

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 939**

51 Int. Cl.:

A61L 24/10 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

A61L 24/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08763426 .7**

96 Fecha de presentación: **01.07.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2170414**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **Kits, formulaciones y soluciones que tienen cantidades de agentes de visualización enzimáticamente permisivos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

02.07.2007 EP 07111565

02.07.2007 US 929534 P

09.04.2008 US 71031

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

02.01.2013

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

02.01.2013

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
WEIZMANN SCIENTIFIC PARK BLDG. 14, NES-
ZIONA P.O. BOX 619
76106 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**NUR, ISRAEL;
MEIDLER, ROBERTO y
BAR, LILIANA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 939 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

Kits, formulaciones y soluciones que tienen cantidades de agentes de visualización enzimáticamente permisivos y usos de las mismas

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a un kit de adhesivo de fibrina para preparar una formulación de adhesivo de fibrina que comprende una concentración enzimáticamente permisiva de un agente de visualización.

Antecedentes de la invención

- 10 El adhesivo de fibrina es, por lo general, un producto de la sangre obtenido a partir de fuentes comerciales o determinados centros regionales de transfusión de sangre. Los componentes que se utilizan comúnmente en la preparación de adhesivos de fibrina son fibrinógeno, trombina, factor VIII, Factor XIII, fibronectina, vitronectina y factor de von Willebrand (vWF).

- 15 El adhesivo de fibrina se forma por una reacción enzimática que implica, entre otras cosas, al fibrinógeno, a la trombina y al Factor XIII. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina por acción enzimática a una velocidad determinada por la concentración de trombina. El Factor XIII, se encuentra presente por lo general en el componente de fibrinógeno del adhesivo y es una enzima del sistema de coagulación de la sangre que reticula y estabiliza el coágulo de fibrina. Este proceso elude la mayoría de las etapas de la coagulación normal e imita su última fase. Determinados fabricantes añaden agentes antiproteolíticos a la formulación de adhesivo de fibrina (como se describe en el documento WO-A-93/05822) o eliminan específicamente el plasminógeno con el fin de detener o retrasar la fibrinólisis (como se describe en los documentos US-B-5.792.835 y US-B-7.125.569).

- 20 Se han notificado numerosos usos del adhesivo de fibrina en diversos campos de la medicina, incluyendo el uso como sellador, agente hemostático, antiadherente y en una variedad de cirugías laparoscópicas. Sin embargo, los adhesivos de fibrina dan como resultado una película transparente que puede distinguirse en la cirugía abierta cuando la iluminación es óptima, pero que podría pasar inadvertida en determinadas cirugías laparoscópicas. Por lo tanto, resultaría ventajoso utilizar un adhesivo de fibrina teñido que permita al usuario evaluar el espesor del material aplicado y mejorar su visibilidad durante la cirugía.

- 25 En el documento US-B-7.009.034 se desvela una composición adecuada para recubrir un tejido de un paciente, que comprende polímeros, "reticuladores" de molécula pequeña que permanecen en el polímero reticulado y un agente de visualización. Los polímeros desvelados pueden ser sintéticos o naturales. Los polímeros naturales mencionados en el documento US-B-7.009.034 son colágeno, fibrinógeno, albúmina y fibrina, polisacáridos, o glicosaminoglicanos. En la descripción del documento US-B-7.009.034 no se dice nada acerca del Factor XIII y/o la trombina. Los Ejemplos demuestran que la adición de un agente de visualización a la composición del documento US-B-7.009.034 en una alta concentración del 1,25% no provocaba ningún cambio inaceptable en los tiempos de gelificación. De acuerdo con la descripción, puede utilizarse en la mezcla final una concentración superior al 1,25%, hasta el límite de solubilidad del agente de visualización.

- 35 Las siguientes solicitudes de patente no desvelan o sugieren ningún efecto no deseado de la adición de colorante sobre la actividad de la trombina.

- 40 En el documento US-A-2003/0077272 se desvelan geles proteínicos que tienen agentes de visualización. Los geles desvelados comprenden fibrinógeno, trombina y "reticuladores" de molécula pequeña, que permanecen en el polímero reticulado. En algunos ejemplos se mencionan posibles preparaciones de una composición de fibrinógeno y Factor XIII, que utiliza hidrogeles y la formación de adhesivo de fibrina por la trombina. En estos ejemplos se desvela la adición de un colorante fluorescente a la solución de fibrinógeno a una concentración del 0,0002 al 0,02% y no se dice nada sobre la concentración final de fibrina en el adhesivo después de la mezcla del fibrinógeno con la solución de trombina.

- 45 En el documento US-A-2005/0049178 se desvela un agente para la oclusión de los vasos sanguíneos que comprende un colorante fisiológico seguro. El colorante permite teñir los vasos sanguíneos embolizados. Un agente preferente es una solución de fibrinógeno líquido que puede utilizarse en cooperación con una preparación de trombina líquida y Factor XIII. En la solicitud de patente no se desvela ninguna concentración concreta de colorante.

- 50 En el documento JP-A-2002104996 se desvela una composición hemostática que contiene un principio activo, tal como trombina, y una materia colorante que puede evitar un mal uso durante el tratamiento médico, es decir, la confusión entre las aplicaciones tópicas y las inyecciones. El colorante se encuentra presente en la composición en un amplio intervalo del 0,0001 al 1%.

- 55 En el documento WO-A-91/04073 se desvela una terapia fotodinámica que utiliza un material que absorbe energía tal como un colorante y un agente de soldadura tal como fibrinógeno o adhesivo de fibrina para conseguir la soldadura de un tejido. De acuerdo con la invención, el colorante se considera un principio químicamente activo y la soldadura sólo se produce cuando se transmite una cantidad suficiente de energía al material que absorbe energía

utilizando una fuente de energía tal como un láser.

El documento US-A-5.292.362 se refiere a una composición que incluye por lo menos un péptido natural o sintético y por lo menos un material de soporte que puede activarse mediante energía para formar una unión o recubrimiento. El fibrinógeno y la trombina se mencionan entre muchos péptidos que pueden emplearse como primer componente de la composición. El segundo componente contribuye con el primer componente produciendo un mayor grado de interrelación entre las moléculas del primer componente. De acuerdo con la descripción, la composición puede incluir también cromóforos endógenos o exógenos. Los colorantes se encuentran presentes en la composición en un amplio intervalo comprendido entre aproximadamente el 0,01% en peso y el 50% en peso en base al peso total de la composición. En el documento WO 97/15188 se desvela un sellador biológico reforzado que comprende una composición de fibrinógeno y una composición de trombina, que puede comprender opcionalmente una sustancia indicadora coloreada.

En el documento WO 03/047530 se desvelan selladores de fibrina que pueden comprender colorantes en una cantidad del 0,01% en peso al 50% en peso.

Sumario de la invención

Los adhesivos de fibrina se utilizan cada vez más en la cirugía para reducir el sangrado y las adherencias, para sellar o rellenar superficies y/o para mejorar la cicatrización de heridas. Las formulaciones de adhesivo de fibrina modernas son incoloras; por lo tanto la aplicación de la preparación en el punto de exudación sigue siendo difícil de controlar. La adición de un agente de visualización mejora las cualidades de aplicación diana del adhesivo de fibrina, por ejemplo, simplifica la localización de la zona de aplicación, permite al usuario evaluar el espesor del material aplicado y mejora la visibilidad del material aplicado. Sin embargo, se descubrió de acuerdo con la presente invención, que la adición de mayores concentraciones de los agentes de visualización a la formulación de adhesivo de fibrina influye en la actividad de la trombina.

Además, se descubrió de acuerdo con la invención, que diferentes agentes de visualización influían manera diferente en la actividad de coagulación de la trombina o en la formación de coágulos.

La presente invención resuelve este problema ya que el agente de visualización se añade a una concentración que es permisiva para la actividad de la trombina o de cualquier otra enzima capaz de formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno.

Ventajosamente, de acuerdo con la invención, el agente de visualización se añade al adhesivo de fibrina o a un componente del mismo a una concentración que es lo suficientemente baja como para ser enzimáticamente permisiva pero que es suficiente para teñir claramente el sitio de aplicación de manera que pueda localizarse el área, pueda evaluarse el espesor del material aplicado y/o pueda distinguirse el material aplicado.

La invención proporciona un kit de adhesivo de fibrina para preparar una formulación de adhesivo de fibrina para su aplicación a una superficie de una parte del cuerpo de un paciente, como se define en la reivindicación 1.

La enzima proteolítica de la invención es la trombina.

El kit puede comprender adicionalmente un catalizador capaz de inducir la reticulación de la fibrina.

En una forma de realización de la presente invención, el catalizador es una transglutaminasa tal como el Factor XIII.

En otra forma de realización adicional de la invención, el Factor XIII se incorpora en el componente que comprende el fibrinógeno.

Los kits de adhesivo de fibrina de acuerdo con la invención pueden utilizarse para estimular la coagulación de la sangre, para evitar y/o reducir las adherencias, para su uso en la cirugía laparoscópica y/o para sellar o rellenar superficies.

Breve descripción de los dibujos

Las características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, ejemplos, reivindicaciones y las siguientes figuras.

Fig. 1A-1B: muestra la actividad de la trombina en dos lotes diferentes (A y B) después de la incubación prolongada de la solución de trombina teñida y sin teñir con o sin exposición a la luz natural. Los resultados obtenidos se expresan como un factor de reducción de la actividad de coagulación de la trombina en comparación con la actividad de la muestra en T0 (100%). IC - índice carmín.

Fig. 2A-2B: muestra el peso del coágulo (A) y la cantidad de proteína coagulable (B) de ambos adhesivos de fibrina teñidos y sin teñir en diversos instantes de tiempo. El experimento se llevó a cabo en una situación *in vivo* y las mediciones se llevaron a cabo 1, 3, 5, 7 y 12 días después de la extracción de los restos de coágulo del abdomen de la rata. Cada punto representa el valor medio de las determinaciones por triplicado.

Descripción detallada de la invención

5 La invención se refiere a un kit de adhesivo de fibrina que comprende una concentración enzimáticamente permisiva de agente de visualización. La expresión "adhesivo de fibrina" tal como se utiliza en el presente documento incluye un sellador de fibrina, una película de fibrina, una red de fibrina, una retícula de fibrina, una malla de fibrina, una matriz de fibrina y un gel de fibrina.

10 La invención se basa en los hallazgos de la invención que demuestran los efectos no deseados de la adición de colorante sobre la actividad de la trombina. Por ejemplo, se descubrió de acuerdo con la presente invención, que la adición de mayores concentraciones de agentes de visualización a una solución de trombina influye en la actividad de coagulación de la trombina o en la formación de coágulos cuando se aplica a una solución de fibrinógeno. Además, se descubrió que diferentes agentes de visualización influyen de manera diferente en la actividad de coagulación de la trombina o en la formación de coágulos. Además, se descubrió que la exposición a la luz de un agente de visualización puede aumentar los efectos no deseados del agente sobre la actividad de la trombina. Por lo tanto, la presente invención proporciona un adhesivo de fibrina coloreada o una solución de una enzima proteolítica capaz de formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno y los procedimientos para mejorar las cualidades de aplicación diana del adhesivo sin cambiar sustancialmente la actividad de coagulación y/o las propiedades mecánicas del adhesivo formado. Ventajosamente, de acuerdo con la invención, el agente de visualización se añade al adhesivo de fibrina o a un componente del mismo a una concentración que es lo suficientemente baja como para ser enzimáticamente permisiva pero es suficiente para teñir claramente el sitio de aplicación de manera que pueda localizarse la zona, pueda evaluarse el espesor del material aplicado y/o pueda distinguirse el material aplicado.

20 En un aspecto, la invención se refiere a un kit de adhesivo de fibrina tal como se define en la reivindicación 1.

En una forma de realización de la invención, cada uno de los componentes del adhesivo se encuentra en envases separados tales como jeringas, que son vaciadas simultáneamente y se forma un coágulo de fibrina cuando se mezclan los componentes.

25 La concentración del fibrinógeno en los kits de la invención puede estar en el intervalo comprendido entre aproximadamente 15 y aproximadamente 150 mg/ml, entre 40 y aproximadamente 100 mg/ml, o entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 mg/ml.

Los agentes de visualización desvelados en el presente documento pueden ser compatibles con la sangre, es decir, un color que proporciona contraste cuando se aplica sobre una superficie sangrante, tal como el azul.

30 El espectro preferente del agente de visualización es el espectro correspondiente a un colorante visible para el ojo humano. Los agentes de visualización de la invención son azul de metileno e índigo carmín. En una forma de realización de la invención, el agente de visualización es azul de metileno. En otra forma de realización de la invención, el agente de visualización es índigo carmín.

35 El término "enzima" en la expresión "enzimáticamente permisiva" se refiere a la enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno. Por "concentración del agente de visualización enzimáticamente permisiva" se entiende que el agente de visualización se encuentra presente en la solución proteolítica o en el adhesivo de fibrina a una concentración que permite la solubilidad y que permite retener de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 100% de la actividad de coagulación de la enzima proteolítica en ausencia del agente de visualización, es decir, la actividad de coagulación residual de la enzima proteolítica después de añadir el agente de visualización se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente el 50 y aproximadamente el 100% de la actividad inicial. En una forma de realización de la invención, la actividad de coagulación residual tras la adición del agente de visualización se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente el 90 y aproximadamente el 100%.

45 La actividad de coagulación de la trombina puede medirse directamente, por ejemplo, mediante el procedimiento de ensayo de la Farmacopea Europea (0903/1997), modificado, y/o de manera indirecta, tal como midiendo la longitud de migración sobre una superficie inclinada (o ensayo de la gota) tal como se describe en los Ejemplos que se presentan más adelante, o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.

50 En la presente invención, la enzima proteolítica es la trombina. La solución de trombina comprende por lo general trombina y cloruro cálcico. La concentración inicial de trombina antes de la adición del agente de visualización puede encontrarse en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4.000 IU/ml, o en el intervalo comprendido entre aproximadamente 800 y aproximadamente 1.200 IU/ml. La concentración de cloruro cálcico en la solución puede encontrarse en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6,2 mg/ml, o en el intervalo comprendido entre aproximadamente 5,6 y aproximadamente 6,2 mg/ml, tal como a la concentración de 5,88 mg/ml. La solución de trombina puede comprender también excipientes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a la composición farmacéutica. Ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, albúmina humana, manitol, acetato sódico y agua para inyección. La albúmina humana en la solución puede encontrarse en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 mg/ml. El manitol puede encontrarse en el intervalo de concentración comprendido entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 mg/ml. El acetato sódico puede añadirse también a

la solución en el intervalo comprendido entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 mg/ml.

En una forma de realización de la invención, el kit de la invención comprende adicionalmente un catalizador capaz de inducir la reticulación de la fibrina.

5 El término "catalizador" se refiere generalmente a una sustancia cuya presencia aumenta la velocidad de una reacción química y permanece sustancialmente inalterado después de la terminación de la correspondiente reacción química en la que está implicado. El catalizador puede ser una enzima, por ejemplo, transglutaminasa. En una forma de realización de la invención, el catalizador es el Factor XIII. El catalizador capaz de inducir la reticulación de la fibrina puede incluirse en el componente que comprende el fibrinógeno, en el componente de trombina y/o puede estar en un componente separado. En una forma de realización de la invención, el Factor XIII se encuentra presente en el componente que comprende el fibrinógeno.

10 El fibrinógeno, el catalizador, la enzima proteolítica y/o el agente de visualización se proporcionan en el kit de la invención como una solución. La solución puede estar en estado congelado. El kit puede incluir instrucciones de uso.

15 La solución puede prepararse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que resulta adecuado para su administración a un ser humano u otro animal. El término "vehículo" indica un ingrediente con el que se combinan los componentes para facilitar la aplicación de la composición de manera que se conserve sustancialmente la eficiencia deseada.

En una forma de realización de la invención, un componente está compuesto de fibrinógeno, y un coestabilizador, tal como arginina, lisina o ácido 4-(aminometil)-ciclohexanocarboxílico (ácido tranexámico) y combinaciones de los mismos.

20 De acuerdo con la invención, los componentes del adhesivo de fibrina pueden prepararse a partir de la composición de sangre inicial. La composición de sangre puede ser sangre completa o fracciones de sangre, es decir, un producto de la sangre completa tal como plasma. El componente de fibrinógeno, la enzima proteolítica y el catalizador pueden ser autólogos, humanos incluyendo el plasma combinado, o de origen no humano.

25 En una forma de realización de la invención, el componente de fibrinógeno se compone de un componente biológicamente activo (BAC), que es una solución de proteínas derivadas del plasma sanguíneo que puede comprender adicionalmente ácido tranexámico y arginina o lisina o mezclas de arginina y lisina, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. El BAC puede derivarse del crioprecipitado, en concreto del crioprecipitado concentrado. El término "crioprecipitado" se refiere a un componente de la sangre que se obtiene a partir de plasma congelado preparado a partir de sangre completa. Puede obtenerse un crioprecipitado cuando el plasma congelado se descongela en frío, por lo general a una temperatura de 0 a 4°C, lo que da como resultado la formación de un sobrenadante precipitado que contiene fibrinógeno y Factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo, por centrifugación. La solución de BAC comprende adicionalmente Factor VIII, fibronectina, factor de von Willebrand (vWF), vitronectina, etc., por ejemplo, como se describe en los documentos US-B-6.121.232 y WO9833533. Preferentemente, la composición de BAC puede comprender estabilizadores tales como ácido tranexámico y clorhidrato de arginina. Por lo general, la cantidad de fibrinógeno en el BAC se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 mg/ml. La cantidad de ácido tranexámico en la solución de BAC puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/ml. La cantidad de clorhidrato de arginina puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg/ml.

40 Opcionalmente, la solución está tamponada a un valor de pH fisiológico compatible. El tampón puede estar compuesto de glicina, citrato sódico, cloruro sódico, cloruro cálcico y agua para inyección como vehículo. La glicina puede estar presente en la composición en una cantidad comprendida entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 mg/ml, el citrato sódico puede encontrarse en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 mg/ml, el cloruro sódico puede encontrarse en el intervalo comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9 mg/ml y el cloruro cálcico puede estar a una concentración de aproximadamente 0,1 a 45 0,2 mg/ml.

En otra forma de realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC se reduce hasta ser igual o inferior a 15 µg/ml como por ejemplo 5 µg/ml o menos de plasminógeno utilizando un procedimiento como el descrito en los documentos US-B-7.125.569 y WO02095019.

50 También es posible que el kit de adhesivo de fibrina comprenda componentes que estimulan la formación del coágulo, tales como Ca²⁺, Factor VIII, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand (vWF) que pueden proporcionarse como un componente separado o formulado con los componentes del adhesivo de fibrina.

Los componentes proteicos del adhesivo de fibrina pueden prepararse mediante procedimientos recombinantes. También es posible preparar parte de los componentes proteicos del adhesivo de fibrina, o todos ellos, mediante procedimientos recombinantes.

55 Los componentes del adhesivo de fibrina derivados de composiciones de sangre se purifican por lo general a partir de partículas infecciosas. El procedimiento de purificación puede llevarse a cabo por nanofiltración, tratamiento con

disolvente/detergente, tratamiento térmico tal como, pero no limitado a, pasteurización, radiación gamma o UVC (< 280 nm), o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. La expresión "partícula infecciosa" se refiere a una partícula microscópica, tal como un microorganismo o un prión, que puede infectar o propagarse en células de un organismo biológico. Las partículas infecciosas pueden ser partículas virales.

- 5 El procedimiento de inactivación viral puede llevarse a cabo añadiendo una molécula a la composición o fracción de sangre antes de y/o durante el procedimiento de purificación. Las moléculas añadidas y sus productos pueden eliminarse por gravitación, cromatografía en columna o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.

La eliminación de las partículas infecciosas puede llevarse a cabo por nanofiltración o mediante procedimientos de absorción selectiva, tales como cromatografía hidrófoba, de afinidad y de intercambio iónico. Puede llevarse a cabo un procedimiento de inactivación viral en varias etapas. Por ejemplo, la composición puede someterse a tratamiento con disolvente/detergente, tratamiento térmico, cromatografía selectiva y nanofiltración.

15 La expresión "superficie de una parte del cuerpo de un paciente" se refiere a una superficie externa de la piel que puede observarse a simple vista y a una superficie de una parte interna del cuerpo que es una parte de la anatomía interna de un organismo. Las superficies externas incluyen, pero no se limitan a, la piel de la cara, garganta, cuero cabelludo, pecho, espalda, orejas, cuello, mano, codo, cadera, rodilla, y otras zonas de piel. Ejemplos de partes internas del cuerpo incluyen, pero no se limitan a, la cavidades corporales o aberturas anatómicas que están expuestas al ambiente externo y a los órganos internos, tales como las fosas nasales; los labios; los oídos; la zona genital, incluyendo el útero, la vagina y los ovarios; los pulmones; el ano; el bazo; el hígado; y el músculo cardíaco. La superficie puede ser una zona sangrante o no sangrante. El fibrinógeno y la enzima proteolítica están en solución y por lo tanto necesitan estar en componentes separados. El agente de visualización en el kit de la invención puede formularse con uno de los componentes antes de la formación del coágulo de fibrina y/o puede estar en un componente separado, por ejemplo, disuelto en un vehículo aceptable que resulte adecuado para su aplicación en el cuerpo humano o animal.

El agente de visualización se encuentra presente junto con la enzima proteolítica.

- 25 En una forma de realización de la invención, la solución de enzima proteolítica teñida con azul de metileno se encuentra en un intervalo de concentración comprendido entre el 0,01 y el 0,05% y la concentración final en el adhesivo de fibrina reticulado se encuentra en el intervalo comprendido entre el 0,005 y el 0,025%.

30 En otra forma de realización de la invención, la solución de enzima proteolítica teñida con índigo carmín se encuentra en un intervalo de concentración comprendido entre el 0,01 y el 0,02%, por ejemplo a una concentración de aproximadamente el 0,015% y la concentración final en el adhesivo de fibrina reticulado se encuentra en el intervalo comprendido entre el 0,005 y el 0,01%, por ejemplo a una concentración de aproximadamente el 0,0075%. En otra forma de realización adicional de la invención, la solución de enzima proteolítica teñida con índigo carmín se encuentra a una concentración del 0,016% y la concentración final en el adhesivo de fibrina reticulado es del 0,008%.

- 35 Se ha demostrado de acuerdo, con la invención, que el uso de azul de metileno a una concentración del 0,02% en la solución de trombina da como resultado una reducción de aproximadamente el 50% de la actividad de coagulación de la trombina tras la exposición a 6 horas de luz natural. Sin embargo, cuando se protegía de la luz la solución teñida con azul de metileno, no se encontró reducción de la actividad de la trombina. En cambio, la exposición a 6 horas de luz natural de la solución de trombina teñida con índigo carmín al 0,02% no tuvo efecto sobre la actividad de la trombina. Además, exposiciones a la luz más largas (16 horas) de la solución de trombina teñida con índigo carmín no interferían con la actividad de coagulación de la trombina. Por lo tanto, para la actividad óptima de la trombina cuando se utiliza azul de metileno como colorante, es importante la protección frente a la luz.

45 De esta manera, en determinadas formas de realización de la invención, el componente que contiene el agente de visualización está protegido de la luz. La protección puede conseguirse envolviendo el envase con una lámina de aluminio, preservando el componente que comprende el agente de visualización en un envase o recipiente oscuro o mediante cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. El componente que comprende el agente de visualización puede comprender también un agente para la protección frente a la luz, tal como eliminadores de radicales naturales o sintéticos que eviten o reduzcan sustancialmente la velocidad de formación de los radicales libres sin afectar a la reacción enzimática.

- 50 La adición del agente de visualización a una concentración que conserve del 50 al 100% de la actividad de coagulación de la enzima proteolítica puede conseguirse hasta aproximadamente el 0,1% cuando se protege de la luz, o hasta aproximadamente el 0,01% cuando no se protege de la luz.

55 Se descubrió, de acuerdo con la invención, que el índigo carmín forma agregados cuando se añade a la solución de trombina a concentraciones superiores al 0,02% cuando el Ca^{2+} está a una concentración de 40 mM. Una concentración de índigo carmín que esté por encima del 0,02% da lugar a agregados de índigo carmín que dan como resultado una disminución de la coloración en comparación con el valor teórico si se hubiese disuelto todo el IC. Sin estar ligado al mecanismo, parece que los agregados se forman con la participación del Ca^{2+} que es esencial para la actividad de la trombina y se encuentra presente en el componente de trombina. De esta manera, resulta

beneficioso que el agente de visualización se añada a la formulación de adhesivo de fibrina o a los componentes del kit a una concentración que permita la solubilidad del agente de visualización sin formar agregados. Esta concentración con índigo carmín y una concentración 40 mM de calcio es igual o inferior al 0,02% en la solución de trombina o al 0,01% en el adhesivo de fibrina. Una menor concentración de calcio puede permitir una mayor concentración de índigo carmín. El término "agregados" se refiere a un fragmento de un material que contiene varios tipos de sólidos.

En una forma de realización de la invención, el agente de visualización en la solución de enzima proteolítica es el índigo carmín y la concentración final en el adhesivo de fibrina y/o después de mezclar los componentes del kit o de la formulación se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,0005 y aproximadamente 0,01%, entre aproximadamente 0,0025 y aproximadamente 0,01%, o entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,01% como 0,0075%.

Como se ha mencionado anteriormente, los agentes de visualización de la invención están seleccionados de entre azul de metileno e índigo carmín.

El uso de un adhesivo de fibrina teñido resulta ventajoso en el entorno quirúrgico, por ejemplo, cuando se utiliza para las indicaciones en la prevención de las adherencias permitiendo que el cirujano visualice el SF durante la aplicación, especialmente cuando se realiza un procedimiento laparoscópico. El sellador de fibrina teñido puede aplicarse, por ejemplo, como pulverización o por goteo como se describe en Wiseman y col., ("The effect of tranexamic acid in fibrin sealant on adhesion formation in the rat". J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004; 68:222-230).

El kit de adhesivo de fibrina de la invención puede utilizarse en procedimientos mínimamente invasivos (MIS). El paciente puede recibir anestesia local o anestesia general. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo a través de pequeñas incisiones o a través de una cavidad corporal u orificio anatómico. Pueden utilizarse técnicas especializadas para visualizar el área operada tales como, cámaras en miniatura con microscopios, linternas diminutas de fibra óptica y monitores de alta definición. La cirugía mínimamente invasiva puede dar como resultado estancias hospitalarias más cortas, permite el tratamiento ambulatorio, puede reducir el traumatismo corporal, reducir la pérdida de sangre, reducir la necesidad de medicamentos para el dolor y reducir las tasas de morbilidad en comparación con la cirugía abierta convencional. Los procedimientos mínimamente invasivos incluyen, pero no se limitan a, laparoscópicos, endovasculares, esplenectomía laparoscópica, reparación laparoscópica de hernia umbilical, extirpación laparoscópica de quistes ováricos benignos, tratamiento discos cervicales y lumbares herniados, y similares.

La aplicación laparoscópica del sellador de fibrina por pulverización abarca las condiciones más desfavorables para la aplicación por pulverización dirigida. Uno de los obstáculos a superar es el efecto de la aplicación laparoscópica por pulverización del sellador de fibrina sobre la presión intraabdominal (PIA) y sobre la hemodinámica. En una publicación reciente Druckrey-Fiskaaen y col., ("Laparoscopic spray application of fibrin sealant effects on hemodynamics and spray efficiency at various application pressures and distances". Surg Endosc. 2007; 21:1750-1759) notificaron que pueden utilizarse de manera segura selladores de fibrina (Quixil) en los procedimientos laparoscópicos si se cumplen las siguientes condiciones: mantener períodos de pulverización cortos y permitir que salga el aire del abdomen. Estas condiciones pueden minimizar el aumento de la PIA. De acuerdo con sus resultados, una aplicación laparoscópica por pulverización del sellador de fibrina debe comenzar con una presión de insuflación de 10 mmHg, una presión de aplicación de 2,5 bares y una distancia de aplicación de 5 cm dejando abierta una válvula del trocar. Esta optimización de las condiciones de pulverización abrió el camino para una aplicación eficaz de capas delgadas de sellador de fibrina en todo tipo de aplicaciones laparoscópicas. Sin embargo, no ha resuelto la cuestión de la dirección de la capa relativamente delgada de un gel transparente a un órgano interno de color oscuro y sangrante. La aplicación de selladores de fibrina se realiza muy frecuentemente en condiciones de iluminación insuficiente cuando la videocámara ha acumulado humedad. Estas duras condiciones requieren la pulverización de un gel teñido que pueda distinguirse fácilmente del tejido circundante.

El sellador de fibrina que comprende azul de metileno a una concentración final del 0,025% resultaba especialmente útil entre otras razones para suministrar una dirección clara cuando se pulveriza sobre un órgano de color oscuro y sangrante tal como el bazo o el hígado. Además, cuando se pulverizaba durante períodos cortos, generando una capa delgada de adhesivo de fibrina, el azul de metileno al 0,025% permitía una dirección segura.

Se descubrió que la trombina complementada con una solución de índigo carmín al 0,01 y al 0,02% daba como resultado una mayor visibilidad en la aplicación laparoscópica en comparación con el sellador sin teñir. De esta manera, el adhesivo de fibrina que contiene índigo carmín a una concentración final del 0,005 y del 0,01% permite la visualización del material pulverizado cuando se pulveriza el componente de adhesivo de fibrina en órganos de color oscuro y sangrantes o no sangrantes tales como el bazo, el hígado y el útero.

Se descubrió, de acuerdo con la invención, que el aumento de la concentración del agente de visualización podía dificultar la coagulación (el endurecimiento) del gel de fibrina, de esta manera las concentraciones anteriormente indicadas tienen la ventaja de que permiten la visibilidad del gel pulverizado sin afectar a la estabilidad de la capa de gel. Se ha optimizado el mantenimiento de la concentración de azul de metileno entre el 0,01% y el 0,05% y del

índigo carmín entre el 0,01 y el 0,02% en el componente de trombina para obtener ambos.

De esta manera, en el presente documento se desvela la aplicación laparoscópica de un adhesivo de fibrina que comprende un colorante a una concentración que es enzimáticamente permisiva y que permite la visualización. También se desvela que la concentración de índigo carmín en la solución de trombina se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 0,02%, por ejemplo la concentración de índigo carmín dentro de la solución de trombina es de aproximadamente el 0,015% o el 0,016%.

Un objeto más de la invención se alcanza proporcionando un kit de sellador de fibrina que comprende por lo menos dos componentes separados necesarios para formar el adhesivo de fibrina, de acuerdo con la invención, con una concentración enzimáticamente permisiva de un agente de visualización y un aplicador. El kit de sellador de fibrina con el aplicador puede utilizarse para evitar y/o reducir de las adherencias y/o para estimular la coagulación de la sangre o detener la hemorragia y/o para sellar o rellenar superficies.

En otro aspecto de acuerdo con la invención, los kits de adhesivo de fibrina pueden utilizarse como agente hemostático. La expresión agente hemostático se refiere a la capacidad del agente para detener la hemorragia de un vaso sanguíneo lesionado y/o para contribuir a mantener la sangre contenida dentro del vaso sanguíneo.

En un aspecto más, los kits de adhesivo de fibrina de acuerdo con la invención pueden utilizarse como agente antiadherente. La formación de adherencias es un efecto secundario no deseado en el que los tejidos corporales que están normalmente separados crecen juntos. Este efecto secundario no deseado puede darse después de procedimientos quirúrgicos, infección, traumatismo o radiación. Por lo general, agentes antiadherentes se refiere a agentes capaces de formar una barrera física (recubrimiento) que separa los tejidos adyacentes en el sitio quirúrgico y que por lo tanto evita y/o reduce la formación de adherencias postoperatorias.

Los kits de adhesivo de fibrina de la invención pueden comprender adicionalmente moléculas biológicamente activas tales como antibióticos, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, factores de crecimiento, fármacos anticancerosos, analgésicos, proteínas, hormonas, antioxidantes y similares. Los kits de adhesivo de fibrina de la invención pueden utilizarse ventajosamente como un sistema de administración de fármacos debido a que el agente de visualización permite mejorar las cualidades diana en el sitio de aplicación, por ejemplo: mejora la localización de la zona diana, permite la liberación controlada durante un período prolongado y permite la administración de una concentración necesaria que no puede conseguirse en una administración oral.

La expresión sistema de administración del fármaco se refiere a la administración de moléculas bioactivas que se incorporan en el kit de adhesivo de fibrina, que permiten la administración controlada de las moléculas en un tejido específico *in vivo*.

Se descubrió, de acuerdo con la invención, que la adición de colorante en el intervalo de concentraciones anteriormente mencionado no tenía ningún efecto crítico sobre la cinética de la formación de coágulos y de la elasticidad y la resistencia del coágulo. De esta manera, se descubrió que el mantenimiento de estos intervalos de concentración daba una intensidad de color deseable y al mismo tiempo conservaba sustancialmente la actividad de coagulación de la trombina, y de las características físicas y mecánicas del adhesivo.

El experto entenderá fácilmente la divulgación de los intervalos en la descripción de la invención. Esto supone la divulgación de los valores continuos y las cifras entre los límites de los intervalos, que incluye los valores y las cifras limitantes. Por ejemplo, si se da un intervalo de 0,0025 a 0,1, se entiende por lo menos 0,0025, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,0075, 0,08, 0,09, y 0,1 o con todas las combinaciones intermedias de los subintervalos tales como 0,0025 y 0,01, 0,0025-0,02, 0,0025-0,03, 0,0025-0,04, 0,0025-0,05, 0,0025-0,06, 0,0025-0,07, 0,0025-0,08, 0,0025 -0,09, 0,0025-0,1 ó 0,01-0,02, 0,01-0,03, 0,01-0,04, 0,01-0,05, 0,01-0,06, 0,01-0,07, 0,01-0,08, 0,01-0,09, 0,01-0,1 y así sucesivamente.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos pero no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de los diferentes colorantes sobre la actividad de coagulación de la trombina.

El presente estudio tenía como objetivo determinar el efecto sobre la actividad de la trombina de la adición de colorante a la formulación de adhesivo de fibrina. Para este fin, la trombina de un sellador de fibrina de dos componentes como el descrito en los documentos US-B-6.121.232 y WO9833533 se formuló con diferentes colorantes a concentraciones finales del 0,01 al 0,2%. La compatibilidad de los colorantes con la trombina se sometió a ensayo midiendo la actividad de coagulación de la trombina en las diferentes formulaciones de acuerdo con el siguiente procedimiento de ensayo de la Farmacopea Europea (0903/1997), modificado.

En resumen, se incubaron la solución convencional de trombina (4, 6, 8 y 10 IU/ml) o la muestra de ensayo durante 2 minutos a 30°C. A continuación, se mezclaron 40 µl de solución de trombina de cada solución con 160 µl de solución de fibrinógeno (0,1%; Enzyme research; cat. Nº FIB1 2800L) y se midió el tiempo de coagulación. Se trazó una curva de calibrado del logaritmo de los tiempos de coagulación frente al logaritmo de la concentración de

trombina utilizando los patrones. Se determinó la actividad de la trombina en las diferentes formulaciones mediante el tiempo de coagulación obtenido (calculado automáticamente por una máquina de coagulación, interpolado a partir de la curva de calibrado y multiplicado por el factor de dilución).

La siguiente tabla resume la actividad de la trombina en las diferentes formulaciones

5 (Tabla 1):

Tabla 1: Actividad de la trombina en las diferentes formulaciones

Colorante	Concentración de colorante dentro del componente de trombina (%)	Actividad de la trombina (IU/ml)	Actividad recuperada (%)
Azul de Metileno	0	1102	100
	0,01	1018	92
	0,05	1070	97
	0,1	991	90
	0,2	978	89
Cristal violeta	0	1.057	100
	0,01	1.125	106
	0,05	995	94
	0,1	516	49
	0,2	234	22

* El Cristal violeta se adquirió de Sigma (cat. Nº 229288)

10 Se sometieron a ensayo el azul de metileno y el cristal violeta para determinar su efecto sobre la actividad de coagulación de la trombina a una concentración del 0,1 al 0,2%. Los hallazgos sugieren que el azul de metileno es más compatible con la trombina que el cristal violeta, por ejemplo, la actividad recuperada de la trombina con azul de metileno al 0,1% fue del 90% frente al 49% de actividad de una formulación con cristal violeta al 0,1%. Además, una formulación con azul de metileno al 0,2% también presentó una alta actividad recuperada en comparación con el cristal violeta a la misma concentración (actividad recuperada del 89% y 22%, respectivamente).

Ejemplo 2: Efecto de los diferentes colorantes sobre la cinética de coagulación.

15 Se mezcló trombina humana con diferentes colorantes a concentraciones finales de colorante del 0,005 al 0,2%. Se sometió a ensayo la influencia de los colorantes sobre la cinética de coagulación utilizando el ensayo de la gota. En resumen, las mediciones de la cinética de coagulación de la fibrina se realizaron en un plano inclinado en un dispositivo alimentado por una presión de nitrógeno de 7×10^5 Pa. En cada experimento se bombearon, en una jeringa separada, 5 ml de componente biológicamente activo (BAC) y 5 ml de una solución de trombina diluida 5 veces (final: 200 IU/ml) (en 40 mM de CaCl_2). El BAC se prepara a partir de crioprecipitado concentrado después de ser tratado como se desvela en el documento EP-A-534 178 en el que la arginina y el ácido tranexámico se añaden como se describe en los documentos US-B-6.121.232 y WO9833533. Se liberaron simultáneamente estas dos soluciones (aproximadamente 1/8 de cada una), y una gota mezclada cae sobre una superficie inclinada. La gota se desliza por la pendiente hasta formar un coágulo. Se registró la distancia recorrida por las gotas en una hoja de papel milimetrado colocada sobre la superficie inclinada. Se demostró que la distancia recorrida por la gota era proporcionalmente inversa a la concentración de trombina. En la Tabla 2 que se presenta a continuación, se enumeran las longitudes de migración del sellador de fibrina con las diferentes formulaciones.

25

Tabla 2: Longitud de migración del sellador de fibrina en las diferentes formulaciones

Colorante	Concentración de colorante dentro del componente de trombina (%)	Longitud de migración (cm)	± DE (N) (cm)
Azul de Metileno	0	9,4	0,95 (8)
	0,1	10,7	2,7 (8)
	0,2	14,3	0,3 (8)
Cristal violeta	0,005	12,1	1,9 (8)
	0,01	23,9	1,0 (8)
	0,05	>25	* ND (8)
Riboflavina	0,005	11,5	1,7 (8)
	0,01	13,3	1,6 (8)
	0,02	22,9	2,4 (8)
Naranja de Metilo	0,005	8,26	1,6 (8)
	0,01	7,6	1,2 (8)
Azul de Bromotimol	0,01	9,7	1,1 (8)
	0,02	11,9	0,9 (8)

* La riboflavina se adquirió de Merck KGaA (cat. Nº 500257).

* La sal sódica naranja de metilo se adquirió de J.T. Baker (cat. Nº 1145).

* El azul de bromotimol se adquirió de BAKER ANALYZED.

* ND - no determinado.

Colorante	*Dilución	Longitud de migración (cm)	± DE (N) (cm)
Rojo de Metilo	01:51	10,2	2,05 (8)
	01:26	12,4	0,8 (8)

* El rojo de metilo se adquirió de J. T. Baker (cat. Nº 5926-04) y se diluyó como se ha especificado anteriormente.

5 Estos resultados confirman los resultados anteriormente indicados que demuestran que el azul de metileno en un intervalo de concentración comprendido entre el 0,1 y el 0,2% conservaba la mayor parte de la actividad de coagulación de la trombina en comparación con la formulación sin teñir.

10 Por otra parte, resulta evidente que en el ensayo de la gota, el cristal violeta en un intervalo de concentración comprendido entre el 0,01 y el 0,05% interfería fuertemente con la actividad de coagulación, mientras que en el ensayo de actividad de coagulación de la trombina ejemplificado anteriormente (Ejemplo 1), el cristal violeta en el mismo intervalo de concentración no interfería con la actividad de la trombina (duplicación de la distancia recorrida en el ensayo de la gota frente al 106 y 94% de recuperación de actividad de la trombina en el ensayo directo de actividad de la trombina). Como se demostró en este ensayo, la riboflavina al 0,005-0,01%, el naranja de metilo al 0,005-0,01%, el rojo de metilo diluido 1:51-1:26 y el azul de bromotimol al 0,01-0,02%, no interferían drásticamente con la cinética de coagulación.

15 **Ejemplo 3: Estabilidad de la actividad de coagulación del adhesivo de fibrina con el agente de visualización (colorante) después de la congelación y la descongelación (F&T).**

Se formuló trombina humana con azul de metileno, cristal violeta, azul de bromotimol o riboflavina a concentraciones finales del 0,005 al 0,1%. Las diferentes formulaciones se congelaron rápidamente a -35°C y, a continuación, se descongelaron. Se evaluó el efecto del procedimiento de congelación y descongelación sobre la actividad de

coagulación de la trombina utilizando el ensayo de la gota (ensayo del tiempo de migración como en el Ejemplo 2). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Efecto del procedimiento de congelación y descongelación sobre la estabilidad del adhesivo

Colorante	Concentración de colorante dentro del componente de trombina (%)	Longitud de migración (cm)	± DE (N) (cm)
Azul de Metileno	0,1	10,7	2,7 (8)
	0,1 (F&T)	8,4	2,1 (8)
Cristal violeta	0,005	12,1	1,9 (8)
	0,005 (F&T)	16,3	1,0 (9)
Azul de Bromotimol	0,02	11,9	0,9 (9)
	0,02 (F&T)	>25	* NA (9)
Riboflavina	0,005	11,5	1,7 (9)
	0,005 (F&T)	19,8	2 (9)
* NA – no disponible			

- 5 La actividad de coagulación del adhesivo de fibrina formulada con azul de metileno no cambiaba significativamente como resultado del procedimiento de congelación y descongelación.

De esta manera, el experimento demuestra que la actividad de coagulación de la formulación de adhesivo de fibrina con azul de metileno es estable aunque la fórmula se congelase y descongelase.

Ejemplo 4: Solubilidad del índigo carmín en la solución de trombina.

- 10 El presente ejemplo tenía como objetivo determinar la solubilidad máxima del índigo carmín en el componente de trombina del sellador de fibrina. Se mezcló el envase final de trombina (Omxix, 1.000 IU/ml, 5 ml) con índigo carmín al 1% (disuelto en agua purificada) a una concentración final de 0,2, 0,21, 0,22, 0,25 ó 0,3 mg/ml. Las soluciones preparadas se mezclaron en un frasco rotatorio durante 30 minutos a temperatura ambiente y se determinó el límite de solubilidad del colorante mediante inspección visual.

- 15 Se ha demostrado que la disolución completa de la muestra sólo se obtenía a una concentración de 0,2 mg/ml. Las concentraciones mayores de solución de trombina teñida con índigo carmín (es decir, 0,21, 0,22, 0,25 y 0,3 mg/ml) superaban el límite de solubilidad y daban como resultado la formación de agregados. Parece que los agregados se forman con la participación del Ca^{2+} presente en el componente de trombina. Estos datos sugieren que la solubilidad límite del índigo carmín dentro de la solución de trombina sometida a ensayo (Ca^{2+} 40 mM) es de aproximadamente el 0,02%.

- 20 Además, se descubrió que el almacenamiento entre 2 y 8°C de las soluciones de trombina teñidas con índigo carmín al 0,02% durante aproximadamente 30 minutos daba como resultado la sedimentación. La incubación de las soluciones refrigeradas de trombina teñidas con índigo carmín al 0,02% a temperatura ambiente (después de incubación durante toda la noche entre 2 y 8°C) conducía a una nueva disolución de la muestra particulada, como se observaba mediante inspección visual.

Ejemplo 5: El efecto del índigo carmín y del azul de metileno sobre la actividad de la trombina.

- En las indicaciones para la prevención de las adherencias el colorante puede añadirse al componente de trombina antes de mezclarlo con el BAC. El presente experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto sobre la actividad de coagulación de la trombina de la adición del agente de visualización a la solución de trombina. Se evaluaron dos colorantes: índigo carmín (IC) y azul de metileno (AM). Para este fin, se mezcló el envase final de trombina (Omxix, 1.000 IU/ml) con AM o IC a una concentración final del 0,02%. Se evaluó el efecto de los colorantes sobre la actividad de la trombina con o sin exposición a la luz natural. Se midió la actividad de coagulación de la trombina como se ha indicado anteriormente en el Ejemplo 1. Se preparó una curva de calibrado (logaritmo del tiempo de coagulación frente al logaritmo de la concentración de trombina) mezclando los patrones de trombina con una solución de fibrinógeno al 0,1%. Se mezclaron las muestras con la misma solución de fibrinógeno y se calculó la actividad de la trombina a partir de la curva de calibrado. Se utilizaron el envase final de trombina (Omxix), índigo carmín (código de cat. de Amresco N° 9827-25g), azul de metileno (cat. de Spectrum N° ME141-25g-USP), un

espectrofotómetro y una máquina de coagulación. Para preparar las soluciones de IC al 1% y AM al 1%, se añadieron 0,04 g de IC o de AM a 4 ml de agua purificada.

En este experimento se utilizaron tres viales de 5 ml de envase final de trombina:

- 5 1. El primer vial de trombina se tiñó con IC añadiendo 0,1 ml de solución de IC al 1% en 4,9 ml de trombina para conseguir la concentración de final de IC de 0,2 mg/ml.
2. El segundo vial de trombina se tiñó con AM añadiendo 0,1 ml de solución de AM al 1% en 4,9 ml de trombina para conseguir la concentración final de AM de 0,2 mg/ml.
3. El tercer vial de trombina se dejó sin tratar.

10 Se dividió cada uno de los tres viales de 5 ml en 2 alícuotas de 2,5 ml en viales transparentes; posteriormente se cubrió un alícuota de cada grupo con una lámina de aluminio. Todas las muestras se incubaron a temperatura ambiente, expuestas a luz natural.

Se midieron la actividad de la trombina y la intensidad de color (DO de IC a 610 nm y de AM a 663 nm) en T0 y después de la exposición a la luz natural durante 6 horas. Este experimento se repitió dos veces para producir duplicados.

15 Los resultados obtenidos demostraron que en las muestras cubiertas la actividad de la trombina y los valores de la DO no se veían influenciados por la exposición a la luz, independientemente de la presencia de IC o AM (Tablas 4 y 5). La exposición a la luz natural de la solución de trombina teñida con IC, al igual que la de la solución de trombina sin teñir, no tuvo efecto sobre la actividad de la trombina durante el período de incubación. Sin embargo, cuando la solución de trombina se tiñó con AM y se incubó sin cubrir expuesta a la luz natural, se descubrió una notable reducción de aproximadamente el 50% de la actividad de la trombina después de la incubación durante 6 horas. La DO de AM y de IC se mantuvo sin cambios durante el período de incubación, lo que indica que la intensidad del color se mantenía sin cambios durante la exposición a la luz natural.

20

Tabla 4: El efecto del índigo carmín y del azul de metileno sobre la actividad de la trombina

Muestra	Actividad de la trombina IU/ml *	
	T0	6 horas
L51 T60	1.155±81	1.047±23
L51T60 + Lámina de aluminio		1.001±9
L51T60 + IC	1.056±0	1.117±67
L51T60 + IC + Lámina de aluminio		1.124±36
L51T60 + AM	1.091±30	514±7 **
L51T60 + AM + Lámina de aluminio		1.070±81

* Los resultados son el promedio de dos repeticiones independientes.

** Este resultado es una estimación, ya que se encontraba fuera de la curva de calibrado del ensayo. El resultado final puede fijarse con precisión como < 564 UI/ml.

25 **Tabla 5: La influencia de la exposición a la luz sobre los valores de la DO de las soluciones de trombina teñidas**

Muestra	Exposición a la luz natural *	
	T0	6 horas
	DO a 610 nm	
L51T60 + IC	0,359±0,002	0,354±0,001
L51T60 + IC + Lámina de aluminio		0,357±0,004

(continuación)

	DO a 663 nm	
L51T60 + AM	0,518±0,007	0,522±0,001
L51T60 + AM + Lámina de aluminio		0,527±0,001
* Los resultados son el promedio de dos repeticiones independientes.		

5 Los resultados demostraron claramente que el uso de índigo carmín a una concentración final del 0,02% en la solución de trombina no influía en la actividad de la trombina independientemente de la exposición a la luz natural durante hasta 6 horas. En cambio, cuando se utilizaba la misma concentración de azul de metileno como colorante, se observó una notable reducción de la actividad de la trombina después de una exposición a la luz natural igual. Sin embargo, cuando la solución teñida con azul de metileno se protegía de la luz (se cubría con papel de aluminio) no se encontró reducción de la actividad de la trombina en todo el período de estudio. Por lo tanto, los resultados indican que no hay necesidad de proteger de la luz la trombina cuando se utiliza índigo carmín como colorante para la trombina, mientras que con el azul de metileno es importante la protección frente a la luz.

Ejemplo 6: El efecto del índigo carmín sobre la actividad de la trombina después de un período de incubación prolongado.

15 El ejemplo anterior demuestra que la adición de índigo carmín al componente de trombina a una concentración final del 0,02% no influía en la actividad de coagulación de la trombina incluso cuando se exponía a 6 horas de luz natural. El presente ejemplo tenía el objetivo de determinar el efecto sobre la actividad de coagulación de la trombina de un período de incubación prolongado de la solución de trombina teñida con índigo carmín. Se examinaron las muestras expuestas a la luz natural y las no expuestas.

20 Para este fin, se mezcló la solución de índigo carmín al 0,4% (disuelta en agua purificada) con 5 ml de solución de trombina (1:26) para conseguir una concentración final de 0,15 mg/ml. Las soluciones mezcladas se incubaron a temperatura ambiente durante 27 horas (16 horas de luz natural) en viales transparentes o de color ámbar.

Se sacaron las muestras (40 µl) de los viales en los siguientes instantes de tiempo: 0, 4, 22, y 27 horas después del inicio del experimento y se determinó la actividad de la trombina de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado.

25 La Tabla 6 resume el efecto sobre la actividad de la trombina de la incubación prolongada de la solución de trombina teñida con índigo carmín, con o sin exposición a la luz natural. Los resultados obtenidos también se expresan como un factor de reducción de la actividad de coagulación de la trombina en comparación con la actividad de la muestra en T0 (100%; Fig. 1A y B para dos lotes diferentes de trombina). IC - índigo carmín.

Tabla 6: El efecto del índigo carmín sobre la actividad de la trombina después de la incubación prolongada de muestras expuestas y no expuestas a la luz natural

Vial de trombina	Muestra	Actividad de la trombina (IU/ml)			
		Tiempo de exposición (horas)			
		0	4	22	27
L51T60K	Trombina	900±12	912±6	809±11	732±8
	Trombina + índigo carmín; vial transparente	921±6	926±25	816±10	785±23
	Trombina + índigo carmín; vial de color ámbar	903±5	917±37	816±20	747±13

30

(continuación)

Vial de trombina	Muestra	Actividad de la trombina (IU/ml)			
		Tiempo de exposición (horas)			
		0	4	22	27
M03T08K	Trombina	990±14	966±20	806±34	782±0
	Trombina + índigo carmín; vial transparente	971±14	966±20	875±12	819±4
	Trombina + índigo carmín; vial de color ámbar	896±6	962±13	852±0	827±25

5 Los resultados indican que la adición de índigo carmín a una concentración final del 0,015% en la solución de trombina no interfiere con la actividad de coagulación de la trombina incluso cuando se expone a 16 horas de luz natural (85 y 84% en comparación con 81 y 78% de actividad recuperada para la solución de trombina teñida con índigo carmín en un vial transparente y solución de trombina sin teñir, respectivamente). Estos resultados confirman que cuando se utiliza índigo carmín como colorante para la solución de trombina, la protección frente la luz no resulta necesaria.

10 **Ejemplo 7: El efecto de la congelación y la descongelación de la solución de índigo carmín sobre la actividad de la trombina.**

15 Se evaluó la estabilidad de la actividad de coagulación de la solución de trombina después de la complementación con solución de índigo carmín que se sometió a uno o cinco ciclos de congelación y descongelación. Las soluciones de índigo carmín descongeladas (disueltas al 0,4% en agua purificada) se diluyeron 1:26 en 5 ml de componente de trombina (Omrix) obteniendo una solución de trombina teñida con índigo carmín a una concentración final de 0,15 mg/ml. Como testigo se utilizó la solución de trombina sin teñir. Se midió la actividad de coagulación de la trombina como se ha indicado anteriormente (Ejemplo 1). Cada medición se llevó a cabo por duplicado.

Tabla 7: Efecto de la congelación y la descongelación de la solución de índigo carmín sobre la actividad de coagulación de la trombina

Vial de trombina	Actividad de la trombina (IU/ml)		
	Trombina	Trombina + Índigo carmín*	Trombina + Índigo carmín + F&T**
L51T06K	819±56	897±33	912±48
M03T08K	932±5	1.002±47	941±30
La solución de índigo carmín se sometió a uno (*) o cinco ciclos (**) de congelación y descongelación.			

20 Los resultados demuestran que la actividad de la trombina se conserva sustancialmente en todos los grupos experimentales, independientemente de los ciclos múltiples de congelación y descongelación de la solución de índigo carmín antes de la adición al componente de trombina.

Ejemplo 8: El efecto del índigo carmín sobre el tiempo de coagulación cuando se añade al componente BAC.

25 El agente de visualización puede añadirse al BAC antes de mezclarlo con el componente de trombina. De esta manera, este ejemplo ilustra el efecto del índigo carmín sobre el tiempo de coagulación cuando se añade al BAC.

Se diluyó una solución de índigo carmín al 0,4% (disuelto en agua purificada) 1:26 en 5 ml de componente BAC a una concentración final de 0,15 mg/ml. Como testigo se utilizó BAC sin teñir.

Se evaluó el tiempo de coagulación de acuerdo con el ensayo de la Farmacopea Europea (0903/1997) modificado, que se basa en el procedimiento de Clauss. En resumen, se preparó una curva de calibrado diluyendo una solución

de fibrinógeno al 1% [Enzyme Research; cat. N° FIB1 2800L disuelto en tampón Owren-Koller (Diagnostica Stago; cat. N° 00360)] a concentraciones finales de 38,46, 25, 12,5, y 8,3 mg/100 ml. Las diluciones se llevaron a cabo en tampón de dilución que contenía albúmina bovina al 1% en tampón Owren-Koller. A continuación, se diluyeron aproximadamente 0,03 g de muestras de BAC teñidas o sin teñir 1:300 en tampón de dilución para obtener una concentración final de fibrinógeno de aproximadamente 0,2 mg/ml. La coagulación se consiguió mezclando 100 µl de las muestras BAC diluidas anteriormente indicadas con 100 µl de Fibrin-Prest Automate 2 (Diagnostica Stago; cat. N° 00316). Se midió el tiempo de coagulación 1 y 3 horas después de la incubación a temperatura ambiente utilizando una máquina de coagulación (ST2 o ST4, Diagnostica Stago).

En base al tiempo de coagulación obtenido, se interpoló la concentración de la muestra de fibrinógeno a partir de la curva de calibrado. El resultado contiene el tiempo de coagulación y la concentración de fibrinógeno calculada. En la Tabla 8 que se presenta a continuación, se enumera el tiempo de coagulación en las diferentes muestras.

Tabla 8: Efecto de la solución de índigo carmín sobre el tiempo de coagulación cuando se añade al componente BAC

Muestra	Tiempo de coagulación (segundos)*		
	Tiempo de incubación (horas)		
	0	1	3
K49B252	13,8±0,8	13,8±0,7	13,5±1,0
K49B252 + índigo carmín	13,5±0,2	13,5±0,5	14,0±0,6

* Cada muestra se sometió a ensayo por duplicado y cada duplicado se sometió a ensayo dos veces. Los datos presentados son la media de las 4 mediciones obtenidas para cada muestra en cada instante de tiempo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, resulta evidente que el índigo carmín no cambiaba el tiempo de coagulación en ninguno de los instantes de tiempo (es decir, 0, 1 y 3 horas). Este hallazgo sugiere que el índigo carmín puede añadirse al componente BAC sin influir en la actividad de coagulación y el tiempo necesario para generar un coágulo.

Ejemplo 9: El efecto de la adición de índigo carmín sobre las propiedades mecánicas del coágulo formado.

El siguiente ejemplo tenía como objetivo determinar si la adición de índigo carmín a la formulación de adhesivo de fibrina influye en el módulo de elasticidad del coágulo generado.

Se midieron las propiedades mecánicas del coágulo de fibrina mediante un ensayo de elongación utilizando un aparato modelo LF Plus (Lloyd Instrument). Este instrumento es un equipo de ensayo de compresión y de tensión accionado por motor diseñado para someter a ensayo las resistencias a la rotura, los puntos de fluencia y la resiliencia de diversos productos y materiales. Se colocaron, uno encima del otro, dos moldes con forma cónica, recubiertos previamente con una solución de vaselina (10% en hexano) para evitar la adherencia a los moldes. Los moldes se rellenaron con adhesivo de fibrina como sigue:

Se diluyó solución convencional de trombina teñida (a una concentración final de 0,15 mg/ml de índigo carmín obtenido como se ha descrito anteriormente) o sin teñir (estándar interno de Omrix, 139 IU/ml), en 40 mM de CaCl₂ para conseguir una actividad de la trombina de 8 IU/ml. Se aplicó BAC (Omrix) con un volumen igual de las muestras de trombina diluidas en los moldes en un volumen total de 0,7 ml utilizando un módulo de doble jeringa. Los coágulos preparados se incubaron a 37°C durante 30 minutos para permitir la polimerización completa del adhesivo. A continuación, se montaron los moldes en el aparato LF Plus y se desmontaron mecánicamente.

Se midió la resistencia del coágulo trazando la fuerza ejercida (y) frente a la distancia recorrida (x) por el molde superior antes del punto de ruptura del coágulo. Los datos se recogieron y se procesaron utilizando el software NexyGen Plus (Empresa Ametek) que soporta el aparato LF Plus. Los datos procesados se utilizaron para generar una curva de tensión-deformación y para calcular el Módulo de Young también conocido como Módulo de Elasticidad que está representado por la pendiente de la curva tensión-deformación. Los resultados se expresan en kPa. La Tabla 9 resume los resultados de estos estudios:

Tabla 9: Efecto de la solución de índigo carmín sobre la elasticidad del coágulo

Muestra de BAC	Módulo de Young (kPa)	
	Trombina sin teñir	Trombina + índigo carmín
J26B162	12,7 ± 0,7	13,5 ± 1,3
K49B252	16,1 ± 0,8	16,8 ± 0,4
K51B262	14,1 ± 1,1	13,5 ± 0,7

5 Las mediciones de elasticidad del coágulo demuestran que, la adición de índigo carmín a una concentración final del 0,0075% en el coágulo generado no tiene efecto sobre la firmeza del coágulo. Estos resultados demuestran que la adición de índigo carmín a la formulación de adhesivo de fibrina no influye en el módulo elástico del coágulo dando por consiguiente como resultado un adhesivo de fibrina con propiedades mecánicas superiores.

Ejemplo 10: El efecto de la adición de índigo carmín sobre la cinética de coagulación y la firmeza del coágulo formado

10 El siguiente ejemplo pretendía evaluar el efecto del índigo carmín sobre la formación y la firmeza del coágulo. Esto se llevó a cabo utilizando el tromboelastógrafo (TEG), que evalúa los parámetros de coagulación en sangre y productos sanguíneos.

Se evaluaron los siguientes parámetros utilizando un analizador de hemostasia (TEG-5000, Haemoscope Corporation): el tiempo R, tiempo K, ángulo (α), amplitud máxima (MA) G, y E.

15 Tiempo de reacción (R) - El tiempo necesario desde la colocación de la muestra en el analizador hasta la formación inicial del coágulo de fibrina.

Tiempo (K) - una medida del tiempo hasta obtener un determinado nivel de resistencia del coágulo. El tiempo se mide desde R hasta desarrollar un nivel fijo de firmeza del coágulo. K representa la cinética de la formación del coágulo.

20 Ángulo (α , grado) - Mide la rapidez de acumulación y reticulación de fibrina. Esta medida refleja la cinética de coagulación.

Amplitud máxima (MA) - representa la firmeza o resistencia máxima del coágulo de fibrina desarrollado.

G (SEMS) es una medida de la resistencia del coágulo.

E es un parámetro G normalizado y se denomina constante de elasticidad.

25 El procedimiento de ensayo fue como sigue: se diluyó BAC (Omrix) 1:9 en tampón Owren-Koller (Diagnostica Stago cat. N° 00360). Se diluyó trombina (estándar interno de Omrix, 139 IU/ml) en solución de CaCl_2 40 mM para conseguir una actividad de la trombina de 10 IU/ml. Se añadió solución de índigo carmín al 0,4% (preparado en agua purificada) a cada uno de los componentes del adhesivo de fibrina diluidos para alcanzar una concentración final de 0,075 mg/ml. Se mezcló la solución diluida de BAC (340 μl) con la solución diluida de trombina (20 μl) dentro de un recipiente de ensayo marcado. A continuación, se colocó el recipiente en el analizador TEG y se recogieron los parámetros de los coágulos desarrollados. Los parámetros de los coágulos obtenidos se presentan a continuación (Tabla 10). Cada ensayo se realizó por duplicado.

Tabla 10: Evaluación de la influencia del IC sobre la cinética de coagulación y la firmeza del coágulo mediante tromboelastografía

Muestra	R (min)	K (min)	Ángulo α (grado)	MA (mm)	G (Kd/sc)	E (d/sc)
J26B162	2,2±0,1	2,5±0,4	54,9±7,1	42,6±1,1	3,7±0,1	74,2±3,1
J26B162 + índigo carmín	2,0±0,2	2,3±0,4	60,1±5,5	45,1±3,7	4,2±0,6	82,4±12,±3
K47B240	1,9±0,3	2,1±0,1	62,2±0,7	44,3±0,21	4,0±0,1	79,4±0,6
K47B240 + índigo carmín	1,7±0,2	2,4±0,8	60,7±8	43,6±2,8	3,9±0,4	77,3±8,7

35 Los parámetros del tromboelastógrafo medidos no cambiaban significativamente como resultado de la adición de

índigo carmín a la formulación de adhesivo de fibrina a una concentración final del 0,0075% en el coágulo generado.

Estos resultados aportan pruebas que sugieren que la cinética de coagulación, la firmeza del coágulo y la resistencia máxima del coágulo desarrollado no se ven afectados como resultado de la adición del agente de visualización a la composición de adhesivo de fibrina.

5 **Ejemplo 11: El efecto del índigo carmín sobre la persistencia del coágulo.**

El fin del siguiente ejemplo era evaluar el efecto sobre la persistencia del coágulo, *in vivo*, de la adición de un agente de visualización al adhesivo de fibrina. El colorante elegido como sustancia de coloración fue el índigo carmín. El coágulo de fibrina sin teñir sirvió como testigo.

10 Se determinó la persistencia del coágulo en ratas Sprague-Dawley que pesaban de 300 a 400 g y de más de 9 meses de edad. Cada grupo de ensayo incluía 15 animales. La asignación a los grupos de tratamiento se realizó durante el período de aclimatación, utilizando un procedimiento aleatorio estratificado.

15 Antes y después de la cirugía, los animales fueron alojados en la sala de animales en una habitación con aire acondicionado, en un intervalo de temperaturas de 22±4°C, humedad relativa del 30 al 70% y bajo un ciclo de luz artificial (12 horas de luz artificial: 12 horas oscuridad). Los animales se pusieron en jaulas (1 ó 2 animales en cada jaula de policarbonato; 42x26x18 cm) con libre acceso al alimento y a agua corriente esterilizada. Los animales se examinaron y pesaron diariamente al inicio y al final del estudio.

Antes de la cirugía, se anestesió a los animales con una inyección IM de 40 a 80 mg/kg de una mezcla de 85/15 cetamina-HCl 100 mg/ml y xilazina-HCl 20 mg/ml.

20 Se utilizó el modelo de defecto de la pared abdominal como describen Wiseman y col., ("The effect of tranexamic acid in fibrin sealant on adhesion formation in the rat". J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004; 68:222-230). En resumen, se rasuró a las ratas y se marcó una línea de incisión de 6 cm sobre la piel que se superpone sobre la línea alba, en la línea media ventral. Con la pared muscular expuesta, se realizó una incisión de 5 cm en el músculo, a lo largo de la línea alba, hasta la cavidad peritoneal. La pared abdominal derecha se plegó hacia atrás. Se retiró una superficie de 2 cm x 1 cm del peritoneo. El borde medio de este defecto se situaba paralelo a la incisión de la línea media, a un centímetro de distancia, a un lado de la misma. El defecto de la pared abdominal se expuso al aire durante 10 minutos para controlar la hemorragia.

30 Las heridas se pulverizaron con las preparaciones de adhesivo de fibrina que incluían BAC como en el Ejemplo 2 (0,5 ml) y trombina como en el Ejemplo 4 (0,5 ml) (1 ml de adhesivo total). En el grupo de la muestra de ensayo el componente de trombina se complementó con índigo carmín a una concentración de 0,16 mg/ml (0,016%). El coágulo de fibrina resultante contenía índigo carmín a una concentración de 0,08 mg/ml (0,008%). Se cerraron la incisión en línea media y la piel con una sutura continua de dos colores Dexon 2-0. Los animales de los dos grupos fueron sacrificados 1, 3, 5, 7 y 12 días después de la iniciación del experimento, 3 animales de cada grupo, en cada instante de tiempo.

35 Al final de los intervalos de tiempo predefinidos, los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de 0,7 ml de Pental, 200 mg/ml por rata. Se realizó una incisión en forma de V que exponía la pared abdominal. Se eliminaron los restos del coágulo del abdomen de las ratas, se extrajo, se pesó, se disolvió en una solución trombolítica y se sometió a ensayo para la determinación de proteínas como se describe más adelante.

40 Se lavó cada coágulo con solución salina, se colocó en un tubo de ensayo que contenía la solución trombolítica (0,5 a 5 ml dependiendo del tamaño del coágulo); urea 7 M y NaOH 0,2 M en un tampón de PBS-cloruro sódico al 0,9% mezclado en una proporción de 1:2. Se dejó reposar el tubo de ensayo a temperatura ambiente hasta que el coágulo se disolvió completamente, según la inspección visual. La concentración de proteínas en el coágulo residual de cada muestra después de la solubilización del coágulo se determinó cuantitativamente mediante el siguiente procedimiento. Se diluyó 0,1 ml de solución de coágulo solubilizado en PuW (1:10) y se leyó a 280 nm. Las mediciones se llevaron a cabo en cubetas de 1 ml. Se determinó la proteína del coágulo después de reducir la dispersión de luz a 320 nm y la interpolación a partir de un patrón interno conocido. Para el cálculo de la cantidad de proteína se tuvo en cuenta el volumen real de la solución trombolítica utilizada para disolver los restos de coágulo. En las Tablas 11 y 12 se presentan, respectivamente, el peso del coágulo y la cantidad de proteína coagulable de las formulaciones de adhesivo de fibrina teñido y sin teñir.

50 En las Figuras 2A y B se presentan, respectivamente, el peso medio del coágulo y la cantidad media de proteína coagulable en los diversos instantes de tiempo

Tabla 11: Peso del coágulo y cantidad de proteína coagulable en los diferentes instantes de tiempo del adhesivo de fibrina teñido con índigo carmín

Nº de animal	Tiempo (días)	Peso del coágulo (g)	Proteína coagulable(mg)
T1-1	1	0,226	12,5
T1-2		0,161	19,9
T1-3		0,219	18,1
T1 medio		0,202±0,036	16,8±3,9
T3-1	3	0,1521	12,2
T3-2		0,2035	14
T3-3		0,2321	17,4
T3 medio		0,196±0,041	14,6±2,6
T5-1	5	0,1135	12,5
T5-2		0,1702	17,1
T5-3		0,1298	15,6
T5 medio		0,138±0,029	15,1±2,3
T7-1	7	0,0482	3,9
T7-2		0,0209	1,1
T7-3		0,1023	8,1
T7 medio		0,057±0,041	4,3±3,5
T12-1	12	ninguno	ninguno
T12-2		ninguno	ninguno
T12-3		ninguno	ninguno
T12 medio		NA	NA

5 **Tabla 12: Peso del coágulo y cantidad de proteína coagulable en los diferentes instantes de tiempo del adhesivo de fibrina no teñido**

Nº de animal	Tiempo (días)	Peso del coágulo (g)	Proteína coagulable(mg)
T1-1	1	0,201	13,2
T1-2		0,301	20,1
T1-3		0,143	11,1
1 medio		0,215±0,080	14,8±4,7
T3-1	3	0,2431	20
T3-2		0,1468	14,1
T3-3		0,1651	15,1
3 medio		0,185±0,051	16,4±3,2

(continuación)

Nº de animal	Tiempo (días)	Peso del coágulo (g)	Proteína coagulable(mg)
T5-1	5	0,1452	15,4
T5-2		0,0891	8,4
T5-3		0,1346	12,7
5 medio		0,123±0,030	12,2±3,5
T7-1	7	0,0183	2
T7-2		0,0404	4,4
T7-3		0,0215	1,9
7 medio		0,027±0,012	2,8±1,4
T12-1	12	ninguno	ninguno
T12-2		ninguno	ninguno
T12-3		ninguno	ninguno
12 medio		NA	NA

5 Los resultados indican que a partir del día 3 el peso del coágulo disminuye con el tiempo en ambos grupos sometidos a ensayo, es decir, adhesivo de fibrina teñido y sin teñir (Fig. 2A). Resultó evidente una reducción de la cantidad de proteína coagulable a partir del 5º día en ambos grupos (Fig. 2B). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto al peso del coágulo y la cantidad de proteína coagulable. Estos resultados demuestran que la adición de índigo carmín a una concentración final del 0,008% en el adhesivo generado no influye en la velocidad de la fibrinólisis y la persistencia del coágulo en una situación *in vivo*.

10 Además, Hay que reseñar que, tras el primer día no se evidenciaba colorante en el coágulo como se determinó espectrofotométricamente o mediante inspección visual.

Ejemplo 12: Visibilidad laparoscópica, en la cavidad intraperitoneal, del adhesivo de fibrina que contiene diferentes concentraciones de azul de metileno y de índigo carmín.

15 El objetivo de estos experimentos era estudiar el efecto de diferentes concentraciones de los agentes de visualización sometidos a ensayo sobre la visibilidad del adhesivo de fibrina (como se describe en los documentos US-B-6.121.232 y WO9833533) en el procedimiento de laparoscopia durante la pulverización en órganos sangrantes o no sangrantes. La visibilidad del producto sometido a ensayo se determinó utilizando un modelo laparoscópico interperitoneal de cerdo con o sin inducción de exudación en la superficie del órgano. Se sometió a ensayo la visibilidad de dos sustancias colorantes: azul de metileno e índigo carmín. Se alojó a hembras adultas de cerdo doméstico híbrido (n = 1) con un peso de aproximadamente 50 kg y menores de 2 años de edad en un centro autorizado de acuerdo con los requisitos éticos actuales.

20 Se colocaron tres puertos laparoscópicos en el abdomen del cerdo. La preparación del adhesivo de fibrina se aplicó al sitio diana por pulverización. El procedimiento de manipulación del ensayo se repitió para cada una de las concentraciones de material sometido a ensayo, y el ensayo testigo (sin teñir). Se descongelaron los viales de adhesivo de fibrina poco antes de su uso y se añadieron los colorantes a los viales de trombina.

25 Se utilizó un aplicador nuevo para cada concentración. Cada sitio de aplicación en el órgano de elección estaba lo bastante alejado de los sitios de aplicación anteriores para poder distinguirlos entre las aplicaciones. La operación y el sitio de aplicación se grabaron antes y después de la aplicación del adhesivo de fibrina. La aplicación de adhesivo de fibrina se grabó desde diferentes ángulos y diferentes ajustes de zoom.

30 Aplicación quirúrgica en el sitio de la hemorragia: se indujo la exudación de la superficie del órgano de elección frotando la superficie del órgano con papel de lija insertado con los clips de laparoscopia en el abdomen.

Aplicación del adhesivo de fibrina complementado con azul de metileno

Se aplicó a la superficie sangrante del bazo adhesivo de fibrina sin teñir o complementado con tres concentraciones diferentes de azul de metileno. El adhesivo de fibrina incluía: 1) BAC como en el Ejemplo 2 (5 ml). 2) Trombina

(1.000 IU/ml; 5 ml). La trombina se complementó con las siguientes concentraciones de azul de metileno: 50, 100 ó 500 ppm (concentraciones del 0,005, 0,01, y 0,05%, respectivamente).

El director del laboratorio designó tres evaluadores para la evaluación independiente de la visibilidad del adhesivo de fibrina con las diferentes concentraciones de azul de metileno. El evaluador tuvo en cuenta dos parámetros: 1) Contraste de color entre la superficie del bazo y el material aplicado. 2) Contraste de color entre la sangre y el material aplicado. Los evaluadores votaron de manera independiente por una concentración de 500 ppm de azul de metileno en los viales de trombina del adhesivo como la concentración que proporciona la mayor visibilidad respecto al adhesivo de fibrina. Todas las concentraciones de AM sometidos a ensayo presentaron una mayor visibilidad en comparación con el adhesivo de fibrina sin teñir.

10 **Aplicación del adhesivo de fibrina complementado con índigo carmín**

Se aplicaron dos concentraciones de índigo carmín y se compararon con el producto no teñido. El ensayo de visibilidad se llevó a cabo en dos órganos de color oscuro (bazo e hígado) en sitios sangrantes y no sangrantes. Además, se sometió a ensayo el adhesivo de fibrina teñido en un órgano de color claro (útero) sólo en un sitio sangrante y sólo con colorante (debido al tamaño limitado del órgano).

15 El adhesivo de fibrina incluía BAC y trombina como se ha indicado anteriormente. El componente de trombina se complementó con las siguientes concentraciones de índigo carmín: 0,2 mg/ml y 0,1 mg/ml (0,02% y 0,01%, respectivamente). En cada aplicación se pulverizó 1 ml de cada componente.

20 Las diferentes aplicaciones fueron valoradas por siete evaluadores que clasificaron la visibilidad del producto pulverizado en cada caso. La visibilidad se clasificó en base al contraste entre la sustancia aplicada y la superficie del órgano o la acumulación de sangre (la visibilidad se clasificó de 1 a 10, donde 1 representaba visibilidad baja y 10 visibilidad alta).

25 Todos los evaluadores coincidieron en que el adhesivo de fibrina que contenía índigo carmín era mejor que el adhesivo de fibrina sin teñir. Los resultados sugerían que las soluciones de trombina teñidas con índigo carmín al 0,01 y 0,02% permitían la clara visualización del material rociado incluso en condiciones de pulverización en órganos de color oscuro con sangrado moderado. Cuando se aplicó el índigo carmín a la superficie sangrante del bazo, en la que una cantidad relativamente mayor de sangre diluía del producto, el adhesivo de fibrina que contenía un 0,02% de índigo carmín resultó mejor a la hora de proporcionar una diana clara.

30 Hay que reseñar que los resultados adicionales demostraron que el aumento de la concentración del agente de visualización (por ejemplo, azul de metileno e índigo carmín) podría dificultar el proceso de coagulación del gel de fibrina. De esta manera, las concentraciones anteriormente indicadas son un equilibrio entre la visibilidad del gel pulverizado y la estabilidad de la capa de gel. Se ha optimizado el mantenimiento de estas concentraciones para obtener ambos.

Ejemplo 13: Eficacia de la formulación de adhesivo de fibrina teñido frente a la formulación sin teñir en la reducción de las adherencias post-quirúrgicas.

35 La formulación de adhesivo de fibrina de la invención puede utilizarse como agente antiadherente. El siguiente ejemplo ilustra la eficacia de la formulación de adhesivo de fibrina teñido en la reducción de adherencias post-quirúrgicas.

40 Se suministró la solución de índigo carmín (indigotindisulfonato sódico, Amresco, Solon, Ohio) como solución estéril al 1% p/v en un vial de color ámbar. Inmediatamente antes de su uso, se sacaron 0,1 ml del vial y se mezclaron con la solución de trombina (5 ml) durante 5 minutos para conseguir una concentración final de colorante del 0,02% (que dio como resultado el adhesivo de fibrina que contenía una concentración final de colorante del 0,01%). Como material de referencia se utilizó una formulación de adhesivo de fibrina sin teñir.

La evaluación se llevó a cabo en un modelo de excoiación de trompa uterina de conejo, en presencia de sangrado.

Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda hembras (*Oryctolagus cuniculus*) con un peso de entre 2,7 y 3,3 kg.

45 Los animales se aclimataron durante un mínimo de 5 días antes de la iniciación del estudio, y fueron supervisados diariamente por personal experimentado en el cuidado de animales.

Los animales se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable. El ambiente de la sala se mantuvo aproximadamente a 20°C con una humedad relativa del 30 al 70% y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas.

50 Se proporcionó a los animales pienso para conejo Harlan Teklad 15% Rabbit Diet # 8630 (Harlan Teklad, Indianapolis, IN) y agua corriente a discreción durante todo el estudio. Se suministró agua de la red pública filtrada a través de un sistema de bebida automático Edstrom. El estudio se realizó de acuerdo con las directrices NIH como se describe en el Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, 1996.

Preparación y recuperación

Los animales se pesaron el día de la cirugía. La anestesia se indujo y mantuvo por inhalación de isoflurano (concentración del 5% y del 3,5%, respectivamente). La depilación de la zona quirúrgica se llevó a cabo con una maquinilla eléctrica para animales. Se aspiró la zona para eliminar los recortes de pelo y los restos de suciedad, y después se enjuagó con alcohol. Se limpió toda la zona con Cloroxilenol al 3% y se dejó actuar durante 5 minutos antes de eliminarlo con alcohol isopropílico al 70% y repetir la operación. Se limpió de nuevo el sitio quirúrgico con alcohol isopropílico al 70%. Se aplicó a la zona preparada un campo de incisión estéril.

Se les administraron, mediante inyección subcutánea, tres dosis de buprenorfina (Buprenex) (0,03 mg/kg, 0,3 mg/ml x 0,3 ml), una la mañana de la cirugía, una de seis a ocho horas después y una a la mañana siguiente. Se dejó a los animales recuperarse completamente en una incubadora antes de devolverlos a sus jaulas. Después de eso, se mantuvieron con alimento y agua a discreción, y se observaron diariamente. Se inspeccionó diariamente la línea de incisión para detectar signos de dehiscencia y sangrado.

Modelo de excoriación de trompa uterina de conejo

El modelo de excoriación de trompa uterina de conejo se llevó a cabo básicamente como describen Wiseman y col., ("Effect of thrombin-induced hemostasis on the efficacy of an absorbable adhesion barrier". J Reprod Med. 1992; 37:766-770). En resumen, después de la anestesia y la preparación para la cirugía estéril se realizó una incisión en la línea media a través de la piel y de la pared abdominal. Se localizaron y se expusieron las dos trompas uterinas. Utilizando una Escala Francesa, se midió y registró el diámetro de cada trompa uterina. Sólo se introdujeron en este protocolo los conejos con trompas uterinas con un tamaño de entre 10 y 16, ambos incluidos, en la Escala Francesa.

Mediante el uso de una hoja de bisturí del número 10, se rasparon longitudes de 5 cm de cada trompa uterina, por toda la longitud de la trompa, a una distancia de aproximadamente 1 cm de la bifurcación uterina, 40 veces por cada lado, hasta lograr un sangrado puntiforme. Para la variación de "sangrado" se hicieron incisiones en cuatro pequeños vasos en la arcada mesouterina a una distancia de aproximadamente 5 mm del útero hasta producir sangrado. Después de terminar los procedimientos de excoriación, se reveló al cirujano la asignación de los grupos. 13 animales recibieron adhesivo de fibrina sin colorante, 11 recibieron adhesivo de fibrina complementado con índigo carmín y cinco animales sirvieron como testigos (se realizaron los procedimientos quirúrgicos pero no se aplicó material de ensayo). La asignación a los grupos de ensayo se realizó al azar por sorteo. Se aplicaron a la trompa uterina los materiales de ensayo.

Aplicación de los materiales de ensayo

Se aplicaron, a cada animal elegido al azar para recibir esos tratamientos, entre 4,5 ml y 10 ml de volumen total de adhesivo de fibrina teñido (0,02% de colorante en la solución de trombina como se ha descrito anteriormente) o sin teñir. Después del endurecimiento (aproximadamente 120 segundos) se dio la vuelta a las trompas para permitir la aplicación al otro lado. A continuación volvieron a colocar anatómicamente los órganos y se cerró la incisión. Las incisiones abdominales se cerraron utilizando una sutura continua de Vicryl 4-0. La fascia se cerró sin apretar con Vicryl 4-0 y la piel se cerró con Vicryl sin teñir 4-0 (aguja de corte) utilizando un procedimiento de sutura subcuticular.

Evaluación

A los 13 ó 14 días después de la cirugía, se sacrificaron los animales mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico (120 mg/ml; 1 ml/kg). Se registraron los pesos corporales de los animales. Se abrió el abdomen y el sitio quirúrgico fue inspeccionado por un observador que desconocía el tratamiento.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

Extensión de las adherencias – El % de la longitud total de la trompa involucrada con adherencias expresadas como el % de la longitud del útero.

Tenacidad (gravedad) de las adherencias – Las adherencias se clasificaron como 0 (ausente), 1,0 (adherencias membranosas) y 2,0 (tenaces, que necesitan una disección cortante).

Grado de circunvolución uterina - Una medida de la distorsión anatómica debido a las adherencias. El grado de circunvolución uterina se registró como:

Sin circunvolución – Tramos rectos de las trompas con o sin adherencias que se distinguen claramente.

Parcialmente circunvolucionada - Las trompas tienen adherencias y del 50 al 75% de la longitud de las trompas está envuelta, impidiendo distinguir las partes rectas.

Completamente circunvolucionada - Es imposible distinguir la anatomía uterina porque la trompa está completamente envuelta.

Procedimientos histológicos y fotográficos

Se tomaron fotografías de la intervención quirúrgica y durante la disección de la mayor parte de los animales. Los úteros y ovarios se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%.

5 Los animales fueron excluidos del análisis primario si había indicios de sucesos inusuales que pudieran haber influido en el resultado. Tales indicios incluyen comúnmente la presencia de infección dentro de la cavidad abdominal. Cualquier decisión de excluir a un animal se realizó antes de la inspección de la zona quirúrgica y la evaluación de las adherencias, sin conocimiento de la asignación de grupo o de la presencia o el alcance de las adherencias.

Análisis estadístico

10 Se calculó el % medio de extensión de las adherencias para las dos trompas. Este promedio se utilizó para calcular la extensión media de las adherencias (+ SEM) para el grupo, que se presenta con una cifra decimal. La comparación de la extensión de las adherencias en los grupos de adhesivo de fibrina teñido y no teñido se realizó construyendo un límite unilateral superior de confianza del 95% para la diferencia (con colorante menos sin colorante), asumiendo normalidad (es decir, en base a la t de Student). Según el protocolo, si este límite de confianza está por debajo de 20 puntos porcentuales, se afirmaría que el adhesivo de fibrina más el índigo carmín no es inferior al adhesivo de fibrina sin teñir.

20 Se realizó una comparación con el grupo testigo para demostrar la sensibilidad del ensayo, y se realizó utilizando la t de Student. Se comparó la incidencia de las adherencias utilizando la prueba exacta de Fisher, y se comparó la tenacidad y el grado de circunvolución uterina utilizando la prueba del Chi-cuadrado. Para todos los ensayos, el nivel de significación estadística se tomó como $p < 0,05$.

Resultados

Ambas preparaciones eran fáciles de manejar y de aplicar. No hubo ningún efecto evidente de ninguna de las formulaciones sobre la cicatrización de la incisión de la pared abdominal.

25 Todos los animales se recuperaron sin complicaciones de la intervención quirúrgica y aumentaron de peso durante el período de estudio. En la Tabla 13 que se presenta a continuación, se presentan los cambios de peso.

Tabla 13: Cambios de peso

Grupo	Media del cambio de peso	N	SEM
Adhesivo de fibrina	0,25	13	0,02
Adhesivo de fibrina + colorante	0,23	11	0,02
Testigo	0,25	5	0,04

Resulta evidente que no hubo diferencias en el cambio de peso entre los grupos de estudio.

Efecto de la formulación de adhesivo de fibrina teñido y sin teñir sobre la formación de adherencias

30 Los resultados se resumen en la Tabla 14 que se presenta a continuación.

Tabla 14: Efecto de la formulación de adhesivo de fibrina teñido y sin teñir sobre la formación de adherencias

Grupo	% de extensión ¹	p t de Student ²	Libre de adherencias ³	Clasificación ⁴	Circunv ⁵	Mat ⁶	N ⁷
Adhesivo de fibrina	9,3 (3,1)	0,027	38% [§]	10/15/1 [#]	25/1/0 ^{##}	5/6/2	13
Adhesivo de fibrina + colorante	8,4 (1,4)	0,027	36% ^{§§}	8/12/2 [#]	22/0/0 ^{##}	4/3/4	11
Testigo	42,5 (10,1)		10%	1/2/7	8/0/2	n/a	5

1. % de la longitud de la trompa uterina con adherencias, media de las trompas izquierda y derecha (SEM)

2. valor p para la t de Student frente al Testigo

3. % de trompas uterinas libres de adherencias (Número de trompas uterinas sin adherencias/total)

4. Número de trompas sin adherencias/adherencias con clasificación 1/adherencias con clasificación 2

5. Número de trompas sin circunvolución/con circunvolución parcial /con circunvolución completa

6. Material remanente pequeño/moderado/grande

7. Número de animales

#p ≤ 0,01, prueba de χ^2 , frente al Testigo; ##p <0,05, prueba de χ^2 , frente al Testigo; §p <0,088, prueba exacta de Fisher frente al Testigo; §§p <0,114, prueba exacta de Fisher frente al Testigo

5 Se formaron adherencias extensas en los animales testigo ($42,5 \pm 10\%$). Se observaron reducciones estadísticamente significativas en el % de extensión de la formación de adherencias para las formulaciones de adhesivo de fibrina teñido y sin teñir ($9,3 \pm 3,1\%$, $p = 0,027$ y $8,4 \pm 1,4\%$, $p = 0,027$) en comparación con el grupo testigo.

Las formulaciones de adhesivo de fibrina teñido y sin teñir lograron reducciones estadísticamente significativas de la tenacidad de las adherencias y del grado de circunvolución uterina en comparación con los testigos. Ambas formulaciones aumentaban el resultado libre adherencias del 10% en los testigos al 38% (sin teñir) y al 36% (teñido), pero estas diferencias no eran estadísticamente significativas.

10 La comparación de la extensión de las adherencias en los dos grupos de adhesivo de fibrina (teñido y sin teñir) demostró que el límite superior de confianza era 5,44, lo que indica que ambos grupos de ensayo eran igualmente eficaces a la hora de reducir las adherencias post-quirúrgicas.

15 Estos resultados demuestran que ambas formulaciones de adhesivo de fibrina (teñido y sin teñir) eran igualmente eficaces a la hora de reducir las adherencias posquirúrgicas. La adición de colorante a la formulación no dio como resultado cambios apreciables en la eficacia, las propiedades de manipulación, los eventos adversos o las propiedades de degradación.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de adhesivo de fibrina para preparar una formulación de adhesivo de fibrina para su aplicación a una superficie de una parte del cuerpo de un paciente, comprendiendo dicho kit:
- 5 un primer componente separado necesario para formar la formulación de adhesivo de fibrina, comprendiendo el primer componente separado una solución de fibrinógeno,
- un segundo componente separado necesario para formar la formulación de adhesivo de fibrina, comprendiendo el segundo componente separado una solución de trombina que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno, en el que dicha solución de trombina comprende adicionalmente un agente de visualización,
- 10 **caracterizado porque:**
- (a) dicho agente de visualización es azul de metileno presente en dicha solución de trombina en un intervalo de concentración comprendido entre el 0,01 y el 0,05%, y dicha solución de trombina teñida con azul de metileno está protegida de la luz; o
- 15 (b) dicho agente de visualización es índigo carmín presente en dicha solución de trombina en un intervalo de concentración comprendido entre el 0,01% y el 0,02%.
2. El kit según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un catalizador capaz de inducir la reticulación de la fibrina.
3. El kit según la reivindicación 1 ó 2, en el que el catalizador es una transglutaminasa.
4. El kit según la reivindicación 3, en el que la transglutaminasa es el Factor XIII.
- 20 5. El kit según la reivindicación 4, en el que el Factor XIII está incorporado en la solución de fibrinógeno.

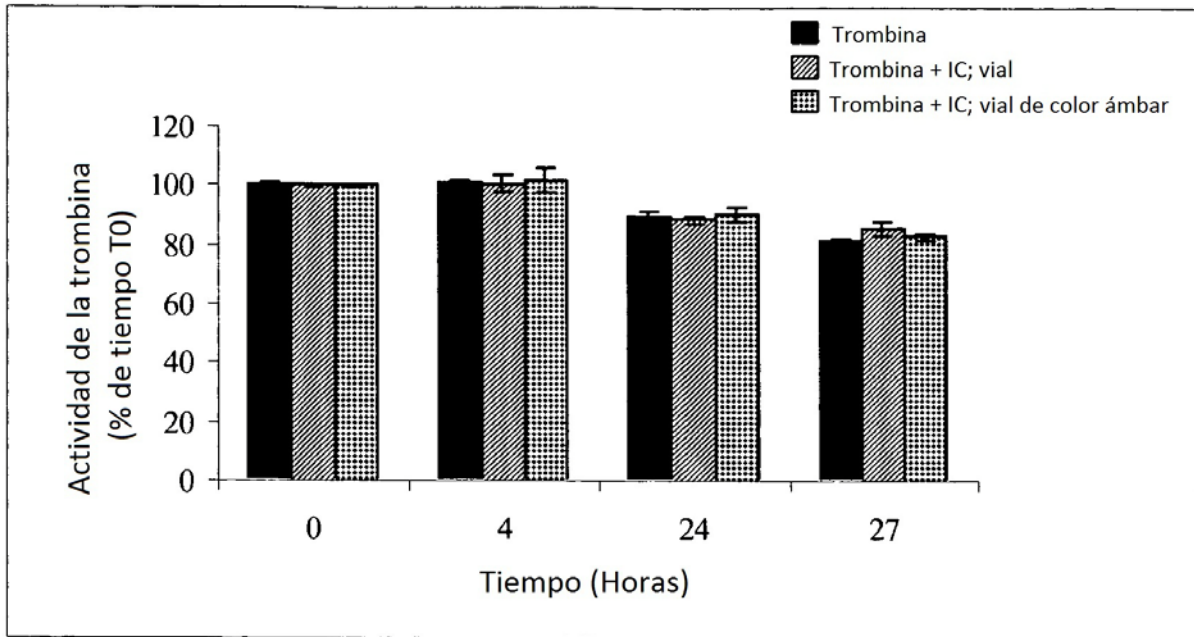


Fig. 1A

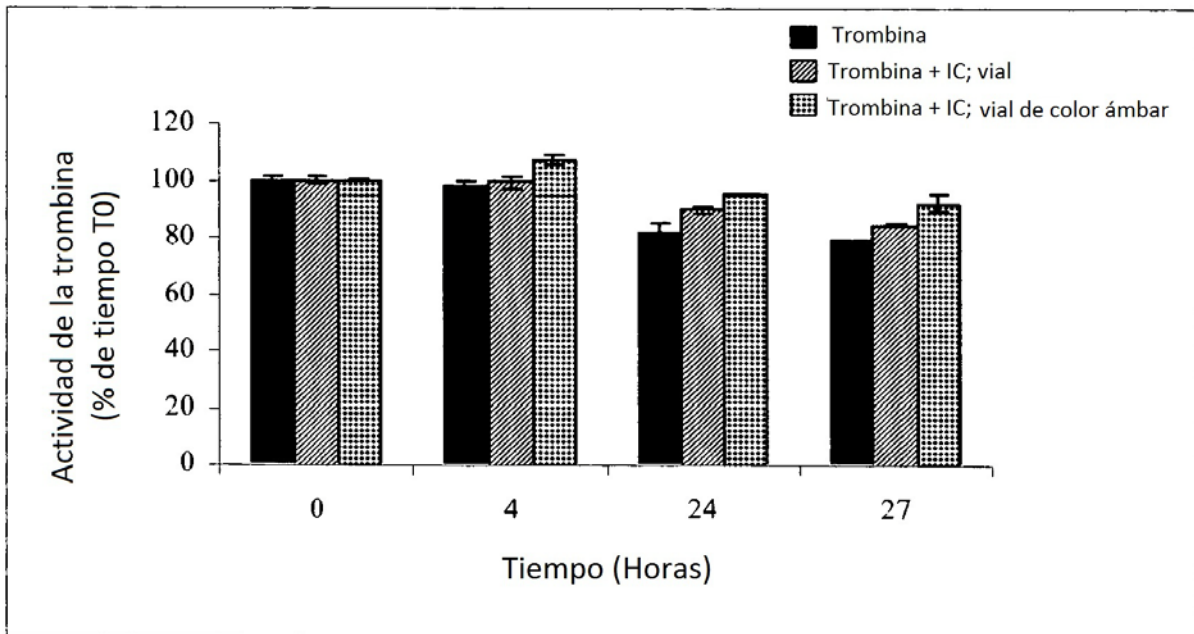


Fig. 1B

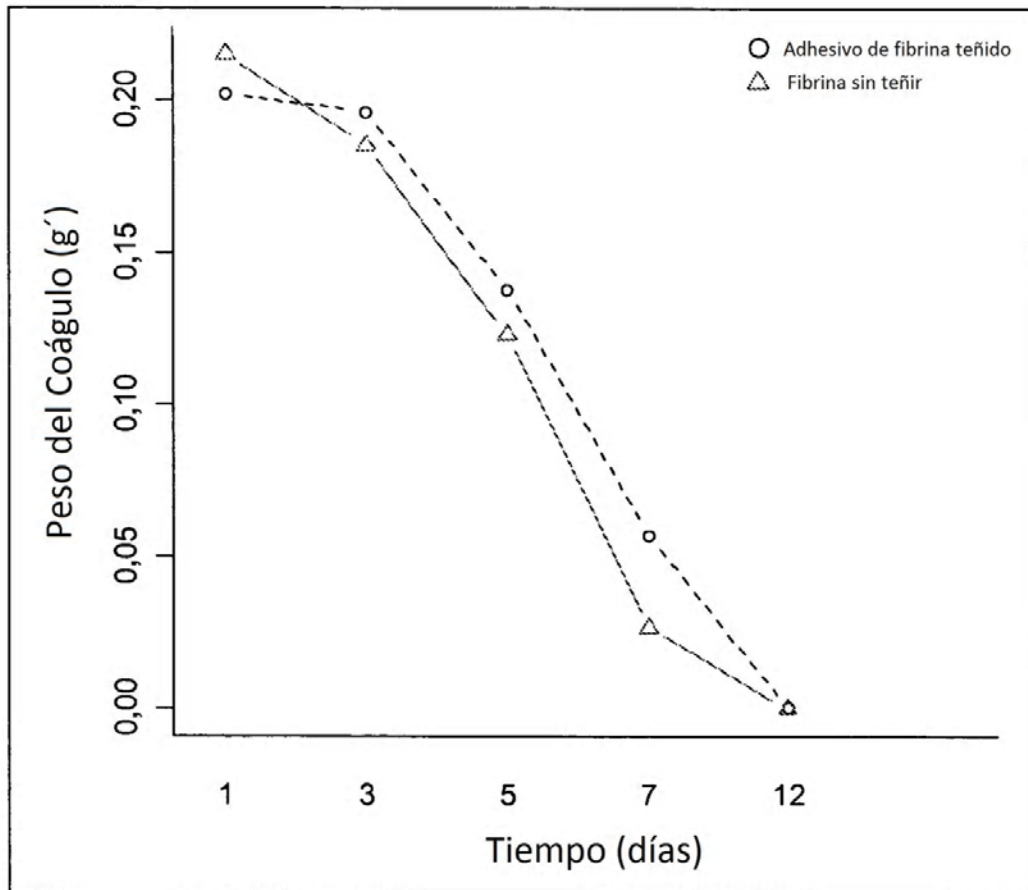


Fig. 2A

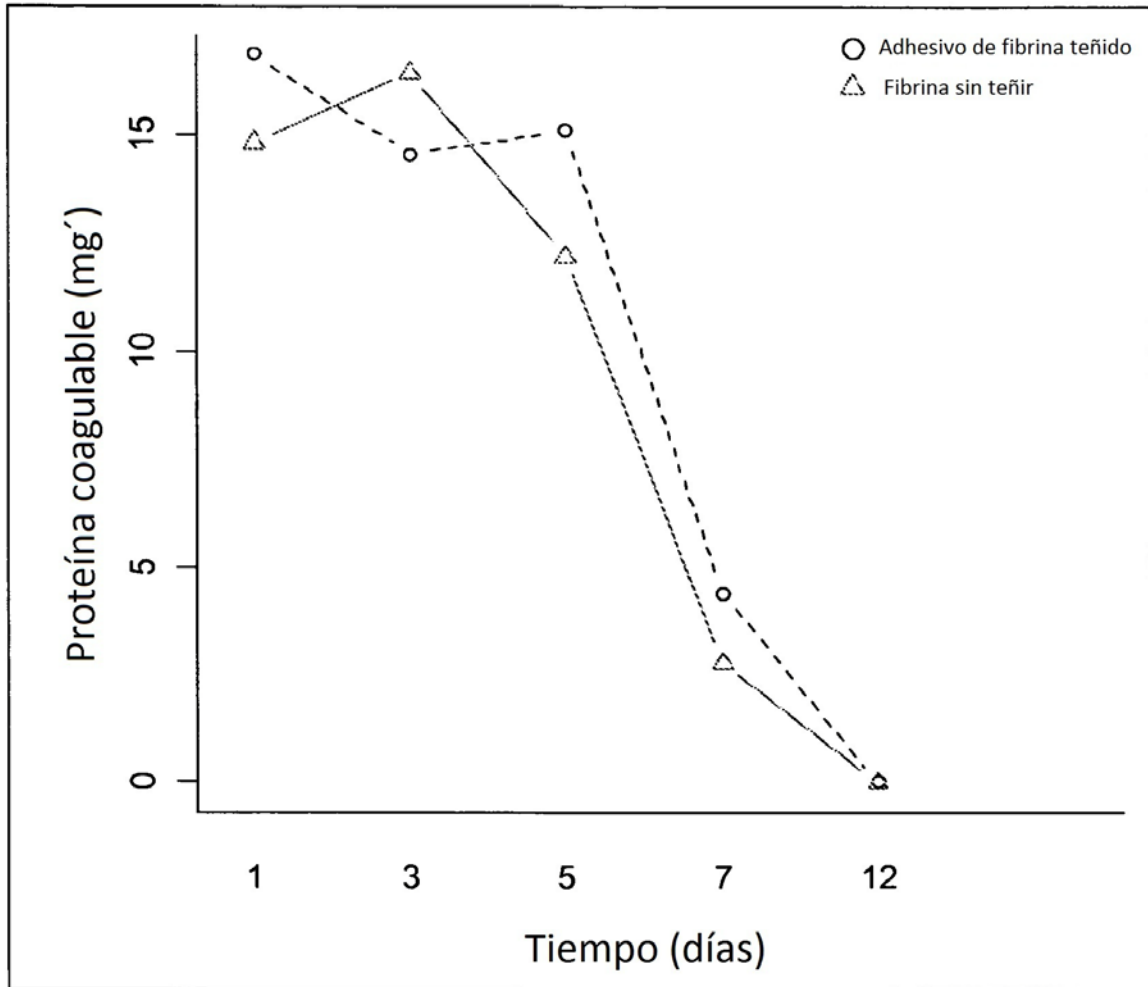


Fig. 2B