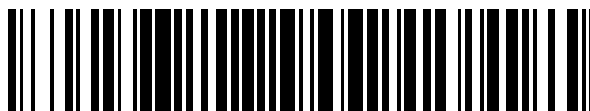


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 813**

51 Int. Cl.:
A61F 13/00 (2006.01)
A61F 13/15 (2006.01)
A61L 15/22 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)
A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07811115 .0**
96 Fecha de presentación: **06.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2059205**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **Procedimientos para la producción de apósito sólido para tratar tejido lesionado**

30 Prioridad:
04.08.2006 US 835423 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

73 Titular/es:
STB LIFESAVING TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
13212 NE 16TH STREET, SUITE 312
BELLEVUE WA 98005, US

72 Inventor/es:
MACPHEE, MARTIN y
BEALL, DAWSON

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 813 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

Procedimientos para la producción de apósito sólido para tratar tejido lesionado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para producir apósitos sólidos para tratar tejido lesionado en un paciente mamífero, tal como un ser humano, y a los apósitos y a los productos intermedios producidos mediante los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Desafortunadamente, los materiales y procedimientos disponibles para detener el sangrado en la atención pre-hospitalaria (apósitos de gasa, la presión directa y torniquetes) no han cambiado significativamente en los últimos 2000 años. Véase L. Zimmerman *et al.*, "Great Ideas in the History of Surgery", (San Francisco, Calif.: Norman Publishing; 1993), 31. Incluso en manos de expertos, no siempre son eficaces, y la aparición de un sangrado excesivo o una hemorragia fatal en una zona accesible no es poco común. Ver J. M. Rocko *et al.*, *J. "Trauma"* 22:635 (1982).

15 Los datos de mortalidad de Vietnam indican que el 10% de las muertes en combate se debieron a hemorragias no controladas en extremidades. Véase SAS/STAT "Users Guide", IV ed. (Cary, N.C.: SAS Institute Inc; 1990). Se podría haber evitado hasta un tercio de las muertes por desangrado ocurridas durante la Guerra de Vietnam mediante el uso de procedimientos eficaces de control de hemorragias en el campo. Véase SAS/STAT "Users Guide", IV ed. (Cary, N.C.: SAS Institute Inc; 1990).

20 Aunque las estadísticas de mortalidad por traumatismos de civiles no arrojan cifras exactas de muertes prehospitales por hemorragias en extremidades, los informes de casos indican situaciones similares. Véase J. M. Rocko *et al.* Estos datos sugieren que se podría obtener un aumento sustancial de la supervivencia mediante el uso pre-hospitalario de un procedimiento simple y eficaz de control de las hemorragias.

Actualmente, hay una serie de nuevos agentes hemostáticos en uso que se han desarrollado para combatir las deficiencias de las vendas de gasa tradicionales. Estos agentes hemostáticos incluyen los siguientes:

- Partículas de polisacáridos microporosas (TraumaDEX®, Medafor Inc., Minneapolis, MN);
- 25 • Zeolita (QuikClot®, Z-Medica Corp, Wallington, CT);
- poli-N-acetilglucosamina acetilada (Rapid Deployment Hemostat™ (RDH), Marine Polymer Technologies, Danvers, MA);
- Chitosán (vendaje HemCon®, HemCon Medical Technologies inc., Portland OR);
- Sellantes líquidos de fibrina (Tisseel VH, Baxter, Deerfield, IL);
- 30 • Fibrinógeno y trombina humanos sobre colágeno equino (TachoComb-S, Hafslund Nycomed Pharma, Linz, Austria);
- Celulosa oxidada microdispersada (m·doc™, Alltracel Group, Dublín, Irlanda);
- Propilgalato (Hemostatin™, Analytical Control Systems Inc., Fishers, IN);
- Ácido épsilon aminocaproico y trombina (parche Hemarrest™, Clarion Pharmaceuticals, Inc);
- 35 • Colágeno de corio bovino purificado (láminas Avitene® (red no tejida o pinza hemostática de colágeno microfibrilar de Avitene (MCH), Davol, Inc., Cranston, RI);
- Oxidación controlada de celulosa regenerada (Surgicel®, Ethicon Inc., Somerville, NJ);
- Sulfato de aluminio con revestimiento de etilcelulosa (Sorbastace Microcaps, Hemostace, LLC, New Orleans, LA);
- 40 • Poliacrilamida formadora de hidrogel microporoso (BioHemostat, Hemodyne, Inc., Richmond VA); y
- Factor VII activado recombinante (NovoSeven®, NovoNordisk Inc., Princeton, NJ).

Estos agentes han tenido un grado variable de éxito cuando se han usado en modelos animales de lesiones traumáticas y/o en el campo.

45 Uno de tales agentes es un agente hemostático basado en almidón comercializado con el nombre comercial TraumaDEX™. Este producto comprende partículas de polisacárido microporosas que se vierten directamente en o

sobre la herida. Las partículas parecen ejercer su efecto hemostático mediante la absorción del agua de la sangre y del plasma de la herida, provocando la acumulación y la concentración de factores de coagulación y plaquetas. Sin embargo, en dos estudios de un modelo de herida letal en la inglete, este agente no mostró ningún beneficio significativo frente a las gasas estándar. Véase McManus *et al.*, "Business Briefing: Emergency Medical Review" 2005, pp. 76–79 (actualmente disponible en línea en www.touchbriefings.com/pdf/1334/Wedmore.pdf).

Otro agente basado en partículas es el polvo QuickClot™, un agente hemostático granular de zeolita que se vierte directamente en o sobre la herida. Las partículas de zeolita también parecen ejercer su efecto hemostático a través de la absorción de líquidos, que causan la acumulación y la concentración de factores de coagulación y plaquetas. Aunque este agente se ha usado con éxito en algunos estudios con animales, sigue habiendo preocupación por el proceso exotérmico de la absorción de los líquidos por parte de las partículas. Algunos estudios han demostrado que esta reacción genera temperaturas superiores a 143°C *in vitro* y en exceso de 50°C *in vivo*, algo suficientemente grave como para causar quemaduras de tercer grado. Véase McManus *et al.*, "Business Briefing: Emergency Medical Review" 2005, en 77. También se ha observado que la reacción exotérmica de QuikClot™ provoca cambios en el tejido bruto e histológico de importancia clínica desconocida. Acheson *et al.*, *J. Trauma* 59:865–874 (2005).

A diferencia de estos agentes basados en partículas, el producto Hemostat™ de Rapid Deployment parece ejercer su efecto hemostático a través de la agregación de glóbulos rojos, la activación plaquetaria, la activación de la cascada de coagulación y la vasoconstricción local. Hemostat™ de Rapid Deployment es un apósito derivado de algas que se compone de poli-N-acetil-glucosamina. Si bien el diseño de apósito original era eficaz para reducir un sangrado de poca importancia, era necesario añadir una gasa de refuerzo con el fin de reducir la pérdida de sangre en modelos porcinos de lesión en la aorta y en el hígado. Véase McManus *et al.*, "Business Briefing: Emergency Medical Review" 2005, en 78.

Otro apósito derivado de poli-N-acetil-glucosamina es el vendaje de chitosán HemCon™, que es un apósito de chitosán liofilizado supuestamente diseñado para optimizar la densidad superficial mucoadhesiva y la integridad estructural del chitosán en la zona de la herida. El vendaje de chitosán HemCon™ aparentemente ejerce sus efectos hemostáticos principalmente a través de su adhesión a la herida, aunque hay pruebas que sugieren que también puede mejorar la función plaquetaria e incorporar glóbulos rojos al coágulo que se forma sobre la herida. Este vendaje ha mostrado mejor hemostasia y una menor pérdida de sangre en varios modelos animales de hemorragia arterial, pero se observó una marcada variabilidad entre vendajes, incluyendo el fallo de algunos debido a la adherencia inadecuada a la herida. Véase McManus *et al.*, "Business Briefing: Emergency Medical Review" 2005, en 79.

Durante años, se han usado los sellantes líquidos de fibrina, tales como Tisseel VH, como complemento para el control de hemorragias en los quirófanos. Véase J. L. Garza *et al.*, *J. Trauma* 30:512–513 (1990); H. B. Kram *et al.*, *J. Trauma* 30:97–101 (1990); M. G. Ochsner *et al.*, *J. Trauma* 30:884–887 (1990); T. L. Matthew *et al.*, *Ann. Thorac. Surg.* 50:40–44 (1990); H. Jakob *et al.*, *J. Vasc. Surg.*, 1:171–180 (1984). La primera mención de la cola para tejidos usada para la hemostasia se remonta a 1909. Véase "Current Trends in Surgical Tissue Adhesives: Proceedings of the First International Symposium on Surgical Adhesives", M. J. MacPhee *et al.*, eds. (Lancaster, Pa.: Technomic Publishing Co; 1995). Los sellantes líquidos de fibrina se componen comúnmente de fibrinógeno y trombina, pero también pueden contener Factor XIII/XIIIa, bien como subproducto de la purificación de fibrinógeno o como ingrediente añadido (en ciertas aplicaciones, no es necesario, por tanto, que el Factor XIII/factor XIIIa esté presente en el sellante de fibrina, porque hay suficiente Factor XIII/ XIIIa u otra transaminasa presente endógenamente para inducir la formación de fibrina). Sin embargo, como líquidos, estos sellantes de fibrina no han demostrado ser útiles para el tratamiento de lesiones traumáticas en el campo.

Los apósitos de fibrinógeno–trombina secos que tienen un soporte de colágeno (p. ej., TachoComb™, TachoComb™ H y TachoSil disponibles en Hafslund Nycomed Pharma, Linz, Austria) también están disponibles para el uso en quirófanos de muchos países europeos. Véase U. Schiele *et al.*, *Clin. Materials* 9:169–177 (1992). Aunque que estos apósitos de fibrinógeno–trombina no requieren la pre-mezcla que necesitan los sellantes de fibrina líquidos, su utilidad para aplicaciones de campo está limitada por su necesidad de permanecer almacenados a 4°C y de prehumedecerlos con solución salina antes de su aplicación a la herida. Estos vendajes tampoco son eficaces contra el sangrado de alta presión y de gran volumen. Véase Sondeen *et al.*, *J. Trauma* 54:280–285 (2003).

También hay un apósito seco de fibrinógeno/trombina para el tratamiento de tejido lesionado disponible en la Cruz Roja estadounidense (ARC). Como se describe en la patente estadounidense n.º 6.762.336, este apósito en concreto se compone de un material de refuerzo y una pluralidad de capas, conteniendo las dos exteriores de las cuales fibrinógeno (pero no trombina), mientras que la capa interior contiene trombina y cloruro de calcio (pero no fibrinógeno). Aunque este apósito ha demostrado un gran éxito en varios modelos animales de hemorragia, el vendaje es frágil, inflexible y tiene una tendencia a romperse cuando se manipula. Véase McManus *et al.*, "Business Briefing: Emergency Medical Review" 2005, en 78.; Kheirabadi *et al.*, *J. Trauma* 59:25–35 (2005).

También se han propuesto otros apósitos basados en fibrinógeno/trombina. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.683.142 describe un material laminar reabsorbente para cerrar y cicatrizar heridas que consiste en una matriz de glucoproteína, tal como colágeno, que contiene proteínas de la coagulación, tales como el fibrinógeno y la trombina. La patente estadounidense n.º 5.702.715 revela un sellador biológico reforzado que se compone de capas separadas de fibrinógeno y trombina, en el que al menos una de las cuales también contiene una carga de refuerzo tal como PEG,

PVP, ASB, manitol, FICOLL, dextrano, mio-inositol o clorato de sodio. La patente estadounidense n.º 6.056.970 describe apósitos que se componen de un polímero bioabsorbible, tal como ácido hialurónico o carboximetilcelulosa, y una composición hemostática que se compone de trombina en polvo y/o fibrinógeno en polvo. La patente estadounidense n.º 7.189.410 revela un vendaje que se compone de un material de refuerzo que tiene encima: (i) partículas de fibrinógeno, (ii) partículas de la trombina; y (iii) cloruro de calcio. La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0155234 A1 revela un apósito que se compone de un material de soporte y una pluralidad de capas de fibrinógeno que tienen superficies diferenciadas de trombina entre ellas. Hasta la fecha, ninguno de estos apósitos ha sido aprobado para su uso o se encuentra disponible comercialmente.

Además, los esfuerzos realizados en el pasado para preparar apósitos sólidos de fibrinógeno/trombina siempre se han visto obstaculizados por la misma propiedad que los convierte en ingredientes deseables para el tratamiento de heridas: su capacidad inherente para reaccionar con rapidez en condiciones acuosas formando fibrina. La presencia de Factor XIII en la mezcla provoca una mayor conversión de la fibrina I en fibrina II reticulada.

En la Figura 1, se muestra el proceso de coagulación global para un ser humano. Como se muestra en la misma, la conversión del fibrinógeno en fibrina I implica la escisión de dos péptidos pequeños (A y B) de las cadenas alfa (α) y beta (β) de fibrinógeno, respectivamente. Estos péptidos pequeños son difíciles de detectar y controlar directamente; sin embargo, la disminución del peso molecular de las cadenas alfa y beta producida por esta escisión se puede controlar mediante electroforesis en gel. De manera similar, la conversión de la fibrina I en fibrina II reticulada se puede controlar mediante la desaparición en geles del monómero de cadena gamma (γ) de fibrinógeno (al convertirse en dímeros γ - γ mediante la acción del factor XIII en los monómeros de cadena γ).

Para evitar la reacción prematura, los intentos anteriores por fabricar apósitos sólidos de fibrinógeno/trombina han incidido en la mayor separación posible de los componentes de fibrinógeno y trombina con el fin de evitar la formación de demasiada fibrina antes de usar el apósito. Por ejemplo, los apósitos de fibrinógeno/trombina que tienen un soporte de colágeno (por ejemplo, TachoComb™, TachoComb™ H y TachoSil), disponibles en Hafslund Nycomed Pharma, se preparan mediante la suspensión de partículas de fibrinógeno y trombina en un líquido no acuoso y luego la pulverización de la suspensión sobre la base de colágeno. El uso de un medio no acuoso, en comparación con una solución acuosa, sirve para evitar la interacción excesiva entre el fibrinógeno y la trombina.

Se han propuesto alternativas a este procedimiento, cada una de ellas diseñada de manera similar para mantener el fibrinógeno y la trombina por separado dentro de lo posible. Por ejemplo, el apósito sólido de fibrinógeno/trombina revelado en la patente estadounidense n.º 7.189.410 se preparó mezclando fibrinógeno en polvo y trombina en polvo en ausencia de disolvente y luego aplicando la mezcla de polvo seco en el lado adhesivo del material de refuerzo. Los apósitos sólidos de fibrinógeno/trombina revelados en la patente estadounidense n.º 6.762.336 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2006/0155234 A1 contienen capas separadas y diferenciadas de fibrinógeno o trombina, cada una de ellas sustancialmente libre de la otra. Sin embargo, estos enfoques no han sido completamente satisfactorios.

Para que funcione apropiadamente, un apósito sólido basado en fibrinógeno/trombina debe cumplir varios criterios. Para empezar, el fibrinógeno y la trombina deben poder interactuar satisfactoriamente para formar un coágulo y cuanto más se adhiera este coágulo a la herida, mejor funcionará el apósito. En general, el apósito debe tener un alto grado de integridad, puesto que la pérdida de ingredientes activos debida al agrietamiento, la descamación y similares, al final, se traducirá en un menor rendimiento y una escasa aceptación por parte del usuario. Se han publicado informes sobre la deficiencia en una o más de estas características de apósitos sólidos de fibrinógeno/trombina conocidos.

Además, el apósito debe ser homogéneo, pues todas las superficies del apósito deben funcionar igualmente bien para garantizar un uso correcto. El apósito también debe hidratarse rápidamente y sin demasiados esfuerzos. En general, se prefieren los apósitos relativamente planos, evitándose en la medida de lo posible las estructuras curvadas o irregulares no planas (éstas tienden a interferir en la aplicación eficaz y, en algunos casos, pueden producir un mal rendimiento). La flexibilidad es otra característica que se prefiere enormemente, tanto para mejorar el rendimiento como para aumentar el número formas geométricas y ubicaciones de las heridas que se puedan tratar eficazmente. Aunque los apósitos sólidos de fibrinógeno/trombina conocidos pueden ser flexibles cuando se hidratan, no poseen suficiente contenido de humedad antes de su hidratación como para ser flexibles. Véase, p. ej., Sondeen *et al.*, *J. "Trauma"* 54:280–285 (2003); Holcomb *et al.*; *J. "Trauma"*, 55 518–526; McManus y Wedmore, "Emergency Medicine Review", pp 76–79, 2005.

La cantidad de fibrina presente en el apósito antes de su uso, concretamente, de fibrina II reticulada insoluble, debe ser relativamente pequeña. Esta última característica es importante por varias razones. En primer lugar, la presencia de fibrina insoluble durante la fabricación normalmente produce apósitos de mala calidad que presentan una menor integridad, una falta de homogeneidad y una hidratación difícil/lenta. Habitualmente, cualquier experto en la técnica puede detectar estas consecuencias a simple vista.

Por ejemplo, es posible detectar visualmente la presencia de fibrina preformada en un apósito sólido basado en fibrinógeno/trombina observando las diferencias con respecto a un aspecto superficial homogéneo. En concreto, un aspecto áspero o abultado frecuentemente indica que hay masas significativas de fibrina que se han formado durante la fabricación y que, probablemente, impedirán una futura utilización. Las "láminas" sólidas, suaves y brillantes sobre la

superficie de los apósitos sólidos también indican fibrina que tenderá a ralentizar (o incluso bloquear) la hidratación durante su uso. Una curvatura hacia arriba excesiva de un apósito sólido es otro signo de que se ha formado una cantidad importante de fibrina durante la fabricación. Tras la adición de agua o de una solución acuosa, los apósitos con un contenido excesivo de fibrina se hidratan lentamente y, a menudo, requieren una aplicación del líquido con fuerza, a veces, con penetración mecánica de la superficie para iniciar la hidratación. Además, una vez hidratados, los apósitos con una cantidad importante de fibrina preformada, habitualmente, tienen un aspecto moteado y distintamente heterogéneo.

También se puede medir la cantidad de fibrina preformada mediante diversos análisis bioquímicos, tales como el procedimiento descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0155234 A1. Según este análisis, se usa la conversión de las cadenas γ de fibrinógeno en dímeros γ - γ reticulados como señal de la presencia de fibrina (siendo la proporción de cadena γ que se convierte en dímero γ - γ una medida de la cantidad de fibrina producida).

Otros análisis podrían medir los cambios en otras cadenas componentes de fibrinógeno, tales como la conversión de la cadena A α en una cadena α libre y un fibrinopéptido A o la conversión de la cadena B β en cadena β libre y fibrinopéptido B. Estos cambios se pueden controlar mediante electroforesis en gel de una manera similar a la conversión de γ - γ descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0155234 A1. Lo interesante es que, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2006/0155234 A1, se publicaron niveles relativamente elevados de dimerización γ - γ (de hasta el 10%), lo que indica que estos apósitos incluían cantidades sustanciales de fibrina antes de su uso. Esta observación puede ser responsable de la deslaminación y/o el agrietamiento observados en algunos de estos apósitos.

Para que un apósito sólido basado en fibrinógeno/trombina funcione apropiadamente, la hidratación, normalmente, se debe completar en unos cuantos segundos y no requerir nada más que la aplicación de agua (o alguna solución acuosa) sobre el apósito. Esta solución podría ser sangre u otro fluido corporal de una zona lesionada en la que se aplique el apósito, o puede proceder de cierta fuente externa, tal como una solución salina u otro líquido acuoso fisiológicamente aceptable aplicado al apósito cuando está sobre la herida que se vaya a tratar. Los tiempos de hidratación más largos, es decir, generalmente de más de 5 segundos, impedirán el funcionamiento del apósito, pues se pueden perder partes del mismo o introducir en los fluidos que seguirán fluyendo libremente antes de la formación suficiente de fibrina reticulada. Dadas las consecuencias potencialmente fatales del sangrado continuo, es muy poco deseable retrasar la hidratación del apósito durante su uso. Además, el rendimiento de los apósitos con un contenido de fibrina excesivo es habitualmente pobre, como se refleja en las menores puntuaciones en los ensayos de EVPA y de adherencia descritos en la presente memoria, así como durante las pruebas in vivo y el uso clínico.

El documento WO97/28832 revela un vendaje hemostático, así como el procedimiento de producción de dicho vendaje que contiene fibrinógeno y trombina en polvo.

El documento WO2004/010913 describe un apósito para heridas, así como el procedimiento de producción de dicho apósito para heridas que comprende fibrinógeno, fibrina o ambos y al menos un procoagulante.

El documento WO99/56798 revela una composición hemostática bioabsorbible fibrosa sólida, así como un procedimiento de producción de dicha composición.

El documento US6762336 revela un vendaje de sándwich hemostático, así como el procedimiento de producción de dicho vendaje que comprende una primera capa de fibrinógeno y una capa de trombina. El procedimiento se realiza a temperaturas muy bajas.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de un apósito sólido que se pueda usar para tratar tejido lesionado, particularmente, tejido lesionado como consecuencia de un traumatismo en el campo.

Resumen de la invención

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos para la producción de apósitos sólidos que puedan tratar tejido lesionado de mamífero, particularmente, tejido lesionado como consecuencia de un traumatismo según lo mencionado en las reivindicaciones. Es otro objeto más de la presente invención proporcionar apósitos sólidos para tratar tejido lesionado de mamífero, particularmente, tejido humano, y los compuestos intermedios útiles en la fabricación de tales apósitos. Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se expondrán en la descripción detallada de las realizaciones preferidas que se presentan a continuación y, se harán en parte evidentes a partir de la descripción y/o se podrán aprender mediante la práctica de la presente invención. Estos objetos y ventajas se realizarán y conseguirán mediante los procedimientos y las composiciones descritos en la presente memoria y destacados particularmente en las reivindicaciones que la siguen.

Según estos y otros objetos, una primera realización de la presente invención se dirige a un procedimiento de producción de un apósito sólido para tratar tejido lesionado en un mamífero que comprende: (a) formar una mezcla acuosa líquida de un componente de fibrinógeno y un activador del fibrinógeno a una temperatura suficientemente baja como para inhibir la activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno; (b) reducir la temperatura de la mezcla acuosa para formar una mezcla acuosa congelada; y (c) reducir el contenido de humedad de

la mezcla acuosa congelada para producir un apósito sólido que tenga una capa hemostática que consista esencialmente en el componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno.

Otras realizaciones de la invención se dirigen a apósitos sólidos producidos mediante este procedimiento y a compuestos intermedios producidos durante este procedimiento.

5 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** es una perspectiva general de la cascada de coagulación humana según lo proporcionado por el sitio Web de ERL (<http://www.enzymere-search.co.uk/coag.htm>).

La **Figura 2** es un diagrama de la configuración del ensayo de arteriotomía porcina *ex vivo* descrito en la presente memoria.

10 Las **Figuras 3A–3C** son gráficas que muestran los resultados obtenidos en el Ejemplo 1.

La **Figura 4A** y la **Figura 4B** son gráficas que representan los resultados de los ensayos de EVPA y de adherencia para los apósitos hechos en los Ejemplos 6 a 12.

Las **Figuras 5A** y **5B** son gráficas que muestran las características de rendimiento de las composiciones congeladas almacenadas a -80°C según lo mostrado en el Ejemplo 13.

15 Las **Figuras 6A–6D** y **7A–7B** muestran los resultados obtenidos en el Ejemplo 20, 21 y 22.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por cualquier experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente memoria se encuentran incorporadas por referencia.

Como se usa en la presente memoria, el uso del artículo en singular, tal como “un/a” y “el/la” no pretende excluir los plurales del objeto del artículo a no ser que el contexto dicte clara e inequívocamente lo contrario.

“Paciente”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un individuo humano o animal en necesidad de atención y/o tratamiento médico.

25 “Herida” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier daño en cualquier tejido de un paciente que provoque la pérdida de sangre del sistema circulatorio y/o de cualquier otro fluido del cuerpo del paciente. El tejido puede ser un tejido interno, tal como un órgano o un vaso sanguíneo, o un tejido externo, tal como la piel. La pérdida de sangre puede ser interna, tal como de la ruptura de un órgano, o externa, tal como de una laceración. La herida puede estar en un tejido blando, tal como un órgano, o en un tejido duro, tal como hueso. El daño puede estar provocado por
30 cualquier agente o fuente, incluyendo traumatismo, infección o intervención quirúrgica.

“Material reabsorbible”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un material que se descompone espontáneamente en y/o por el cuerpo del mamífero en componentes que se consumen o eliminan de manera que no interfieran significativamente en la cicatrización de las heridas y/o la regeneración tisular, y sin provocar ninguna perturbación metabólica significativa.

35 “Estabilidad”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la retención de aquellas características de un material que determinan la actividad y/o la función.

“Adecuado/a”, como se usa en la presente memoria, pretende significar que un material no afecta negativamente a la estabilidad de los apósitos o de cualquier componente de los mismos.

40 “Agente aglutinante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que mejora la adherencia y/o la cohesión de los componentes de la/s capa/s hemostática/s de los apósitos.

“Agente de solubilización”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que mejora la disolución de una proteína o proteínas en un disolvente acuoso.

“Carga”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o una mezcla de compuestos que proporciona volumen y/o porosidad a la/s capa/s hemostática/s de un apósito.

45 “Agente de desmoldeo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o una mezcla de compuestos que facilita la retirada del apósito de un molde de fabricación.

“Agente formador de espuma”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o una mezcla de compuestos que produce gas cuando se hidrata en condiciones adecuadas.

“Sólido”, como se usa en la presente memoria, pretende significar que el apósito no cambiará sustancialmente de forma cuando se coloque sobre una superficie rígida, boca abajo enfrentado a la herida, y se deje luego reposar a temperatura ambiente durante 24 horas.

5 “Congelado”, como se usa en la presente memoria, pretende significar que la composición no cambiará sustancialmente de forma cuando se coloque sobre una superficie rígida, boca abajo enfrentado a la herida, y se deje reposar a -40°C durante 24 horas, pero que sí cambiará sustancialmente de forma cuando se coloque sobre una superficie rígida, boca abajo enfrentado a la herida, y luego se deje a temperatura ambiente durante 24 horas. Así pues, en el contexto de la presente invención, un apósito “sólido” no es un apósito “congelado” y una composición o mezcla “congelada” no es “sólida”.

10 Una primera realización de la presente invención se dirige a un procedimiento de producción de un apósito sólido para tratar tejido lesionado en un mamífero que comprende: (a) formar una mezcla acuosa líquida de un componente de fibrinógeno y un activador del fibrinógeno a una temperatura suficientemente baja como para inhibir la activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno; (b) reducir la temperatura de la mezcla acuosa para formar una mezcla acuosa congelada; y (c) reducir el contenido de humedad de la mezcla acuosa congelada para producir un apósito sólido que tenga una capa hemostática que consista esencialmente en el componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno.

15 Como se usa en la presente memoria, “que consiste esencialmente en” pretende significar que el componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno son los únicos ingredientes necesarios y esenciales de la/s capa/s hemostática/s del apósito sólido cuando se usa según lo previsto para tratar tejido lesionado. Por consiguiente, la capa hemostática puede contener otros ingredientes además del componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno según se desee para una aplicación en concreto, pero estos otros ingredientes no son necesarios para que el apósito sólido funcione como se pretende en condiciones normales, i.e., estos otros ingredientes no son necesarios para que el componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno reaccionen y formen suficiente fibrina para reducir el flujo de sangre y/o fluido del tejido lesionado normal cuando se aplique el apósito en este tejido en las condiciones de uso para las que está destinado. Sin embargo, si las condiciones de uso de una situación concreta no son normales, por ejemplo, el paciente es un sujeto hemofílico que padece una deficiencia de Factor XIII, entonces se pueden añadir componentes adicionales apropiados, tales como el Factor XIII/XIIIa o alguna otra transaminasa, a la/s capa/s hemostática/s sin desviarse del espíritu de la presente invención. De igual manera, el apósito sólido de la presente invención puede contener una o más de estas capas hemostáticas, así como una o más de otras capas, tales como una o más capas de soporte (p. ej., un material de refuerzo o un material de soporte interno) y capas de desmoldeo.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención se dirigen a procedimientos para tratar tejido lesionado en un mamífero que comprenden colocar un apósito sólido de la presente invención en tejido lesionado y aplicar suficiente presión sobre el apósito durante un tiempo suficiente para que se forme suficiente fibrina para reducir la pérdida de sangre and/or otro fluido desde la herida.

35 Otras realizaciones preferidas más se dirigen a composiciones que consisten esencialmente en una mezcla de un componente de fibrinógeno, un activador de fibrinógeno y agua, en el que estas composiciones son estables a una temperatura reducida durante al menos 24 horas. Estas incluyen composiciones congeladas y composiciones líquidas. Tales composiciones son particularmente útiles para preparar la/s capa/s hemostática/s de los apósitos sólidos de la invención, pero también se pueden usar por sí solas para tratar el tejido lesionado.

40 Según ciertas realizaciones de la presente invención, la/s capa/s hemostática/s del apósito sólido se prepara/n como una sola pieza. Según estas realizaciones, la capa hemostática se puede formar introduciendo una solución acuosa de componente de fibrinógeno y una solución acuosa de activador de fibrinógeno en un recipiente adecuado, tal como un molde o similar, con mezclado. Luego se enfría la mezcla acuosa resultante para formar una mezcla acuosa congelada del componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno.

45 Según otras ciertas realizaciones de la presente invención, la capa hemostática tiene un solo origen, p. ej., una solución acuosa que contiene una mezcla del fibrinógeno y del activador de fibrinógeno. Según estas realizaciones, la capa hemostática se puede formar introduciendo una mezcla acuosa líquida de componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno en un recipiente adecuado, tal como un molde o similar, y luego reducir la temperatura para formar una mezcla acuosa congelada del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno.

50 Preferiblemente, en cada una de las realizaciones de la presente invención, la/s capa/s hemostática/s es/son sustancialmente homogénea/s.

Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el apósito sólido se fabrica usando un molde. Según estas realizaciones, los apósitos sólidos también pueden comprender además opcionalmente una capa de desmoldeo además de la/s capa/s hemostática/s y la/s capa/s de soporte. Como se usa en la presente memoria, una “capa de desmoldeo” se refiere a una capa que contiene uno o más agentes (“agentes de desmoldeo”) que potencian o facilitan la separación del apósito sólido del molde en el que ha sido fabricado. Uno de tales agentes preferido es la sacarosa, pero otros agentes de desmoldeo adecuados incluyen gelatina, hialurona y sus derivados, tal como ácido hialurónico,

manitol, sorbitol y glucosa. Tal capa de desmoldeo se coloca o se forma preferiblemente en el molde antes de introducir la mezcla acuosa líquida o las soluciones de componente de fibrinógeno y de activador de fibrinógeno.

Alternativamente, tales uno o más agentes de desmoldeo pueden estar contenidos en la capa hemostática. Según estas realizaciones, el agente de desmoldeo se puede introducir en la mezcla acuosa líquida antes de o durante la introducción de la mezcla acuosa líquida en el molde. El agente de desmoldeo también se puede introducir en la solución del componente de fibrinógeno y/o la solución del activador de fibrinógeno antes de o durante la formación de la mezcla acuosa líquida.

La mezcla acuosa del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno se puede realizar en cualquier recipiente adecuado. Según ciertas realizaciones preferidas, el recipiente usado para mezclar es el molde en el que, posteriormente, se vaya a congelar la mezcla acuosa líquida. Según tales realizaciones, las soluciones acuosas líquidas separadas del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno se introducen simultáneamente en el molde, haciendo así que las dos soluciones se mezclen. Alternativamente, se puede preparar una sola solución acuosa líquida del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno en un recipiente, y luego introducir las posteriormente en el molde.

Cualquier experto en la técnica puede determinar empíricamente el tamaño y la geometría de un determinado molde en función del tamaño y de la forma deseados del apósito sólido que se esté produciendo. Los materiales adecuados para un molde incluyen, pero sin limitación, polímeros tales como cloruro de polivinilo (PVC), polietilentetraftalato modificado con glicol (PETG) y polietileno. Otros materiales adecuados incluyen metales, tales como acero inoxidable, papel, cartón y papel o cartón impermeable. El molde también se puede fabricar con un material de rápida disolución que sea sólido a las temperaturas a la que el molde se mantiene y/o un material que se pueda liofilizar en un estado sólido.

Según los procedimientos de la presente invención, la formación de una mezcla acuosa líquida del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno se realiza a una temperatura que es lo suficientemente baja como para inhibir la activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno.

La activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido y disponible para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la formación de fibrina a partir de la activación del componente de fibrinógeno se puede detectar visualmente mediante la observación de las diferencias con respecto a un aspecto superficial homogéneo del apósito sólido resultante. Las "láminas" sólidas, suaves y brillantes sobre la superficie de los apósitos sólidos también indican fibrina, así como una ondulación excesiva de los bordes. Además, una vez hidratados, los apósitos con una cantidad relevante de fibrina, habitualmente, tienen un aspecto moteado y distintamente heterogéneo.

Preferiblemente, la activación del componente de fibrinógeno se puede medir mediante diversos análisis bioquímicos, tales como el procedimiento descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0155234 A1. Según este análisis, se puede usar la conversión de las cadenas γ y de fibrinógeno en dímeros γ - γ reticulados como señal de la activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno (estando la proporción de cadena γ que se convierte en dímero γ - γ relacionada con la cantidad de fibrinógeno activado).

Otros análisis bioquímicos podrían medir los cambios en otras cadenas componentes de fibrinógeno, tales como la conversión de la cadena A α en una cadena α libre y un fibrinopéptido A o la conversión de la cadena B β en cadena β libre y fibrinopéptido B. Estos cambios se pueden controlar mediante electroforesis en gel de una manera similar a la conversión de γ en γ - γ descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0155234 A1.

Las mezclas acuosas líquidas preferidas se preparan usando los procedimientos de la invención que, en general, no contienen dímero γ - γ detectable, aunque se pueden aceptar ciertas circunstancias para que el apósito contenga hasta el 9% de dímero γ - γ o incluso hasta el 38% de dímero γ - γ . De igual manera, las mezclas acuosas líquidas preferidas pueden contener hasta el 60% de cadena α libre y seguir funcionando aceptablemente. Las mezclas acuosas particularmente preferidas contendrán menos del 60% de cadena α libre, más preferiblemente, menos del 50%, e incluso más preferiblemente, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10% de cadena α libre. Según ciertas realizaciones preferidas, estos valores no cambian significativamente a lo largo del tiempo cuando la mezcla acuosa líquida se mantiene a una temperatura adecuada, preferiblemente, a o por debajo de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

La temperatura para preparar las mezclas acuosas líquidas es suficiente para inhibir la activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno. Preferiblemente, esta temperatura está a o por debajo de 2°C a 8°C , o más preferiblemente, $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para alcanzar la temperatura deseada para preparar la mezcla acuosa líquida.

Según ciertas realizaciones preferidas, se enfría el recipiente o el molde hasta una temperatura deseada colocándolo en un medio que tenga una temperatura a o por debajo de la temperatura deseada. Preferiblemente, el recipiente o molde se enfría hasta una temperatura sustancialmente inferior a la temperatura deseada para preparar la mezcla acuosa líquida. Según una realización particularmente preferida, el recipiente o el molde se enfría colocándolo en un medio que tenga una temperatura de aproximadamente -80°C durante un tiempo suficiente.

Según otras realizaciones, la solución acuosa del componente de fibrinógeno y la solución acuosa del activador de fibrinógeno se enfrían hasta una temperatura deseada antes de preparar la mezcla acuosa líquida. Tal enfriamiento se puede alcanzar mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como colocando los recipientes que contienen las soluciones acuosas sobre hielo.

- 5 Una vez preparada la mezcla acuosa líquida, se puede almacenar a una temperatura adecuada o se puede usar directamente para preparar la mezcla acuosa congelada de la presente invención. Preferiblemente, la mezcla acuosa líquida se usa directamente para preparar la mezcla acuosa congelada.

- 10 Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, posteriormente, se enfría la mezcla acuosa líquida hasta una temperatura en la que se convierte en una mezcla acuosa congelada del componente de fibrinógeno y el activador de fibrinógeno. Tal mezcla acuosa congelada se puede usar directamente o se puede almacenar a una temperatura adecuada.

- 15 La mezcla acuosa líquida se puede enfriar hasta la temperatura necesaria usando cualquiera de los procedimientos y de las técnicas conocidos y disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir la mezcla acuosa líquida en un segundo recipiente o molde que haya sido enfriado hasta una temperatura suficiente para hacer que la mezcla acuosa líquida se congele. Alternativamente, la mezcla acuosa líquida del recipiente o molde se puede colocar en un medio que tenga una temperatura suficiente para hacer que la mezcla acuosa líquida se congele. Tal medio podría incluir, por ejemplo, un congelador a una temperatura predeterminada, tal como a -5°C , -10°C , -15°C , -20°C , -25°C , -30°C , -40°C , -50°C o -80°C . El molde se puede colocar de modo que una o más de sus superficies estén en contacto directo con una superficie que haya estado y/o esté enfriada hasta una temperatura deseada.
- 20 Alternativamente, el molde o el recipiente que contiene la solución acuosa líquida se puede colocar directamente sobre hielo seco (-78°C) o en un baño de enfriamiento adecuado, tal como en hielo seco/acetona, hielo seco/nitrógeno líquido o solo nitrógeno líquido. El molde o recipiente también se puede colocar en una corriente de gas de nitrógeno producida por la evaporación de nitrógeno líquido u otro gas refrigerante criogénico adecuado. En este caso, puede ser deseable para la corriente gaseosa estar en contacto con un solo lado del molde que se vaya a enfriar. En una realización más preferida, tal corriente se podría dirigir hacia dos o más lados del objeto que se vaya a enfriar.
- 25

- Las mezclas acuosas congeladas preferidas se preparan con los procedimientos de la invención, en general, no contienen dímero γ - γ detectable, aunque se pueden aceptar ciertas circunstancias para que la mezcla contenga hasta el 9% de dímero γ - γ o incluso hasta el 38% de dímero γ - γ . De igual manera, las mezclas acuosas congeladas preferidas pueden contener hasta el 57% de cadena α libre y seguir funcionando aceptablemente. Las mezclas congeladas particularmente preferidas contendrán menos del 57% de cadena α libre, más preferiblemente, menos del 46%, e incluso más preferiblemente, menos del 46%, menos del 31%, menos del 20%, menos del 16% o menos del 10% de cadena α libre. Según ciertas realizaciones preferidas, estos valores no cambian significativamente a lo largo del tiempo.
- 30

- La mezcla acuosa congelada se puede almacenar o usar directamente bien para preparar los apósitos sólidos o para tratar el tejido lesionado. Ciertas realizaciones de la presente invención se dirigen a estas mezclas acuosas congeladas y a su uso bien para la preparación de los apósitos sólidos o para el tratamiento del tejido lesionado.
- 35

- Preferiblemente, cuando se usan para preparar un apósito sólido, la mezcla acuosa congelada se somete a un procedimiento, tal como una liofilización o criodesecación, que reducirá el contenido de humedad hasta el nivel deseado, i.e., hasta un nivel en el que el apósito sea sólido, pero no esté congelado, y por tanto no cambie sustancialmente de forma tras colocarlo, boca abajo enfrentado a la herida, a temperatura ambiente durante 24 horas. También se pueden emplear procedimientos similares que alcancen el mismo resultado, tales como secado, secado por pulverización, secado al vacío y vitrificación.
- 40

- Como se usa en la presente memoria, "contenido de humedad" se refiere a la cantidad de agua disponible libremente en el apósito. "Disponible libremente" significa que el agua no está unida a o que no forma un complejo con uno o más componentes no líquidos del apósito. El contenido de humedad al que se hace referencia en la presente memoria se refiere a niveles determinados por procedimientos sustancialmente similares al procedimiento de Karl Fischer modificado aprobado por la FDA (Meyer y Boyd, *Analytical Chem.*, 31:215-219, 1959; May et al., *J. Biol. Standardization*, 10:249-259, 1982; Centers for Biologics Evaluation and Research, FDA, n.º de caso 89D-0140, 83-93; 1990) o por espectroscopia cercana al infrarrojo.
- 45

- El experto en la técnica puede determinar empíricamente las condiciones apropiadas para la liofilización o criodesecación, incluyendo (pero sin limitación) la temperatura y la duración de las mismas, de la mezcla acuosa congelada para formar un apósito sólido. Tales condiciones dependerán, por ejemplo, del contenido de humedad de la mezcla acuosa congelada, del contenido de humedad deseado del apósito sólido, del medio en el que se realice el procedimiento y del equipo usado.
- 50

- Los apósitos sólidos producidos mediante los procedimientos de la invención también son realizaciones preferidas de la presente invención. Tales apósitos contienen suficiente componente de fibrinógeno y suficiente activador de fibrinógeno para formar un coágulo de fibrina cuando se aplica sobre un tejido lesionado, bien con o sin hidratación adicional. Tales apósitos no contienen una cantidad no deseable de fibrina, ya sea reticulada o no. Cualquier experto
- 55

en la técnica puede determinar empíricamente si una determinada cantidad de fibrina es indeseable en base a características predeterminadas del apósito sólido, tales como el aspecto visual, la flexibilidad, el tiempo de hidratación y similares, así como el uso pretendido del mismo (p. ej., un apósito destinado a usarse en una herida sangrante puede tolerar mayores cantidades de fibrina que un apósito destinado a usarse en una herida arterial).

- 5 La cantidad de fibrina presente en un apósito dado se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido y disponible para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de fibrina de un apósito en particular se puede detectar visualmente mediante la observación de las diferencias con respecto a un aspecto superficial homogéneo. Las "láminas" sólidas, suaves y brillantes sobre la superficie de los apósitos sólidos también indican fibrina, así como una ondulación excesiva de los bordes. Además, una vez hidratados, los apósitos con una cantidad relevante de
10 fibrina, habitualmente, tienen un aspecto moteado y distintamente heterogéneo.

Alternativamente, la cantidad de fibrina también se puede determinar mediante diversos análisis bioquímicos, tales como el procedimiento descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2006/0155234 A1. Según este análisis, se usa la conversión de las cadenas γ de fibrinógeno en dímeros γ - γ reticulados como señal de la presencia de fibrina (siendo la proporción de cadena γ que se convierte en dímero γ - γ una medida de la cantidad de
15 fibrina producida).

Otros análisis bioquímicos podrían medir los cambios en otras cadenas componentes de fibrinógeno, tales como la conversión de la cadena A α en una cadena α libre y un fibrinopéptido A o la conversión de la cadena B β en cadena β libre y fibrinopéptido B. Estos cambios se pueden monitorizar mediante electroforesis en gel de una manera similar a la conversión de γ en γ - γ descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0155234 A1.

- 20 Los apósitos sólidos preferidos preparados con los procedimientos de la invención, en general, no contienen dímero γ - γ detectable, aunque se pueden aceptar ciertas circunstancias para que el apósito contenga hasta el 9% de dímero γ - γ o incluso hasta el 38% de dímero γ - γ . De igual manera, las mezclas acuosas congeladas preferidas pueden contener hasta el 57% de cadena α libre y seguir funcionando aceptablemente. Las mezclas congeladas particularmente preferidas contendrán menos del 57% de cadena α libre, más preferiblemente, menos del 46%, e
25 incluso más preferiblemente, menos del 46%, menos del 31%, menos del 20%, menos del 16% o menos del 10% de cadena α libre.

Según ciertas realizaciones preferidas, la/s capa/s hemostática/s del apósito sólido también puede contener un agente aglutinante para facilitar o mejorar la adherencia de la/s capa/s entre sí y/o a cualquier capa o capas de soporte. Los ejemplos ilustrativos de los agentes aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitación, sacarosa, manitol, sorbitol, gelatina, hialurona y sus derivados, tales como ácido hialurónico, maltosa, povidona, almidón, chitosán y sus derivados, y derivados de celulosa, tales como carboximetilcelulosa, así como mezclas de dos o más de los mismos. Tal agente aglutinante se puede introducir en la mezcla acuosa de componente de fibrinógeno y activador de fibrinógeno, o se puede introducir en una solución acuosa del componente de fibrinógeno y/o una solución acuosa del activador de fibrinógeno antes de mezclar.

- 35 La/s capa/s hemostática/s del apósito sólido también pueden contener opcionalmente una o más cargas adecuadas, tales como sacarosa, lactosa, maltosa, seda, fibrina, colágeno albúmina, polisorbato (Tween™), quitrina, chitosán y sus derivados, tales como NOCC-chitosán, ácido algínico y sus sales, celulosa y sus derivados, proteoglicanos, hialurona y sus derivados, tales como ácido hialurónico, polímeros de ácido glicólico, polímeros de ácido láctico, copolímeros de ácido glicólico/ácido láctico, y mezclas de dos o más de los mismos. Tal carga se puede introducir en la
40 mezcla acuosa de componente de fibrinógeno y activador de fibrinógeno, o se puede introducir en una solución acuosa del componente de fibrinógeno y/o una solución acuosa del activador de fibrinógeno antes de mezclar.

La capa hemostática del apósito sólido también pueden contener opcionalmente uno o más agentes de solubilización adecuados, tales como sacarosa, dextrosa, manosa, trehalosa, manitol, sorbitol, albúmina, hialurona y sus derivados, tales como ácido hialurónico, sorbato, polisorbato (Tween™), sorbitán (SPAN™) y mezclas de dos o más de los
45 mismos. Tal agente de solubilización se puede introducir en la mezcla acuosa de componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno, o se puede introducir en una solución acuosa del componente de fibrinógeno y/o una solución acuosa del activador de fibrinógeno antes de mezclar.

La capa hemostática del apósito sólido también puede contener opcionalmente uno o más agentes espumantes adecuados, tales como una mezcla de un ácido fisiológicamente aceptable (p. ej., ácido cítrico o ácido acético) y una base fisiológicamente adecuada (p. ej., bicarbonato de sodio o carbonato de calcio). Otros agentes espumantes adecuados incluyen, pero sin limitación, partículas secas que contienen gas a presión, tales como partículas de azúcar que contienen dióxido de carbono (Véase, p.ej.: patente estadounidense n.º 3.012.893) u otros gases fisiológicamente aceptables (p. ej., nitrógeno o argón) y peróxidos farmacológicamente aceptables. Tal agente espumante se puede introducir en la mezcla acuosa del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno, o se puede introducir en una solución acuosa del componente de fibrinógeno y/o una solución acuosa del activador de fibrinógeno antes de
55 mezclar.

La/s capa/s hemostática/s del apósito sólido también puede contener opcionalmente una fuente adecuada de iones de calcio, tal como cloruro de calcio y/o un reticulador de fibrina, tal como transaminasa (p. ej. Factor XIII/XIIIa) o

glutaraldehído. Las fuentes de iones de calcio y/o reticuladores de fibrina se pueden introducir en la mezcla acuosa del componente de fibrinógeno y del activador de fibrinógeno, o se puede introducir en una solución acuosa del componente de fibrinógeno y/o una solución acuosa del activador de fibrinógeno antes de mezclar.

5 Cualquier experto en la técnica puede determinar empíricamente el contenido de humedad adecuado para un apósito sólido en particular en función de la/s aplicación/es deseada/s para el mismo.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente invención, los contenidos de humedad superiores se asocian con apósitos sólidos más flexibles. Así pues, en los apósitos sólidos destinados a heridas producidas en extremidades, se puede preferir que tengan un contenido de humedad del al menos 6% e, incluso más preferiblemente, en el intervalo del 6% al 44%.

10 De manera similar, en otras realizaciones de la presente invención, los contenidos de humedad inferiores se asocian con apósitos sólidos más rígidos. Así pues, en los apósitos sólidos destinados a heridas planas tales como heridas en el abdomen o el pecho, se puede preferir que tengan un contenido de humedad del al menos 6% e, incluso más preferiblemente, en el intervalo del 1% al 6%.

15 Por consiguiente, los ejemplos ilustrativos de contenido de humedad adecuado para los apósitos sólidos incluyen, pero sin limitación los siguientes (siendo cada valor del $\pm 0,9\%$): menos del 53%; menos del 44%; menos del 28%; menos del 24%; menos del 16%; menos del 12%; menos del 6%; menos del 5%; menos del 4%; menos del 3%; menos del 2,5%; menos del 2%; menos del 1,4%; entre el 0 y el 12%, no incluidos; entre el 0 y el 6%; entre el 0 y el 4%; entre el 0 y el 3%; entre el 0 y el 2%; entre el 0 y el 1%; entre el 1 y el 16%; entre el 1 y el 11%; entre el 1 y el 8%; entre el 1 y el 6%; entre el 1 y el 4%; entre el 1 y el 3%; entre el 1 y el 2%; y el entre el 2 y el 4%.

20 El componente de fibrinógeno de la/s capa/s hemostática/s de los apósitos sólidos puede ser cualquier fibrinógeno adecuado conocido y disponible para los expertos en la técnica. El componente de fibrinógeno también puede ser un derivado o metabolito funcional de un fibrinógeno, tal como las cadenas α , β y/o γ del fibrinógeno, fibrina I o fibrina II soluble, o una mezcla de dos o más de las mismas. El experto en la técnica puede seleccionar empíricamente un fibrinógeno específico (o derivado o metabolito funcional) para una determinada aplicación. Como se usa en la presente memoria, el término "fibrinógeno" pretende incluir mezclas de fibrinógeno y pequeñas cantidades de Factor XIII/Factor XIIIa, o alguna otra de tales transaminasas. En general, los expertos en la técnica reconocen tales cantidades pequeñas como las que se encuentran habitualmente en el fibrinógeno de mamífero tras ser purificado según los procedimientos y las técnicas conocidos en la actualidad y disponibles en la técnica, pudiendo ser cualquier cantidad y variando, comúnmente, de 0,1 a 20 unidades/ml.

30 Preferiblemente, el fibrinógeno empleado como el componente de fibrinógeno del apósito sólido es un fibrinógeno purificado adecuado para su introducción en un mamífero. Comúnmente, dicho fibrinógeno forma parte de una mezcla de proteínas plasmáticas humanas que incluyen el Factor XIII/XIIIa, y se han purificado hasta un nivel apropiado y desactivado viralmente. Una solución acuosa preferida de fibrinógeno para la preparación de un apósito sólido contiene aproximadamente 37,5 mg/ml de fibrinógeno a un pH de aprox. $7,4 \pm 0,1$, aunque puede ser aceptable un pH en el intervalo de 5,5–8,5. El fibrinógeno adecuado para su uso como componente de fibrinógeno se ha descrito en la técnica, p. ej. en la patente estadounidense n.º 5.716.645, encontrándose disponibles comercialmente materiales similares, p. ej., proveedores tales como Sigma–Aldrich, Enzyme Research Laboratories, Haematologic Technologies y Anlara.

40 Preferiblemente, el componente de fibrinógeno está presente en una cantidad de del aproximadamente 1,5 a aproximadamente 13,0 mg ($\pm 0,9$ mg) de fibrinógeno por centímetro cuadrado de apósito sólido, y más preferiblemente, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 13,0 mg/cm². Sin embargo, se pueden emplear cantidades superiores o inferiores en función de la aplicación concreta deseada para el apósito sólido. Por ejemplo, según ciertas realizaciones en las que se desea aumentar la adherencia, el componente de fibrinógeno está presente en una cantidad de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 13,0 mg ($\pm 0,9$ mg) de fibrinógeno por centímetro cuadrado de apósito sólido. Asimismo, según ciertas realizaciones destinadas a tratar vasos que contienen baja presión, se pueden emplear niveles inferiores de componente de fibrinógeno.

50 El activador de fibrinógeno empleado en la/s capa/s hemostática/s del apósito sólido puede ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias conocida por los expertos en la técnica para convertir el fibrinógeno en fibrina. Los ejemplos ilustrativos de activadores de fibrinógeno adecuados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: trombinas, tales como trombina humana o trombina bovina, y protrombinas, tales como protrombina humana o concentrado de complejo de protrombina (una mezcla de Factores II, VII, IX y X); venenos de serpientes, tales como batroxobina, reptilasa (una mezcla de batroxobina y Factor XIIIa), botrombina, calobina, fibrozima y enzimas aisladas del veneno de *Bothrops jararacussu*; y mezclas de dos o más cualquiera de éstas. Véase, p.ej., Dascombe *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78:947–51 (1997); Hahn *et al.*, *J. Biochem.* (Tokio) 119:835–43 (1996); Fortova *et al.*, *J. Chromatogr. S. Biomed. Appl.* 694:49–53 (1997); y Andriao–Escarso *et al.*, *Toxicol.* 35: 40 1 043–52 (1997).

Preferiblemente, el activador de fibrinógeno es una trombina. Más preferiblemente, el activador de fibrinógeno es una trombina de mamífero, aunque también se pueden emplear trombina de ave y/o trombina de pez en las circunstancias apropiadas. Aunque se puede usar cualquier trombina de mamífero adecuada en el apósito sólido, la trombina

empleada en la capa hemostática es preferiblemente una mezcla liofilizada de proteínas plasmáticas humanas que han sido suficientemente purificadas y desactivadas viralmente para el uso pretendido del apósito sólido. La trombina adecuada se puede adquirir comercialmente en proveedores tales como Sigma–Aldrich, Enzyme Research Laboratories, Haematologic Technologies y Biomol International. Una solución acuosa particularmente preferida de trombina para preparar un apósito sólido contiene trombina a una potencia de entre 10 y 2000 ± 50 unidades internacionales/ml, y más preferiblemente, a una potencia de 25 ± 2,5 unidades internacionales/ml. Otros constituyentes puede incluir albúmina (generalmente, aproximadamente 0,1 mg/ml) y glicina (generalmente aproximadamente 100mM ± 0,1mM). El pH de esta solución acuosa particularmente preferida de trombina está generalmente en el intervalo de 6,5–7,8, y preferiblemente a 7,4± 0,1, aunque puede ser aceptable un pH en el intervalo de 5,5–8,5.

Además de la/s capa/s hemostática/s, el apósito sólido puede comprender además, opcionalmente, una o más capas de soporte. Como se usa en la presente memoria, una “capa de soporte” se refiere a un material que sostiene o mejora la integridad estructural del apósito sólido y/o el coágulo de fibrina formado cuando se aplica dicho apósito en el tejido lesionado.

Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, la capa de soporte comprende un material de refuerzo en el lado del apósito opuesto al lado que se aplica en el tejido lesionado. Tal material de refuerzo se puede fijar con un adhesivo fisiológicamente aceptable o puede ser autoadherente (p. ej., que tiene una carga estática superficial suficiente). Preferiblemente, el material de refuerzo se coloca en el molde o en el recipiente antes de introducir la mezcla acuosa líquida o las soluciones de componente de fibrinógeno y de activador de fibrinógeno. Se puede colocar un adhesivo fisiológicamente aceptable sobre el material de refuerzo antes de introducir la mezcla acuosa líquida o las soluciones de componente de fibrinógeno y de activador de fibrinógeno.

El material de refuerzo puede comprender uno o más materiales reabsorbibles o uno o más materiales no reabsorbibles, o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el material de refuerzo es un solo material reabsorbible.

En la presente invención, se puede emplear cualquier material reabsorbible adecuado conocido y disponible para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el material reabsorbible puede ser una sustancia proteica, tal como seda, fibrina, queratina, colágeno y/o gelatina. Alternativamente, el material reabsorbible puede ser una sustancia de hidrato de carbono, tal como alginatos, quitrina, celulosa, proteoglicanos (p. ej., poli-*N*-acetil-glucosamina), hialurona y sus derivados (p. ej., ácido hialurónico), polímeros de ácido glicólico, polímeros de ácido láctico o copolímeros de ácido glicólico/ácido láctico. El material reabsorbible también puede comprender una mezcla de sustancias proteicas o una mezcla de sustancias de hidratos de carbono, o una mezcla tanto de sustancias proteicas como de sustancias de hidratos de carbono. Cualquier experto en la técnica puede seleccionar empíricamente el/los material/es reabsorbible/s específico/s en función del uso pretendido del apósito sólido.

Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el material reabsorbible es una sustancia de hidrato de carbono. Los ejemplos ilustrativos de los materiales reabsorbibles particularmente preferidos incluyen, pero sin limitación, los materiales comercializados con los nombres comerciales VICRYL™ (un copolímero de ácido glicólico/ácido láctico) y DEXON™ (un polímero de ácido glicólico).

Se puede emplear cualquier material no reabsorbible adecuado conocido y disponible para los expertos en la técnica como material de refuerzo. Los ejemplos ilustrativos de materiales no reabsorbibles adecuados incluyen, pero sin limitación, plásticos, polímeros de silicona, papel y productos de papel, látex, gasa y similares.

Según otras realizaciones preferidas, la capa de soporte comprende un material de soporte interno. Tal material de soporte interno se encuentra, preferiblemente, completamente contenido en la capa hemostática del apósito sólido, aunque puede estar colocado entre dos capas hemostáticas adyacentes en ciertas realizaciones. Preferiblemente, el material de soporte interno se coloca en el molde o recipiente durante la introducción de la mezcla acuosa líquida o las soluciones de componente de fibrinógeno y de activador de fibrinógeno.

Al igual que con el material de refuerzo, el material de soporte interno puede ser un material reabsorbible o un material no reabsorbible, o una mezcla de los mismos, tal como una mezcla de dos o más materiales reabsorbibles, o una mezcla de dos o más materiales no reabsorbibles, o una mezcla de uno o varios materiales reabsorbibles y uno o varios materiales no reabsorbibles.

Según otras realizaciones preferidas más, la capa de soporte puede comprender un material de soporte frontal en el lado del apósito enfrentado a la herida, i.e., el lado que se aplica en el tejido lesionado. Al igual que con el material de refuerzo y el material de soporte interno, el material de soporte frontal puede ser un material reabsorbible o un material no reabsorbible, o una mezcla de los mismos, tal como una mezcla de dos o más materiales reabsorbibles, o una mezcla de dos o más materiales no reabsorbibles, o una mezcla de uno o varios materiales reabsorbibles y uno o varios materiales no reabsorbibles.

Según otras realizaciones preferidas más, el apósito sólido comprende tanto un material de refuerzo como un material de soporte interno además de la/s capa/s hemostática/s, i.e., el apósito sólido comprende dos capas de soporte además de la/s capa/s hemostática/s. Según otras realizaciones preferidas más, el apósito sólido comprende tanto un material de soporte frontal como un material de soporte interno además de la/s capa/s hemostática/s. Según otras

realizaciones preferidas más, el apósito sólido comprende tanto un material de refuerzo, un material de soporte frontal y un material de soporte interno además de la/s capa/s hemostática/s.

5 Las diversas capas de los apósitos de la invención se pueden fijar entre sí mediante cualquier procedimiento conocido y disponible para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede aplicar un adhesivo fisiológicamente aceptable a un material de refuerzo (cuando está presente) y fijar después sobre el mismo la/s capa/s hemostática/s.

10 En ciertas realizaciones de la presente invención, el adhesivo fisiológicamente aceptable tiene una resistencia a la rotura y/o una estructura de modo que el material de refuerzo se puede separar del coágulo de fibrina formado por la capa hemostática tras la aplicación del apósito sobre el tejido lesionado. En otras realizaciones, el adhesivo fisiológicamente aceptable tiene una resistencia a la rotura y/o una estructura de modo que el material de refuerzo no se puede separar del coágulo de fibrina tras la aplicación del vendaje sobre el tejido lesionado.

15 Los fibrinógenos adecuados y los activadores de fibrinógeno adecuados para la/s capa/s hemostática/s del apósito sólido pueden tener cualquier origen apropiado conocido y disponible para los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, los siguientes: de proveedores comerciales, tales como Sigma–Aldrich y Enzyme Research Laboratories; de la extracción y la purificación de plasma humano o de mamífero mediante cualquier procedimiento conocido y disponible para los expertos en la técnica; de sobrenadantes o pastas derivados de plasma o de cultivo tisular recombinante, virus, levadura, bacterias o similares que contienen un gen que expresa una proteína plasmática humana o de mamífero que se haya introducido según técnicas de ADN recombinante estándar; y/o de los fluidos (p. ej., sangre, leche, linfa, orina y similares) de mamíferos transgénicos (p. ej., cabras, ovejas, vacas) que contienen un gen que se haya introducido según técnicas transgénicas estándar y que exprese el fibrinógeno deseado y/o el activador de fibrinógeno deseado.

20 Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el fibrinógeno es un fibrinógeno de mamífero, tal como fibrinógeno bovino, fibrinógeno porcino, fibrinógeno ovino, fibrinógeno equino, fibrinógeno caprino, fibrinógeno felino, fibrinógeno canino, fibrinógeno murino o fibrinógeno humano. Según otras realizaciones, el fibrinógeno es fibrinógeno de ave o fibrinógeno de pez. Según cualquiera de estas realizaciones, el fibrinógeno puede ser fibrinógeno producido recombinantemente o fibrinógeno transgénico.

25 Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el activador de fibrinógeno es una trombina de mamífero, tal como trombina bovina, trombina porcina, trombina ovina, trombina equina, trombina caprina, trombina felina, trombina canina, trombina murina y trombina humana. Según otras realizaciones, la trombina es trombina de ave o trombina de pez. Según cualquiera de estas realizaciones, la trombina puede ser trombina producida recombinantemente o trombina transgénica.

30 Como proposición general, la pureza del fibrinógeno y/o del activador de fibrinógeno para su uso en el apósito sólido será una pureza conocida por el experto en la técnica relevante para obtener la eficacia y estabilidad óptimas de la/s proteína/s. Preferiblemente, el fibrinógeno y/o el activador de fibrinógeno se ha/n sometido a múltiples etapas de purificación, tales como precipitación, concentración, diafiltración y cromatografía de afinidad (preferiblemente, cromatografía de inmunoafinidad), para eliminar las sustancias que provoquen la fragmentación, la activación y/o la degradación del fibrinógeno y/o del activador de fibrinógeno durante la fabricación, el almacenamiento y/o el uso del apósito sólido. Los ejemplos ilustrativos de dichas sustancias que se eliminan preferiblemente mediante purificación incluyen: contaminantes proteicos, tales como inhibidor de inter–alfa tripsina e inhibidor de pre–alfa tripsina, contaminantes no proteicos, tales como lípidos; y mezclas de contaminantes proteicos y no proteicos, tales como lipoproteínas.

35 La cantidad de activador de fibrinógeno empleada en el apósito sólido se selecciona, preferiblemente, para optimizar tanto la eficacia como la estabilidad del mismo. Como tal, cualquier experto en la técnica puede determinar empíricamente la concentración adecuada para la aplicación en particular del apósito sólido. Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, cuando el activador de fibrinógeno es trombina humana, la cantidad de trombina humana empleada está entre 2,50 unidades/mg de componente de fibrinógeno y 0,025 unidades/mg del fibrinógeno (siendo todos los valores de $\pm 0,001$). Otras realizaciones preferidas se dirigen a apósitos sólidos similares en los que la cantidad de trombina es de entre 0,250 unidades/mg de fibrinógeno y 0,062 unidades/mg de fibrinógeno y a apósitos sólidos en los que la cantidad de trombina es de entre 0,125 unidades/mg de fibrinógeno y 0,080 unidades/mg de fibrinógeno.

40 Durante el uso del apósito sólido, el fibrinógeno y el activador de fibrinógeno se activan preferiblemente en el momento en el que el apósito se aplica sobre el tejido lesionado mediante los fluidos endógenos del paciente que escapan de la herida hemorrágica. Alternativamente, en aquellos casos en los que la pérdida de fluido del tejido lesionado sea insuficiente para proporcionar una hidratación adecuada de las capas proteicas, el componente de fibrinógeno y/o la trombina se pueden activar mediante un líquido fisiológicamente aceptable adecuado que contenga, opcionalmente, cualquier cofactor y/o enzima necesarios, antes o durante la aplicación del apósito sobre el tejido lesionado.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, la/s capa/s hemostática/s también pueden contener uno o más complementos, tales como factores de crecimiento, fármacos, anticuerpos policlonales y monoclonales y otros compuestos. Los ejemplos ilustrativos de tales complementos incluyen, pero sin limitación: inhibidores de la fibrinolisis,

tales como aprotonina, ácido tranexámico y ácido épsilon aminocaproico; antibióticos, tales como tetraciclina y ciprofloxacina, amoxicilina y metronidazol; anticoagulantes, tales como proteína C activada, heparina, prostaciclina, prostaglandinas (particularmente, (PGI₂), leucotrienos, antitrombina III, ADPasa y activador del plasminógeno; esteroides, tales como dexametasona, inhibidores de prostaciclina, prostaglandinas, leucotrienos y/o quininas para inhibir la inflamación; fármacos cardiovasculares, tales como bloqueadores del canal del calcio, vasodilatadores y vasoconstrictores; quimioatrayentes; anestésicos locales tales como bupivacaína; y fármacos antiproliferativos/antitumorales tales como 5-fluorouracil (5-FU), taxol y/o taxotere; antivirales, tales como gangciclovir, zidovudina, amantidina, vidarabina, ribaravina, trifluridina, aciclovir, didesoxiuridina y anticuerpos contra componentes virales o productos génicos; citocinas, tales como alfa- o beta- o gamma-Interferón, factor de necrosis tumoral alfa o beta e interleucinas; factores estimulantes de colonias; eritropoyetina; antifúngicos, tales como diflucán, quetaconizol y nistatina; agentes antiparasitarios, tales como pentamidina; agentes antiinflamatorios, tales como alfa-1-anti-tripsina y alfa-1-antiquimiotripsina; anestésicos, tales como bupivacaína; analgésicos; antisépticos; hormonas; vitaminas y otros complementos nutricionales; glucoproteínas; fibronectina; péptidos y proteínas; hidratos de carbono (tanto simples como complejos); proteoglicanos; antiangiogeninas; antígenos; lípidos o liposomas; oligonucleótidos (ADN y/o ARN sentido y/o antisentido); y reactivos de terapias génicas. En otras realizaciones de la presente invención, la capa de refuerzo y/o la capa de soporte interno, si está/n presente/s, puede/n contener uno o más complementos. Según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el apósito terapéutico está presente en una cantidad mayor que su límite de solubilidad en la fibrina.

Ejemplos

Se determinó la capacidad de los apósitos para sellar un vaso sanguíneo lesionado mediante una prueba de rendimiento mediante una arteriotomía porcina *ex vivo* (EVPA), descrita por primera vez en la patente estadounidense n.º 6.762.336. La prueba de rendimiento mediante EVPA evalúa la capacidad de un apósito para detener el flujo de fluido a través de un orificio de una arteria porcina. Aunque el procedimiento descrito en la patente estadounidense n.º 6.762.336 ha demostrado ser útil para evaluar los apósitos hemostáticos, no repitió fiablemente los requisitos para funcionar satisfactoriamente *in vivo*. Más específicamente, el procedimiento revelado en la patente estadounidense n.º 6.762.336 requirió hacer la prueba a 37°C, mientras que, en el mundo real, las heridas están, por lo común, a una temperatura menor. Esta disminución de la temperatura puede reducir significativamente la tasa de formación de fibrina y su eficacia hemostática en víctimas de traumatismos. Véase, p.ej., Acheson *et al.*, *J. "Trauma"* 59:865–874 (2005). La prueba de la patente estadounidense n.º 6.762.336 tampoco cumplió el requisito de un grado elevado de adherencia del apósito al tejido lesionado. Por lo tanto, mediante esta prueba, no se detectó un modo de fallos en el que la fibrina se forma, pero el apósito no se une en contacto directo con la herida. Además, la presión utilizada en el procedimiento (26,66 kPa) se puede superar durante la terapia para algunos pacientes que sufren traumatismo. El resultado general de esto es que se deben realizar numerosas pruebas en animales utilizando, por lo común, pequeños animales (tales como ratas y conejos) para predecir con exactitud el rendimiento de los apósitos en animales de mayor tamaño, estudios de traumatismos reales y en el entorno clínico.

Para minimizar la cantidad de tiempo y el número estudios en animales necesarios para desarrollar la presente invención, se desarrolló un procedimiento de prueba *ex vivo* mejorado. Para hacerlo, se cambiaron las condiciones básicas en las que se realizó la prueba del apósito, y se aumentó la gravedad de los parámetros de prueba para incluir la prueba a temperaturas inferiores (i.e. 29–33°C frente a 37°C, representando el desafío fisiológico real de las temperaturas de las heridas reales (Acheson *et al.*, *J. "Trauma"* 59:865–874 (2005)), presiones más altas (i.e. 33,33 kPa frente a 26,66 kPa), un periodo de prueba más largo (3 minutos frente a 2 minutos) y lesiones arteriales de mayor tamaño (la patente estadounidense n.º 6.762.336 usó una punción de aguja de calibre 18, mientras que el procedimiento revisado usó orificios de punción que variaban de 2,8 mm a 4 mm x 6 mm).

Además, se obtuvo una nueva prueba para medir directamente la adherencia del apósito al tejido lesionado. Ambas pruebas mostraron un carácter restrictivo enormemente mejorado, siendo por tanto capaces de superar la prueba *ex vivo* previa y reemplazar muchas pruebas *in vivo* de eficacia.

A continuación, se presenta una lista de los acrónimos usados en los ejemplos que figuran más adelante:

- TCF: Tampón Completo de Fibrinógeno (cloruro de sodio 100mM, cloruro de calcio 1,1mM, Tris 10mM, citrato de sodio 10mM, sacarosa al 1,5%, albúmina de suero humano (80mg/g de proteína total) y Tween™ 80 (de origen animal) 15 mg/g de proteína total).
- TCT: Tampón Completo de Trombina (cloruro de sodio 150mM, cloruro de calcio 40mM, Tris 10mM y L-lisina 100mM con la adición de ASH a 100 ug/ml).
- ERL: Enzyme Research Laboratories
- EVPA: Arteriotomía Porcina *Ex Vivo*
- AF: Apósito hemostático de la invención
- ASH Albúmina de Suero Bovino;

AH: Un apósito hemostático sellante de fibrina “de sándwich” como el revelado en la patente estadounidense n.º 6.762.336;

TFI: Tampón de Fibrinógeno Incompleto; TCF sin ASH ni Tween;

PETG: Polietilentetraftalato modificado con glicol;

5 PPG: Polipropileno;

PVC: Cloruro polivinílico;

TRIS: Trishidroximetilaminometano-(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol).

Ejemplo 1

10 Se cortó material de refuerzo (DEXON™) y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se introdujeron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló fibrinógeno (Enzyme Research Laboratories™) en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Las concentraciones de fibrinógeno se ajustaron hasta 37,5; 31,7; 25,9; 20,16; 14,4; 8,64 y 4,3 mg/ml. Cuando se administraron 2 ml de fibrinógeno en los moldes, se produjeron dosis de fibrinógeno de 13, 11, 9, 7, 5, 3 ó 1,5 mg/cm².
 15 Una vez preparado, se colocó el fibrinógeno sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Las concentraciones de trombina se ajustaron de manera que cuando se mezclaron con las soluciones de fibrinógeno según lo descrito a continuación, la combinación produjo una solución que contenía 0,1 unidades/mg de fibrinógeno. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C
 20 y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron dos ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se dejaron congelar y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas. Entonces se colocaron los apósitos congelados en un liofilizador Genesis™ preenfriado (Virtis, Gardiner, NY). Se cerró herméticamente la cámara y se equilibró la temperatura. Luego se evacuó la cámara y se liofilizaron los apósitos mediante un ciclo de secado primario y
 25 secundario.

Se retiraron los apósitos del liofilizador, se sellaron en bolsas de papel de aluminio y se almacenaron a temperatura ambiente hasta la prueba. Posteriormente, los apósitos se evaluaron en los ensayos de EVPA, adherencia y peso.

Los resultados se ofrecen en la siguiente tabla y se representan gráficamente en las Figuras 3A-3C.

Grupo	aptos/total de EVPA	Adherencia de la prueba de despegue	Desviación estándar de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	Desviación estándar del peso soportado
13 mg/cm ²	6/6	4,0	0,0	198,0	12,6
11 mg/cm ²	6/6	3,8	0,4	163	48,5
9 mg/cm ²	5/6	3,0	0,0	88	20,0
7 mg/cm ²	6/6	3,2	0,4	93	17,6
7 mg/cm ²	5/6	3,0	0,0	94,7	8,2
5 mg/cm ²	5/5	2,8	0,4	76	34,2
3 mg/cm ²	5/5	2,4	0,5	48	27,4
1,5 mg/cm ²	0/6	0,1	0,2	4,7	11,4

30

Ejemplo 2

Los apósitos monolíticos se fabricaron de la siguiente manera: se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante
 35 al menos 60 minutos.

5 Para todos los apósitos, se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado, se colocó el fibrinógeno sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito anteriormente. Una vez completados los apósitos, se almacenaron en bolsas de papel de aluminio de baja transmisión de la humedad que contenían 5 gramos de desecante.

10 Los apósitos de tres capas se fabricaron como se describe previamente¹, usando los mismos materiales descritos anteriormente. Posteriormente, se colocaron los apósitos en condiciones de humedad relativa al 100% a 37°C durante varios tiempos para aumentar su contenido de humedad relativa hasta niveles deseados. Se evaluaron los apósitos visualmente y en cuanto a sus características de manejo u otras características físicas. Tras esta evaluación, se analizó una muestra de cada apósito para determinar su contenido de humedad. El rendimiento del resto de los apósitos se probó en los ensayos de EVPA, adherencia y peso.

Resultados

Los resultados de los ensayos se ofrecen en las siguientes tablas:

20 **Tabla 1: Datos de rendimiento de los apósitos sólidos de la invención**

Tiempo de exposición a una humedad del 100% a 37°C (minutos)	% de humedad	N.º de aptos/total en EVPA	Adherencia superficial (\pm DE)	Peso soportado (g) (media \pm DE)
0	2,5	2/2	$4,0 \pm 0$	$148 \pm 28,3$
1	5,8	2/2	$3,5 \pm 0,71$	$123 \pm 7,1$
15	16	2/2	$2,5 \pm .71$	$108 \pm 14,1$
45	24	2/2	$4,0 \pm 0$	168 ± 0
60	28	2/2	$4,0 \pm 0$	$273 \pm 7,1$
225	44	2/2	2 ± 0	$58 \pm 14,1$
1200	52	ND	ND	ND

Tabla 2: Datos de rendimiento de los apósitos de tres capas

Tiempo de exposición a una humedad del 100% a 37°C (minutos)	% de humedad	N.º de aptos/total en EVPA	Adherencia superficial	Peso soportado (g) (media)
0	3	1/1	2,0	78
15	22	1/1	2,0	78
60	33,7	0/1	0,5	28

Tabla 3: Integridad y características de manejo de los apósitos sólidos de la invención

Tiempo de exposición a una humedad del 100% a 37°C (minutos)	Antes de la hidratación				Durante la hidratación		Tras la hidratación
	Aspecto superficial	Ondulamiento	Integridad	Flexibilidad	Velocidad de hidratación	Fuerza necesaria para la hidratación	Aspecto
0	Normal (suave, sin "piel")	No	Excelente (sin grietas ni descamación)	No	Normal	No	Normal
1	"	"	"	Sí	"	"	"
15	"	"	"	"	"	"	"
45	"	"	"	"	"	"	"
60	"	ligero	"	"	"	"	"
225	"	Sí	"	"	"	"	"
1200	"	Ondulado sobre sí mismo	"	"	n/d	n/d	Moteado y desigual

Tabla 4: Integridad y características de manejo de los apósitos de tres capas

Tiempo de exposición a una humedad del 100% a 37°C (minutos)	Antes de la hidratación				Durante la hidratación		Tras la hidratación
	Aspecto superficial	Ondulamiento	Integridad	Flexibilidad	Velocidad de hidratación	Fuerza necesaria para la hidratación	Aspecto
0	Normal	No	Buena; algo de deslaminación	No	Normal	No	Normal
15	Irregular	No	"	Sí	Lenta	No	Moteado
60	Con piel	Sí	"	Sí	Muy lenta	Sí	Muy moldeado y desigual

5 Conclusiones:

Los apósitos monolíticos fueron completamente funcionales a niveles muy altos de humedad. Se descubrió que, a una humedad tan elevada como del 28%, seguían siendo completamente funcionales. Al elevar los niveles de humedad hasta el 44%, los apósitos seguían siendo funcionales, sin embargo, se redujo parte de su actividad. Niveles más altos de humedad también pueden conservar cierta función. Los apósitos originales, a un contenido de humedad del 2,5%, no resultaron ser flexibles, pero tenían el resto de propiedades deseadas, incluyendo aspecto, superficie plana, integridad, hidratación rápida y sin complicaciones, y aspecto suave tras su hidratación. Una vez aumentado el contenido de humedad hasta el 5,8%, los apósitos monolíticos se volvieron flexibles, conservando a la vez su funcionalidad y características deseables. Conservaron su flexibilidad son ondularse ni perder su integridad, o parecieron formar cantidades excesivas de fibrina antes de la hidratación.

Esto contrastó con los apósitos de tres capas, que comenzaron a perder sus características deseables tras la adición de humedad y las perdieron por completo cuando se alcanzó una humedad del 33%.

Ejemplo 3

5 Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Para los apósitos sin material de refuerzo, los moldes de PETG de 2,4 x 2,4 cm se introdujeron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

10 Para todos los apósitos, se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado, se colocó el fibrinógeno sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito más adelante.

20 El rendimiento de ambos grupos se analizó en el ensayo de EVPA. Además, el grupo que tenía refuerzo se analizó en los ensayos de adherencia y peso soportado.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total en EVPA	Adherencia a la piel analizada	DE de la adherencia	Peso mantenido (medio) (g)	Peso mantenido (DE)
Refuerzo	6/6	3,7	0,5	153	37,3
Sin refuerzo	9/12				

Conclusiones:

25 Los apósitos formulados con material de refuerzo funcionaron bien, pasando todos los apósitos la prueba de EVPA y obteniéndose valores altos de adherencia y de peso soportado. Los apósitos sin material de refuerzo no fueron tan eficaces en el ensayo de EVPA. Sin embargo, sorprendentemente, el 75% de ellos pasó la prueba de EVPA. Sin refuerzo, no se pudo realizar el resto de pruebas. La capacidad de los apósitos fabricados sin refuerzo para superar satisfactoriamente el ensayo de EVPA indica que estos apósitos serían eficaces en el tratamiento de lesiones arteriales e incluso más eficaces en el tratamiento de lesiones venosas y de vasos pequeños.

Ejemplo 4

30 Para todos los apósitos, el fibrinógeno de ERL, lote 3130, se formuló en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado, se colocó el fibrinógeno sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Para el grupo con malla VICRYL™ cortada en tiras dispersada, se cortó este material de refuerzo en trozos de aproximadamente 1 mm x 1 mm y se dispersó en la solución de trombina antes de llenar los moldes. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se usaron moldes cilíndricos de jeringas de polipropileno (Becton Dickinson) de 10 ó 3 ml retirando el extremo de tipo Luer-Lock. Se retiraron los émbolos hasta la marca de 6 ml y de 2 ml respectivamente. Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de soporte y se colocó en cada molde, empujando hasta que quedó adyacente al émbolo. Una vez preparados, se colocaron los moldes verticalmente y se rodearon de hielo seco, dejando la abertura expuesta en la parte superior. Se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en ellos) en moldes de 10 ml, y se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en ellos) en moldes de 3 ml, que se dejaron congelar durante 5 minutos. Entonces se colocaron los moldes en el congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador y se liofilizaron según lo descrito anteriormente.

50 Tras retirarlos del liofilizador, se analizó su rendimiento de ambos grupos en un ensayo de EVPA modificado. En síntesis, se puso una forma de espuma de plástico sobre la arteria. Esta cubierta tenía un orificio que correspondía al orificio de la arteria y al tejido circundante. Se añadió solución salina caliente a la superficie del apósito e, inmediatamente, se pasó el molde por el orificio en la espuma hasta la superficie de la arteria. Entonces se presionó el

émbolo y se mantuvo presionado durante 3 minutos, tras lo que se retiró el molde a medida que se presionaba más el émbolo. En este momento, se presurizó la arteria y se continuó el ensayo como se ha explicado anteriormente.

Resultados

Material de soporte	Tamaño del molde	Resultado de la EVPA a 33,33 kPa)	Presión máxima
Ninguno	10 ml	Apto	> 33,33 kPa
Malla de refuerzo Dexon	10 ml	Apto	"
"	3 ml	Apto	"
Malla Dexon cortada en tiras (dispersada)	10 ml	Apto	"
"	3 ml	No apto	20 kPa

5 Conclusiones:

Los apósitos sin refuerzo o con refuerzo de malla DEXON™ tuvieron buenos resultados, pasando todos ellos la prueba de EVPA a 33,33 kPa. Cuando se dispersó el material de soporte por la composición, los apósitos también obtuvieron buenos resultados, soportando los apósitos de mayor tamaño (molde de 10 ml) toda la presión de 33,33 kPa, mientras que el pequeño mantuvo una presión hasta 20 kPa. Esto indica que el uso de un material de soporte puede ser opcional, y su ubicación puede estar en la parte trasera del apósito o dispersado por la composición, según se desee.

Ejemplo 5

Se fabricaron apósitos con un material de soporte en la parte "trasera" (i.e., el lado no enfrentado a la herida) del apósito cortando primero el material de soporte de malla y colocándolo en cada molde de PETG de 10 x 10 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

En el caso de los apósitos con material de refuerzo en la parte "delantera" (i.e., el lado enfrentado a la herida) del apósito, éstos se fabricaron sin material de soporte en el molde. La malla de soporte se colocó sobre el apósito inmediatamente después de dispensar el fibrinógeno y la trombina en el molde (véase más adelante) y presionando ligeramente en la superficie antes de su congelación. El resto de modos de fabricación de los apósitos fue similar a los descritos más adelante.

Para todos los apósitos, se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. La placa de aluminio tenía un orificio de 0,635 cm perforado en el centro y un conector para poder unir un trozo de tubo a una fuente de vacío. Se centró el molde sobre el orificio de la placa de aluminio y se inició el vacío. El vacío tenía dos objetivos, evitar que el molde se moviera y mantenerlo plano contra la placa de aluminio. Se introdujeron treinta y cinco mililitros de fibrinógeno y 5,25 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde. Una vez llenos los moldes y aplicado el material de soporte como se describe anteriormente, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito anteriormente.

Se analizó su rendimiento de ambos grupos en el ensayo de EVPA. Además, el grupo que tenía refuerzo, también se analizó en los ensayos de adherencia y peso soportado.

Resultados:

Orientación del material de soporte (malla)	N.º de aptos/total en EVPA	Puntuación de la prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Parte trasera (apartado de la zona lesionada)	6/6	3,5	0,5	136	49
Parte delantera (inmediatamente adyacente a la zona lesionada)	6/6	3,8	0,4	163	32

Conclusiones:

- 5 Los apósitos formulados con material de refuerzo en cualquier orientación funcionaron bien, pasando todos los apósitos la prueba de EVPA y obteniéndose valores altos de adherencia y de peso soportado. Esto indica que la ubicación de un material de soporte puede estar en la parte "trasera" del apósito o en la parte "delantera" de la composición según se desee.

Ejemplo 6

- 10 Se colocó un material de refuerzo (DEXON™) en moldes de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló fibrinógeno (Enzyme Research Laboratories™ (ERL), lote 3114) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 15 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 12,5 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) que correspondían a 3.120 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 20 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se preenfrió sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron dos ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante. Estos resultados se muestran en la Figura 4A y Figura 4B.

25 **Ejemplo 7**

- 30 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Las concentraciones de trombina se ajustaron usando TCT para administrar las siguientes cantidades 2,5, 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,016; 0,0125 y 0,01 unidades/mg de fibrinógeno (tras mezclar), correspondientes a 624; 62,4; 25; 12,5; 6,24; 3,99; 3,12 y 2,5 unidades/ml de trombina antes de mezclar. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se había enfriado previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para inyectar fibrinógeno, el segundo, para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta, con trombina. Simultáneamente, se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su

rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante. Estos resultados se muestran en la Figura 4A y Figura 4B.

Ejemplo 8

5 Se colocó el material de refuerzo en moldes de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustaron las concentraciones de trombina con TCT para administrar las siguientes cantidades 10 0,125; 0,025; 0,0125; 0,00625 y 0,0031 unidades/mg de fibrinógeno tras mezclar, correspondientes a 31,2; 6,24; 3,12; 1,56 y 0,78 unidades/ml de trombina antes de mezclar. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml 15 dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante. Estos resultados se muestran en la Figura 4A y Figura 4B.

20 Ejemplo 9

Se colocó el material de refuerzo en moldes de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se retiró un vial que contenía 3 gramos de fibrinógeno (Sigma™ n.º de lote F-3879) del congelador a -20°C y se colocó a 4°C durante 8 horas. Entonces se retiró la botella 25 del congelador y se llevó a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadieron a la botella 60 ml de agua a 37°C y se dejó que se mezclara durante 15 minutos a 37°C . Una vez en la solución, se sometió el fibrinógeno a diálisis contra tampón de fibrinógeno incompleto (TFI, que fue TCF sin ASH y Tween™) durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las cuatro horas, se añadió ASH a una concentración de 80 mg/g de proteína total y se añadió Tween™ 80 (de origen animal) a una concentración de 15 mg/g de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Entonces, se ajustó la concentración de fibrinógeno a 37,5 mg/ml con TCF. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustaron las concentraciones de trombina con TCT para administrar las siguientes cantidades 30 2,5; 0,25; 0,125; 0,083 y 0,0625 unidades/mg de fibrinógeno (tras mezclar), correspondientes a 624, 62,4; 31,2; 20,8 y 15,6 unidades/ml de trombina antes de mezclar. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante. Estos resultados se muestran en la Figura 4A y Figura 4B.

Ejemplo 10

45 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se cortó una segunda pieza de plástico PETG para colocarla encima de los moldes y se fijó con clips ubicados a cada lado del molde, generando moldes cerrados. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló fibrinógeno (ERL lote 3060) en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Entonces, se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml con TCF. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustaron las 50 concentraciones de trombina con TCT para administrar las siguientes cantidades 2,5; 0,25; 0,125; 0,083 y 0,062 unidades/mg de fibrinógeno (tras mezclar), correspondientes a 624; 62,4; 31,2; 20,8 y 15,6 unidades/ml de trombina (antes de mezclar). Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante. Estos resultados se muestran en la Figura 4A y Figura 4B.

Ejemplo 11

Se colocó el material de refuerzo en moldes de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se cortó una segunda pieza de plástico PETG para colocarla encima de los moldes de 2,4 x 2,4 cm y se fijó con clips colocados a cada lado del molde, produciendo moldes cerrados. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se retiró un vial que contenía 3 gramos de fibrinógeno (Sigma™ n.º de lote F-3879) del congelador a -20°C y se colocó a 4°C durante 18 horas. Entonces se retiró la botella del congelador y se llevó a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadieron a la botella 60 ml de agua a 37°C y se dejó que se mezclara durante 15 minutos a 37°C . Una vez en disolución, se sometió el fibrinógeno a diálisis contra TFI. Transcurridas las cuatro horas, se añadió ASH a una concentración de 80 mg/g de proteína total y se añadió Tween™ 80 (de origen animal) a una concentración de 15 mg/g de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración de trombina para administrar las siguientes cantidades 2,5; 0,25; 0,125; 0,1 y 0,083 unidades/mg de fibrinógeno (tras mezclar), correspondientes a 624; 62,4; 31,2; 24,96 y 20,79 unidades/ml de trombina (antes de mezclar). Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se había enfriado previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante. Estos resultados se muestran en la Figura 4A y Figura 4B.

Ejemplo 12

Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se cortó una segunda pieza de plástico PETG para colocarla encima de los moldes y se fijó con clips colocados a cada lado del molde, produciendo moldes cerrados. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se retiró un vial que contenía 3 gramos de fibrinógeno (Sigma™ n.º de lote F-3879) del congelador a -20°C y se colocó a 4°C durante 18 horas. Entonces se dejó que la botella alcanzara la temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadieron a la botella 60 ml de agua a 37°C y se dejó que se mezclara durante 20 minutos a 37°C . Una vez en disolución, se sometió el fibrinógeno a diálisis contra TFI. Transcurridas las cuatro horas, se añadió albúmina de suero humano (ASH) a una concentración de 80 mg/g de proteína total y se añadió Tween™ 80 (de origen animal) a una concentración de 15 mg/g de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar las siguientes cantidades 2,5; 0,25; 0,125; 0,08 y 0,06 unidades/mg de fibrinógeno (tras mezclar), correspondientes a 624; 62,4; 31,2; 20,8 y 15,6 unidades/ml de trombina (antes de mezclar). Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante.

Apósitos de tres capas (sándwich)

Los apósitos de tres capas se produjeron usando el procedimiento descrito en la patente estadounidense 6.762.336, usando las mismas fuentes de fibrinógeno y trombina utilizadas para producir los anteriores apósitos monolíticos.

Resultados

Los resultados de los ensayos de EVPA y de adherencia se muestran en las Figuras 4A y 4B respectivamente.

Conclusiones (Ejemplo 6 a 12):

Los apósitos producidos con entre 2,5 a 0,025 unidades de trombina/mg de fibrinógeno fueron activos en ambos ensayos, mientras que aquéllos con proporciones mayores o menores de trombina con respecto al fibrinógeno no lo fueron. Se observó una actividad significativamente superior en el intervalo de 2,5 a 0,05 unidades de trombina/mg de

fibrinógeno. Se observó un rendimiento enormemente mejor entre los intervalos de 0,25 a 0,062 de unidades de trombina/mg de fibrinógeno, mientras que el rendimiento óptimo se observó entre los intervalos de 0,125 a 0,08 unidades de trombina/mg de fibrinógeno. Esto contrastó con los apósitos producidos usando el procedimiento descrito en patente estadounidense n.º 6.762.336, que alcanzaron un rendimiento total a 12,5 unidades de trombina/mg de fibrinógeno con un rendimiento inaceptable al disminuir la concentración de trombina por debajo de 12,5 unidades de trombina/mg de fibrinógeno, no quedando esencialmente nada de actividad a 1,4 unidades de trombina/mg de fibrinógeno. Esta diferencia tanto en los límites de rendimiento como en los niveles óptimos es la más acentuada, dado que el rendimiento de los apósitos de tres capas de la patente estadounidense n.º 6.762.336 disminuyó mediante el uso de cantidades decrecientes de trombina, mientras que el apósito descrito en la presente memoria mostró una mayor actividad en este intervalo.

Ejemplo 13

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló fibrinógeno (Enzyme Research Laboratories™ (ERL)) en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina con TCT para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Se liofilizó un grupo de apósitos el día 0, mientras que el resto se mantuvo congelado a -80°C . Se liofilizó un segundo grupo de apósitos el séptimo día y un tercer grupo, el décimo cuarto día.

Una vez liofilizados todos los apósitos, se analizaron usando los ensayos de EVPA, adherencia y peso descritos en la presente memoria.

Resultados:

Días de congelación antes de criodesecación	N.º de apósitos/total en EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
0	5/6	3,5	0,5	168,0	63,2
7	6/6	3,8	0,4	164,7	29,4
14	6/6	3,7	0,5	139,7	39,7

Estos resultados también se muestran gráficamente en la Figura 5A y Figura 5B.

Conclusiones:

Las composiciones de fibrinógeno y trombina congeladas totalmente mezcladas permanecieron estables y funcionales durante 7 y 14 días, sin degradación aparente de su rendimiento. Sería de esperar que un almacenamiento más prolongado produjera resultados similares.

Ejemplo 14

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Grupo de apósitos 1 (sin albúmina, sin Tween 80): se formuló fibrinógeno de Enzyme Research Laboratories (ERL), lote 3130, en cloruro sódico 100mM, cloruro de calcio 1,1mM, Tris 10mM, citrato de sodio 10mM y sacarosa al 1,5%. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml.

Grupo de apósitos 2 (sin albúmina, Tween 80): se formuló fibrinógeno de ERL en cloruro de sodio 100mM, cloruro de calcio 1,1mM, Tris 10mM, citrato de sodio 10mM y sacarosa al 1,5%. Se añadió Tween 80 (de origen animal) a 15 mg/g de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml.

Grupo de apósitos 3 (albúmina, sin Tween 80): se formuló fibrinógeno de ERL en cloruro de sodio 100mM , cloruro de calcio 1,1mM, Tris 10mM, citrato de sodio 10mM y sacarosa al 1,5%. Se añadió ASH a 80 mg/g de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml.

5 Grupo de apósitos 4 (albúmina, Tween 80): se formuló fibrinógeno de ERL en cloruro de sodio 100mM, cloruro de calcio 1,1mM, Tris 10mM, citrato de sodio 10mM y sacarosa al 1,5% (tampón completo de fibrinógeno). Además, se añadió ASH a 80 mg/g de proteína total y Tween™ 80 (de origen animal) a 15 mg/g de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparadas las soluciones de fibrinógeno, se colocaron sobre hielo hasta su uso.

10 Se formuló trombina en cloruro de sodio 150mM , cloruro de calcio 40mM, Tris 10mM, L–lisina 100mM con la adición de ASH a 100 ug/ml. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la solución de trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 La temperatura de las soluciones de fibrinógeno y de trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con solución de fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con solución de trombina. Se dispensaron 2 ml de solución de fibrinógeno y 300 microlitros de solución de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador.

Resultados:

Formulación	N.º de aptos/total de la EVPA	Adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
–Alb –Tween	0/6	0,8	1,0	24,0	26,3
–Alb +Tween	3/6	3,3	0,8	114,7	40,8
+ Alb –Tween	1/6	1,7	1,0	45,0	39,9
+Alb +Tween	5/6	3,5	0,5	131,3	32,0

20

Conclusiones:

Los resultados muestran que la adición de albúmina mejoró el rendimiento de los apósitos. La adición de Tween mejoró el rendimiento todavía más. La combinación de ambos dio como resultado un mejor rendimiento.

Ejemplo 15

25 Los moldes consistían en un par de placas de aluminio separadas por un espaciador de plástico de Plexiglas de 7,6/40,6 cm con muescas cuadradas de 2,5 x 2,5 cm. En uso, el lado abierto de las muescas estaba orientado hacia la parte superior del sándwich de placa–espaciador–placa montado verticalmente, formando en su conjunto el molde para los apósitos. Se preenfrió el molde mediante inmersión en cubitos de hielo seco con la parte superior ligeramente por encima del hielo seco. Luego, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde. Se formuló el fibrinógeno de ERL en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración de fibrinógeno para producir apósitos con 13 mg/cm² de fibrinógeno en el producto final. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno en el apósito final.

30 Se enfriaron el fibrinógeno y la trombina hasta las temperaturas necesarias (2, 4, 6 y 8°C) y se mezclaron en un tubo cónico de 15 ml previamente enfriado y se mezclaron con movimientos vorticiales a una velocidad alta durante 5 segundos antes de dispensarlos en los moldes. Entonces se pipeteó la mezcla de fibrinógeno y trombina en los moldes con una pipeta serológica.

35

Resultados:

Temperatura inicial del fibrinógeno y la trombina (°C)	Prueba de rendimiento		Caracterización bioquímica	
	EVPA (aptos/analizados)	Adherencia (Media)	% de Aα convertida en cadena α libre	% de cadena y convertida en dímero Y–Y
2	5/5	4,0	51	0

(continuación)

Temperatura inicial del fibrinógeno y la trombina (°C)	Prueba de rendimiento		Caracterización bioquímica	
	EVPA (aptos/analizados)	Adherencia (Media)	% de A α convertida en cadena α libre	% de cadena γ convertida en dímero γ - γ
4	5/5	4,0	38	0
6	5/5	3,8	57	0
8	4/4	4,0	44	0

Conclusiones:

Se crearon apósitos funcionales que comprendían del 38 al 57% de cadena α libre y nada de dímero γ - γ .

5 Ejemplo 16

Los moldes consistían en un par de placas de aluminio o acero separadas por un espaciador de plástico de Plexiglas de 7,6/40,6 cm con muescas cuadradas de 2,5 x 2,5 cm. En uso, el lado abierto de las muescas estaba orientado hacia la parte superior del sándwich de placa-espaciador-placa montado verticalmente, formando en su conjunto el molde para los apósitos. En algunos grupos, se usó un revestimiento de plástico fino (PVC) para proporcionar la superficie de contacto del producto para las placas de enfriamiento de los moldes. Se preenfriaron los moldes hasta la temperatura deseada, y se cortó y se colocó el material de refuerzo en cada molde.

Se formuló el fibrinógeno de ERL en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración de fibrinógeno para producir apósitos con 13 mg/cm^2 de fibrinógeno en el producto final. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno en el apósito final.

Se dispensaron fibrinógeno y trombina en los moldes. Una vez llenos los moldes, se dejó que se congelaran y luego se mantuvieron a -80°C antes de meterlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito anteriormente. Una vez completados los apósitos, se almacenaron en bolsas de papel de aluminio de baja transmisión de la humedad que contenían 5 gramos de desecante.

20 Se evaluó el rendimiento de los apósitos en los ensayos de EVPA y adherencia según lo descrito anteriormente. La caracterización bioquímica de los apósitos fabricados se realizó mediante el análisis de electroforesis sobre gel según lo descrito anteriormente.

Resultados:

Temperatura de la placa congeladora (°C)	Material de la placa	Interfase de la placa y el apósito	Prueba de rendimiento			Caracterización bioquímica	
			EVPA (aptos/analizados)	Adherencia (Media \pm DE)	Peso (Media \pm DE)	% A α convertido en cadena α libre	% de cadena γ convertido en dímero γ - γ
-20	Aluminio	Aluminio	5/5	$4,0 \pm 0,0$	$180 \pm 16,7$	53	0
-30	"	"	5/5	$4,0 \pm 0,0$	$162 \pm 34,4$	51	0
-40	"	"	5/5	$4,0 \pm 0,0$	$184 \pm 21,9$	56	0
-60	"	"	5/5	$4,0 \pm 0,0$	$198 \pm 30,8$	55	0
"	Acero	Plástico	5/5	$3,8 \pm 0,4$	$158 \pm 25,5$	53	0
"	"	Acero	5/5	$4,0 \pm 0,0$	$172 \pm 33,6$	46	0

Conclusiones:

Se fabricaron apósitos que pasaron todas las pruebas de rendimiento. El porcentaje de cadena α libre varió del 46 al 56%, mientras que no hubo dímero γ - γ detectable en ninguno de los apósitos.

Ejemplo 17

5 Los moldes consistían en un par de placas de aluminio separadas por un espaciador de plástico de Plexiglas de de 7,6/40,6 cm con muescas cuadradas de 2,5 x 2,5 cm. En uso, el lado abierto de las muescas estaba orientado hacia la parte superior del sándwich de placa-espaciador-placa montado verticalmente, formando en su conjunto el molde para los apósitos. Se preenfrió el molde mediante inmersión en cubitos de hielo seco con la parte superior ligeramente por encima del hielo seco. Luego se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde. Se formuló el fibrinógeno de ERL en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración de fibrinógeno para producir los apósitos con 13 mg/cm² de fibrinógeno en el producto final. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno en el apósito final.

15 El fibrinógeno y la trombina se mantuvieron sobre hielo y bien: se añadieron a un tubo cónico de 15 ml previamente enfriado y se mezclaron con movimientos vorticiales a alta velocidad durante 5 segundos y luego se pipetearon en moldes usando una pipeta serológica, o se cargaron en una jeringa de 60 ml para dispensar el fibrinógeno y en una jeringa de 3 ml para dispensar la trombina, se colocaron las jeringas en una bomba de jeringas lineal, usándose un tubo para conectar cada jeringa a lados opuestos del conector en forma de T. Entonces se encendió la bomba y se usó la parte inferior del conector para dispensar la mezcla de fibrinógeno-trombina en los moldes.

20 Una vez llenos los moldes, se dejó que se congelaran y luego se mantuvieron a -80°C antes de meterlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito anteriormente. Una vez completados los apósitos, se almacenaron en bolsas de papel de aluminio de baja transmisión de la humedad que contenían 5 gamos de desecante.

Se evaluó el rendimiento de los apósitos en los ensayos de EVPA y adherencia según lo descrito anteriormente. La caracterización bioquímica de los apósitos fabricados se realizó mediante el análisis de electroforesis sobre gel según lo descrito anteriormente.

25 **Resultados:**

Procedimiento de mezclado	Prueba de rendimiento			Caracterización bioquímica	
	EVPA (aptos/ analizados)	Puntuación de adherencia (Media \pm DE)	Peso soportado (Media \pm DE)	% A α convertido en cadena α libre	% de cadena γ convertido en dímero γ - γ
Conector en forma de T	0/2	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	100	55
Movimientos vorticiales	0/1	0	0,0	100	58

Conclusiones:

30 Los apósitos producidos no pasaron todas las pruebas de rendimiento. Los niveles α libres de estos apósitos fueron del 100%, lo que indica una conversión completa del fibrinógeno nativo en fibrina Ia. El nivel de dímero γ - γ varió del 55-58%. No se produjeron diferencias entre los procedimientos usados para mezclar el fibrinógeno y la trombina.

Ejemplo 18

35 Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3112, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25,0 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

40 Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Se pipetearon 2,4 ml de fibrinógeno en un tubo previamente enfriado de 12 x 75 mm, seguidos de la adición de 360 μ l de trombina. Se sometieron los tubos a movimientos vorticiales durante 3 segundos y se retiraron alícuotas de 897 μ l y se pipetearon en moldes. Se fabricaron apósitos en seis puntos temporales (25 segundos, 1, 2, 3, 5 y 8

minutos) y apósitos control. Los apósitos control no se premezclaron, se pipetearon simultáneamente 780 µl de fibrinógeno y 117 µl de trombina en los moldes sobre hielo seco. Una vez llenos los moldes, se colocaron en el congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador.

Resultados:

Tiempo de mantenimiento del mezclado	Prueba de rendimiento			Caracterización bioquímica	
	EVPA (aptos/ analizados)	Puntuación de adherencia (Media \pm DE)	Peso soportado (Media \pm DE)	% A α convertido en cadena α libre	% de cadena γ convertido en dímero γ - γ
Control	3/4	2,8 \pm 0,5	61 \pm 15,0	0	0
25 s	4/4	3,3 \pm 0,5	93 \pm 26,5	n.a.*	n.a.
1 min	5/5	3,0 \pm 0,0	86 \pm 11,0	n.a.	n.a.
2 min	5/5	3,2 \pm 0,4	94 \pm 32,1	n.a.	n.a.
3 min	5/5	2,6 \pm 0,5	74 \pm 26,1	20	0
5 min	4/4	2,8 \pm 1,0	83 \pm 23,8	26	0
8 min	3/3	2,7 \pm 0,6	81 \pm 15,3	42	0
n.a.: no analizado					

5

Conclusiones:

Se fabricaron apósitos completamente funcionales con niveles de α libre del 0 al 42%.

Ejemplo 19

10

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló fibrinógeno de Enzyme Research Laboratories™ (ERL), n.º de lote 3112, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

20

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron varios grupos sobre los estantes de acero de un liofilizador. Las temperaturas de los estantes fueron las siguientes: -10°C , -20°C , -30°C y -40°C , y se colocaron los moldes en el estante durante 30 minutos para que se equilibraran. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, permanecieron dentro del liofilizador a sus temperaturas establecidas durante 30 minutos. Tras ello, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 2 horas antes de liofilizarlos según lo descrito anteriormente.

25

Además, se fabricaron dos grupos de apósitos colocándolos sobre una placa de aluminio que se situó encima de hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, permanecieron sobre hielo seco durante 5 minutos o se colocaron sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos. Tras ello, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 2 horas antes de liofilizarlos según lo descrito anteriormente.

30

Se analizó el rendimiento de los apósitos liofilizados en los ensayos de EVPA, adherencia y peso. Además, se analizaron con análisis de electroforesis en gel según lo descrito.

Resultados:

Temperatura/s de congelación	Prueba de rendimiento			Caracterización bioquímica	
	EVPA (aptos/ analizados)	Puntuación de adherencia (Media ± DE)	Peso soportado (Media ± DE)	% Aα convertido en cadena α libre	% de cadena γ convertido en dímero γ-γ
-10	2/5	0,1 ± 0,2	6,0 ± 12,5	33	0
-20	2/4	0,0 ± 0,0	0 ± 0	19	0
-30	4/5	1,3 ± 1,2	68 ± 39,2	11	0
-40	3/5	1,5 ± 1,2	74 ± 77,8	16	0
Hielo seco (-78°C)	4/5	1,8 ± 1,3	50 ± 47,1	11	0
Hielo seco (-78°C) y N ₂ líquido (-196°C)	5/5	2,8 ± 0,8	126 ± 39,6	10	0

Conclusiones:

- 5 Se fabricaron apósitos con niveles de cadena α libre del 10% al 33%, y dímero γ-γ no detectable. El rendimiento fue inversamente proporcional al nivel de cadena α libre y a la/s temperatura/s de congelación.

Ejemplo 20

Se formuló fibrinógeno humano (Sigma, St. Louis) en TCF a una concentración de 35 mg de fibrinógeno/ml. Se formuló trombina bobina (Sigma, St. Louis) en TCT a 87,5 U/ml. Se ajustó el pH de los tampones para adaptarse al pH diana para cada pocillo.

- 10 El intervalo de pH tanto para el fibrinógeno como para la trombina fue de 5,5 a 8,5, en incrementos de 0,5 unidades. Se usaron dos temperaturas de análisis, 4°C y 24°C. El experimento se llevó a cabo en placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene, VWR).

- 15 Se pipetearon cien µl de fibrinógeno en cada pocillo (3,5 mg/pocillo) de las placas de 96 pocillos seguidos de la adición de 100 µl de trombina (8,75 U/pocillo). Véase la configuración de la placa a continuación. Se incubó la placa durante 10 minutos antes de su evaluación. Se evaluó la formación de coágulos y la estructura mediante: inversión para detectar la formación de coágulos y la adherencia, y la opacidad.

Configuración de la placa:

	pH del fibrinógeno						
	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
pH de la trombina							
5,5							
6,0							
6,5							
7,0							
7,5							
8,0							
8,5							

Resultados:

Placa a temperatura ambiente:

5 Se formaron coágulos en todos los pocillos. El fibrinógeno a un pH de 5,5 y 6,0 tuvo coágulos que eran muy opacos a todos los intervalos de pH de la trombina. El pH del fibrinógeno a 6,5 tuvo coágulos que eran opacos usando trombina entre intervalos de pH de 5,5 a 7,0. Con la trombina a un pH por encima de 7,5, los coágulos fueron transparentes. El fibrinógeno a niveles de pH de 7,0 y superiores formó coágulos transparentes a todos los niveles de pH de trombina. Los resultados se muestran en la figura 6A.

Placa a 4°C:

10 Se formaron coágulos en todos los pocillos. El fibrinógeno a un pH de 5,5 y 6,0 tuvo coágulos que eran muy opacos a todos los intervalos de pH de la trombina. El pH del fibrinógeno a 6,5 tuvo coágulos que eran opacos usando trombina entre intervalos de pH de 5,5 a 7,0. Con la trombina con un pH 7,5, los coágulos eran transparentes. El fibrinógeno a niveles de pH de 7,0 y superiores formó coágulos transparentes a todos los niveles de pH de trombina. Los resultados se muestran en la figura 6B.

Adherencia:

15 Se determinó la adherencia de los coágulos invirtiendo la placa sobre una toalla de papel y golpeando ligeramente la parte trasera de la placa. Se retiró la placa tras 30 segundos y los coágulos que permanecieron en la placa se consideraron adherentes, mientras que los coágulos que aparecieron en la toalla de papel no eran adherentes.

Observaciones:

20 Aunque la opacidad de los coágulos formados fue variable, los coágulos formados usando fibrinógeno a un pH 5,5 y 6,0 carecieron de adherencia. Esto también se cumplió para el fibrinógeno a pH de 6,5, cuando el pH de trombina fue de entre 5,5 y 7,0. Una vez que el pH del fibrinógeno fue de 7,0 o superior, se formaron coágulos adhesivos en todos los intervalos de pH de la trombina analizados. Esto se cumplió tanto para las placas a temperatura ambiente como a 4°C.

Conclusiones:

25 A partir de estos resultados, se determinó que los apósitos tienen preferiblemente fibrinógeno a un pH de 7,0 o superior, pero que el pH de la trombina puede variar de 5,5 a 8,5.

Ejemplo 21

30 Se formuló fibrinógeno humano (Sigma, St. Louis) en TCF modificado (que carecía de cloruro de calcio) a una concentración de 35 mg de fibrinógeno/ml. Se formuló trombina bobina (Sigma, St. Louis) en TCT modificado (que carecía de cloruro de calcio) a 87,5 U/ml. Se ajustó el pH de los tampones para adaptarse al pH diana para cada pocillo. El intervalo de pH tanto para el fibrinógeno como para la trombina fue de 5,5 a 8,5 en incrementos de 0,5 unidades. Se usaron dos temperaturas de análisis, 4°C y 24°C. El experimento se llevó a cabo en placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene, VWR).

35 Se pipetearon cien µl de fibrinógeno en cada pocillo (3,5 mg/pocillo) de las placas de 96 pocillos seguidos de la adición de 100 µl de trombina (8,75 U/pocillo). Véase la configuración de la placa a continuación. Se incubó la placa durante 10 minutos antes de su evaluación. Se evaluó la formación de coágulos y la estructura mediante: inversión para detectar la formación de coágulos y la adherencia, y la opacidad.

Configuración de la placa:

	pH del fibrinógeno						
	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
pH de la trombina							
5,5							
6,0							
6,5							
7,0							
7,5							

(continuación)

	pH del fibrinógeno						
	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
pH de la trombina							
8,0							
8,5							

Resultados:

Placa a temperatura ambiente:

5 Se formaron coágulos en todos los pocillos. El fibrinógeno a un pH de 5,5 y 6,0 tuvo coágulos que eran muy opacos a todos los intervalos de pH de la trombina. El pH del fibrinógeno a 6,5 tuvo coágulos que no eran opacos usando trombina entre intervalos de pH de 5,5 a 8,5, lo que se diferencia de los resultados anteriores. Con la trombina a un pH mayor de 7,5, los coágulos fueron transparentes. El fibrinógeno a niveles de pH de 6,5 y superiores formó coágulos a todos los niveles de pH de la trombina. Los resultados se muestran en la figura 6C.

10 **Placa a 4°C:**

Se formaron coágulos en todos los pocillos. El fibrinógeno a un pH de 5,5 y 6,0 tuvo coágulos que eran muy opacos a todos los intervalos de pH de la trombina. El pH del fibrinógeno a 6,5 tenía coágulos que eran opacos usando trombina entre intervalos de pH de 5,5 a 7,0. Con la trombina a un pH por encima de 7,5, los coágulos fueron transparentes. El fibrinógeno a niveles de pH de 7,0 y superiores formó coágulos a todos los niveles de pH de la trombina. Los resultados se muestran en la figura 6D.

Adherencia:

Se determinó la adherencia de los coágulos invirtiendo la placa sobre una toalla de papel y golpeando ligeramente la parte trasera de la placa. Se retiró la placa tras 30 segundos y los coágulos que permanecieron en la placa se consideraron adherentes, mientras que los coágulos que aparecieron en la toalla de papel no eran adherentes.

20 **Observaciones:**

Aunque la opacidad de los coágulos formados fue variable, los coágulos formados usando fibrinógeno a un pH 5,5 y 6,0 carecieron de adherencia. Una vez que el pH del fibrinógeno fue de 6,5 o superior, se formaron coágulos adhesivos a todos los intervalos de pH de la trombina analizados. Esto se cumplió tanto para las placas a temperatura ambiente como a 4°C. Estos resultados se diferencian de los resultados previos en que el fibrinógeno a pH 6,5 formó coágulos adhesivos cuando el tampón no contenía CaCl₂.

Conclusiones:

A partir de estos resultados, se determinó que en ausencia de CaCl₂, los apósitos deberían tener fibrinógeno a un pH de 6,5 o superior, pero que el pH de la trombina podría variar de 5,5 a 8,5,

Ejemplo 22

30 Se formuló fibrinógeno humano (Sigma, St. Louis) en TCF a una concentración de 35 mg de fibrinógeno/ml. Se formuló trombina bobina (Sigma, St. Louis) en TCT a 87,5 U/ml. Se ajustó el pH de los tampones para ajustarse al pH diana para cada pocillo. Los apósitos se fabricaron en moldes de histología de 2,4 x 2,4 cm desechables. Material de refuerzo absorbible. Jeringas (2,0 ml). Congelación bidireccional vertical sobre hielo seco.

35 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% encima de cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

40 El fibrinógeno (Sigma) se formuló en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno se ajustó como se muestra más adelante. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina se ajustó como se muestra más adelante. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado)

correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

5 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron entre placas de aluminio que se habían enfriado previamente en hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Se usó un orificio para inyectar fibrinógeno, el segundo para inyectar la trombina. Se colocaron estos orificios en los extremos opuestos de los moldes y el tercer orificio, que estaba ubicado en el centro de la parte superior del molde, servía como ventilación para liberar el aire desplazado desde el interior del molde. Entonces se llenaron dos jeringas de 3 ml con 2,0 ml de fibrinógeno y trombina respectivamente. Luego se inyectaron éstas simultáneamente en los moldes por los dos orificios de los extremos del molde. Una vez llenos los moldes, se taparon con cubitos de hielo seco y se dejó que se congelaran durante 2 minutos, tras lo que se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito anteriormente.

Combinaciones de fabricación de apósitos:

N.º de apósito	pH del fibrinógeno	pH de la trombina
1	5,5	6,0
2	6,0	6,5
3	6,5	8,0
4	7,0	7,0
5	7,5	7,0
6	8,0	7,5
7	8,5	7,5

15 **Criterios de evaluación**

Se evaluó el aspecto de los apósitos. La amplia experiencia en la fabricación de apósitos basados en sellantes de fibrina ha establecido que los apósitos que parecen estar hechos de una cantidad importante de material en polvo son peores. De igual manera, la detección visual de la fibrina preformada en los apósitos es inversamente proporcional al rendimiento, lo que indica que el apósito tendrá una mala adherencia. También se evalúa fácilmente la facilidad y la velocidad de hidratación, prediciéndose un buen rendimiento del apósito si se trata de un apósito que se hidrata fácil y rápidamente de manera uniforme. Finalmente, para un buen rendimiento, también se requiere la capacidad de formar un coágulo que consista en fibrina densa y uniforme, y se puede evaluar visualmente.

Se evaluaron visualmente todos los apósitos. Además, los apósitos 1–4 y 6 se hidrataron con 2 ml de agua a 37°C y se evaluaron visualmente la velocidad de hidratación, su capacidad para formar un coágulo y su posterior adherencia.

25 **Resultados:**

Aspecto tras la liofilización:

Todos los apósitos se evaluaron fácilmente mediante criterios visuales (véanse las Figuras 7A y 7B). Los apósitos 1 y 2 eran muy polvorientos en comparación con el resto de los apósitos. La proporción relativa del apósito que estaba en polvo disminuía a medida que aumentaba el pH del fibrinógeno.

30 Los apósitos 1 y 2 resultaron tener algo de fibrina preformada, que se puede ver en la imagen anexa como densas zonas moteadas de color blanco, mientras que los apósitos 3, 4 y 6 resultaron tener una gran cantidad de fibrina preformada y tuvieron una solubilización lenta. Por el contrario, el apósito número 5 resultó tener una alta integridad y no se detectó visualmente fibrina preformada. Estos resultados se resumen en la siguiente tabla.

N.º de apósito	pH del fibrinógeno	pH de la trombina	Integridad	Fibrina preformada	Velocidad de hidratación
1	5,5	6,0	Muy polvoriento	Sí	Moderada
2	6,0	6,5	En polvo	"	"

(continuación)

N.º de apósito	pH del fibrinógeno	pH de la trombina	Integridad	Fibrina preformada	Velocidad de hidratación
3	6,5	8,0	Buena	Gran proporción	Difícil y lenta
4	7,0	7,0	Excelente	Sí	"
5	7,5	7,0	"	Nada	No analizada
6	8,0	7,5	"	Gran proporción	Difícil y lenta
7	8,5	7,5	"	Sí	No analizada

Conclusiones:

5 Las características de los apósitos se ofrecen en la tabla anterior. Todos los apósitos formaron coágulos a todos los pH del intervalo. Aquéllos con un pH del fibrinógeno de entre 5,5 y 6,0 y de la trombina de entre 6,0 y 6,5 resultaron tener la menor integridad antes de la hidratación. También tenían una pequeña cantidad de fibrina formada antes de la hidratación. Aquéllos con un pH del fibrinógeno de entre 6,5 y 7,0 y de la trombina de entre 8,0 y 7,0 resultaron tener mayor integridad, pero más fibrina antes de la hidratación. Los apósitos fabricados con fibrinógeno entre 8,0 y 8,5, y con trombina a 7,5 resultaron tener una buena integridad, pero mostraron grandes cantidades de fibrina antes de la hidratación y fueron difíciles de hidratar. Por el contrario, cuando tanto el fibrinógeno como la trombina tenían un pH 10 7,0, el apósito resultante tuvo una integridad excelente y una cantidad menor de fibrina preformada. Los mejores apósitos se obtuvieron con una combinación de fibrinógeno a pH 7,5 y de trombina a pH de 7,0.

Ejemplo 23

15 Se cortó material de refuerzo (Dexon™) y se colocó en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se cortó una segunda pieza de plástico PETG para colocarla encima de los moldes de 1,5 x 1,5 cm y se fijó con clips colocados a cada extremo del molde. De este modo, se cerró el molde. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

20 Se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3100, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml con TCF. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la trombina con TCT para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

25 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron entre dos placas de aluminio en posición vertical y luego, se colocaron sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para la entrada del fibrinógeno, el segundo, para la entrada de la trombina y el tercero sirvió para liberar el aire del molde. Se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se dispensaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml 30 de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador, y se liofilizaron según lo descrito previamente.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Puntuación de la prueba de adherencia (media ± DE)
Cerrado/Vertical	5/5	3,4 ± 0,5

35 **Conclusiones:**

A partir de estos resultados, se determinó que los apósitos fabricados con un pH total de 7,3 a 7,5 dieron un rendimiento excelente.

Ejemplo 24

Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

5 El fibrinógeno de ERL, lote 3114, se formuló en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

10 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

15

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Puntuación de la prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Abierto / Horizontal	6/6	3,7	0,5	153	37,3

Ejemplo 25

20 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

El fibrinógeno (ERL lote 3100) se formuló en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

25 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para inyectar el fibrinógeno, el segundo, para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

35

Resultados:

Grupo	n.º de aptos/total de la EVPA	Puntuación de la prueba de adherencia	DE de la adherencia
Cerrado / Vertical	5/5	3,4	0,5

Ejemplo 26

40 Para todos los apósitos, se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3130, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Para el grupo con malla VICRYL™ cortada en tiras dispersada en el mismo, se cortó este material de soporte en trozos de aproximadamente 1 mm x 1 mm y se dispersó en la solución de trombina antes de llenar los moldes. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se usaron moldes cilíndricos de de jeringas de polipropileno de 10 ó 3 ml (Becton Dickinson) retirando el extremo de tipo Luer–Lock. Se retiraron los émbolos hasta la marca de 6 ml y de 2 ml respectivamente. Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de soporte y se colocó en cada molde, empujando hasta que quedó adyacente al émbolo. Una vez preparados, se colocaron los moldes verticalmente y se rodearon de hielo seco, dejando la abertura expuesta en la parte superior. Se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en su interior) en moldes de 10 ml, y se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en su interior) en moldes de 3 ml, que se dejaron congelar durante 5 minutos. Entonces se colocaron los moldes en el congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador y se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupo	n.º de aptos/total de la EVPA
Tubular (Jeringa)	3/3

Resumen

Grupo	n.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Abierto / Horizontal	6/6	3,7	0,5	153	37,3
Cerrado / Vertical	5/5	3,4	0,5		
Tubular (Jeringa)	3/3				

Conclusiones:

Se fabricaron apósitos que pasaron la prueba de EVPA para las condiciones de fabricación.

Ejemplo 27

Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para inyectar el fibrinógeno, el segundo, para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupo	n.º de aptos/total de la EVPA	Puntuación de la prueba de adherencia	DE de la adherencia
Pipeta	5/5	3,4	0,5

Ejemplo 28

5 Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

10 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Pipeteador de repetición	6/6	3,7	0,5	153	37,3

Ejemplo 29

20 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

25 Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada con una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

35

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Jeringa	4/4	3,8	0,5

Ejemplo 30

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 10 x 10 cm. Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

- 5 Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 10 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 15 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. La placa de aluminio tenía un orificio de 0,635 cm perforado en el centro y tenía un conector para unir un trozo de tubo a una fuente de vacío. Se centró el molde con respecto al orificio en la placa de aluminio y se inició el vacío. El vacío tenía dos objetivos, evitar que el molde se moviera y mantenerlo plano contra la placa de aluminio. Se colocaron treinta y cinco mililitros de fibrinógeno y 5,25 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde. Una vez llenos los moldes y aplicado el material de refuerzo como se describe anteriormente, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

20 **Resultados:**

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Mezclado y vertido	6/6	3,8	0,4	163 31,5

Ejemplo 31

- 25 Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 2890, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 30 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina.

- 35 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Se conectaron dos sistemas dispensadores automáticos de IJ Fisner según las instrucciones de los fabricantes. Se llenó una jeringa con fibrinógeno y una segunda, con trombina. Se dispensaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17ml de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador.

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Dispensador	5/5	4,0	0,0

40

Resumen:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Pipeta	5/5	3,4	0,5		
Pipeteador de repetición	6/6	3,7	0,5	153	37,3
Jeringa	4/4	3,8	0,5		
Mezclado y vertido	6/6	3,8	0,4	163	31,5
Dispensador	5/5	4,0	0,0		

Conclusiones:

- 5 Los apósitos fabricados usando muchas técnicas de llenado diversas pasaron los ensayos en los que se probaron. Esto demuestra que hay una mezcla aceptable de los componentes de trombina y fibrinógeno en muchos procedimientos de llenado diversos.

Ejemplo 32

- 10 Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 15 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 20 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Unidireccional	6/6	3,7	0,5	153	37,3

Ejemplo 33

- 25 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

- 30 Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 35 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para

inyectar el fibrinógeno, el segundo para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Bidireccional	5/5	3,4	0,5

Ejemplo 34

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3130, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Para el grupo con malla VICRYL™ cortada en tiras dispersada en el mismo, se cortó este material de refuerzo en trozos de aproximadamente 1 mm x 1 mm y se dispersó en la solución de trombina antes de llenar los moldes. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se usaron moldes cilíndricos de jeringas de polipropileno de 10 ó 3 ml (Becton Dickinson) retirando el extremo de tipo Luer–Lock. Se retiraron los émbolos hasta la marca de 6 ml y de 2 ml respectivamente. Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde, empujando hasta que quedó adyacente al émbolo. Una vez preparados, se colocaron los moldes verticalmente y se rodearon de hielo seco, dejando la abertura expuesta en la parte superior. Se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en su interior) en moldes de 10 ml y se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en su interior) en moldes de 3 ml, que se dejaron congelar durante 5 minutos. Entonces se colocaron los moldes en el congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador y se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA
Marco	3/3

Conclusiones:

Todos los apósitos que se fabricaron y se congelaron en diversas condiciones pasaron los ensayos usados para cada ejemplo. El fibrinógeno y la trombina se pueden combinar en forma de líquidos y congelar en una variedad de condiciones.

Ejemplo 35

Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para

inyectar el fibrinógeno, el segundo para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Aspecto
1,5 x 1,5cm	5/5	3,4	0,5	Suave, aceptable

Ejemplo 36

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado	Aspecto
2,4 x 2,4 cm	6/6	3,7	0,5	153	37,3	Suave, aceptable

Ejemplo 37

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 10 x 10 cm. Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. La placa de aluminio tenía un orificio de 0,635 cm perforado en el centro y tenía un conector para unir un trozo de tubo a una fuente de vacío. Se centró el molde con respecto al orificio en la placa de aluminio y se inició el vacío. El vacío tenía dos objetivos, evitar que el molde se moviera y mantenerlo plano contra la placa de aluminio. Se colocaron treinta y cinco mililitros de fibrinógeno y 5,25 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde.

Una vez llenos los moldes y aplicado el material de refuerzo como se describe anteriormente, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado	Aspecto
10 x 10cm	6/6	3,8	0,4	163	31,5	Suave, aceptable

5

Ejemplo 38

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 3,7 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

10 Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3100, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se dispensaron 3,1 ml de fibrinógeno y 0,465 ml de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

20

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Aspecto
3,7 x 2,4cm	5/5	3,4	0,5	Suave, aceptable

Ejemplo 39

25 Se cortó material de refuerzo y se colocó en un molde redondo de $63,6 \text{ cm}^2$. Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre el material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3100, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

35 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Se introdujeron veintidós mililitros de fibrinógeno y 3,3 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde. Una vez lleno el molde, se colocó sobre nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvió al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlo en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

40

Resultados:

Grupos	Aspecto
63,6 cm ²	Suave, aceptable

Ejemplo 40

5 Se cortó material de refuerzo y se colocó en un molde redondo de 63,6 cm². Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre el material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3100, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

10 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Para el molde de 5,2 x 5,6 cm, se colocaron 10,1 mililitros de fibrinógeno y 1,5 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde. El molde de 13,0 x 8,0 cm recibió 36 ml de fibrinógeno y 5,4 ml de trombina. El molde de 7,0 x 3,0 cm recibió 7,3 ml de fibrinógeno y 1,1 ml de trombina. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupos	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado	Aspecto
5,2 x 5,6 cm						Suave, aceptable
13,0 x 8,0 cm	8/8	3,3	1,0	99	43	Suave, aceptable
7,0 x 3,0 cm	3/3	4	0	121	55	Suave, aceptable

20

Ejemplo 41

Se cortó material de refuerzo y se colocó en un molde redondo de 63,6 cm². Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre el material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

25 Se formuló el fibrinógeno de ERL lote 3112 en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. Para el molde de 5,5 x 6,0 cm, se introdujeron 11,5 mililitros de fibrinógeno y 1,73 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde. El molde de 10,0 x 8,0 cm recibió 27,7 ml de fibrinógeno y 4,16 ml de trombina. El molde de 12,0 x 8,0 cm recibió 37,4 ml de fibrinógeno y 5,62 ml de trombina. Una vez lleno cada molde, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador.

35

Resultados:

Grupos:	Aspecto
5,5 x 6,0 cm	Suave, aceptable

(continuación)

Grupos:	Aspecto
10,0 x 8,0 cm	Suave, aceptable
12,0 x 9,0 cm	Suave, aceptable

Conclusiones:

- 5 Los apósitos se pueden producir en una serie de tamaños que varían de pequeño (2,25 cm²) a grande (108 cm²). La totalidad de los 30 apósitos producidos pasaron sus respectivos criterios de análisis. Siempre que se controlen la mezcla de los reactivos, y el tiempo y la temperatura de congelación, los apósitos se pueden fabricar hasta cualquier tamaño útil razonable y aceptable.

Ejemplo 42

- 10 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 15 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 20 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para inyectar el fibrinógeno, el segundo para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador.

Luego se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupos:	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
PVC	5/5	3,4	0,5

Ejemplo 43

- 30 Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 35 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

- 40 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupos:	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
PETG	6/6	3,7	0,5	153	37,3

Ejemplo 44

5 Se cortó material de refuerzo y se colocó en moldes de acero inoxidable de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

10 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Entonces se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron en una placa de aluminio que había sido previamente enfriada encima de hielo seco. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 2,0 ml de fibrinógeno y 0,3 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupos:	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Acero inoxidable	3/3	4,0	0,0

20 **Ejemplo 45**

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3130, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

25 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Para el grupo con malla VICRYL™ cortada en tiras dispersada en el mismo, se cortó este material de refuerzo en trozos de aproximadamente 1 mm x 1 mm y se dispersó en la solución de trombina antes de llenar los moldes. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se usaron moldes cilíndricos de jeringas de polipropileno de 10 ó 3 ml (Becton Dickinson) retirando el extremo de tipo Luer–Lock. Se retiraron los émbolos hasta la marca de 6 ml y de 2 ml respectivamente. Para los apósitos con refuerzo, se cortó el material de refuerzo y se colocó en cada molde, empujando hasta que quedó adyacente al émbolo. Una vez preparados, se colocaron los moldes verticalmente y se rodearon de hielo seco, dejando la abertura expuesta en la parte superior. Se dispensaron 1 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en su interior) en moldes de 10 ml y se dispensaron 10 ml de fibrinógeno y 0,15 ml de trombina (con o sin material de refuerzo dispersado en su interior) en moldes de 3 ml, que se dejaron congelar durante 5 minutos. Entonces se colocaron los moldes en el congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador y se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupos:	N.º aptos/total de la EVPA
Polipropileno	3/3

Resumen:

Grupos:	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
PVC	5/5	3,4	0,5		
PETG	6/6	3,7	0,5	153	37,3
Acero inoxidable	3/3	4,0	0,0		
Polipropileno	3/3				

Conclusiones:

5 Los apósitos se pueden fabricar con una variedad de plásticos o metal como soporte del molde. Todos estos apósitos cumplieron sus criterios de prueba.

Ejemplo 46

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 10 x 10 cm. Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

10 Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

20 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiró el molde del congelador a -80°C y se colocó sobre una placa de aluminio que se situó sobre hielo seco. La placa de aluminio tenía un orificio de 0,635 cm perforado en el centro y tenía un conector para unir un trozo de tubo a una fuente de vacío. Se centró el molde con respecto al orificio en la placa de aluminio y se inició el vacío. El vacío tenía dos objetivos, evitar que el molde se moviera y mantenerlo plano contra la placa de aluminio. Se colocaron treinta y cinco mililitros de fibrinógeno y 5,25 mililitros de trombina en un tubo de ensayo de 50 ml, se invirtió tres veces y se vertió en el molde. Una vez llenos los moldes y aplicado el material de refuerzo como se describe anteriormente, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupos:	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Aluminio con orificio	6/6	3,8	0,4	163	31,5

Ejemplo 47

30 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon cincuenta microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

35 Se formuló la trombina en TCT. El pH de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para inyectar el fibrinógeno, el segundo para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

10 **Resultados:**

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Aluminio	5/5	3,4	0,5

Ejemplo 48

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupos:	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Cobre	6/6	3,7	0,5	153	37,3

Ejemplo 49

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3130, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron un estante de acero del liofilizador que tenía una temperatura de -50°C . Los moldes permanecieron en el estante durante 30 minutos, de manera que las temperaturas de los moldes se equilibraron hasta -50°C . Tras 30 minutos, se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, permanecieron dentro del liofilizador a -50°C durante 30 minutos. Tras ello, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 24 horas antes de liofilizarlos.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Acero	5/5	3,4	0,5	106	11

Resumen:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Aluminio con orificio	6/6	3,8	0,4	163	31,5
Aluminio	5/5	3,4	0,5		
Cobre	6/6	3,7	0,5	153	37,3
Acero	5/5	3,4	0,5	106	11

5 Conclusiones:

Los apósitos producidos sobre placas de metal que permitieron una congelación rápida y una rápida transferencia del calor cumplen todos los criterios de prueba. Cabría esperar que otros metales o materiales similares que puedan transferir calor a tasas comparables produzcan resultados similares.

Ejemplo 50

10 Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3114, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

20 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de cobre que se situó sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron los apósitos según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Hielo seco	6/6	3,7	0,5	153	37,3

25

Ejemplo 51

30 Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Se montó una segunda pieza de plástico de PETG sobre los moldes de 1,5 x 1,5 y se fijó. Esto formó un molde cerrado. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3100) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Las concentraciones de trombina se ajustaron con TCT para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina antes de la mezcla. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

5 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se perforaron tres orificios en la parte superior del molde usando una aguja de calibre 18. Un orificio se usó para inyectar el fibrinógeno, el segundo para inyectar la trombina y el tercero sirvió como ventilación para liberar el aire que se había desplazado en el interior del molde. Entonces se llenó una pipeta con fibrinógeno y una segunda pipeta con trombina. Simultáneamente, se inyectaron 0,78 ml de fibrinógeno y 0,17 ml de trombina con estas pipetas en cada
10 molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre una mezcla de nitrógeno líquido durante treinta segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito más adelante y se analizó su rendimiento usando ensayos de EVPA y de adherencia según lo descrito más adelante.

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Hielo seco y nitrógeno líquido	5/5	3,4	0,5

15

Ejemplo 52

Se colocó el material de refuerzo en cada molde de PVC de 1,5 x 1,5 cm. Se pipetearon quince microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Entonces, se introdujeron los moldes en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

20 Se retiró un vial que contenía 3 gramos de fibrinógeno (Sigma n.º de lote F-3879) del congelador a -20°C y se colocó a 4°C durante 18 horas. Entonces se retiró la botella del congelador y se llevó a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadieron a la botella 60 ml de agua a 37°C y se dejó que se mezclaran durante 15 minutos a 37°C . Una vez en disolución, se sometió el fibrinógeno a diálisis contra TFI. Transcurridas las cuatro horas, se añadió ASH a una concentración de 80 mg/g de proteína total y se añadió Tween™ 80 (de origen animal) a una concentración de 15 mg/g
25 de proteína total. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. La concentración de trombina se ajustó para producir 0,1 unidades/mg de fibrinógeno (tras su mezclado) correspondientes a 25 unidades/ml de trombina (antes de la mezcla). Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que había sido enfriada previamente sobre hielo seco. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada con una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se colocaron sobre nitrógeno líquido durante treinta
35 segundos y luego se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 10 horas antes de colocarlos en el liofilizador. Luego se liofilizaron según lo descrito.

Resultados:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia
Nitrógeno líquido	5/5	3,6	0,5

Ejemplo 53

40 Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3130, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

5 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre un soporte de aluminio que se encontraba dentro de un pequeño túnel de congelación de nitrógeno. Se bombeó nitrógeno líquido en la parte frontal del túnel, donde luego pasó de estado líquido a gaseoso. Este cambio de estado y de presión a la entrada del túnel hizo que el gas ascendiera, permitiéndole fluir por los moldes y salir del túnel. Antes de añadir fibrinógeno o trombina, se enfriaron el túnel y los moldes con el gas de nitrógeno líquido durante 5 minutos.

10 Tras 5 minutos, se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se sacó el soporte de aluminio que contenía los moldes del túnel de congelación. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al interior del túnel de congelación. Se activó el nitrógeno líquido y se permitió su proceso durante 3 minutos. Tras ello, se devolvieron los apósitos al congelador a -80°C durante al menos 2 horas antes de liofilizarlos.

15 **Resultados:**

Grupo	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Vapor de nitrógeno líquido	3/6	2,8	0,98	93	48

Ejemplo 54

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3130, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

25 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

30 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre estantes de acero de un liofilizador. Las temperaturas de los estante fueron las siguientes: -5°C , -10°C , -15°C , -20°C , -25°C , -30°C , -40°C y -50°C . A cada temperatura, se colocar on los moldes sobre el estante durante 30 minutos para dejar que se equilibraran. Tras 30 minutos, se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, permanecieron dentro del liofilizador a sus temperaturas establecidas durante 30 minutos. Tras ello, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 24 horas antes de liofilizarlos.

Resultados:

Refrigerante de silicona del grupo ($^{\circ}\text{C}$)	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
-5	5/5	0,3	0,4	15,2	22,0
-10	5/5	2,2	0,8	80,0	20,5
-15	5/5	1,4	0,5	62,0	13,4
-20	3/5	2,0	0,7	72,0	18,2
-25	5/5	2,5	1,5	82	41,0
-30	5/5	2,8	0,4	88	22,4
-40	4/5	2,8	1,1	108	54,8

(continuación)

Refrigerante de silicona del grupo (°C)	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
-50	5/5	3,4	0,5	106	11,0

Ejemplo 55

5 Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos.

Se formuló el fibrinógeno de ERL, lote 3112, en TCF. El pH final del fibrinógeno fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la concentración del fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso.

10 Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de 7,4 ± 0,1. Se ajustó la trombina para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. Una vez preparada la trombina, se colocó sobre hielo hasta su uso.

15 La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de 4°C ± 2°C. Se retiraron los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre estantes de acero de un liofilizador. Las temperaturas de los estantes fueron las siguientes: -10°C, -20°C, -30°C y -40°C. A cada temperatura, se colocaron los moldes sobre el estante durante 30 minutos para dejar que se equilibraran. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, permanecieron dentro del liofilizador a sus temperaturas establecidas durante 30 minutos. Tras ello, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 2 horas antes de liofilizarlos.

20 Además, se fabricó un grupo de apósitos, colocándolos sobre una placa de aluminio que se situó encima de hielo seco, bien solo o seguido de la colocación sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos. Se llenó una jeringa de 3 ml dotada de una aguja de calibre 18 con 2 ml de fibrinógeno y una segunda jeringa de 1 ml dotada de una aguja de calibre 22 se llenó con 0,3 ml de trombina. Se dispensaron los contenidos de ambas jeringas simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, permanecieron sobre hielo seco durante 5 minutos o se colocaron sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos. Tras ello, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos 2 horas antes de liofilizarlos.

25

Refrigerante de silicona del grupo (°C)	N.º de aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
-10	2/5	0,1	0,2	6,0	12,5
-20	2/4	0,0	0,0	0	0
-30	4/5	1,3	1,2	68	39,2
-40	3/5	1,5	1,2	74	77,8
Hielo seco (-78°C)	4/5	1,8	1,3	50	47,1
Hielo seco (-78°C) y nitrógeno líquido (-196°C)	5/5	2,8	0,8	126	39,6

Resumen:

Grupo	N.º aptos/total de la EVPA	Prueba de adherencia	DE de la adherencia	Peso soportado (medio) (g)	DE del peso soportado
Hielo seco (-78°C)	6/6	3,7	0,5	153	37,3
<i>Hielo seco (-78°C)</i>	<i>4/5</i>	<i>1,8</i>	<i>1,3</i>	<i>50</i>	<i>47,1</i>
Hielo seco (-78°C) y nitrógeno líquido (-196°C)	5/5	3,4	0,5		
<i>Hielo seco (-78°C) y nitrógeno líquido (-196°C)</i>	<i>5/5</i>	<i>2,8</i>	<i>0,8</i>	<i>126</i>	<i>39,6</i>
Nitrógeno líquido (-196°C)	5/5	3,6	0,5		
Vapor de nitrógeno líquido (-196°C)	3/6	2,8	0,98	93	48
Refrigerante de silicona a -5°C	5/5	0,3	0,4	15,2	22,0
Refrigerante de silicona a -10°C	5/5	2,2	0,8	80,0	20,5
<i>Refrigerante de silicona a -10°C</i>	<i>2/5</i>	<i>0,1</i>	<i>0,2</i>	<i>6,0</i>	<i>12,5</i>
Refrigerante de silicona a -15°C	5/5	1,4	0,5	62,0	13,4
Refrigerante de silicona a -20°C	3/5	2,0	0,7	72,0	18,2
Refrigerante de silicona a -20°C	2/4	0,0	0,0	0	0
Refrigerante de silicona a -25°C	5/5	2,5	1,5	82	41,0
Refrigerante de silicona a -30°C	5/5	2,8	0,4	88	22,4
<i>Refrigerante de silicona a -30°C</i>	<i>4/5</i>	<i>1,3</i>	<i>1,2</i>	<i>68</i>	<i>39,2</i>
<i>Refrigerante de silicona a -40°C</i>	<i>4/5</i>	<i>2,8</i>	<i>1,1</i>	<i>108</i>	<i>54,8</i>
<i>Refrigerante de silicona a -40°C</i>	<i>3/5</i>	<i>1,5</i>	<i>1,2</i>	<i>74</i>	<i>77,8</i>
<i>Refrigerante de silicona a -50°C</i>	<i>5/5</i>	<i>3,4</i>	<i>0,5</i>	<i>106</i>	<i>11,0</i>

Ejemplo 56

Se cortó material de refuerzo y se colocó en cada molde de PETG de 2,4 x 2,4 cm. Se pipetearon veinticinco microlitros de sacarosa al 2% sobre cada una de las cuatro esquinas del material de refuerzo. Una vez completados los moldes, se colocaron en un congelador a -80°C durante al menos 60 minutos. Se formuló el fibrinógeno (ERL lote 3150) en TCF. Se ajustó la concentración de fibrinógeno hasta 37,5 mg/ml usando TCF. El pH final del fibrinógeno fue de $7,4 \pm 0,1$. Una vez preparado el fibrinógeno, se colocó sobre hielo hasta su uso. Se formuló la trombina en TCT. El pH final de la trombina fue de $7,4 \pm 0,1$. La concentración de la trombina se ajustó usando TCT para administrar 0,1 unidades/mg de fibrinógeno o 25 unidades/ml de trombina. La temperatura del fibrinógeno y de la trombina antes de dispensarse fue de $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Se retiraron tres moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre una placa de aluminio que se había enfriado previamente sobre hielo seco. Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Una vez llenos los moldes, se devolvieron al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Este fue el procedimiento de "control" para el experimento. Se retiró el resto de los moldes del congelador a -80°C y se colocaron sobre el banco de laboratorio, dejando que alcanzaran el equilibrio hasta la temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$). Se llenó un pipeteador de repetición con fibrinógeno y un segundo pipeteador de repetición, con trombina. Se dispensaron 2 ml de fibrinógeno y 300 microlitros de trombina simultáneamente en cada molde. Se dejó que los moldes permanecieran a temperatura ambiente durante los siguientes tiempos (1, 5, 10 y 15 minutos). Al finalizar cada punto temporal, se colocaron los moldes sobre una placa de aluminio que se había enfriado previamente sobre hielo seco durante 5 minutos. Tras los 5 minutos, se devolvieron los moldes al congelador a -80°C durante al menos dos horas antes de colocarlos en el liofilizador. Entonces se liofilizaron, y se analizaron su rendimiento y sus características bioquímicas según lo descrito.

Resultados:

Tiempo de mantenimiento del mezclado	Caracterización bioquímica de la prueba de rendimiento					
	N.º aptos/total de la EVPA	Puntuación de adherencia (media ± DE)	Peso soportado (media ± DE)	%Aα	% de Aα convertido en cadena α	% de γ convertido en dímero γ-γ
Control	2/2	4,0 ± 0	118 ± 14	69	31	0
1 min	2/2	3,5 ± 0,7	113 ± 50	65	35	0
5 min	2/2	2,0 ± 0	58 ± 14	63	37	9
10 min	0/2	2,0 ± 0	48 ± 0	45	55	39
15 min	0/2	0 ± 0	0 ± 0	59	41	38

Conclusiones:

5 Con el procedimiento de control, se fabricaron apósitos completamente funcionales que contenían 31% de cadena α libre y ningún dímero γ-γ. Se observaron resultados similares cuando se modificó el procedimiento para permitir la sedimentación del fibrinógeno y la trombina mezclados a temperatura ambiente durante un minuto. Cuando se mezclaron los reactivos y se mantuvieron durante 5 minutos, su rendimiento seguía siendo aceptable, aunque algo reducido. Se detectó dímero γ-γ a un nivel del 9% en estos apósitos. El aumento de tiempo hasta 10 minutos dio como resultado una pérdida inaceptable de actividad en el ensayo de EVPA y un aumento importante de la cantidad de cadena α libre, así como un nivel elevado de dímero γ-γ (39%). El aumento del tiempo de mantenimiento hasta 15 minutos produjo la pérdida tanto de adherencia como de la capacidad de soporte de cualquier peso.

Prueba de rendimiento de EVPA

Equipo y materiales:

- Transductor de alta presión en línea (Ashcroft Duralife™ o equivalente)
- 15 • Bomba peristáltica (Pharmacia Biotech™, Modelo P-1 o equivalente)
- Voltímetro (Craftsman™, Modelo profesional 82324 o equivalente)
- Ordenador dotado de un programa informático para registrar la información de presión o de voltaje
- Tubos Tygon™ (diversos tamaños) con conectores
- Baño de agua (Baxter Durabath™ o equivalente), preconfigurado a 37°C
- 20 • Cámara de incubación (VWR™, Modelo 1400G o equivalente), preconfigurada a 37°C
- Termómetro para controlar las temperaturas tanto del baño de agua como del horno
- Diversos fórceps, pinzas hemostáticas y tijeras
- Jeringas de 10 cc y de 20 cc con un orificio de aproximadamente 0,6 cm perforado en el centro y un orificio menor perforado tanto a través de la jeringa como del émbolo. Este orificio, perforado en el extremo de la jeringa, se usará para mantener el émbolo retraído y estacionario.
- 25 • Juntas tóricas (tamaño 10 y 13)
- Cubiertas de plástico para ajustar las jeringas de 10 cc y de 20 cc (de una longitud de aproximadamente 3,5 cm de longitud)
- P-1000 Pipetman™ con puntas
- 30 • Esfigmomanómetro con brazal y cámara de aire de tamaño neonatal
- Control lógico programable (CLP) para controlar las bombas con el fin de mantener el perfil de presión deseado (opcional). Se puede usar el control manual si se desea.

1. Materiales y compuestos químicos

- Aortas descendentes porcina (Pel-Freez Biologicals™, n.º de catálogo 59402-2 o equivalente)
- Goma de pegar de cianoacrilato (Vetbond™, 3M o equivalente)
- Aguja/s de calibre 18
- 5 • Solución salina al 0,9% mantenida a 37°C
- Colorante alimentario rojo
- Punzón/es vascular/es, de 2,8 mm u otros
- Envoltorio de plástico

2. Limpieza y almacenamiento de las arterias

- 10 1. Se almacenan las arterias a -20°C hasta su uso.
2. Se descongelan las arterias a 37°C en un baño de H₂O.
3. Se limpia el tejido graso y conjuntivo de la superficie externa de la arteria.
4. Se cortan las arterias en segmentos de ~ 5cm.
5. Se pueden volver a congelar las arterias hasta -20°C y almacenarlas hasta su uso.

15 3. Preparación de las arterias para el ensayo

1. Se da la vuelta a la arteria de manera que la pared interior suave quede hacia afuera.
2. Se extiende una junta tórica de tamaño 13 en una jeringa de 20 cc o una junta tórica de tamaño 10 en una jeringa de 10 cc con un orificio de aproximadamente 0,6 cm (0,25 pulgadas) en un lado.
- 20 3. Se empuja la arteria sobre la jeringa, teniendo cuidado de no desgarrarla o de que quede demasiado suelta. La arteria ha de ajustarse perfectamente en la jeringa. Se desliza otro junta tórica del mismo tamaño sobre el fondo de la jeringa.
4. Se presionan cuidadosamente ambas juntas tóricas sobre los extremos de la arteria. La distancia entre las juntas tóricas ha de ser de al menos 3,5 cm.
- 25 5. Con la cuchilla de unas tijeras quirúrgicas, se raspa suavemente la superficie de la arteria para volver la superficie de la arteria áspera.
6. Se usa una aguja de calibre 18 para perforar un orificio a través de la arteria en una zona del orificio del barril de la jeringa (véase la nota anterior).
- 30 7. Se inserta la punta del punzón de biopsia a través del orificio de la arteria. Se presiona el émbolo del punzón para abrir un orificio en la arteria. Se repite un par de veces la operación para asegurarse de que se abre el orificio y de que está limpio de tejido conjuntivo.
8. Se tapan los orificios dejados por arterias colaterales. En general, esto se hace cortando un parche de guante de látex y pegándolo sobre el orificio con goma de pegar de cianoacrilato. Se deja que se seque el pegamento durante al menos 10 minutos.
- 35 9. Se introduce la arteria en el recipiente calentado y humedecido, y se coloca en una cámara de incubación. Se dejan calentar las arterias durante al menos 30 minutos.

4. Preparación de las soluciones y del equipo

1. Se comprueba que el baño de agua y la cámara de incubación se mantienen a 29-33°C.
2. Se comprueba que hay suficiente solución salina al 0,9% en el depósito de la bomba para completar los ensayos del día. Se añade más si es necesario
- 40 3. Se introduce solución salina al 0,9% y solución salina al 0,9% con unas cuantas gotas de colorante alimentario rojo añadidas en recipientes en un baño de agua, de manera que las soluciones se calentarán antes de realizar el ensayo.

4. Es prepara el recipiente para calentar las arterias en la cámara de incubación forrándolo con KimWipes™ y añadiendo una pequeña cantidad de agua para mantener las arterias húmedas.

5. Se comprueban las burbujas de aire de los tubos. Si hay burbujas, se enciende la bomba y se deja fluir solución salina al 0,9% hasta eliminarlas.

5. Aplicación del apósito

1. Se abre la bolsa del apósito hemostático se retira el apósito hemostático.

2. Se coloca el apósito hemostático, con el refuerzo de malla hacia arriba, sobre el orificio de la arteria.

3. Se humedece lentamente el apósito hemostático con una cantidad de solución salina apropiada para el artículo que se esté probando.

10 **NOTA:** un apósito hemostático estándar (13–15 mg/cm² de fibrinógeno) de 2,4 x 2,4 cm se ha de humedecer con 800 µl de solución salina u otro sustituto sanguíneo. Se puede ajustar la cantidad de solución salina usada en función de las necesidades del experimento que se esté realizando en concreto. Sin embargo, es necesario anotar cualquier cambio en los formularios de recogida de datos.

15 **NOTA:** se humedece el apósito hemostático con gotas de solución salina al 0,9% calentada a 29–33°C u otro sustituto sanguíneo, teniendo cuidado de que la solución salina no se salga de los bordes. Se ha de anotar en los formularios de recogida de datos cualquier diferencia evidente en las características humectantes con respecto al control positivo.

4. Se coloca la cubierta despacio sobre el apósito hemostático, teniendo cuidado de que quede plana entre las juntas tóricas. Se presiona ligeramente para colocarla en su sitio.

20 5. Se envuelven la arteria y el apósito hemostático con un envoltorio de plástico.

6. Se envuelve con el brazal de presión sanguínea, teniendo cuidado de que la cámara de aire quede adyacente al apósito hemostático.

7. Se bombea la cámara de aire hasta 13,33–16 kPa y se controla la presión, y se vuelve a bombear si baja de 13,33 kPa. Se mantiene la presión durante 5 minutos.

25 **NOTA:** Se pueden modificar el tiempo y la presión según los requisitos del experimento; se debe anotar cualquier cambio de las condiciones estándar en los formularios de recogida de datos.

8. Tras la polimerización, se desenvuelve cuidadosamente la arteria y se anota el estado del apósito hemostático. Se debe anotar en el formulario de recogida de datos cualquier variación con respecto al control positivo.

30 **CRITERIO DE EXCLUSIÓN:** El refuerzo de malla debe permanecer sobre el orificio de la arteria. Si se desplaza durante la polimerización y no cubre el orificio completamente, el apósito hemostático deberá excluirse.

Procedimientos de prueba

1. Diagrama de configuración del equipo de prueba

La configuración del equipo de prueba se muestra en la Figura 2. Se pueden utilizar otros componentes adicionales no mostrados para la lectura (manómetro) o el control de la presión en el sistema.

35 2. Equipo y ensamblaje de las arterias

Se llena la arteria y la jeringa con solución salina al 0,9% roja calentada hasta 37°C, teniendo cuidado de minimizar la cantidad de burbujas de aire de la jeringa y la arteria. Realizar el llenado de la arteria con la abertura superior puede ayudar a ello. Se conecta la arteria y la jeringa al aparato de prueba, asegurándose de que haya la menor cantidad posible de burbujas de aire en el tubo. Se ha de calibrar la bomba peristáltica, de manera que administre aproximadamente 3 ml/min. Si es viable, el CLP debe manejarse según un intervalo predeterminado de presiones y de tiempos mantenidos según sea apropiado para el artículo que se esté analizando. Si se emplea el control manual, el perfil de presión/tiempo que se ha de seguir se consigue encendiendo y apagando la bomba manualmente en función de la presión del sistema leída por uno o más componentes de lectura de presión del sistema. Una vez finalizada la prueba, se analiza subjetivamente el apósito hemostático con respecto a la adhesión a la arteria y a la formación de un tapón en el orificio arterial. Se debe anotar en el formulario de recogida de datos cualquier variación con respecto al control positivo.

45 Criterios de éxito

Se considera que los apósitos hemostáticos que pueden soportar presiones durante 3 minutos son aptos según el ensayo. Una vez que un apósito hemostático haya superado satisfactoriamente el ensayo, se ha de detener

5 inmediatamente la recogida de datos, de manera que no se incluya en las gráficas la disminución natural de la presión producida en la arteria al finalizar la prueba. Si el operador no deja de recoger los datos, estos puntos se pueden eliminar del archivo de datos para evitar confundir la disminución de la presión natural que se produce tras la prueba con un fallo real del apósito. El periodo de prueba completo desde la aplicación del apósito hemostático hasta la finalización debe cumplir los criterios preestablecidos. La presión máxima alcanzada se ha de registrar en el formulario de recogida de datos.

NOTA: El desafío típico es 33,33 kPa durante tres minutos en una etapa, pero se puede modificar en función del artículo que se esté analizando. Se debe anotar en el formulario de recogida de datos cualquier variación con respecto al procedimiento estándar.

10 **Crterios de fallo**

Se considera que los apósitos hemostáticos que comienzan a soltar solución salina en cualquier momento de la prueba no han pasado el ensayo. NOTA: Se pueden ignorar los fallos de elaboración provocados por el ensanchamiento de la arteria y continuar o reiniciar la prueba (siempre y cuando el tiempo de prueba total no supere el límite establecido).

15 Cuando no se producen fugas, se debe dejar que la presión baje a ~2,5 kPa antes de dejar de recoger datos, de manera que se pueda observar fácilmente el fallo en las gráficas. Se deben registrar en el formulario de recogida de datos las presiones a las que se producen fugas. En el caso de detener la recogida de datos en medio del experimento debido a un fallo del equipo, se pueden recoger los datos a mano en intervalos de 5 segundos hasta el final de la prueba o el fallo del apósito hemostático, lo que ocurra primero. Los puntos de los datos se han de registrar en la parte de atrás del formulario de recogida de datos, marcados claramente e introducidos a mano en las tablas de datos.

20 **Crterios de exclusión**

Si el periodo de prueba total supera el máximo permitido para el procedimiento, independientemente de la causa, los resultados se deben excluir. Si se producen fugas en arterias colaterales que se pueden arreglar bien con un parche o presionando con el dedo, se deben excluir los resultados. Si la prueba no es superada por las fugas en las juntas tóricas, los resultados se deben excluir. Si el soporte de malla no cubre completamente el orificio de la arteria, se deben excluir los resultados.

Prueba de rendimiento de la adherencia

1. Equipo y materiales

30 Pinza/s hemostática/s, arteria porcina y apósito hemostático (habitualmente tras finalizar el ensayo de EVPA, aunque no es necesario realizarlo para hacer el ensayo de adherencia).

I. Preparación de la arteria + el apósito

35 Tras aplicar el apósito sin finalizar el ensayo de EVPA, el apósito está listo para el ensayo de adherencia y la prueba del límite de peso (si procede). Tras aplicar el apósito y tras el ensayo de EVPA, se desconectan la arteria y el sistema de jeringa lentamente de la bomba para que no se pulverice solución por todas partes. La solución salina roja caliente del ensayo de EVPA permanece en la jeringa hasta que se completa el ensayo de adherencia y la prueba de límite de peso (si procede).

Realización del ensayo de adherencia

1. Tras preparar la arteria y el apósito (con o sin ensayo de EVPA) se levanta suavemente la esquina de la malla y se une una pinza hemostática de masa conocida a la esquina.

40 NOTA: Si el AF genera una fuga en canal durante la realización del ensayo de EVPA, se analiza la adherencia en el lado opuesto del apósito hemostático para obtener una evaluación más exacta de la adherencia global.

2. Se suelta la pinza hemostática suavemente, teniendo cuidado de que no se caiga o gire. Se da la vuelta a la jeringa de modo que la pinza hemostática se aproxime a la parte superior y se deja que la pinza hemostática se despegue del apósito siempre y cuando lo permita el apósito. Esto habitualmente se produce en 10 segundos. Cuando la pinza hemostática ha terminado de despegarse del apósito, se puntúa la adherencia del vendaje según la siguiente escala:

Puntuación del rendimiento del apósito	Cantidad de adherencia
4	90+%

(continuación)

Puntuación de rendimiento del apósito	Cantidad de adherencia
3	75–90%
2	50–75%
1	~50%
0,5	Sólo el tapón sujeta el pinza hemostática
0	No hay adherencia

Crterios de exclusión

- 5 El refuerzo de malla debe permanecer sobre el orificio de la arteria. Si se desplaza durante la polimerización y no cubre el orificio completamente, el apósito hemostático debe excluirse.

Crterios de éxito

Los apósitos que se ofrecen con una puntuación de adherencia de 3 se consideran que han superado satisfactoriamente el ensayo.

Crterios de fallo

- 10 Si un apósito no se adhiere a la arteria tras la aplicación y/o antes de realizar el ensayo de EVPA, recibe una puntuación de 0 y no supera la prueba de adherencia. Si un apósito recibe una puntuación < 2, se considera que el apósito no ha superado la prueba de adherencia.

Ensayo de peso soportado

- 15 Tras la puntuación inicial de la “prueba de adherencia”, se pueden añadir pesos a la pinza hemostática de una manera ascendente hasta que el soporte de malla sea empujado por completo fuera de la arteria. Entonces se registra el peso máximo soportado por el apósito como una medida de la cantidad de peso que el apósito podría soportar unido a la arteria.

Ensayo de humedad

- 20 Las determinaciones de la humedad se llevaron a cabo con un sistema analizador de la humedad Brinkman Metrohm. El sistema contiene los siguientes componentes individuales: Procesador de muestras de horno 774, controlador 774SC, Titrando 836, 5 ml y 50 ml de unidades de Dosino 800 y un agitador 801. Se conectó el sistema a un ordenador usando el programa informático Tiamo de Brinkman para la recogida, el análisis y el almacenamiento de datos. El sistema de humedad se configura y emplea según las recomendaciones y especificaciones de los fabricantes para medir el contenido de humedad de muestras liofilizadas mediante el procedimiento de Karl Fischer.

- 25 Se encendieron todos los componentes y se permitió que alcanzaran la temperatura de funcionamiento antes de su uso. Se emplearon lactosa y agua como patrones y para calibrar el instrumento. Una vez calibrada correctamente la máquina, se prepararon las muestras de la siguiente manera: los trozos de apósito que pesaban al menos 30 mg se colocaron en viales y se taparon. Los viales se colocaron en un procesador de muestras de horno 774 en orden numérico y se colocó un vial tapado vacío en el espacio de acondicionamiento. Entonces se comenzó a utilizar la máquina para determinar el contenido de humedad (humedad residual) de los controles y de las muestras.
- 30

Electroforesis en gel de poliacrilamida–dodecil sulfato de sodio

- 35 Se corta cada apósito en cuatro partes, aproximadamente 50 mg por sección y luego se coloca una sección en un tubo cónico de 15 ml. Para la producción del control (i.e. tiempo 0), se añaden 1,0 ml de solución disolvente de Okuda (urea 10M; dodecilsulfato de sodio al 0,1%, P–Mercaptoetanol al 0,1%). Para las otras 3 piezas, se añaden 80 µl de solución salina al 0,9% para humedecer el apósito. Entonces se incuban las piezas a 37°C durante 2, 5 y 10 minutos o el tiempo que se desee. Para detener la reacción en el momento deseado, se añade 1,0 ml de solución disolvente de Okuda. Entonces se incuban las muestras a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se incuban a 70°C durante 30 minutos.

- 40 Para preparar las muestras para cargarlas sobre el gel, se añadieron las muestras previamente disueltas en solución disolvente de Okuda a tampón de muestra, de manera que una alícuota de 20 µl contenía 10 µg. Entonces se añadió

5 un μl de ditioneitol 0,1M a cada muestra. Después se cargaron veinte μl de cada muestra diluida sobre gel de Tris–glicina al 8% (Invitrogen), de 1,0 mm de espesor, 10 pocillos. Luego se procesaron los geles a 140 V hasta que el frente de colorante alcanzó el extremo del gel. Luego se retiraron y se colocaron en tinte de azul de Coomassie (metanol al 50% (v/v), azul brillante de Coomassie al 0,25% (p/v), ácido acético al 10% (p/v) en H_2O) en una plataforma agitadora durante un mínimo de 1 hora. Después se transfirió el gel a la solución Destain (metanol al 25%, ácido acético al 10%, H_2O al 65%) en una plataforma de agitación hasta que el fondo quedó casi incoloro. Tras el desteñido, se exploran los geles y se analizan las bandas de dímero γ – γ y las bandas de $\text{A}\alpha$ y $\text{B}\beta$ con el programa informático de densitometría Scion para determinar la cantidad de conversión producida.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento de producción de un apósito sólido para tratar tejido lesionado en un mamífero que comprende: (a) formar una mezcla acuosa líquida de un componente de fibrinógeno y un activador de fibrinógeno a una temperatura de entre 2°C y 8°C para inhibir la activación del componente de fibrinógeno por parte del activador de fibrinógeno; (b) reducir la temperatura entre -10°C y -196°C de dicha mezcla acuosa para formar una mezcla acuosa congelada; y (c) reducir el contenido de humedad de dicha mezcla acuosa congelada hasta menos del 53% para producir un apósito sólido que tenga una capa hemostática homogénea que consista en dicho componente de fibrinógeno y dicho activador de fibrinógeno.
- 10 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho apósito sólido comprende además al menos una capa de soporte.
- 3.- El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha capa de soporte comprende un material de refuerzo.
- 4.- El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha capa de soporte comprende uno de los siguientes:
 un material de soporte interno;
 un material reabsorbible; y
 15 un material no reabsorbible.
- 5.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha capa hemostática también contiene un reticulador de fibrina y/o una fuente de iones de calcio.
- 20 6.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha capa hemostática también contiene uno o más de los siguientes: al menos una carga; al menos un agente de solubilización; al menos un agente formador de espuma; y al menos un agente de desmoldeo.
- 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho agente de solubilización se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, maltosa, dextrosa, manosa, trehalosa, manitol, sorbitol, albúmina, hialurona, ácido hialurónico, sorbato, polisorbato y mezclas de dos o más de los mismos.
- 25 8.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha capa hemostática también contiene al menos un complemento terapéutico seleccionados del grupo que consiste en antibióticos, anticoagulantes, esteroides, fármacos cardiovasculares, factores de crecimiento, anticuerpos (poli y mono), quimioatrayentes, anestésicos, agentes antiproliferativos/antitumorales, antivirales, citocinas, factores estimulantes de colonias, antifúngicas, antiparasitarios, antiinflamatorios, antisépticos, hormonas, vitaminas, glucoproteínas, fibronectina, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, proteoglicanos, antiangiogénicas, antígenos, nucleótidos, lípidos, liposomas, inhibidores de la fibrinólisis y reactivos de terapia génica.
- 30 9.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho complemento terapéutico está presente en una cantidad igual o mayor de su límite de solubilidad en fibrina.
- 10.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha capa hemostática es un monolito.
- 11.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha mezcla acuosa congelada es liofilizada en (c).
- 35 12.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho componente de fibrinógeno se selecciona del grupo que consiste en fibrinógeno humano, fibrina I humana, fibrina II humana, cadena α de fibrinógeno humano, cadena β de fibrinógeno humano, cadena γ de fibrinógeno humano y mezclas de dos o más de los mismos.
- 13.- El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho fibrinógeno se selecciona del grupo que consiste en fibrinógeno producido recombinantemente y fibrinógeno transgénico.
- 40 14.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho activador de fibrinógeno se selecciona del grupo que consiste en trombinas, protrombinas, venenos de serpiente y mezclas de dos cualquiera o más de los mismos.
- 15.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho activador de fibrinógeno se selecciona del grupo que consiste en trombina producida recombinantemente y trombina transgénica.
- 45 16.- Un apósito sólido para tratar tejido lesionado en un mamífero preparado mediante el procedimiento de la reivindicación 1.
- 17.- Una mezcla acuosa congelada homogénea preparada según (a) y (b) de la reivindicación 1.
- 18.- Una mezcla acuosa líquida homogénea preparada según (a) de la reivindicación 1.
- 19.- El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha capa de soporte comprende un material de soporte frontal.

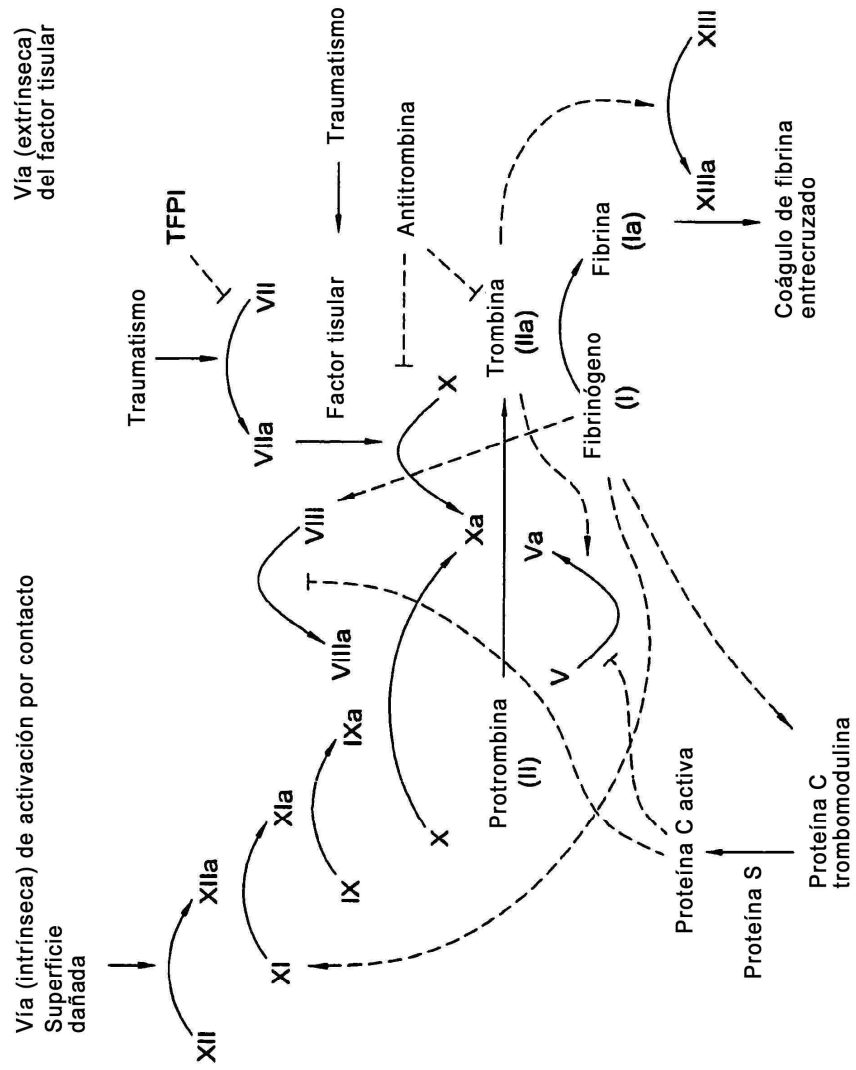


FIGURA 1. CASCADA DE COAGULACIÓN HUMANA

Configuración del ensayo de arteriotomía porcina ex vivo
EVPA*

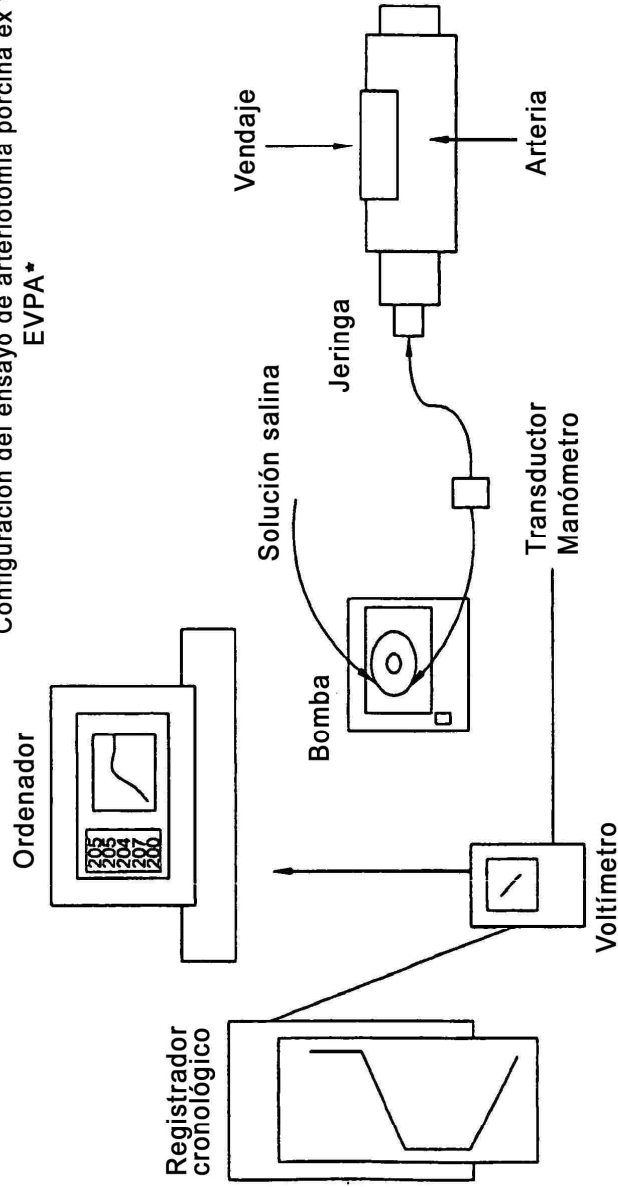


FIGURA 2

Resultados de dosis de fibrinógeno para apósitos monolíticos

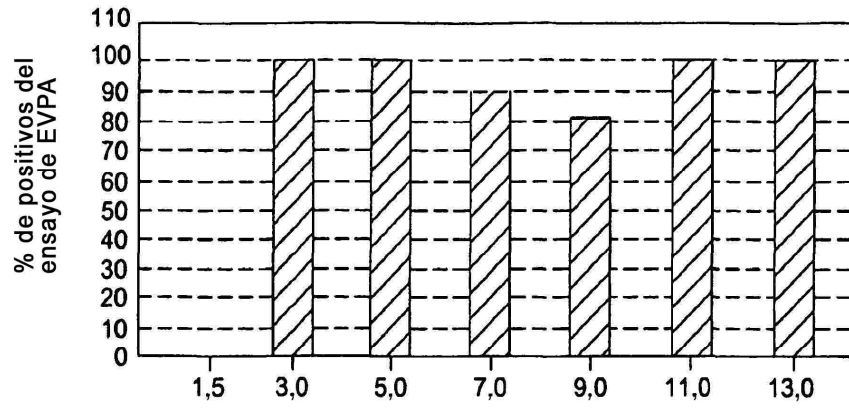


FIGURA 3A

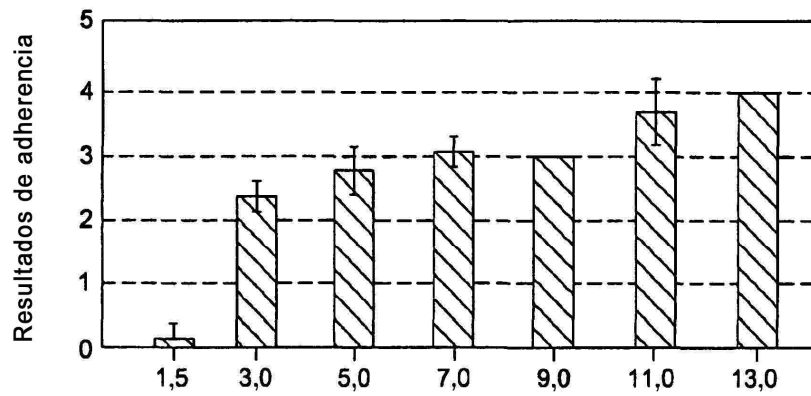


FIGURA 3B

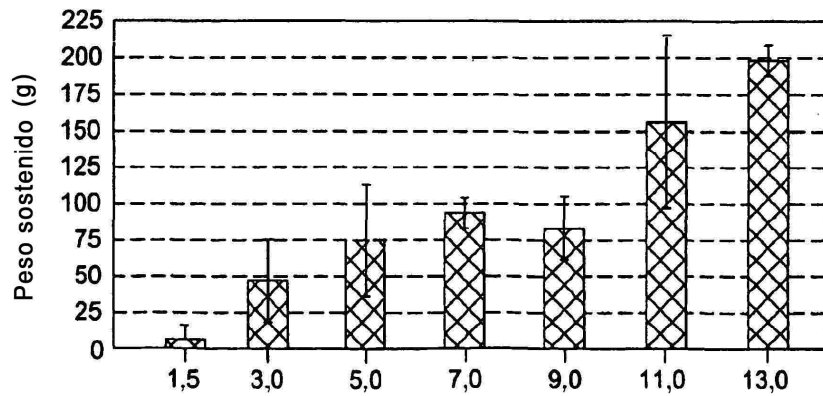


FIGURA 3C

EVPA y rendimiento de la adherencia de los apósitos al diluir trombina

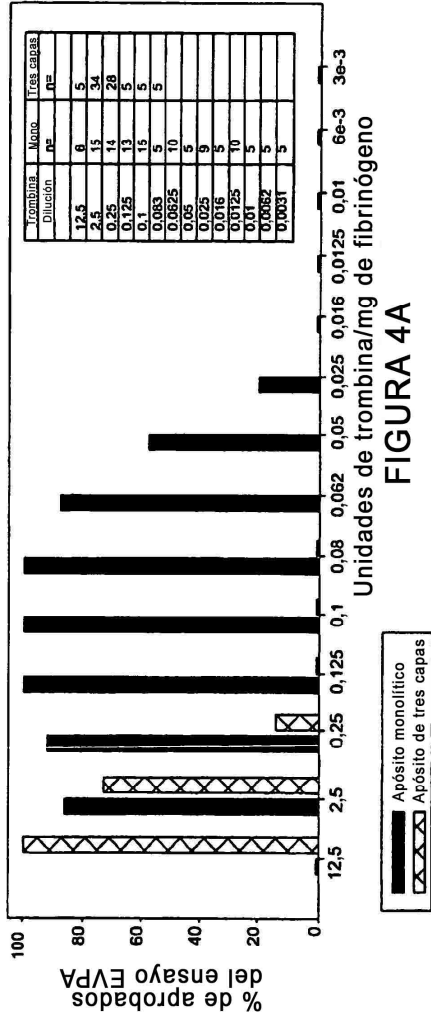


FIGURA 4A

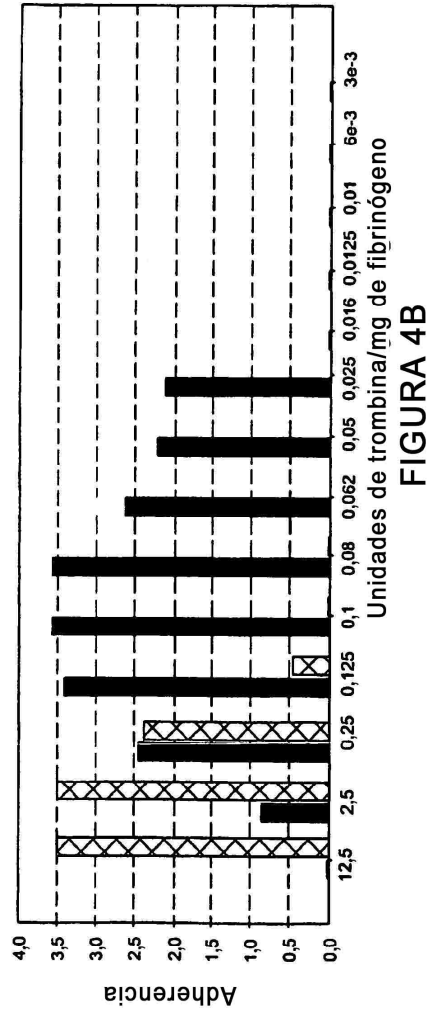


FIGURA 4B

Efecto de almacenamiento en congelación (-80°C) sobre el rendimiento del apósito

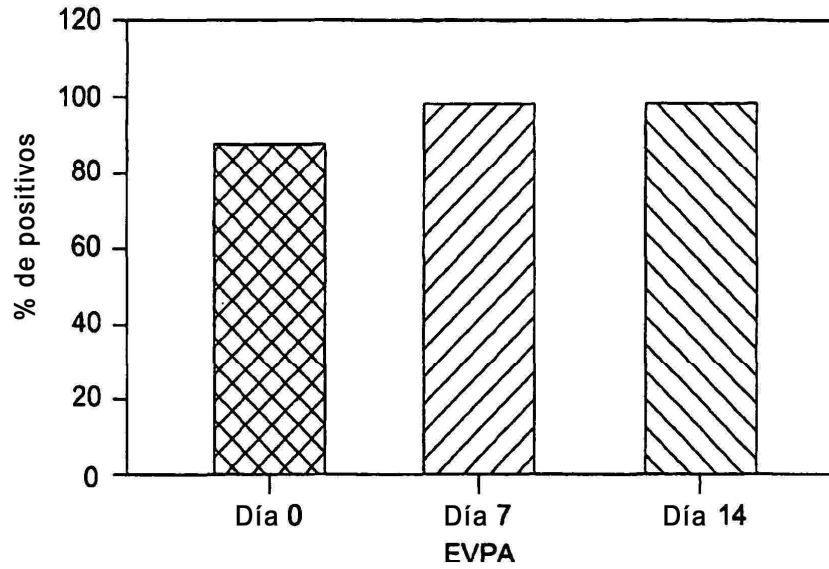


FIGURA 5A

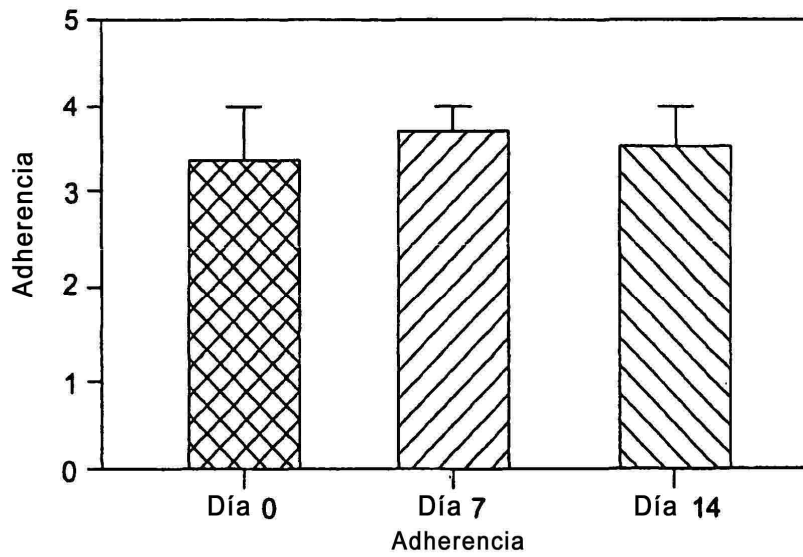


FIGURA 5B

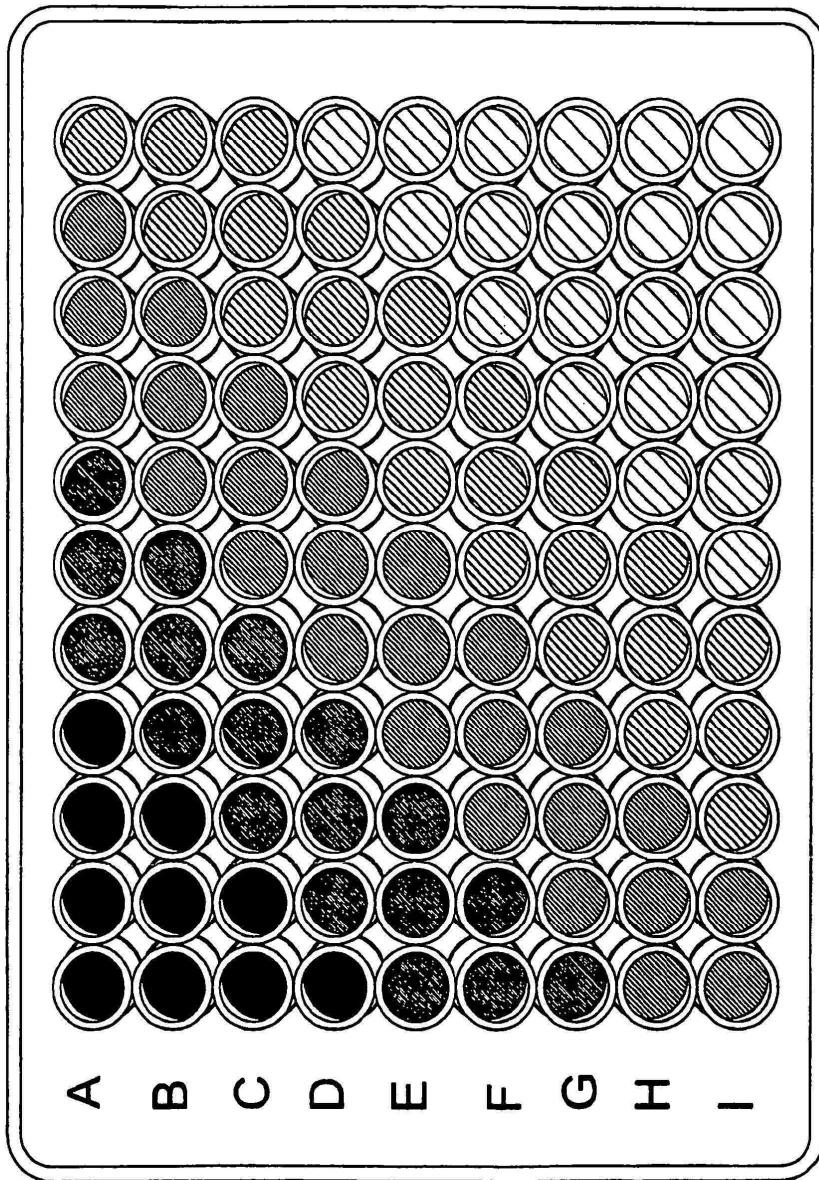


FIGURA 6 A

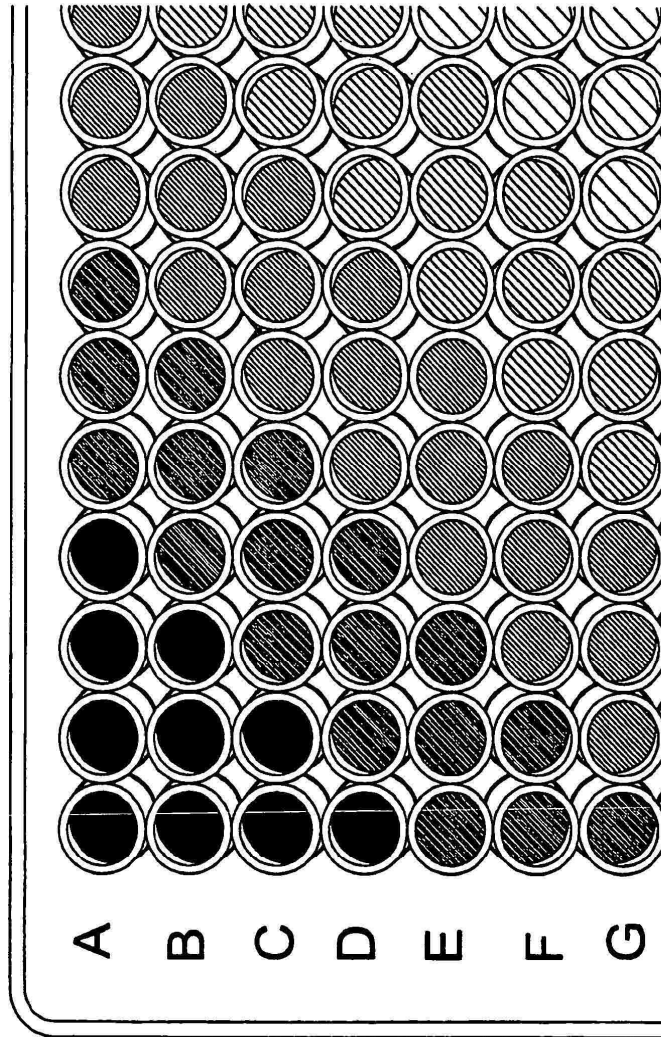


FIGURA 6B

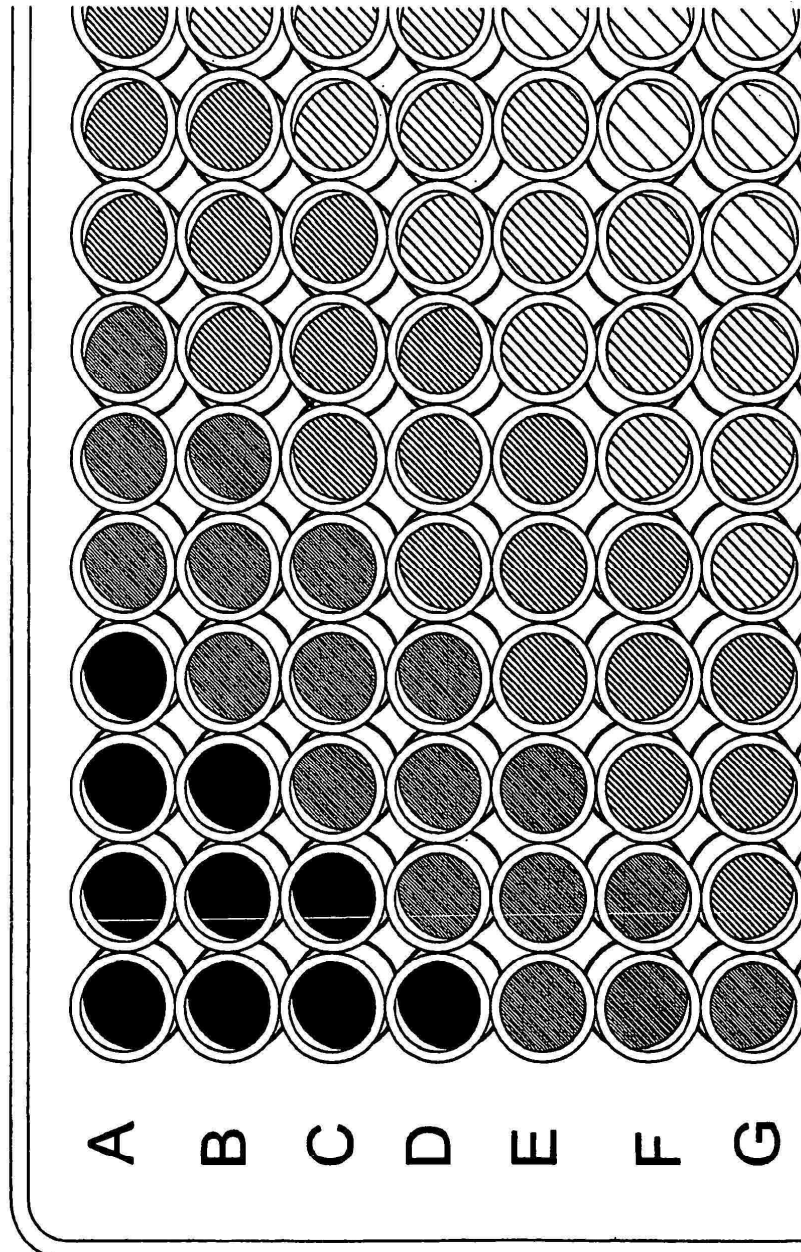


FIGURA 6C

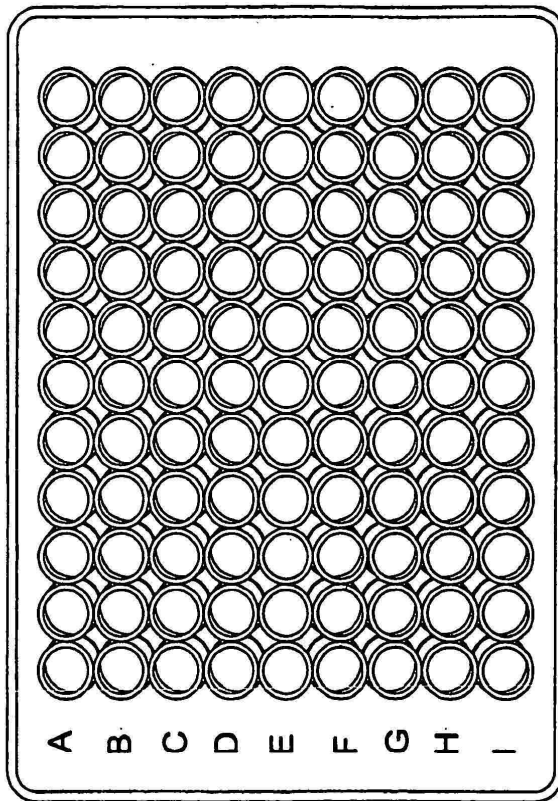


FIGURA 6D

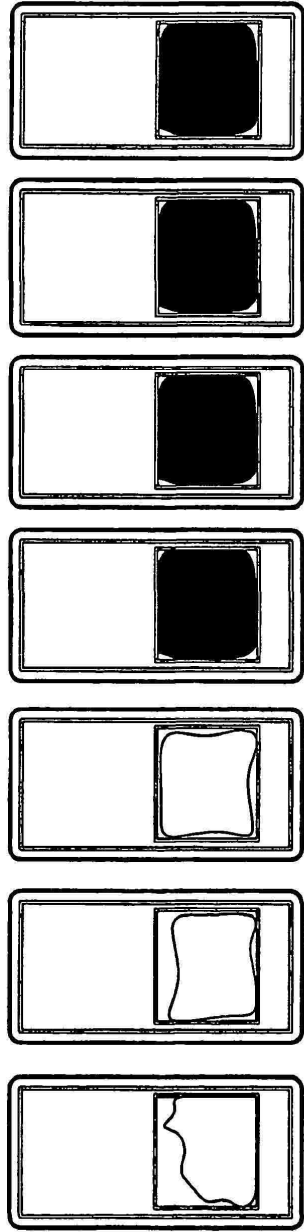


FIGURA 7A

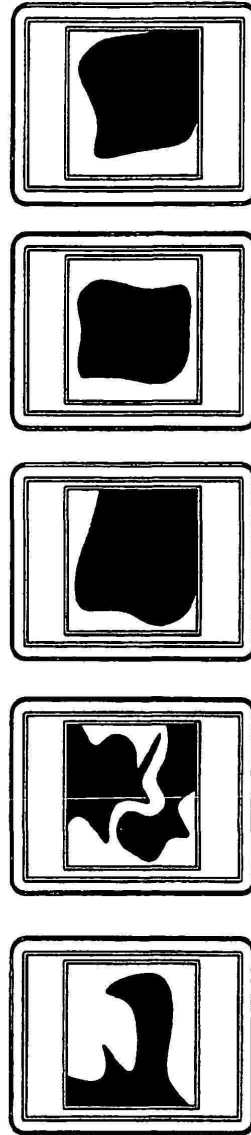


FIGURA 7B