéutico.
18. El material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 7, 8, 9 o 17 en el que el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en antibióticos, agentes fibrinolíticos y modificadores de la respuesta biológica.

19. El material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 7, 8, 9 o 17 en el que el agente terapéutico comprende un compuesto farmacéutico.
20. El material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 7, 8, 9 o 17 en el que el agente terapéutico comprende células vivas.
- 5 21. El material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 8, 9 o 16 en el que la capa de hidrogel de fibrina terapéutico tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 5 μm .
22. El material de fibrina de múltiples capas de la Reivindicación 9 o 10 en el que la capa de película de fibrina tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 10 μm .
- 10 23. El material de hidrogel de fibrina de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 o el material de fibrina de múltiples capas de una cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 22 para su uso en medicina.
24. Uso de un primer material de fibrina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un segundo material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener el 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos y está sustancialmente exento de reticulación y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina es para ser aplicado en una superficie, y el segundo material de fibrina es para ser aplicado en el primer material de fibrina.
- 15 25. Uso de un segundo material de fibrina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un primer material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener el 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos y está sustancialmente exento de reticulación y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina es para ser aplicado en una superficie, y el segundo material de fibrina es para ser aplicado en el primer material de fibrina.
- 20 26. Un primer material de fibrina para su uso en el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un segundo material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener el 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos y está sustancialmente exento de reticulación y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina es para su uso mediante su aplicación en una superficie, y el segundo material de fibrina es para ser aplicado en el primer material de fibrina.
- 30 27. Un segundo material de fibrina para su uso en el tratamiento de un paciente que va ser tratado con un primer material de fibrina, en el que el primer material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 2 μm y 10 μm ; y el segundo material de fibrina tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 5 μm y es capaz de retener el 80-90 % de agua tras una compresión mediante una centrifugación a 625 G durante 30 minutos y está sustancialmente exento de reticulación y se formó en ausencia de una solución que contiene calcio o en presencia de una solución que es capaz de capturar los iones de calcio asociados con las moléculas de fibrinógeno; y en el que el primer material de fibrina es para ser aplicado en una superficie, y el segundo material de fibrina es para su uso mediante su aplicación en el primer material de fibrina.
- 35 28. El uso de la Reivindicación 24 o 25 o el material de fibrina de la Reivindicación 26 o 27 en el que el primer material de fibrina se proporciona mediante:
- 40 proporcionar una solución de trombina que tiene una concentración de entre aproximadamente 50 UI/ml y aproximadamente 300 UI/ml;
proporcionar una solución de fibrinógeno que tiene una concentración de entre aproximadamente 1,5 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml; y
mezclar la solución de trombina con la solución de fibrinógeno.
- 45 29. El uso de la Reivindicación 24 o 25 o el material de fibrina de la Reivindicación 26 o 27 en el que el segundo material de fibrina se proporciona mediante:
- 50 proporcionar una solución de trombina que tiene una concentración de entre 1 UI/ml y aproximadamente 300 UI/ml;
proporcionar una solución de fibrinógeno que tiene una concentración de entre aproximadamente 1,5 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml;
- 55 proporcionar un agente quelante como un antagonista de las reacciones de transamidación del fibrinopéptido; y

mezclar la solución de trombina, la solución de fibrinógeno y el agente quelante.

30. El uso o el material de fibrina de la Reivindicación 29 en el que el diluyente es una solución salina tamponada con fosfato.

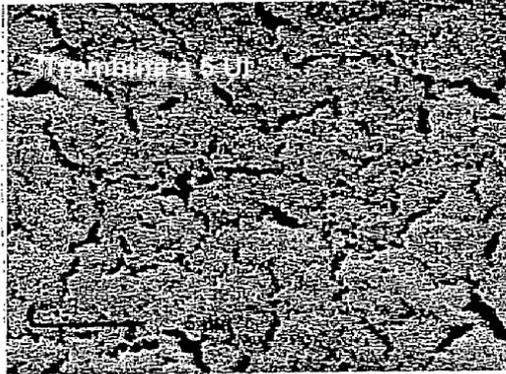


Fig. 1

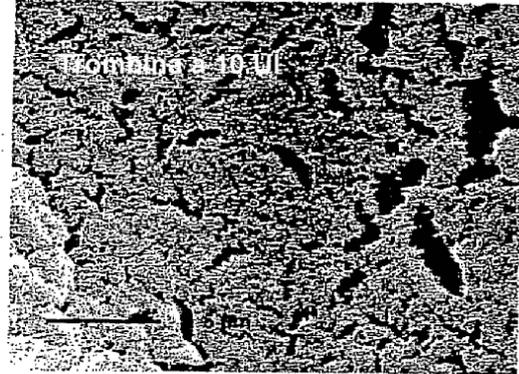


Fig. 2



Fig. 3

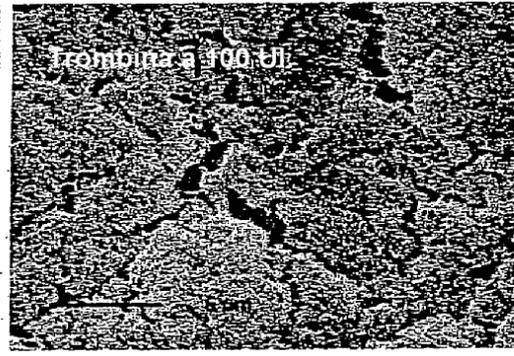


Fig. 4

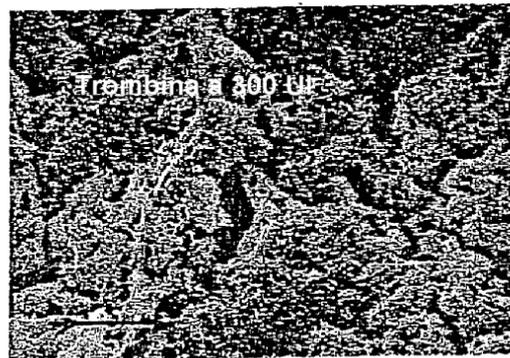


Fig. 5

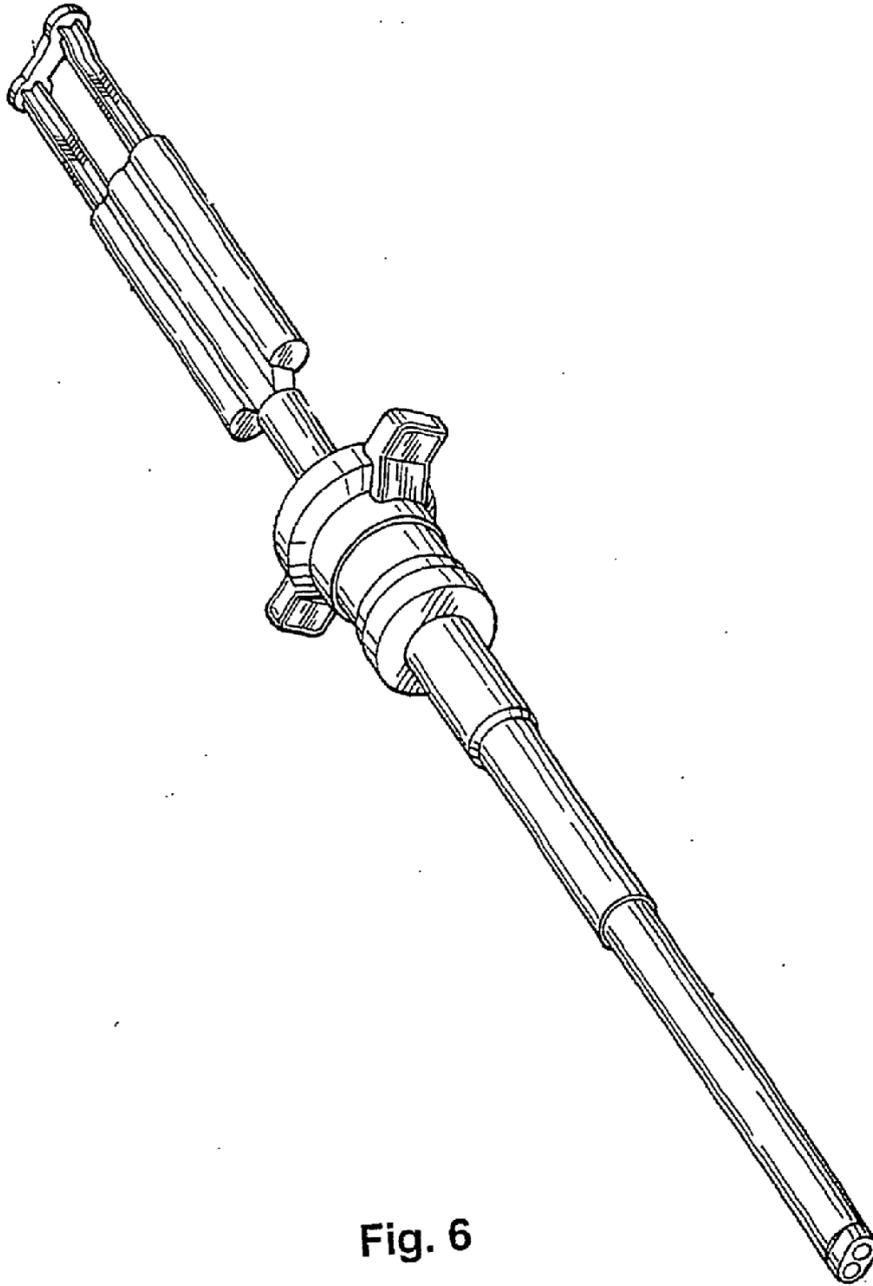


Fig. 6

Dispositivo de administración: bote presurizado

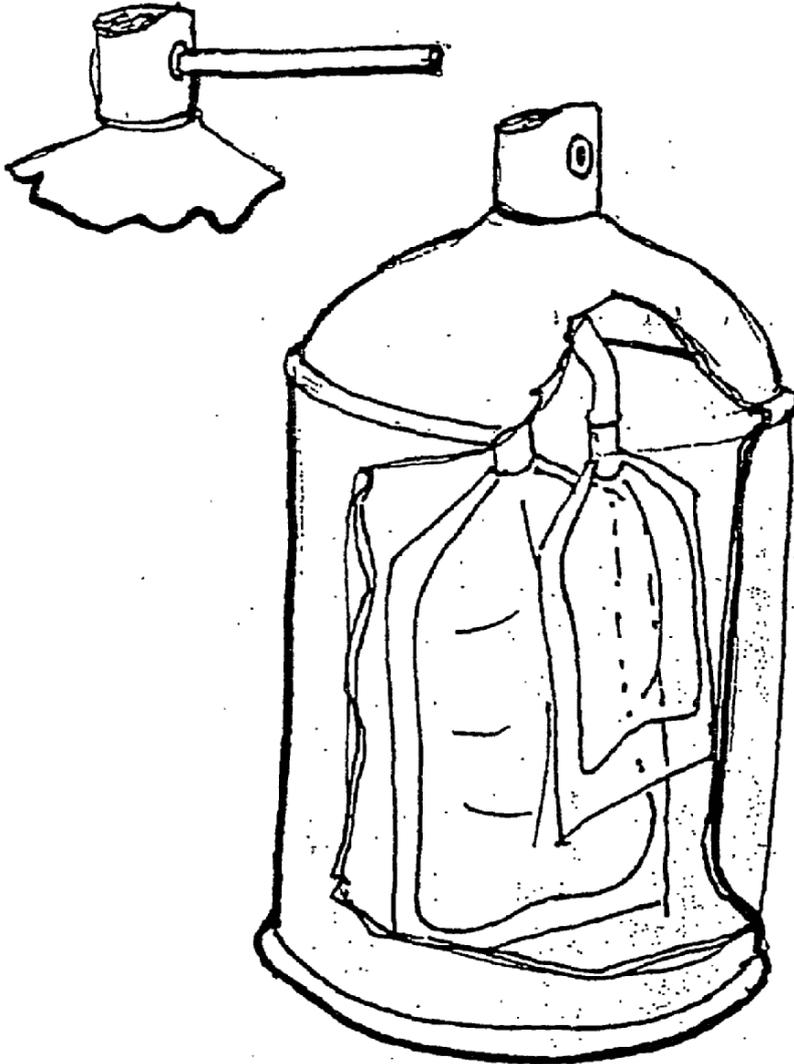


Fig. 7

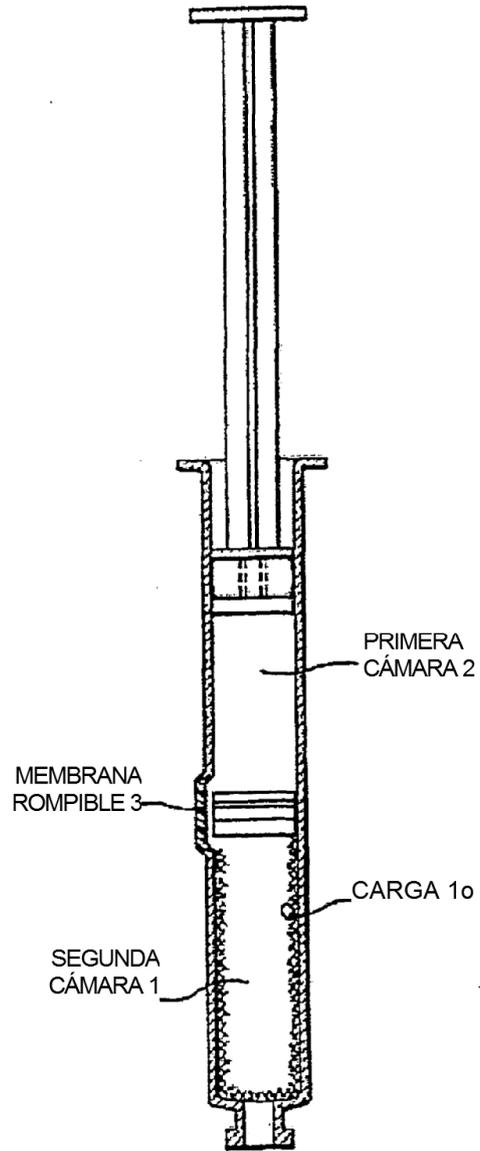


Fig. 8

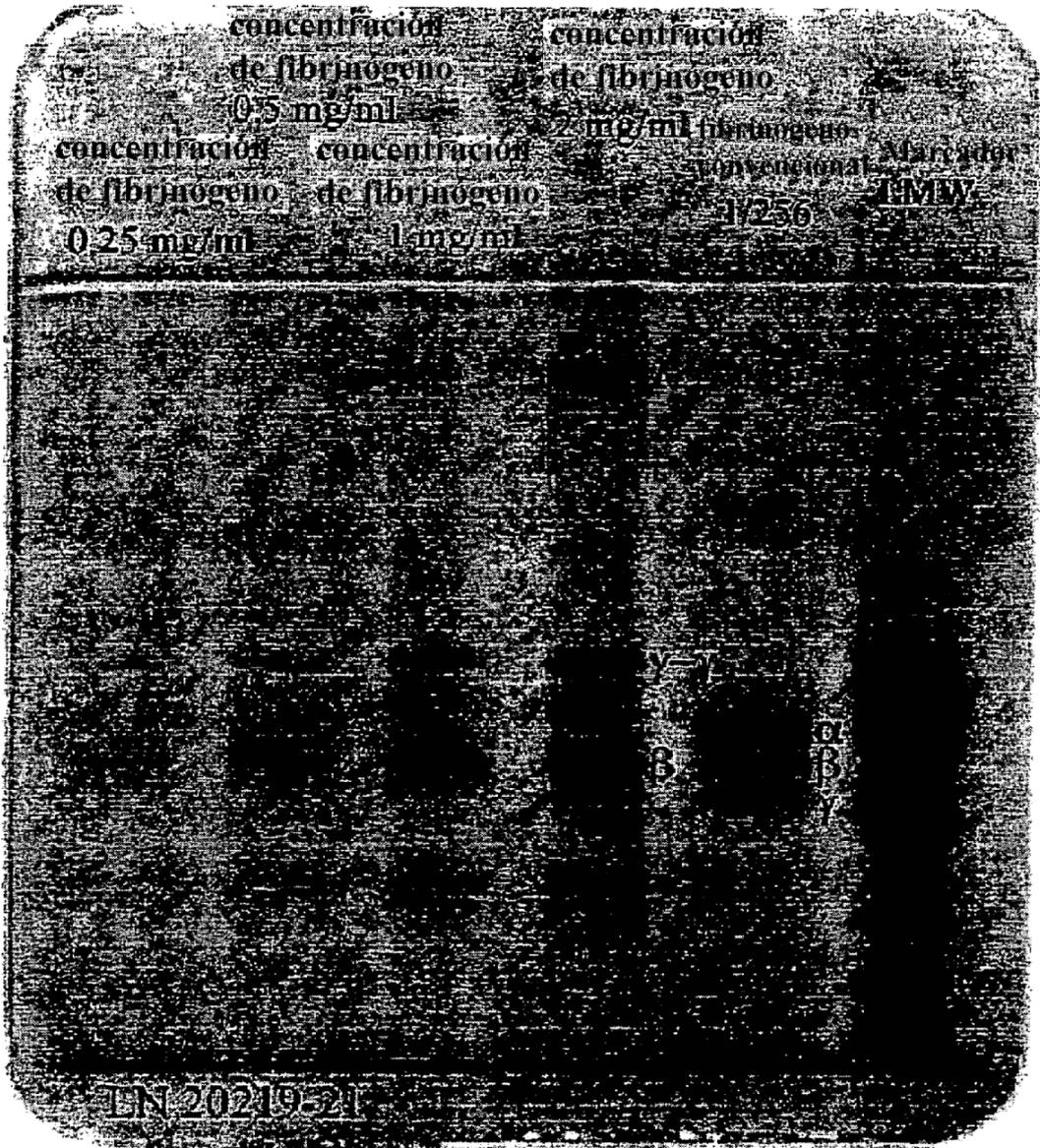


FIG. 9

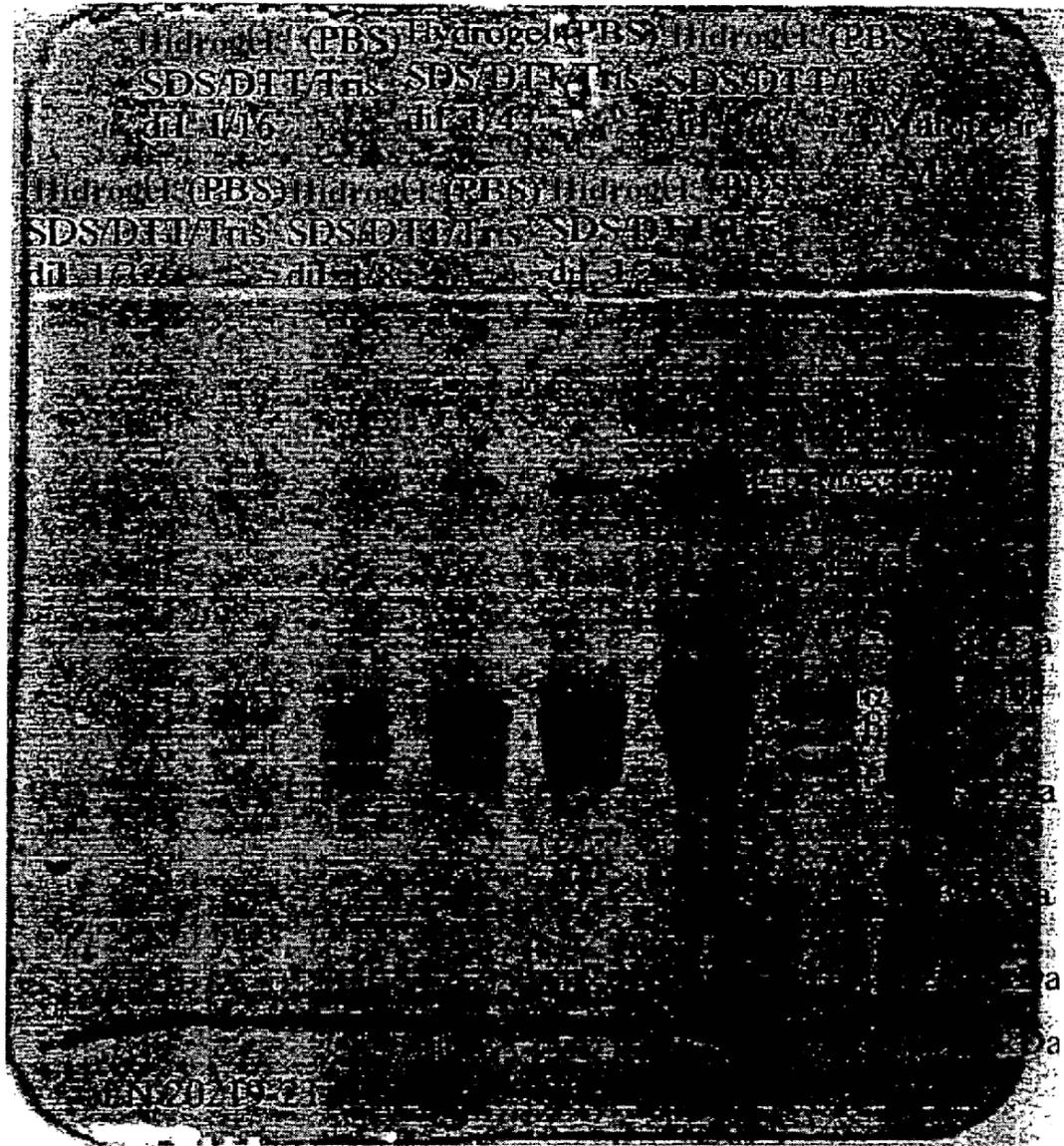


FIG. 10