

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 775**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04779114 .0**

96 Fecha de presentación: **23.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1659919**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **DISPOSITIVOS HEMOSTÁTICOS QUE CONTIENEN UN PRECIPITADO DE PROTEÍNA.**

30 Prioridad:
07.08.2003 US 493117 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
ETHICON, INC.
US Route No. 22
Somerville, NJ 08876-0151, US

72 Inventor/es:
PENDHARKAR, Sanyog, M. y
GORMAN, Anne, J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 775 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

Dispositivos hemostáticos que contienen un precipitado de proteína

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un dispositivo hemostático, por ejemplo un apósito de heridas, que comprende un precipitado de proteína y a procedimientos para hacer el dispositivo.

Antecedentes de la invención

10 Comúnmente se usa tela de celulosa regenerada que ha sido oxidada para que contenga grupos carboxílicos (CORC) en la preparación de apósitos hemostáticos para heridas y que son por naturaleza ácidos debido a la presencia de grupos de ácido carboxílico. Entre tales tejidos figuran telas de rayón que se han oxidado para incluir grupos carboxílicos. Entre los ejemplos de materiales hemostáticos de celulosa regenerada absorbibles disponibles comercialmente figuran el hemostato absorbible Surgicel®, una tela tricotada de celulosa oxidada regenerada (ORC), el hemostato quirúrgico Nu-Knit® absorbible, una tela densa de ORC, y el hemostato absorbible Surgicel® Fibrillar, microfibrillas de ORC, todos ellos asequibles de Jonson & Jonson Wound Management Worldwide, una división de Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey, una compañía de Johnson & Johnson.

15 Se cree que tales telas son incompatibles con materiales biológicos que pueden ser sensibles a medios ácidos. Por ejemplo, se sabe que, cuando se expone trombina a telas de CORC, pierde rápidamente su actividad enzimática. En Intentos previos de lograr que la CORC sea compatible con enzimas y otras proteínas que son sensibles a los ácidos se ha recurrido a la neutralización de la tela o polvo de CORC con sales sódicas o cálcicas u otros agentes de neutralización.

20 El documento WO 02/058749 A2 describe el uso de una esponja de colágeno como vehículo, con una distribución de fibrinógeno sólido y trombina sólida fijada al vehículo. Se dice que la composición es útil para que se adhiera el tejido, se cierre el tejido y la hemostasis.

El documento GB 2314842 A describe polvos, escamas o esponjas que comprenden una proteína complejada con ORC. La proteína preferida es colágeno y se dice que los complejos son útiles para apósitos de heridas.

25 La patente U.S. 5134229 describe la neutralización de un material de celulosa ácida oxidada con una sal básica de un ácido orgánico débil en una solución de agua y alcohol. El producto neutralizado se puede impregnar luego con agentes hemostáticos sensibles a ácidos, tales como trombina.

30 Sería ventajoso proporcionar apósitos hemostáticos y dispositivos médicos para heridas que utilizaran tales apósitos para heridas que proporcionarían una hemostasis eficaz y/o mejorada en el sitio de un cuerpo que lo necesita en comparación con un apósito para heridas convencional, a la vez que permitiera la incorporación de materiales que pueden ser sensibles a medios ácidos. Las invenciones que se describen aquí proporcionan tales ventajas.

Sumario de la invención

35 La presente invención está dirigida a procedimientos de producción de dispositivos hemostáticos que comprenden un sustrato según se define en la reivindicación 1, y también a un producto según se define en la reivindicación 12.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es una imagen producida por microscopía electrónica de barrido (1500 X) de la superficie de un apósito de heridas comparativo.

40 La Figura 2 es una imagen producida por microscopía electrónica de barrido (1500 X) de la superficie de un apósito de heridas comparativo.

La Figura 3 es una imagen producida por microscopía electrónica de barrido (1500 X) de la superficie de un apósito de heridas comparativo.

La Figura 4 es una imagen producida por microscopía electrónica de barrido (1500 X) de la superficie de un apósito de heridas de la presente invención.

45 La Figura 5 es una imagen producida por microscopía electrónica de barrido (750 X) de la superficie de un apósito de heridas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

En una realización, la presente invención está dirigida a dispositivos hemostáticos definidos en la reivindicación 12.

En ciertas realizaciones, el precipitado de proteína se puede formar simultáneamente con el contacto de la proteína

con el sustrato, incorporándose así el precipitado de proteína al sustrato o sobre el sustrato.

Tal como se usa aquí, "hemostático" o "propiedades hemostáticas" significa la capacidad de parar o minimizar la hemorragia, como entendería un experto en la técnica de la hemostasis que significan esos términos, según se ejemplifica más adelante en los ejemplos de la memoria.

5 Sin que ello signifique que se asume teoría alguna, se cree que los precipitados de proteína de acuerdo con la presente invención son capaces de unirse a plaquetas y otras células del cuerpo cuando se ponen en contacto con sangre de un cuerpo, así como de unirse a otras proteínas y activar plaquetas. Se cree que la unión a las plaquetas del precipitado de proteína intensifica las propiedades hemostáticas de telas que incluyen el precipitado de proteína. Además, el enriquecimiento en plaquetas causado por la unión de proteína a ellas puede mejorar la curación de la herida dado que las plaquetas contienen factores de crecimiento que se conoce que intensifican la curación de heridas. La unión de los precipitados de proteína también puede estimular el crecimiento de las células para aplicaciones de diseño de tejidos por ingeniería.

10 El precipitado de proteína se puede preparar a partir de proteínas seleccionadas entre el grupo constituido por fibrinógeno, fibrina, fibronectina y Factor Von Willebrand. En realizaciones concernientes, el precipitado de proteína puede formarse a partir de un hidrogel de fibrina formado por combinación de fibrinógeno con trombina. La proteína usada para preparar el precipitado de proteína puede ser humana, animal o recombinante. Se describen proteínas derivadas de seres humanos en la solicitud de patente PCT WO 02/095019 A1 y las patentes U.S. n°. 5.792.835 y n°. 6.121.232.

15 En ciertas realizaciones de la invención, los apósitos para heridas de la presente invención comprenden una tela fibrosa que tiene una primera superficie y una segunda superficie opuesta a la primera superficie. La tela comprende fibras y posee propiedades físicas adecuadas para uso como hemostato. Entre tales propiedades figuran flexibilidad, resistencia mecánica y porosidad. Las telas utilizadas en la presente invención son tejidas o no tejidas, con tal que la tela posea mantenga las propiedades físicas necesarias para su aplicación al sitio del cuerpo mientras que se mantiene su integridad estructural y, preferiblemente, aunque no necesariamente, proporcione hemostasis al sitio. Una tela tejida preferida tiene una estructura densa y tricotada que proporciona solidez y forma al hemostato.

20 Las fibras usadas para preparar el sustrato de tela comprenden un polímero biocompatible. Las fibras pueden fabricarse de cualquier polímero biocompatible conocido para uso en apósitos médicos de heridas. El precipitado de proteína está dispersado al menos sobre una de las superficies del sustrato de tela que se ha de poner en contacto con el sitio de la hemorragia o, en ciertas realizaciones, en la propia tela. El precipitado debe estar distribuido sustancialmente uniformemente sobre la superficie del sustrato con el fin de proporcionar las propiedades hemostáticas deseadas, puesto que unos vacíos excesivos en el sustrato en los que no está presente el precipitado pueden comprometer las propiedades hemostáticas buscadas. Además de la distribución del precipitado, debe cuidarse de emplear una cantidad de precipitado de proteína eficaz para proporcionar y/o mantener y/o mejorar las propiedades hemostáticas del apósito de la herida. A modo de ejemplo, los vehículos tales como las soluciones o geles descritos aquí pueden contener de 1-100 a 10-40 miligramos de proteína por mililitro de vehículo. Se señala que sustancialmente la totalidad de la proteína precipitará del vehículo. Una vez que conozca esta exposición, un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente la cantidad particular de precipitado de proteína requerida por peso de sustrato y el grado de uniformidad requerido para alcanzar propiedades hemostáticas de dispositivos de la presente invención.

25 En ciertas realizaciones de la presente invención, el apósito hemostático absorbible para heridas comprende una tela tricotada de urdimbre hecha de hilo de rayón brillante que posteriormente se oxida por técnicas conocidas para obtener CORC. Las telas se caracterizan por tener un espesor de capa simple como mínimo de aproximadamente 0,5 mm, una densidad de como mínimo aproximadamente 0,03 g/cm², una porosidad al aire de menos de 150 cm³/s/cm² y una capacidad de absorción de líquido de como mínimo tres veces el peso en seco de la tela y como mínimo aproximadamente 0,1 g de agua por cm² de la tela.

30 Las telas tricotadas tienen un buen volumen, sin un peso excesivo, son blandas y plegables y se adaptan bien a la configuración de la superficie a la que se aplican. La tela puede cortarse a tamaños adecuados sin que se deshaga o deshilache a lo largo del borde del corte. La resistencia mecánica de la tela después de la oxidación es mayor que la adecuada para usarla como hemostato quirúrgico.

35 Las telas hemostáticas preferidas usadas en la presente invención comprenden CORC y se caracterizan mejor por sus propiedades físicas de espesor, volumen, porosidad y capacidad de absorción de líquidos, como se ha indicado antes. Las telas adecuadas que tienen estas propiedades se pueden construir por tricotado de hilo de denier 60, hilo de rayón brillante de filamento 18 en una máquina de galga 32 a una calidad de tricotado de hilo de 12. Una construcción de tela tricotada adecuada es barra frontal 1-0, 10-11; barra trasera 2-3, 1-0. El movimiento de lanzado extendido impartido a la barra frontal da por resultado para la barra frontal un lizarol de 477 cm en comparación con uno de 178 cm para la barra de guía trasera y aumenta el volumen de la tela y la densidad. La relación de lizarol de

barra frontal a lizarol de barra trasera en esta construcción particular es de 1:2,68.

En la Tabla 1 se indican las propiedades físicas y hemostáticas típicas conforme a lo descrito antes.

Tabla 1

Propiedad	
Espesor, mm	0,645
Densidad, g/cm ²	0,052
Porosidad al aire, cm ³ /secc/cm ²	62,8
Resistencia a tracción ⁽¹⁾ dm/dt/kg	1,9/4,5
Alargamiento ⁽²⁾ , %	23/49
Absorción ⁽³⁾	
g/g de tela	3,88
g/cm ² de tela	0,20
Hemostasis ⁽⁴⁾ , mm	
1 capa	5,7±1,0
2 capas	5,6±1,8
<p>(1) Resistencia a tracción determinada a 5,08 cm/min de extensión en dm/dt = dirección de la máquina/dirección transversal</p> <p>(2) Alargamiento en la dirección de la máquina/dirección transversal</p> <p>(3) Absorción basada en el peso de agua absorbida por la tela</p> <p>(4) Evaluación de la hemostasis en heridas esplénicas por incisión en porcino, tiempo hasta la detención de la hemorragia</p>	

5

Las telas tricotadas utilizadas en la presente invención se hicieron de hilo de rayón brillante de aproximadamente 40 a 80 denier en total. Cada hilo puede contener de 10 a 25 filamentos individuales, aunque preferiblemente cada filamento individual es de denier inferior a 5 para evitar tiempos de absorción alargados. El elevado volumen y alta densidad de la tela se obtienen tricotando a galga 28 o menor, preferiblemente galga 32, con una calidad de la tela de aproximadamente 10 o 12 (de 15,7 a 18,4 recorridos por cm). Un movimiento de lanzado de la guía largo, de como mínimo 6 espacios de aguja y, preferiblemente, de 8 a 12 espacios, aumenta más el espesor y la densidad de la tela. En la fabricación de telas hemostáticas y apósitos para heridas de la presente invención se pueden utilizar otras estructuras de telas tricotadas que tienen propiedades físicas equivalentes y tales telas las identificarán los expertos en la técnica una vez hayan estudiado la presente descripción.

10

15

Entre los polímeros útiles en la preparación de telas y apósitos de heridas de la presente invención figuran, no limitativamente, quitosano, quitina, polisacáridos, poli(ácidos metacrílicos), poliaminas, poliiminas, poliamidas, poliésteres, poliéteres, polinucleótidos, poli(ácidos nucleicos), polipéptidos, proteínas, poli(óxido de alquileo), politioésteres, politioéteres, polivinilos, poliláctidos, poliglicoles y copolímeros o mezclas de los mismos. Los polímeros pueden ser degradables o no degradables dependiendo de si el dispositivo que comprende la tela se contempla para uso externo o interno. En ciertas realizaciones, de acuerdo con la presente invención se puede usar tela de rayón que se ha oxidado para incluir otros restos carboxílicos o restos de aldehído.

20

25

El apósito para heridas de la presente invención permanece muy flexible, se adapta al sitio de la hemorragia y retiene una buena resistencia a la tracción y a la compresión para resistir la manipulación durante la aplicación. El apósito para heridas se puede cortar a diferentes tamaños y formas para satisfacer las necesidades quirúrgicas. El apósito para heridas se puede enrollar o empaquetar en zonas anatómicas irregulares. En una realización preferida, la tela es un CORC, tal como Surgical Nu-Knit®, asequible de Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey, aunque se

pueden utilizar otras telas.

El sustrato contiene restos ácidos a niveles suficientes para proporcionar el medio ácido apropiado para hacer que precipite la proteína del vehículo seleccionado, por ejemplo, restos carboxílicos como los contenidos en CORC, pudiendo formarse el precipitado de proteína simultáneamente con el contacto de la proteína y el sustrato de la tela e incorporarse directamente sobre la superficie y/o en el sustrato de tela. Típicamente el medio ácido comprenderá un pH de 2,5 a 6. Se pueden usar vehículos para suministrar la proteína a precipitar, entre los que figuran soluciones o geles.

En una realización, se puso en contacto una solución que contenía fibrinógeno con un sustrato de tela de CORC. La solución contenía de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de fibrinógeno por ml de solución. Después del contacto del fibrinógeno con la tela de CORC, el fibrinógeno precipitó de la solución sobre el sustrato de tela, formándose una almohadilla de fibrinógeno que comprendía el sustrato de tela que tenía incorporado el precipitado de fibrinógeno.

En otra realización, se preparó primeramente un gel de fibrina mezclando fibrinógeno con trombina a niveles eficaces para impartir propiedades hemostáticas después de la precipitación de fibrina sobre el sustrato. El gel se aplicó luego al sustrato de tela de CORC y se vio que la fibrina precipitó del gel en presencia de la CORC. Los componentes sólido y líquido del gel se separaron así y el sólido, precipitado de fibrina, se incorporó al sustrato de tela de CORC. Cuando se utiliza trombina, ésta puede ser humana o recombinante. En la patente U.S. nº. 5.143.838 se describen ejemplos de trombina humana que se pueden utilizar en la presente invención.

En los dos casos, vehículo como solución o como gel, se formó una almohadilla hemostática de fibrina (fibrinógeno) que contenía fibrina (fibrinógeno) precipitada por exposición de fibrina (fibrinógeno) a los restos carboxílicos de la tela. La almohadilla de fibrina (fibrinógeno) formada tenía propiedades hemostáticas tan buenas o mejores, en cuanto a la promoción de hemostasis in vivo, que las de una almohadilla preparada de tela que no contenía restos ácidos y que fue expuesta a fibrina (fibrinógeno) nativa, o que las de una almohadilla preparada de tela de CORC que no fue expuesta a fibrinógeno y que por ello no incluía un precipitado de fibrina (fibrinógeno).

Al sustrato se aplica una solución o un gel que comprende la proteína seleccionada entre el grupo constituido por fibrinógeno, fibrina y fibronectina y primeramente se prepara la solución o el gel que tiene una concentración de proteína eficaz para proporcionar, mejorar o mantener la hemostasis cuando se pone en contacto con un sustrato que tiene restos ácidos en cantidades eficaces para proporcionar un medio ácido adecuado para causar que la proteína precipite de la solución o el gel. Luego se pone en contacto la solución o el gel con el sustrato y se deja que permanezcan en contacto durante un tiempo suficiente para que se forme el precipitado de proteína. Típicamente, la precipitación de la proteína es sustancialmente simultánea al contacto y, por tanto, el tiempo de contacto puede ser mínimo. En ciertas realizaciones, el tiempo de contacto del sustrato con la proteína puede ser de hasta aproximadamente 30 o 45 minutos. Luego se seca el sustrato que comprende el precipitado de proteína para eliminar el componente líquido de la solución o el gel. En ciertas realizaciones, la eliminación del líquido se realiza usando la liofilización, en la que se congela el líquido y luego se elimina en vacío.

Como se, ve en las Figs. 1-5 se muestran telas descritas aquí que se han hecho reaccionar con plasma rico en plaquetas (PRP) según se describe en el Ejemplo 8. La Fig. 1 representa un sustrato de tela de rayón que no contiene restos ácidos, que no ha tenido contacto con fibrinógeno pero que se ha hecho reaccionar con PRP según se describe en el Ejemplo 8. La Fig. 2 corresponde a un sustrato de tela de CORC según lo descrito aquí que no ha tenido contacto con fibrinógeno, que no comprende proteína pero que se ha hecho reaccionar con PRP según se describe en el Ejemplo 8. La Fig. 3 muestra un sustrato de tela de rayón que no contiene restos ácidos, que se ha expuesto a fibrinógeno según se prepara en el Ejemplo 7b y que se ha hecho reaccionar con PRP según se describe en el Ejemplo 8. No se observa precipitado. Las Figs. 4 y 5 muestran un sustrato de CORC que se ha puesto en contacto con fibrinógeno como se ha preparado en el Ejemplo 7a y que se ha hecho reaccionar con PRP como se describe en el Ejemplo 8. Como se observa, el precipitado de proteína une las plaquetas 12 sobre la tela de CORC.

Se presentan los ejemplos siguientes con el fin de ejemplificar más realizaciones de la presente invención y no son limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1: Almohadilla de rayón revestida con fibrinógeno de porcino

Se puso en un recipiente de plástico una pieza de 10 x 10 cm de tela de rayón (1,1 g) y se añadieron hasta saturación 10 ml de una solución de fibrinógeno (fracción 1 de plasma de cerdo – 40 mg/ml de proteína coagulable en solución salina tamponada con citrato, pH 6,8). No se observó precipitación del fibrinógeno. Se liofilizó la tela y se cortó en piezas de 2,5 x 1,5 cm para ensayar el model de hemostasis en bazo de cerdo.

Ejemplo 2: Almohadilla de CORC revestida con fibrinógeno de porcino

Se puso en un recipiente de plástico una pieza de 10 x 10 cm de apósito de heridas Surgical® NuKnit de CORC

(1,2 g) y se añadieron 10 ml de una solución de fibrinógeno (fracción 1 de plasma de cerdo – 40 mg/ml de proteína coagulable en solución salina tamponada con citrato, pH 6,8) a saturación. Se observó una precipitación inmediata de fibrinógeno. Se liofilizó la tela y se cortó en piezas de 2,5 x 1,5 cm para ensayar el modelo de hemostasis en bazo de cerdo.

5 Ejemplo 3: Almohadilla de rayón revestida con fibrinógeno de porcino

Se vertieron en una placa petri de vidrio 10 ml de fibrinógeno (fracción 1 de plasma de cerdo – 40 mg/ml de proteína coagulable en solución salina tamponada con citrato, pH 6,8) para cubrir el fondo de la placa. Se añadió 1 ml de trombina bovina (1000 u/ml) y se arremolinó suavemente la placa para mezclar la trombina con el fibrinógeno. Se formó rápidamente un gel de fibrina. Después de aproximadamente 10 minutos, se puso encima del gel una pieza de 10 x 10 cm de tela de rayón no oxidado (1,0 g) y se dejó que se asentara durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. No se observó precipitación alguna. El material compuesto tela/gel se liofilizó luego. Se observó una separación completa como lámina de la tela de la capa de gel. Por tanto, con este material no se hizo ensayo alguno según se describe más adelante,

15 Ejemplo 4: Almohadilla de CORC revestida con fibrinógeno de porcino

Se vertieron en una placa petri de vidrio 10 ml de fibrinógeno (fracción 1 de plasma de cerdo – 40 mg/ml de proteína coagulable en solución salina tamponada con citrato, pH 6,8) para cubrir el fondo de la placa. Se añadió 1 ml de trombina bovina (1000 u/ml) y se arremolinó suavemente la placa para mezclar la trombina con el fibrinógeno. Se formó rápidamente un gel de fibrina. Después de aproximadamente 10 minutos, se puso encima del gel una pieza de 10 x 10 cm de apósito de heridas Surgical®NiKnit hecho de tela de rayón de CORC (1,3 g) y se dejó que se asentara durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se observó una precipitación inmediata dentro de la capa de gel y la tela se sumergió en el gel, formándose así un material compuesto de gel y tela. Luego se liofilizó el material compuesto. El material resultante se cortó luego en piezas de 2,5 x 1,5 cm y se ensayó según un modelo de hemostasis en bazo de cerdo.

20 Ejemplo 5: Almohadilla de CORC revestida de fibrina porcina

Se vertieron en una placa petri de vidrio 10 ml de fibrinógeno (fracción 1 de plasma de cerdo – 40 mg/ml de proteína coagulable en solución salina tamponada con citrato, pH 6,8) para cubrir el fondo del disco. Se añadió 1 ml de trombina bovina (1000 u/ml) y se arremolinó suavemente la placa para mezclar la trombina con el fibrinógeno. Se formó rápidamente un gel de fibrina. Después de aproximadamente 10 minutos, se puso encima del gel una pieza de 10 x 10 cm de apósito de heridas Surgical®NuKnit hecho de tela de rayón de CORC (1,1 g) y se dejó que se asentara durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se observó una precipitación inmediata dentro de la capa de gel y la tela se sumergió en el gel, formándose así un material compuesto de gel y tela. Luego se liofilizó el material compuesto. El material resultante se cortó luego en piezas de 2,5 x 1,5 cm y se ensayó según un modelo de hemostasis en bazo de cerdo.

25 Ejemplo 6: Comportamiento hemostático de materiales en el modelo de incisión esplénica en porcino

Se usó un modelo de incisión esplénica en porcino para la evaluación de la hemostasis en almohadillas liofilizadas preparadas como en los Ejemplos 1, 2, 4 y 5. Se hizo una incisión lineal de 1,5 cm de una profundidad de 0,3 cm con un bisturí en un bazo de porcino. Las almohadillas (2,5 x 1,5 cm) se pusieron sobre la herida sangrante. Después de aplicar la almohadilla de ensayo, se aplicó taponamiento digital a la incisión durante 30 segundos. Se usaron aplicaciones de taponamiento digital adicionales durante 30 s cada vez hasta lograr la hemostasis completa. En ciertas realizaciones, se aplicaron algunas almohadillas a heridas que se habían prehumedecido con solución salina. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos.

45

50

Tabla 1

Hemostasis in vivo de almohadillas con fibrina (fibrinógeno)		
Muestra de ensayo	Número de compresiones	Tiempo hasta hemostasis , s
Ejemplo 5	1	30
Ejemplo 5	1	30
Ejemplo 5	2	75
Ejemplo 2	2	90
Ejemplo 2	2	75
Ejemplo 2 (prehumedecida)	1	30
Ejemplo 1	6	285
Ejemplo 1	9	525
Ejemplo 1 (prehumedecida)	6	245
Ejemplo 4	3	105
Ejemplo 4	2	65
Ejemplo 4 (prehumedecida)	1	30
Ejemplo 4 (prehumedecida)	2	75
Ejemplo 4 (prehumedecida)	1	30

5 Ejemplo 7: Preparación de Surgical®NuKnit revestido con fibrinógeno humano y rayón revestido con fibrinógeno para estudios de unión de plaquetas

10 Una pieza de 10 x 10 cm de Surgical®NuKnit se puso plana sobre una bandeja de acero inoxidable. Se añadieron con pipeta sobre la tela 5 ml de una solución que contenía fibrinógeno humano como se describe en el documento WO 02/095019 A1 a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml y se esparció para que cubriera homogéneamente la superficie de la tela. El fluido caló lentamente la tela y precipitó, dejando una capa visible de precipitado sobre la superficie de la tela. La tela revestida se enfrió luego a -30°C y el disolvente congelado se eliminó en vacío y se designó Muestra 7a. Se designó Muestra 7b una pieza de control de rayón no oxidado de 10 x 10 cm preparada de idéntica manera. Ambas muestras 7a y 7b se ensayaron en cuanto a su capacidad de unir plaquetas humanas como se describe en el Ejemplo 8 y se compararon con el control de rayón no revestido designado Muestra 7.

15 Ejemplo 8: Medida de recuentos de unión de plaquetas

20 Se puso en una cacerola de aluminio de 7,5 mm de diámetro una pieza de tela de ensayo de 2,5 x 2,5 cm de cada una de las muestras de ensayo 7, 7a y 7b. Se añadieron a cada pieza de tela 2 ml de plasma rico en plaquetas diluido en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato y se incubó a temperatura ambiente con una agitación suave en una mesa de sacudidas de laboratorio. Los recuentos de plaquetas se realizaron en el PRP usando un contador de células Beckman Coulter AcT antes y después de la reacción con la tela.

Las células se lavaron tres veces en 20 ml de PBS, pH 7,4, y luego se fijaron durante la noche con glutaraldehído al 2,5%. Las muestras fijadas se enjuagaron durante períodos de 10 minutos en soluciones de etanol al 20%, 50% y 95%, respectivamente, luego se secaron en vacío. La microscopía electrónica de barrido se realizó en muestras secadas. La Tabla 2 muestra el resultado de la evaluación.

25

Tabla 2

Muestra	Recuento de plaquetas antes de la reacción	Recuento de plaquetas después de la reacción	Total de plaquetas unidas
Control	259x10 ⁶	240x10 ⁶	19x10 ⁶
7a	518x10 ⁶	404x10 ⁶	114x10 ⁶
7b	518x10 ⁶	464x10 ⁶	54x10 ⁶

5 Ejemplo 9: Preparación de Surgical®NuKnit revestido con fibrinógeno humano y rayón revestido con fibrinógeno para estudios de hemostasis

10 Una pieza de 10 x 10 cm de Surgical®NuKnit se puso plana sobre una bandeja de acero inoxidable. Se añadieron con pipeta sobre la tela 5 ml de una solución que contenía fibrinógeno humano a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml y se esparció para que cubriera homogéneamente la superficie de la tela. El fluido caló lentamente la tela y precipitó, dejando una capa visible de precipitado sobre la superficie de la tela. La tela revestida se enfrió luego a -30°C y se liofilizó y se designó Muestra 9a. Se revistió con fibrinógeno, de manera idéntica, una pieza de control de rayón no oxidado de 10 x 10 cm y se designó Muestra 9b. Ambas muestras 9a y 9b se ensayaron según un modelo de hemostasis en bazo de porcino como se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 10: Comportamiento hemostático de materiales en un modelo de incisión esplénica en porcino

15 Se usó un modelo de incisión esplénica en porcino para la evaluación de la hemostasis de almohadillas liofilizadas preparadas como en el Ejemplo 1. Se hizo una incisión lineal de 1,5 cm con una profundidad de 0,3 cm con un bisturí en un bazo de porcino. Las almohadillas (2,5 x 1,5 cm) se pusieron sobre la herida sangrante. Después de aplicar la almohadilla de ensayo, se aplicó taponamiento digital a la incisión durante 2 minutos. Se usaron aplicaciones de taponamiento digital adicionales durante 30 s cada vez hasta lograr la hemostasis completa. En ciertas realizaciones, se aplicaron algunas almohadillas a heridas que se habían prehumedecido con solución salina. La Tabla 3 muestra los resultados de la evaluación.

Tabla 3

Datos de hemostasis in vivo de almohadillas revestidas con fibrinógeno humano	
Muestra	Tiempo de hemostasis, minutos
Muestra 9b	2,25
	2,45
	3,15
Muestra 9a	2,00
	2,00
	2,00

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fabricar un dispositivo médico, que comprende:
proporcionar un sustrato fibroso de tela tejida o no tejida que comprende restos ácidos; y poner en contacto el mencionado sustrato fibroso con una solución o un gel que comprende una proteína seleccionada entre el grupo constituido por fibrinógeno, fibrina y fibronectina
5 en el que los mencionados restos ácidos están presentes en el mencionado sustrato en una cantidad eficaz para proporcionar un medio ácido suficiente para formar un precipitado de la mencionada proteína, con lo que el mencionado precipitado se incorpora al mencionado sustrato en una cantidad eficaz para proporcionar, mantener o mejorar las propiedades hemostáticas del mencionado sustrato.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mencionada proteína es humana, animal o recombinante.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se pone en contacto con el mencionado sustrato un gel que comprende la mencionada proteína.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la mencionada proteína comprende fibrinógeno.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el mencionado gel comprende trombina.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se pone en contacto con el mencionado sustrato una solución que comprende la mencionada proteína.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la mencionada proteína comprende fibrinógeno.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio ácido comprende un pH de 2,5 a 6.
- 20 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato fibroso es una tela tricotada en la que cada hilo contiene de 10 a 25 filamentos individuales y cada filamento individual es inferior a 0,56 tex (5 denier).
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato que comprende el precipitado de proteína se seca para eliminar el componente líquido de la solución o el gel.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el secado comprende la liofilización.
12. Un producto obtenible por el procedimiento de la reivindicación 10 u 11.

30

35

40

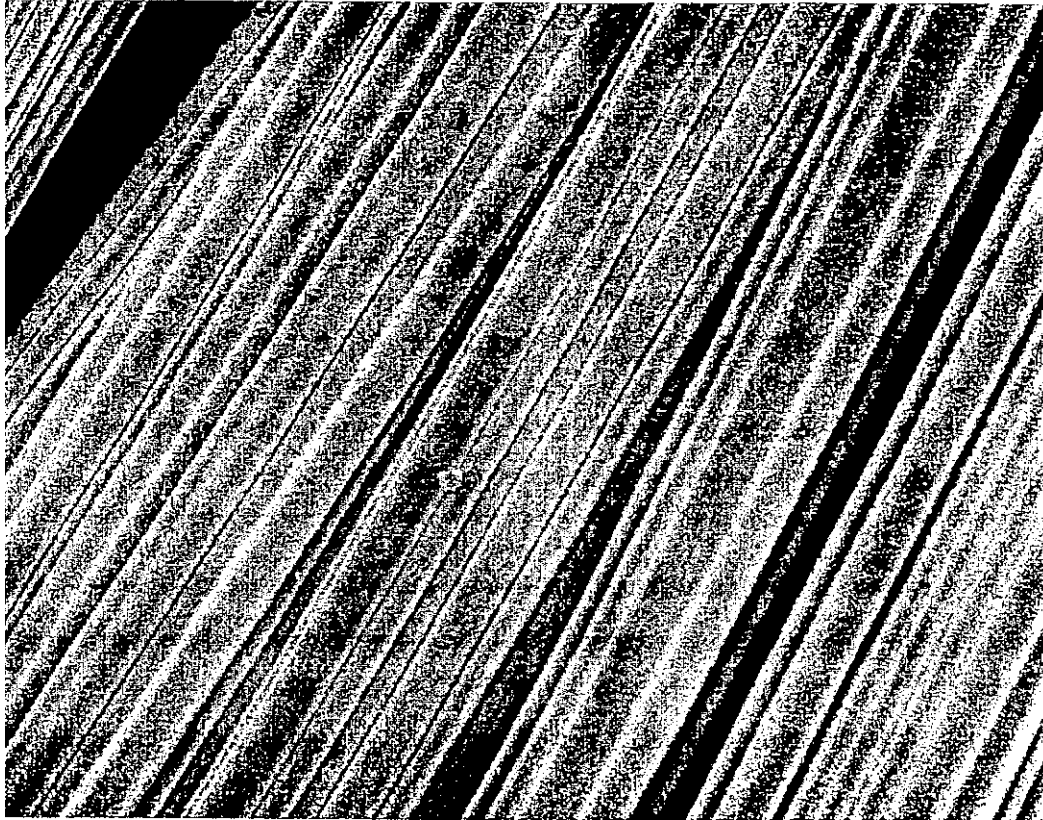


Figura 1

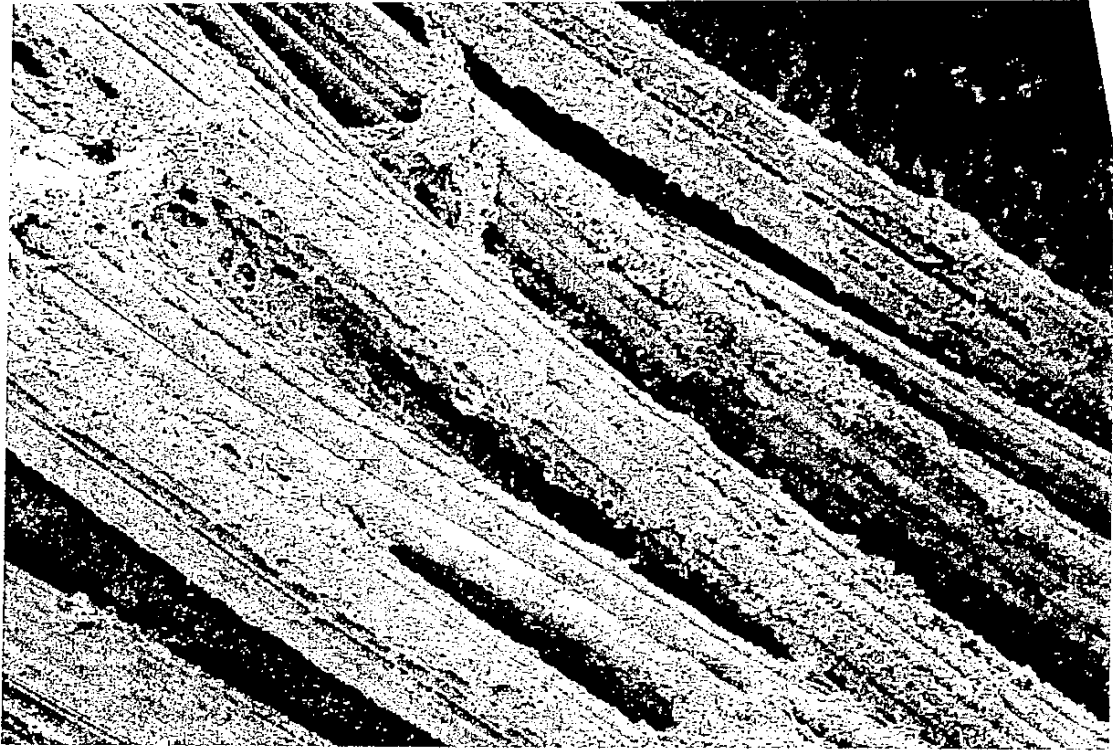


Figura 2

5

10

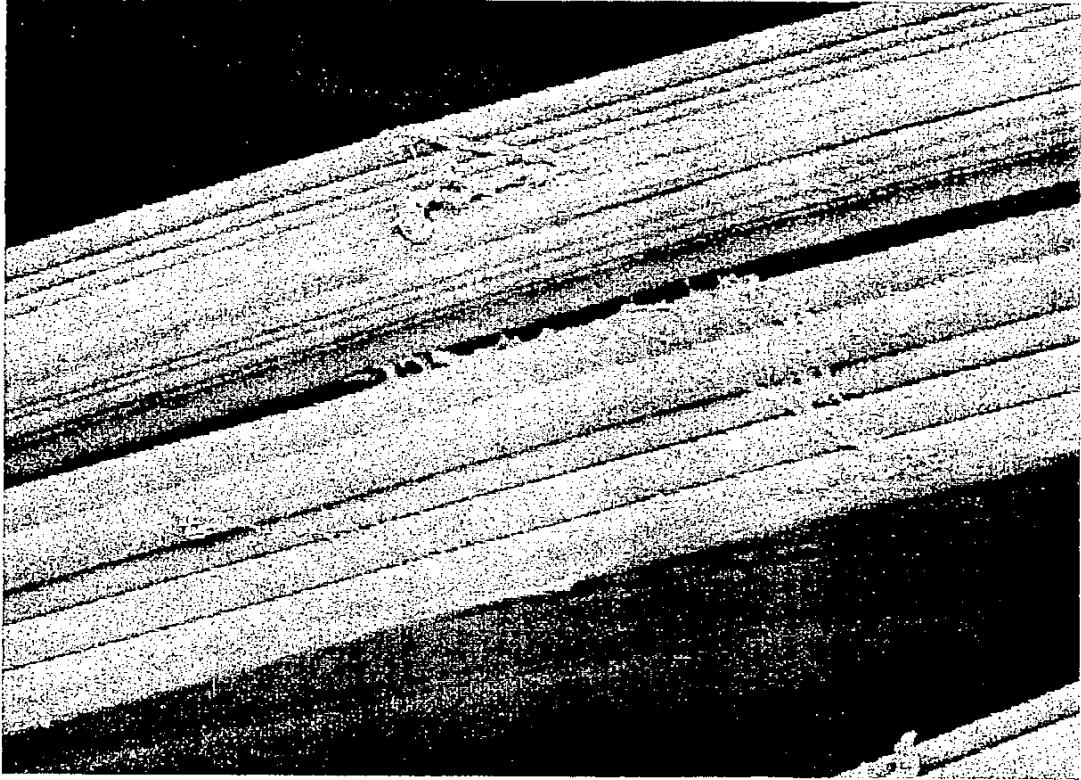


Figura 3

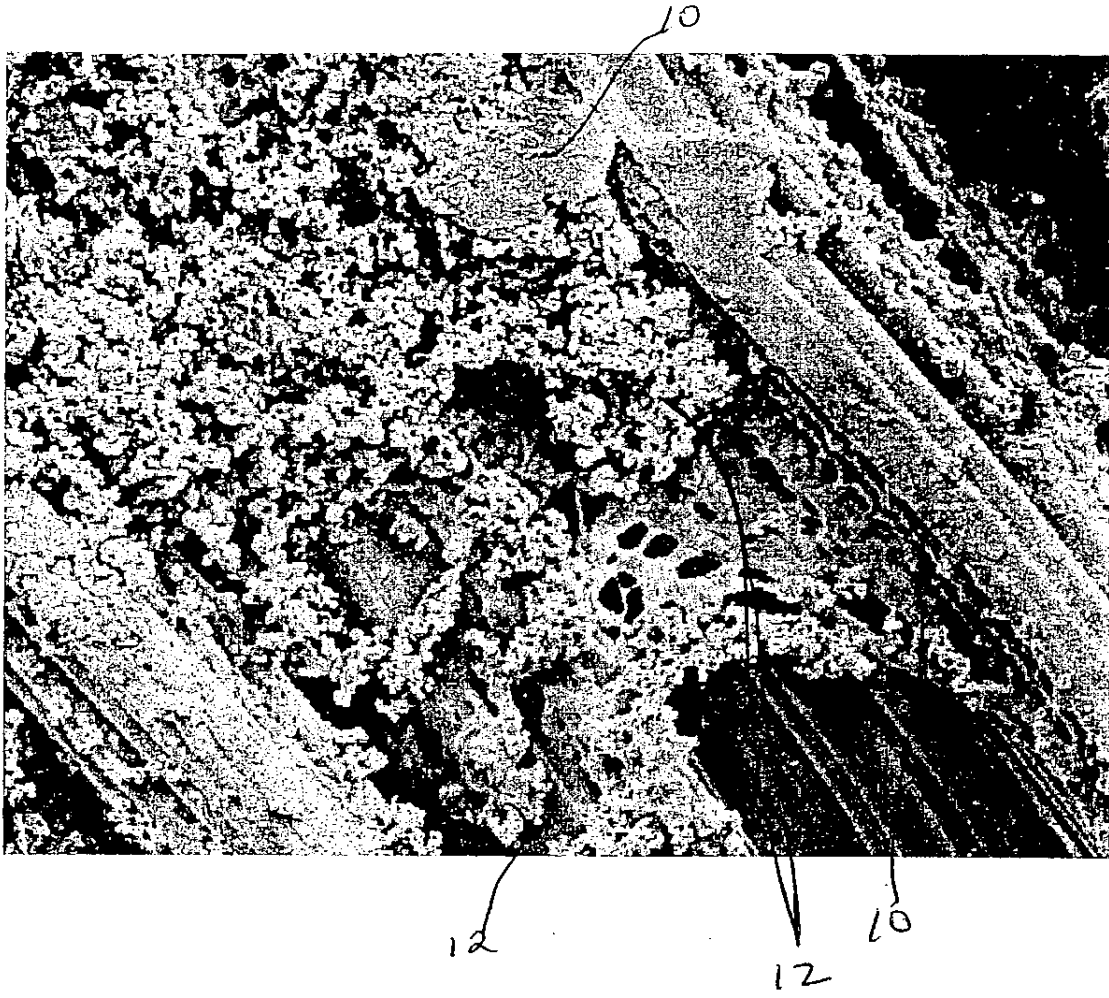


Figura 4



10

Figura 5

12