

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 491**

51 Int. Cl.:

**A61L 31/10** (2006.01)

**A61L 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2009 E 09744205 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2331158**

54 Título: **Dispositivo implantable que comprende un sustrato pre-recubierto con fibrina estabilizada**

30 Prioridad:

**22.09.2008 US 99174 P**  
**03.02.2009 EP 09151987**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.01.2014**

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)**  
**Bldg. 14 Weizmann Science Park P.O. Box 619**  
**Rehovot 76106, IL**

72 Inventor/es:

**SHEETRIT, EYAL;**  
**NUR, ISRAEL;**  
**BAR, LILIANA y**  
**WEISSMAN, LIOR**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 438 491 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**

Dispositivo implantable que comprende un sustrato pre-recubierto con fibrina estabilizada

**5 Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo implantable que comprende un sustrato recubierto con fibrina estabilizada y no completamente secada y usos del mismo.

**10 Antecedentes de la invención**

Una hernia se produce cuando el contenido de una cavidad del cuerpo sobresale del área en la que está normalmente contenida. Hay muchos tipos diferentes de hernias que se clasifican según su localización anatómica. El tipo más común de hernia es en la región del abdomen, en la que una debilidad en la pared abdominal evoluciona en un orificio localizado, o un "defecto" a través del cual pueden sobresalir los órganos abdominales.

Las hernias normalmente necesitan ser reparadas quirúrgicamente para prevenir la disfunción del órgano y complicaciones adicionales. La reparación se realiza normalmente reforzando el músculo con prótesis de malla quirúrgica. Las complicaciones quirúrgicas pueden incluir infección del sitio quirúrgico, adhesiones posoperatorias, contaminación bacteriana, reaparición de la hernia o dolor crónico.

En los últimos años, los pegamentos de fibrina se usan cada vez más en diversos ámbitos clínicos y quirúrgicos para reducir la formación de adhesiones posoperatorias. En la práctica, los componentes del pegamento de fibrina se pulverizan sobre el sitio operado.

Los pegamentos de fibrina también se conocen como sellantes de fibrina o adhesivos de fibrina. Normalmente se obtienen mezclando un componente de fibrinógeno y un componente de trombina. La mezcla de ambos componentes imita la reacción fisiológica de la formación de fibrina cuando se produce en la circulación sanguínea durante la última etapa de la cascada de coagulación, cuando la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina por una acción enzimática. Sin embargo, hay una diferencia importante, la concentración de tanto el fibrinógeno como la trombina en los componentes del pegamento de fibrina es al menos 20 veces superior a su concentración en el plasma. Por ejemplo, la concentración de fibrinógeno en el plasma es aproximadamente 2-3 mg/ml, mientras que la concentración de fibrinógeno en la formulación de pegamento de fibrina es aproximadamente 70-100 mg/ml. Estos atributos contribuyen a la naturaleza física y a la longevidad del coágulo formado. El componente de fibrinógeno también puede contener otras proteínas plasmáticas tales como factor VIII, factor XIII, fibronectina, vitronectina y factor de von Willebrand. Algunos fabricantes añaden agentes antiproteolíticos a la formulación de pegamento 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). Cuando los componentes se mezclan se forma el coágulo de fibrina y se adhiere al sitio de aplicación. Las propiedades físicas del sellante de fibrina permiten que actúe de agente sellante estanco a fluidos y detenga la hemorragia y/o selle tejidos y materiales quirúrgicos, tales como injerto, en una configuración deseada. La estanca estructura de fibrina, formada por una alta concentración de trombina, también forma una barrera física que previene la infiltración de células inflamatorias, bacterias y epiplón en el tejido lesionado, produciendo por consiguiente reacción inflamatoria local reducida, formación reducida de adhesiones y proliferación bacteriana reducida.

Martin-Cartes y col. (Surg. Today 2008 38:135-140) desvelan que una reducción en tanto la cantidad como la uniformidad de adhesiones se observó en prótesis implantadas cubiertas con pegamento de fibrina usado en reparación de eventración. En estos estudios las prótesis se colocaron en el sitio de cirugía y se cubrieron con pegamento de fibrina sobre el lado visceral durante el transcurso del procedimiento quirúrgico. El inconveniente de pulverizar el pegamento de fibrina sobre una malla quirúrgica dispuesta dentro del área de cirugía es que el procedimiento requiere tiempo y es técnicamente difícil de realizar mientras se trabaja a través de pequeñas incisiones y bajo iluminación artificial tal como en el procedimiento laparoscópico debido a una evaluación errónea del espesor y la posición del pegamento de fibrina sobre la superficie de la malla. Además, los componentes del pegamento de fibrina pueden salirse de la localización deseada tanto debido a enjuague como a error del cirujano, produciendo un volumen relativamente bajo de pegamento de fibrina aplicado a la superficie lesionada y en una capa no uniforme del material aplicado. Se han desvelado dispositivos pre-recubiertos con pegamento de fibrina para injertos vasculares. En estos dispositivos, el recubrimiento con fibrina está seco, presente sobre el lado intraluminal del injerto vascular y permite el cultivo de células endoteliales dentro del injerto.

El documento US-B-5.272.074 proporciona procedimientos para recubrir superficies de materiales poliméricos con fibrinógeno y fibrina mediante un procedimiento de desnaturalización por calor. Se describe que la adherencia del fibrinógeno a superficies poliméricas puede potenciarse enormemente por desnaturalización térmica del dominio D del fibrinógeno. Se desvela que las superficies recubiertas con fibrina polimerizada pueden estabilizarse mediante tratamiento con trombina, factor XIII y fibrinógeno adicional. Se indica que los procedimientos de recubrimiento son adecuados para el recubrimiento de superficies de dispositivos protésicos que se exponen a la circulación sanguínea tales como injertos vasculares, válvulas cardíacas artificiales y dispositivo de ayuda cardíaca.

5 El documento US-B-5.660.873 se refiere a un procedimiento para el recubrimiento de una superficie de un sustrato con fibrina. Se desvela que el sustrato recubierto con fibrina se seca dando un sustrato recubierto con fibrina secado adecuado para sustratos que se exponen a la circulación sanguínea tales como prótesis endovasculares intraluminales, creando así dispositivos con un bajo riesgo de inducir formación de coágulos. Las anteriores patentes no dicen nada sobre un dispositivo de malla para hernia.

10 El documento US-A-2005/0010239 desvela un dispositivo de malla para la reparación quirúrgica de hernia que contiene un adhesivo de tejido. Se desvela que el adhesivo de tejido dentro de la malla se activa después de que el dispositivo de malla se haya dispuesto en el cuerpo del paciente para asegurar la malla en su sitio sin la necesidad de suturas, grapas u otro aparato de aseguramiento.

15 El documento WO 2009/019685 desvela una malla que comprende una primera capa hecha de fibrina y permite la adhesión celular y una segunda capa sustancialmente no porosa caracterizada por no adhesión. En uso, la primera capa se adhiere al tejido de la pared abdominal y permite la infiltración de tejidos en la pared en la capa.

Hay claramente una necesidad sin satisfacer de un implante protésico quirúrgico con complicaciones posoperatorias reducidas.

20 **Resumen de la invención**

25 La invención se refiere a un dispositivo protésico o implantable que comprende un sustrato que tiene una superficie visceral recubierta con fibrina en el que tal fibrina se estabiliza sobre el sustrato. Ventajosamente, la fibrina se estabiliza sobre el sustrato sin emplear secado intensivo (por ejemplo, secado sin someter a procedimientos de liofilización (secado por congelación) o secado por pulverización). En un procedimiento de la invención, la fibrina se estabiliza sobre el sustrato por inclusión de una alta concentración de soluto tal como sal en la composición de recubrimiento de fibrina.

30 Aunque se han descrito dispositivos recubiertos con pegamento de fibrina, el dispositivo de la invención puede adherirse fuertemente al tejido lesionado y disminuir las complicaciones relacionadas con la cirugía tales como adhesiones, colonización microbiana y/o bacteriana, reparación de la lesión y/o infección. Ventajosamente, el dispositivo según la invención puede almacenarse durante periodos prolongados de tiempo antes de uso. El dispositivo de la invención es suficientemente flexible para administrarse fácilmente durante el procedimiento laparoscópico.

35 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un dispositivo implantable mejorado para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, comprendiendo el procedimiento las etapas de: proporcionar un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie no visceral; formar un recubrimiento de fibrina sobre al menos una parte de la superficie visceral aplicando a esa porción un volumen definido de una disolución que comprende fibrinógeno y una disolución que comprende una enzima proteolítica que puede formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno; y secar el recubrimiento, que comprende además, antes de la etapa de secado, la etapa de añadir un soluto que pueda unirse a agua libre y que tenga un peso molecular de 1.000 Dalton o menos, obteniéndose así un dispositivo implantable mejorado que comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada.

45 En una realización de la invención, las complicaciones posoperatorias están seleccionadas del grupo que consiste en adhesiones, contaminación bacteriana, infecciones, reparación de aberturas o defectos, y una combinación de los mismos.

50 En otra realización de la presente invención, la superficie del sustrato se activa antes de formar el recubrimiento de fibrina. La activación de la superficie puede llevarse a cabo por tratamiento con plasma.

En otra realización de la presente invención, la enzima proteolítica es trombina.

55 Todavía en otra realización de la invención, la etapa de formación de fibrina se lleva a cabo aplicando en primer lugar a la superficie visceral una disolución que comprende fibrinógeno y aplicando en segundo lugar a la superficie visceral una disolución que comprende una enzima proteolítica que puede formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno.

Todavía en otra realización de la invención, el sustrato es poroso. El sustrato puede ser una malla.

60 Todavía en otra realización de la invención, la abertura o defecto es una hernia.

65 En una realización de la invención, el dispositivo se implanta usando un procedimiento laparoscópico. El dispositivo puede usarse en área contaminada o potencialmente contaminada. Todavía en otra realización de la invención, el soluto puede añadirse antes de la formación de fibrina.

Todavía en otra realización de la invención, el soluto está seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos tales

- como ácido tranexámico, clorhidrato de arginina, clorhidrato de lisina y sales de los mismos; sales tales como cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de trisodio; sacáridos tales como sacarosa y maltosa; polioles tales como poliglicerol; alcoholes de azúcar tales como manitol y xilitol, y una combinación de los mismos. En una realización de la invención, el soluto es una sal.
- 5 El contenido de sal en el recubrimiento de fibrina tras el secado puede estar en el intervalo del 5% - 68%. En una realización de la presente invención, el contenido de sal en el recubrimiento de fibrina tras el secado está en el intervalo del 20% - 68%, en el intervalo del 20% - 32%, o en el intervalo del 51% - 68%.
- 10 Las disoluciones pueden aplicarse usando un dispensador de líquidos.
- En una realización de la presente invención, el secado se lleva a cabo por secado no intensivo. En otra realización de la invención, el recubrimiento se seca al aire. La temperatura durante la etapa de secado puede ser inferior a 37 °C.
- 15 En otra realización de la invención, el recubrimiento de fibrina tiene una actividad del agua igual a o inferior a 0,6 tras la etapa de secado.
- Todavía en otra realización de la invención, el recubrimiento de fibrina comprende agua residual tras la etapa de secado.
- 20 Todavía en otra realización de la invención, el contenido de agua en el recubrimiento está en el intervalo del 3%-20%, igual a o inferior al 15%, igual a o inferior al 10%, o igual a o superior al 3%.
- 25 Todavía en otra realización de la invención, el recubrimiento comprende un contenido de agua en el intervalo del 3%-20% y un contenido de sal en el intervalo del 20%-68% tras la etapa de secado.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un dispositivo implantable para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, el dispositivo comprende un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie no visceral, en el que dicha superficie visceral comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada, en el que el recubrimiento comprende un soluto que puede unirse a agua libre que tiene un peso molecular de 1.000 Dalton o menos.
- 30 En una realización de la invención, la abertura o defecto es una hernia.
- 35 En otra realización de la invención, el soluto está seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos tales como ácido tranexámico, clorhidrato de arginina, clorhidrato de lisina y sales de los mismos; sales tales como cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de trisodio; sacáridos tales como sacarosa y maltosa; polioles tales como poliglicerol; alcoholes de azúcar tales como manitol y xilitol y combinación de los mismos. En una realización de la invención, el soluto es una sal. En otra realización de la invención, el contenido de sal en el recubrimiento de fibrina está en el intervalo del 5% - 68%, en el intervalo del 20% - 68%, en el intervalo del 20% - 32%, o en el intervalo del 51% - 68%.
- 40 En una realización de la invención, el recubrimiento tiene una actividad del agua igual a o inferior a 0,6. En otra realización de la invención, la mayoría de dicha superficie visceral está recubierta.
- 45 En otra realización de la invención, el recubrimiento no está completamente seco. Todavía en otra realización de la invención, el recubrimiento comprende agua en el intervalo del 3%-20%, igual a o inferior al 15%, igual a o inferior al 10%, igual a o superior al 3%.
- 50 Todavía en otra realización de la invención, el recubrimiento comprende un contenido de agua en el intervalo del 3%-20% y un contenido de sal en el intervalo del 20%-68%.
- Todavía en otra realización de la invención, el sustrato es poroso. En una realización de la invención, el sustrato es una malla.
- 55 El dispositivo según la invención puede implantarse en un procedimiento laparoscópico. El dispositivo según la invención puede usarse en área contaminada o una potencialmente contaminada.
- 60 Otro objetivo de la invención es proporcionar un dispositivo implantable quirúrgico para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, pudiendo reducir el dispositivo complicaciones quirúrgicamente relacionadas seleccionadas del grupo que consiste en adhesiones posoperatorias, contaminación bacteriana, reparación de aberturas o defectos, infecciones y combinación de los mismos, el dispositivo comprende un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie no visceral, en el que la superficie visceral está al menos parcialmente recubierta con un recubrimiento que comprende fibrina estabilizada, en el que dicho recubrimiento comprende un soluto que puede unirse a agua libre que tiene un peso molecular de 1.000 Dalton o menos.
- 65

En una realización de la invención, la abertura o defecto es una hernia. En otra realización de la invención, el sustrato es poroso. En otra realización de la invención, el sustrato es una malla.

5 Todavía en otra realización de la invención, la mayoría de la superficie visceral está recubierta. El dispositivo de la invención puede implantarse en un procedimiento laparoscópico. El dispositivo de la invención puede usarse en área contaminada o una potencialmente contaminada.

10 En otra realización de la invención, el soluto está seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos tales como ácido tranexámico, clorhidrato de arginina, clorhidrato de lisina y sales de los mismos; sales tales como cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de trisodio; sacáridos tales como sacarosa y maltosa; polioles tales como poliglicerol; alcoholes de azúcar tales como manitol y xilitol y combinación de los mismos.

15 En una realización de la invención, el soluto es una sal. En otra realización de la invención, el contenido de sal en el recubrimiento de fibrina está en el intervalo del 5% - 68%, en el intervalo del 20% - 68%, en el intervalo del 20% - 32%, o en el intervalo del 51%-68%.

En otra realización de la invención, el recubrimiento no está completamente seco. En otra realización de la invención, el recubrimiento comprende agua en el intervalo de aproximadamente el 3%-20%.

20 La presente invención puede usarse en proporcionar un kit que comprende: un primer recipiente que comprende un dispositivo implantable según la invención, un segundo recipiente que comprende una disolución de rehidratación, e instrucciones para su uso.

25 La presente invención también puede usarse en proporcionar un envase que contiene un dispositivo implantable esterilizado según la invención.

30 La presente invención también puede usarse en proporcionar un procedimiento para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando en un paciente en necesidad, comprendiendo el procedimiento las etapas de: proporcionar un dispositivo implantable según la invención; y aplicar el dispositivo adyacente a la abertura y/o defecto.

En una realización de la invención, la reparación se lleva a cabo por un procedimiento laparoscópico. En otra realización de la invención, el tejido es área contaminada o una potencialmente contaminada.

35 En otra realización de la invención, la abertura o defecto es una hernia. Todavía en otra realización de la invención, el dispositivo se rehidrata en una disolución acuosa antes de su aplicación.

La etapa de aplicación puede llevarse a cabo de forma que la superficie visceral esté orientada hacia los órganos internos del paciente y la superficie no visceral esté orientada hacia la abertura o el defecto.

40 En una realización de la invención, el dispositivo muestra complicaciones quirúrgicamente relacionadas reducidas seleccionadas del grupo que consiste en adhesiones, contaminación bacteriana, reaparición de aberturas o defectos, infecciones y una combinación de los mismos.

45 El dispositivo implantable según la invención, el kit según la invención, o el envase según la invención, pueden usarse para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando.

### Breve descripción de los dibujos

50 Las Fig. 1-2 muestran el nivel de adhesión en el área de cirugía 14 y 30 días tras la cirugía, respectivamente, en grupos de control (A), 0,3 ml de sellante de fibrina aplicado (B) y 0,6 ml de sellante de fibrina aplicado (C).

55 Las Fig. 3-5 muestran el grado de adhesión y la integración de la malla con el tejido de alrededor de ratas representativas en el grupo de control (A) con respecto a tejidos de malla pre-recubierta con pegamento de fibrina húmedos (B) en los días 15 (Fig. 3) y 30 (Fig. 4 y 5) tras la implantación (el área operada está rodeada con un círculo).

Las Fig. 6-7 muestran el nivel de adhesión en el área operada 17 y 30 días tras el procedimiento de cirugía, respectivamente, en animales implantados con tejidos de malla sin recubrir (grupos de control; A) y recubiertos reticulados (B).

60 La Fig. 8 muestra la fuerza promedio de adhesiones intestinales a la superficie de la malla (nivel de adhesión promedio) en los animales implantados con la malla sin recubrir y recubierta con fibrina estabilizada.

La Fig. 9 muestra las unidades formadoras de colonias (UFC) por cm<sup>2</sup> de superficie de malla en mallas recubiertas de fibrina secada y mallas sin recubrir con (+) o sin (-) adiciones bacterianas 5 días tras la reparación de los defectos de la pared abdominal en un modelo de rata.

65 La Fig. 10 muestra las UFC promedio por malla 15 días tras la implantación de la malla en un modelo subcutáneo. La eficacia de la malla recubierta con fibrina secada en reducir la colonización bacteriana de la malla y el tejido de alrededor se comparó con la malla SURGISIS®, una malla comercialmente disponible prevista para la

reconstrucción de hernia.

La Fig. 11 muestra la puntuación de infección promedio clasificada de 1 a 3 de las mallas descritas en la Fig. 10. Mientras que la clasificación 1 describe sin infección, explante plano, el tejido parece sano; la clasificación 2 describe alguna infección, explante hinchado, ligeramente necrótico; y la clasificación 3 describe infección más grave, explantes encapsulados y tejido necrótico.

La Fig. 12 muestra curvas isotermas de desorción (curva superior de cada muestra) y adsorción (curva inferior de cada muestra) para dos mallas diferentes recubiertas con fibrina estabilizada.

### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un dispositivo protésico o implantable para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando. El dispositivo comprende un sustrato pre-recubierto con fibrina estabilizada. Un recubrimiento de fibrina estabilizada es, por ejemplo, un recubrimiento de fibrina secada que no se descascarilla del dispositivo y/o un recubrimiento de fibrina que no se deteriora durante al menos 2-3 semanas a condiciones de almacenamiento a temperatura de no congelación, por ejemplo, a una temperatura de 2-8 °C y hasta temperatura ambiente tal como inferior a 37 °C y/o bajo condiciones no estériles. En una realización de la invención, el recubrimiento es estable durante 1 año cuando se guarda a temperatura ambiente. El término "tejido blando" se refiere a estructuras del cuerpo que conectan, soportan, envuelven y/o rodean otras estructuras y órganos. Ejemplos de tejido blando incluyen, pero no se limitan a, fascia, músculos, pared muscular, tejido adiposo y vasos sanguíneos.

El término "un recubrimiento que no se descascarilla" se refiere a un recubrimiento que es sustancialmente continuo, un recubrimiento que no se rompe y/o un recubrimiento que no se desmorona en trozos individuales. En una realización de la invención, el recubrimiento no se rompe y/o desmorona en trozos individuales incluso en una forma enrollada o plegada cuando se administra mediante un trocar durante el procedimiento laparoscópico.

En una realización de la invención, la estabilidad del recubrimiento puede evaluarse por una inspección visual de la estructura del recubrimiento teniendo en cuenta la continuidad del recubrimiento y/o la friabilidad del recubrimiento de la superficie del dispositivo. La inspección visual puede llevarse a cabo antes o después de la rehidratación del dispositivo implantable en agua y/o disolución de sal tal como solución salina.

Se ha encontrado según la presente invención que un dispositivo quirúrgico implantable que comprende un sustrato recubierto con fibrina estabilizada puede obtenerse usando una fibrina no completamente seca que tiene una alta concentración de un soluto que puede unirse a agua libre y que tiene un peso molecular de 1.000 Dalton o menos. Así, en la invención, el recubrimiento comprende un soluto. En una realización de la invención, el soluto usado es una sal.

Como se usa en el presente documento, el término "soluto" se refiere a un agente soluble en agua. Ejemplos no limitantes de solutos son aminoácidos tales como ácido tranexámico, clorhidrato de arginina, clorhidrato de lisina y sales de los mismos. En una realización de la invención se usa sal de ácido tranexámico. En otra realización de la invención pueden usarse sales orgánicas o inorgánicas. Ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de trisodio y mezclas de los mismos.

También pueden usarse otros solutos que se unen a agua libre que incluyen sacáridos tales como sacarosa y maltosa; polioles tales como poliglicerol; alcoholes de azúcar tales como manitol y xilitol. También es posible en el presente documento que el recubrimiento comprenda una combinación de los solutos anteriormente especificados.

Se desea tener en el recubrimiento de fibrina secada algo de agua residual para permitir la reducción de la friabilidad y/o para aumentar la flexibilidad del dispositivo implantable. También se desea que el recubrimiento de fibrina secada tenga una baja actividad del agua para minimizar el crecimiento bacteriano mientras que está en almacenamiento.

Ventajosamente, el dispositivo implantable comprende un recubrimiento de fibrina secada estable que no se deteriora y al mismo tiempo comprende un contenido de agua suficiente que facilita el mantenimiento de la continuidad y la flexibilidad del recubrimiento. En una realización de la invención, el dispositivo también es suficientemente flexible para administrarse en un procedimiento laparoscópico y/o para poder conformarse a la superficie del cuerpo.

La actividad del agua ( $a_w$ ) del recubrimiento de fibrina estabilizada puede ser igual a o inferior a 0,6 tal como 0,5 y 0,4. Dentro del contexto de la presente invención, el término "actividad del agua" se refiere al agua en el recubrimiento que está libre y disponible para crecimiento microbiano y/o bacteriano. El crecimiento de microorganismos específicos está limitado por debajo de una cierta actividad del agua específica. Estos límites están bien definidos en la bibliografía científica (JA. Troller, DT. Bernard y VW Scott. Measurement of water activity. En: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association Washington DC, 1984, pág. 124-134). Por ejemplo, por debajo de 0,6 de  $a_w$ , el agua está tan fuertemente unida que no está disponible para incluso los hongos más xerofíticos.

La actividad del agua puede afectar enormemente la acción microbiana, perfil de seguridad, estabilidad en almacén propuesta, calidad y eficacia y/o textura o aglomeración de productos farmacéuticos. De importancia, el Procedimiento <1112> [Aplicación de la Determinación de la Actividad del Agua a Productos Farmacéuticos no Estériles] de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) indica que las mediciones de la actividad del agua pueden proporcionar una ventana precisa en la calidad y seguridad microbiana de productos farmacéuticos.

Las mediciones de actividad del agua se hacen normalmente por un procedimiento indirecto tal como disponiendo una muestra en una cámara cerrada, dejando que alcance el equilibrio y midiendo la presión del vapor de agua del aire sobre la muestra. La actividad del agua puede expresarse como la relación de esta presión de vapor de la muestra con respecto a la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

Las mediciones de la actividad del agua pueden llevarse a cabo usando instrumentos que usan tecnología de punto de rocío con espejo refrigerado, instrumentos que utilizan sensores de humedad relativa que cambian la resistencia eléctrica o capacitancia, como se detalla en Official Methods of Analysis of AOAC International (1995), o por cualquier otro modo conocido en la técnica. El término "secado", como se usa en toda esta memoria descriptiva, se refiere a un recubrimiento de fibrina del que se ha eliminado el agua. Según la invención, el recubrimiento secado comprende algo de agua residual contenida en su interior. El término "agua residual" se refiere a un recubrimiento que comprende un contenido de agua en el intervalo del 3 al 20% en peso basado en el peso total de la composición de recubrimiento estabilizada secada.

El contenido de agua en el recubrimiento puede ser igual a o inferior al 20% tal como igual a o inferior al 15%, 14% o 10%. Alternativamente, es posible que el recubrimiento esté en una forma sustancialmente seca que tiene un contenido de agua igual a o superior a aproximadamente el 3%.

Si se usa sal, el contenido de sal en el recubrimiento de fibrina estabilizada puede ser igual o superior al 60% e igual o inferior al 65%. En otra realización de la invención, el contenido de sal es igual o superior al 26% e igual o inferior al 28%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es igual o superior al 51% e igual o inferior al 68%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es igual o superior al 20% e igual o inferior al 32%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es igual o superior al 5% e igual o inferior al 8%. El contenido de agua en el recubrimiento de fibrina secada puede ser igual o inferior al 20%. En otra realización de la invención, el contenido de agua es igual o inferior al 10% e igual o superior al 3%. El contenido de proteína en el recubrimiento estabilizado puede ser igual o superior al 30%, por ejemplo, hasta el 32%. En otra realización de la invención, el contenido de proteína es superior al 64% e inferior al 69%. En otra realización de la invención, el contenido de proteína es del 29%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de proteína es superior al 60% e inferior al 65%.

Por ejemplo, el sustrato puede recubrirse con un concentrado de proteínas que contiene fibrina en condiciones en las que la cantidad total de agua sea más del 3%, la sal sea igual o superior al 20% y el contenido de proteína sea del 77% o menos. En otra realización de la invención, el contenido de sal es igual o superior al 60%, el contenido de agua es inferior al 10% y el contenido de proteína es igual o superior al 30%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es inferior al 65%, el contenido de agua es superior al 3% y el contenido de proteína es del 32% o menos. En otra realización de la invención, el contenido de sal es inferior al 28%, el contenido de agua es superior al 3% y el contenido de proteína es inferior al 69%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es superior al 26%, el contenido de agua es inferior al 10% y el contenido de proteína es superior al 64%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es inferior al 68%, el contenido de agua es superior al 3% y el contenido de proteína es del 29% o menos. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es superior al 51%, el contenido de agua es inferior al 20% y el contenido de proteína es superior al 29%. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es inferior al 32%, el contenido de agua es superior al 3% y el contenido de proteína es del 65% o menos. Todavía en otra realización de la invención, el contenido de sal es superior al 20%, el contenido de agua es inferior al 20% y el contenido de proteína es superior al 60%. En otra realización de la invención, el contenido de sal es superior al 5%, el contenido de agua es inferior al 20% y el contenido de proteína es superior al 75%. Todos los porcentajes son en peso basado en el peso total de la composición de recubrimiento estabilizada secada en la que el peso del sustrato no se tiene en cuenta.

Se ha informado que las complicaciones relacionadas con la cirugía incluyen adhesiones tales como adhesiones viscerales que pueden conducir a obstrucción intestinal, dolor, reaparición de hernia, contaminación bacteriana y/o infecciones del sitio quirúrgico que pueden desarrollarse en una fístula crónica que tiene que operarse.

Se informó que la fibrina sobre el dispositivo protésico puede promover la infección bacteriana (Loike y col. documento US5843436; y Mehall y col. "Fibrin sheath enhances central venous catheter infection". Crit Care Med. 2002; 30:908-912). Sorprendentemente, se encontró según la invención que usar fibrina estabilizada sobre un sustrato preparado según la invención produjo una reducción en la carga bacteriana al dispositivo de recubierto. Ventajosamente, incluyendo el recubrimiento de fibrina se reduce la colonización bacteriana de patógenos bacterianos comúnmente encontrados.

La eficacia del dispositivo según la invención en reducir complicaciones quirúrgicamente relacionadas puede

5 evaluarse en un modelo animal, tal como en el modelo de defecto de la pared abdominal como se ejemplifica más adelante. Por ejemplo, en el modelo de defecto de la pared abdominal, un defecto puede crearse mediante la membrana que reviste la cavidad abdominal, es decir, el peritoneo, y también mediante una parte del músculo abdominal, y una malla puede aplicarse intraperitonealmente al defecto creado durante diferentes periodos de tiempo tal como durante hasta 30 días. Los resultados obtenidos indican que pulverizar sellante de fibrina sobre la superficie de una malla dispuesta dentro del área de cirugía produjo un menor nivel de adhesión con respecto a una malla sin recubrir. Sin embargo, aplicar un sellante de fibrina sobre una malla dispuesta dentro del área de cirugía requiere tiempo, es complicado y puede resultar en una baja cantidad de pegamento de fibrina aplicada a la superficie de la malla debido al desplazamiento del material aplicado. Ventajosamente también se mostró que usar una malla de sellante de fibrina pre-recubierta y húmeda era más eficaz en la reducción de la adhesión con respecto a pulverizar el sellante de fibrina sobre una malla que se dispone en el área de cirugía durante la cirugía. Ventajosamente, el formar una malla de sellante de fibrina pre-recubierta permite usar una concentración relativamente baja de activadores de fibrinógeno, tales como trombina o veneno de serpiente, por ejemplo, batroxobina, reduciendo la exposición de los alrededores del implante al activador. Bajas concentraciones de activadores también generan fibras de fibrina gruesa que pueden potenciar las propiedades físicas del recubrimiento de fibrina. Además, el procedimiento de formación de fibrina puede llevarse a cabo durante un periodo de tiempo prolongado, permitiendo la reticulación completa de la fibrina que contribuye adicionalmente a la resistencia a la tracción del recubrimiento de fibrina. El aumento en las propiedades físicas tales como la resistencia a la tracción es esencial para implantes quirúrgicos que tienen la tarea de hacer de puente entre tejidos y órganos.

20 Ventajosamente, el dispositivo según la invención comprende un sustrato pre-recubierto con fibrina secada que puede almacenarse durante periodos prolongados de tiempo antes de uso. Se ha encontrado sorprendentemente que el uso del dispositivo preparado según la invención puede disminuir la probabilidad de complicaciones posoperatorias tales como infección y contaminación bacteriana del dispositivo recubierto y prevenir adhesiones, particularmente adhesiones en las que participa el intestino en comparación con otros dispositivos. También se encontró que la superficie no visceral del dispositivo permite infiltración de tejido e integración del dispositivo con el tejido huésped. Ventajosamente, la integración del dispositivo con el tejido huésped fija el dispositivo, reduciendo así significativamente el riesgo de reparación de aberturas o defectos y reduciendo el dolor posoperatorio.

30 Para evaluar la eficacia del dispositivo implantable de la invención en reducir la gravedad de adhesiones puede asignarse una puntuación numérica. A este respecto puede evaluarse la densidad de las adhesiones y/o el porcentaje de la superficie del dispositivo implicado en la adhesión. La densidad de la adhesión puede clasificarse de 0 a 3 según Smith y col. (como se ha especificado en: Kayaoglu y col. "Comparison of adhesive properties of five different prosthetic materials used in hernioplasty". J Invest Surg. 2005; 18:89-95). Mientras que la clasificación 0 describe sin adhesiones; y la clasificación 3 describe densas adhesiones intestinales a la malla. La densidad de las adhesiones también puede describirse de 0 a 3 como se ha especificado en Toosie y col. 2000; la clasificación 0 describe sin adhesión, y la clasificación 3 adhesiones altamente inseparables, requieren instrumentos afilados para la separación.

40 El porcentaje de cobertura del dispositivo por formación de adhesiones puede determinarse usando una rejilla de área superficial y redondeando al 5 por ciento próximo como se describe en Toosie y col. (2000), o como se idea por Diamond y col. que se refiere a cinco posibles categorías que describen la gravedad de la adhesión (clasificación 0-4) (como se ha especificado en: Kayaoglu y col. 2005). La clasificación 0 describe sin adhesiones; y la clasificación 4 describe > 75 por ciento de cobertura.

45 El término "sustrato" se refiere a cualquier dispositivo médico o implante médico que tenga una o más superficies a las que pueda aplicarse un "recubrimiento". También incluye dispositivos médicos introducidos en un organismo. El sustrato comprende una superficie orientada visceral y una superficie orientada no visceral. El sustrato usado puede formarse de cualquier material biocompatible que incluye plástico, silicona, sustancias metálicas o no metálicas. El sustrato usado puede ser poroso y/o no poroso. En una realización de la invención, el sustrato comprende una pluralidad de poros abiertos o espacios vacíos. Los poros pueden estar en el intervalo de 10 a 3200 micrómetros. En una realización de la invención, los poros son de 1000 a 1600 micrómetros. El sustrato puede ser inerte. El sustrato puede ser flexible. El sustrato puede tener diversos tamaños y/o texturas. En ciertas realizaciones, si se requiere, el sustrato puede ser rígido con el fin de prevenir la compresión y/o distorsión durante el uso. En una realización de la invención, el sustrato es flexible y permite enrollarlo, de manera que pueda administrarse al sitio quirúrgico mediante una estrecha luz en una forma plegada y luego enderezarse en el sitio de cirugía. En una realización de la invención, el sustrato es no degradable.

60 Como se usa en el presente documento, el término "superficie visceral" se refiere al límite exterior del sustrato orientado hacia los órganos internos del paciente en uso, y el término "superficie no visceral" se refiere al límite exterior del sustrato orientado hacia la cavidad interior del tejido lesionado. El término superficie visceral en el presente documento es intercambiable con el término superficie extraluminal. Según la invención, el recubrimiento de fibrina se formará sobre al menos una parte de la superficie visceral del sustrato. Por consiguiente, el dispositivo implantable de la invención comprende una superficie no visceral adaptada para adherirse quirúrgicamente a la cavidad interior del tejido lesionado y una superficie visceral caracterizada por propiedades de no adhesión que en uso se orientará hacia los órganos internos del paciente. En una realización de la invención, la superficie visceral es

la porción de la superficie que se orienta en la dirección opuesta al defecto de la fascia y la superficie no visceral es la porción que se orienta hacia el defecto. Así, en una realización de la invención, el dispositivo según la invención refuerza y/o repara el tejido de la fascia.

- 5 El término “superficie recubierta” significa que la superficie visceral del sustrato está al menos parcialmente recubierta con un recubrimiento de fibrina estabilizada para obtener una superficie que reducirá el nivel de adhesión entre los órganos viscerales y el dispositivo de la invención. De importancia, durante la etapa de recubrimiento, cantidades residuales del material de recubrimiento también pueden ponerse en contacto con la superficie no visceral del dispositivo resultando por consiguiente también la presencia de un recubrimiento de fibrina sobre la  
10 superficie no visceral del dispositivo. A ese respecto, las porciones recubiertas son de forma que no interfieran con la infiltración de tejido e integración del dispositivo con el tejido huésped.

- Ejemplos de sustratos adecuados según la invención incluyen, pero no se limitan a, marcapasos; prótesis endovasculares, por ejemplo, prótesis endovasculares, de gastroenterología, ureterales o uretrales; prótesis ortopédicas; implantes de silicona tales como mama de silicona; suturas; grapas, catéteres; válvulas cardíacas artificiales; mallas; y bombas.

- En una realización de la invención, el sustrato es una malla. En una realización tal, la malla que va a usarse según la invención puede estar hecha de material sintético o semisintético, que incluye plásticos y otros polímeros. Materiales  
20 útiles para hacer mallas incluyen, pero no se limitan a, poli(etileno); poliésteres; poli(propileno), poli(propileno) poliésteres tales como fumarato de poli(propileno); poliestireno; poli(tetrafluoroetileno) (PTFE); nailon; polipropileno/celulosa; polipropileno/PTFE; polipropileno/monocryl; poliéster/colágeno; poli(acrilato); poli(metacrilato de metilo); poli(metacrilato de hidroxietilo); poli(alcohol vinílico); poli(carbonato); poli(carbonato de trimetileno); poli(etileno-co-acetato de vinilo); poli(éster-uretano); poli(éter-uretano); poli(arilato); poli(imida); poli(anhídrido-co-imida); poli(aminoácido); polidepsipéptido; poli(fosfazeno); poli(ácido glicólico); poli(lactida-co-glicolida); poli(ácido láctico); poli(e-caprolactona); poli(p-dioxanona); poli(lactida-co-glicolida); poli(e-caprolactona-co-glicolida); poli(glicolida-co-carbonato de trimetileno); copolímero de lactida/tetrametilglicolida; copolímero de lactida/carbonato de trimetileno; copolímero de lactida-d-valerolactona; copolímero de poli(lactida)/poli(óxido de etileno); lactida (copolímero de e-caprolactona); poli(1,4-dioxano-2,5-diona) 3,6-sustituido asimétricamente; poli(ácidos β-alcanoicos) tales como copolímero de poli(β-hidroxibutirato)/(β-hidroxi valerato), poli(β-hidroxibutirato), poli(ácido β-maleico) y  
30 poli(β-hidroxipropionato), poli(d-valerolactona); copolímero de metacrilato de metilo-N-vinilpirrolidona, poliésteramida; poliésteres de ácido oxálico; polidihidropirano; polialquil-1-2-cianoacrilato; materiales celulósicos; materiales compuestos de los mismos; y combinaciones de los mismos. En una realización de la invención, la malla que va a usarse está hecha de polipropileno. Por tanto, puede usarse cualquiera de los productos de malla actualmente comercializados que incluyen, pero no se limitan a, Mersilene (Ethicon), Prolene® (Ethicon), SURGIPRO™ (Tyco), C-OUR™ (Atrium), Marlex (Bard), DUALMESH®, (Gore), DynaMesh® (FEG Textiltechnik), TiMesh (GFE) y PARIETEX® (Tyco). La fibrina puede recubrir la malla parcialmente o completamente. El espesor de malla puede ser similar a hoja. En otra realización de la invención, el espesor de la malla que va a usarse es  $0,3 \pm 0,2$  mm.

- 40 El dispositivo implantable según la invención puede usarse para prevenir, tratar, mejorar, corregir y/o reducir los síntomas de cualquier condición médica. El dispositivo de la invención puede utilizarse para sustituir, aumentar y/o para facilitar la reparación de un tejido lesionado en cualquier aplicación médica tal como soporte o refuerzo de tejido blando, reconstrucción de deficiencias de tejido blando, o para sustitución de tejido y órgano tal como para la reparación de una abertura y/o defecto en un tejido tal como defectos de tejido de la fascia. Ejemplos de tal  
45 aplicación incluyen, pero no se limitan a, hernias, reparación de hernias, defecto de la pared torácica y sellado de tejido herido interno tal como reparación de un vaso sanguíneo lesionado. También es adecuado para su uso en defectos de tejido blando resultantes de extirpación de tumores. En una realización de la invención, el sustrato se diseña para sustitución intraperitoneal.

- 50 Las hernias no complicadas se reparan normalmente devolviendo el tejido u órgano herniado a su posición original y correcta, y luego reparando y reforzando la debilidad en el tejido muscular.

- El término “hernia” se refiere a cualquier abultamiento de un tejido, estructura o parte de un órgano a través del tejido muscular o la membrana en la que está normalmente contenido. Normalmente, la hernia se produce como resultado  
55 de una abertura, debilitamiento, abultamiento o desgarramiento de la estructura muscular de la pared del abdomen. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, hernia quirúrgica, eventración, hernia de hiato, hernia posoperatoria, hernia epigástrica, hernia espigiana, hernia umbilical, hernia inguinal indirecta o directa, hernia crural, hernia diafragmática, y generalmente cualquier hernia relacionada con la pared abdominal.

- 60 En aplicaciones vasculares, el dispositivo implantable recubierto según la invención se aplicará de tal manera que la superficie recubierta esté fuera de la superficie extraluminal del vaso sanguíneo implantado. La superficie recubierta permite reducir sustancialmente el contacto del dispositivo con los órganos viscerales de los pacientes proporcionándose así una barrera entre el dispositivo y los órganos internos.

- 65 Ventajosamente, el lado visceral del dispositivo está recubierto con un recubrimiento de fibrina estabilizada para separar físicamente el dispositivo de superficies de tejido y órgano adyacentes con el fin de minimizar la unión del

tejido al dispositivo. El recubrimiento puede cubrir completamente el lado visceral del dispositivo y crear una superficie suave sobre un lado del dispositivo, proporcionando una capa de separación de tejido entre el dispositivo y la cavidad visceral.

5 Los dispositivos médicos implantados pueden provocar una serie de reacciones biológicas, denominadas en el presente documento reacciones a cuerpos extraños. Normalmente, una reacción a cuerpos extraños se caracteriza por una acumulación de células inflamatorias y fibróticas que se adhieren a la superficie del implante. Ventajosamente, el dispositivo protésico implantable de la presente invención comprende el recubrimiento de fibrina estabilizada sobre el lado visceral que proporciona una capa de separación no inmunogénica entre el dispositivo y la cavidad visceral. El término "protésico" se refiere a un sustituto de una parte del cuerpo lesionada o ausente.

10 Los resultados obtenidos según la invención muestran que el lado no recubierto del dispositivo permite la integración del dispositivo con el tejido huésped. Sin quedar ligado por el mecanismo, se cree que la superficie sin recubrir induce una rápida respuesta fibroblástica que asegura la rápida fijación e integración con el tejido mediante los intersticios del dispositivo.

15 A diferencia de otras mallas de material compuesto, el dispositivo según la invención muestra buen rendimiento en presencia de contaminación bacteriana. Por ejemplo, la implantación del dispositivo según la invención en un modelo *in vivo* contaminado produjo la reducción del nivel de adhesión y/o la prevención de infección con respecto a una malla cubierta con un tejido de celulosa regenerada oxidada (ORC); así, el dispositivo implantable puede usarse eficazmente incluso en áreas quirúrgicas contaminadas o potencialmente contaminadas. "Área contaminada" se refiere a un entorno no estéril. El término "material compuesto" se refiere a un dispositivo que está compuesto por diferentes elementos. En una realización de la invención, el dispositivo está compuesto por una malla de polipropileno sintético y un recubrimiento de fibrina estabilizada. En otra realización de la invención, la malla proporciona la resistencia mecánica que refuerza el tejido con defecto, sirve de matriz para el recubrimiento de fibrina y permite el óptimo crecimiento hacia adentro del tejido. En otra realización de la invención, el recubrimiento de fibrina estabilizada disminuye la unión de tejido y órgano intraperitoneal a la malla y reduce la colonización bacteriana de la malla. En otra realización de la invención, la malla sintética se integra con el tejido huésped en el momento en el que el recubrimiento de fibrina es digerido en el cuerpo.

20 A diferencia de implantes biológicos, el uso de la malla de material compuesto según la invención en la reparación de hernia (también conocida como hernioplastia o herniorrafia) produce menos reaparición de hernia a largo plazo. "Implantes biológicos" se refiere a un dispositivo médico de origen biológico que se inserta en, o se injerta sobre, tejido corporal que generalmente puede servir de sustituto de tejido temporal y una plantilla para la formación de nuevo tejido.

25 El dispositivo según la invención puede usarse como tal, o puede rehidratarse antes de uso. En una realización de la invención, el dispositivo se rehidrata en una solución salina estéril antes de uso. El dispositivo puede comprender aditivos tales como un agente colorante.

30 El dispositivo también puede comprender agentes antimicrobianos y/o antibióticos que incluyen, pero no se limitan a, metales pesados tales como plata, clorhexidina u otros productos químicos antimicrobianos usados clínicamente.

35 También se encontró según la presente invención que el recubrimiento de fibrina según la invención reduce la carga bacteriana al dispositivo.

40 El dispositivo implantable puede administrarse a la localización deseada mediante cualquier medio usado por los cirujanos para la reparación de defectos que incluyen, pero no se limitan a, cirugía abierta y procedimiento mínimo invasivo (PMI) tal como laparoscopia. En una realización de la invención, se hace una incisión en el sitio de cirugía y el dispositivo implantable se aplica sobre el defecto. El paciente puede recibir anestesia local, regional o general.

45 El término "cirugía abierta" se refiere a cirugía en la que el cirujano obtiene acceso directo al sitio quirúrgico por una incisión relativamente grande.

50 Como se usa en el presente documento, el término "procedimiento mínimamente invasivo" significa una cirugía en la que el cirujano obtiene acceso al sitio quirúrgico mediante pequeñas incisiones o mediante una cavidad del cuerpo o abertura anatómica, por ejemplo, mediante laparoscopia. El dispositivo puede ser plegable, por ejemplo, enrollándose, de manera que pueda administrarse al sitio quirúrgico mediante una estrecha luz en una forma plegada y enderezarse en el sitio de cirugía debido a su capacidad para reanudar su forma después de deformación. Pueden usarse técnicas especializadas para visualizar el área operada tal como cámaras en miniatura con microscopios, minúsculas linternas de fibra óptica y monitores de alta definición. Los instrumentos que tienen "efectores finales" tales como pinzas, cuchillas, porta-agujas, cauterizadores y similares, pueden introducirse al sitio quirúrgico. En una realización de la invención, el dispositivo permite el fácil plegamiento y desplegado cuando se introduce mediante un trocar en cirugía laparoscópica.

55 El dispositivo según la presente invención tiene al menos una de las siguientes ventajas: elevadas propiedades anti-

adhesivas sobre su superficie visceral, resistencia a colonización bacteriana, reducida reacción a cuerpos extraños sobre el lado visceral, facilita la curación del tejido huésped, es suficientemente flexible para conformarse fácilmente a la forma de la superficie del cuerpo y/o para administrarse fácilmente durante el procedimiento laparoscópico, retiene resistencia a la tracción dentro del cuerpo para evitar el estiramiento excesivo del tejido debilitado, no requiere almacenamiento especial y tiene estabilidad a largo plazo bajo almacenamiento prolongado, se une al lado facial cuando se presiona en húmedo, se convierte en una parte integral del tejido huésped sobre el lado no visceral del dispositivo, está listo para ser usado y puede fabricarse en diversos tamaños y formas. El dispositivo de la invención puede usarse en cirugía laparoscópica. En una realización de la invención, el recubrimiento de fibrina es transparente y permite la visualización del tejido subyacente. El dispositivo según la invención puede integrarse en el tejido después de algunos días.

La materia de la presente invención engloba un procedimiento para producir un dispositivo implantable para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, comprendiendo el procedimiento las etapas de proporcionar un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie no visceral; formar un recubrimiento de fibrina sobre al menos una parte de la superficie visceral aplicando un volumen definido de una disolución que comprende fibrinógeno y una disolución que comprende una enzima proteolítica que puede formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno a la porción deseada; y secar el recubrimiento, que comprende además, antes de la etapa de secado, la etapa de añadir un soluto que puede unirse a agua libre y que tiene un peso molecular de 1.000 Dalton o menos, obteniéndose así un dispositivo implantable mejorado que comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada.

El término "dispositivo implantable mejorado" se refiere a un dispositivo implantable que muestra complicaciones posoperatorias reducidas después de su implantación. En una realización de la invención, las complicaciones posoperatorias están seleccionadas del grupo que consiste en contaminación bacteriana, adhesiones, infecciones, reaparición de hernia y una combinación de los mismos.

Normalmente, un recubrimiento de fibrina se forma cuando se mezclan fibrinógeno y una disolución de enzima proteolítica. El factor XIII está normalmente presente en la formulación para la reticulación de los monómeros de fibrina.

En una realización de la invención, la enzima proteolítica es una disolución obtenible de veneno de serpiente. En otra realización de la invención, la enzima proteolítica es trombina. El fibrinógeno usado en la práctica de la presente invención incluye cualquier fibrinógeno que formará fibrina.

El fibrinógeno y la trombina pueden prepararse a partir de composición de sangre inicial. La composición de sangre puede ser sangre completa o fracciones de sangre, es decir, un producto de sangre completa tal como plasma. El fibrinógeno y la trombina pueden ser plasma humano autólogo, que incluye reunido, o de fuente no humana. También es posible que el fibrinógeno y la enzima proteolítica se preparen mediante procedimientos recombinantes.

La disolución de trombina acuosa normalmente comprende trombina y cloruro de calcio. La concentración de trombina puede estar en el intervalo de 2 a 4.000 UI/ml, o en el intervalo de 800 a 1200 UI/ml. La concentración de cloruro de calcio en la disolución puede estar en el intervalo de 2 a 6,2 mg/ml, o en el intervalo de 5,6 a 6,2 mg/ml, tal como en la concentración de 5,88 mg/ml. La disolución de trombina también puede comprender excipientes. Como se usa en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a la disolución. Ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, albúmina humana, manitol y acetato sódico. La albúmina humana en la disolución puede estar en el intervalo de 2 a 8 mg/ml. El manitol puede estar en el intervalo de concentración de 15 a 25 mg/ml. El acetato sódico puede añadirse a la disolución en el intervalo de 2 a 3 mg/ml.

En una realización de la invención, el componente de fibrinógeno comprende un componente biológicamente activo (CBA) que es una disolución de proteínas derivada de plasma sanguíneo que puede comprender además ácido tranexámico y arginina o lisina, o mezclas de arginina y lisina, o sus sales farmacéuticamente aceptables. El CBA puede ser un crioprecipitado derivado de la sangre, en particular 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. Un crioprecipitado puede obtenerse cuando se descongela plasma precipitado en frío, normalmente a una temperatura de 0-4 °C, produciendo la formación de un precipitado que contiene fibrinógeno y factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo, por centrifugación. La disolución de CBA comprende además factor VIII, fibronectina, factor de von Willebrand (vWF), vitronectina, etc. Ejemplos de tal CBA se desvelan en los documentos US-B-6.121.232 y W09833533. Normalmente, la cantidad de fibrinógeno en CBA está en el intervalo de 40 a 85 mg/ml. La cantidad de ácido tranexámico en la disolución de CBA puede ser de 80 a 110 mg/ml. La cantidad de clorhidrato de arginina puede ser de 15 a 25 mg/ml.

Opcionalmente, la enzima proteolítica y/o el componente de fibrinógeno se tamponan a un valor de pH compatible fisiológico. El tampón puede estar compuesto de glicina, citrato de sodio, cloruro sódico, cloruro de calcio y agua para inyección como vehículo. Puede estar presente glicina en la composición en la cantidad de 6 a 10 mg/ml, el citrato de sodio puede estar en el intervalo de 1 a 5 mg/ml, el cloruro sódico puede estar en el intervalo de 5 a 9 mg/ml y el cloruro de calcio puede estar en la concentración de 0,1-0,2 mg/ml.

5 En otra realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de CBA se reduce a igual o inferior a 15 µg/ml como, por ejemplo, 5 µg/ml o menos de plasminógeno usando un procedimiento como se describe en los documentos US-B-7.125.569, EP-B-1.390.485 y WO02095019. En otra realización de la invención, cuando la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de CBA se reduce, la composición no contiene ácido tranexámico.

10 También es posible que la disolución de enzima proteolítica y/o el componente de fibrinógeno comprendan componentes que estimulan la formación del coágulo tal como, pero no se limitan a,  $\text{Ca}^{2+}$ , factor VIII, fibronectina, vitronectina y factor de von Willebrand (vWF).

15 Los componentes derivados de composiciones de la sangre pueden tratarse para reducir y/o inactivar partículas infecciosas. Esto puede llevarse a cabo por diferentes procedimientos tales como, pero no limitados a, filtración, tratamiento con disolvente/detergente, tratamiento por calor tal como pasteurización, irradiación gamma o UVC (< 280 nm), o por cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. El término "partícula infecciosa" se refiere a una partícula microscópica tal como, pero no se limita a, microorganismo o un prión, que puede infectar o propagarse en las células de un organismo biológico. Las partículas infecciosas son, por ejemplo, partículas virales.

20 El procedimiento de inactivación de partículas infecciosas puede llevarse a cabo añadiendo una molécula inactivante a la composición antes de y/o durante el procedimiento. Las moléculas añadidas y sus productos pueden eliminarse por gravitación, cromatografía en columna o por cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.

25 La eliminación de partículas infecciosas puede llevarse a cabo por filtración o por procedimientos de absorción selectivos tales como cromatografía de afinidad, intercambio iónico o hidrófoba. Puede llevarse a cabo un procedimiento de inactivación viral de múltiples etapas. Por ejemplo, la composición puede someterse a tratamiento con disolvente/detergente, tratamiento por calor, cromatografía selectiva y filtración.

30 La superficie del sustrato puede activarse antes de la etapa de recubrimiento para potenciar la humectación de la superficie por las disoluciones de recubrimiento, para aumentar la fuerza adhesiva entre las disoluciones de recubrimiento y la superficie del sustrato y/o para ayudar con la unión celular sobre el lado no visceral del dispositivo facilitando por consiguiente la infiltración de tejido e integración del dispositivo con el tejido huésped. Procedimientos de activación de la superficie incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con plasma tal como reticulación por especies activadas de gases inertes, deposición de plasma, grabado con plasma y limpieza con plasma; descarga de corona; modificaciones químicas de la superficie tales como ataque químico con líquidos ácidos; modificación por exposición a irradiación gamma en presencia de un gas reactivo; y combinaciones de los mismos. En una realización de la invención, la superficie del sustrato se somete a tratamiento con plasma antes de formar el recubrimiento de fibrina.

35 El sustrato puede recubrirse por cualquiera de los procedimientos conocidos para un experto habitual en la materia. Por ejemplo, adsorción física, inmersión del sustrato en el material de recubrimiento, compresión del sustrato contra un rodillo saturado con el material de recubrimiento, pasar el sustrato mediante rodillos que transfieren el recubrimiento sobre la superficie del sustrato, pasar el material de recubrimiento mediante una ranura sobre la superficie del sustrato o usar un cepillo o pulverizar el sustrato con el material de recubrimiento. El sustrato también puede pulverizarse con microgotitas y nanogotitas. También puede lograrse distribución homogénea usando un aparato de goteo o un aplicador que comprende al menos un chorro o usando un dispensador tal como usando la máquina de recubrimiento BioSpot® fabricada por BioFluidix que permite controlar el volumen de recubrimiento mediante la superficie del sustrato. Esta tecnología permite dispensar sin contacto gotitas líquidas en el intervalo de algunos nanolitros hasta algunos microlitros. El material de recubrimiento puede cubrir completamente o parcialmente la superficie visceral del dispositivo y crear una película sustancialmente suave. Para recubrir selectivamente solo una parte del sustrato, el material de recubrimiento puede depositarse mediante una plantilla que expone solo las áreas deseadas de cobertura para el recubrimiento.

40 El sustrato puede recubrirse con fibrinógeno y la enzima proteolítica tanto simultáneamente como uno después del otro. En una realización de la invención, el fibrinógeno se aplica primero al sustrato, seguido de aplicación de la trombina.

45 Los componentes pueden mezclarse en cualquier intervalo deseado de relaciones. Por ejemplo, si la concentración del componente de fibrinógeno es 40-85 mg/ml y la concentración de trombina es aproximadamente 800-1200 UI/ml, los dos componentes pueden mezclarse en una relación de 1:1, 1:0,5, 1:0,3, 1:0,25, 1:0,1, 1:0,05, respectivamente, etc.

50 Puede usarse cualquier secado no intensivo conocido en la técnica que no deteriore el recubrimiento y el sustrato. El término "secado intensivo" es, por ejemplo, procedimientos de liofilización (secado por congelación) o secado por pulverización. El secado puede llevarse a cabo a diferentes temperaturas usando diversos equipos de secado tales como cámara de humedad controlada, estufa de secado, túnel de secado, secadora a vacío, o en cualquier otro procedimiento adecuado que no afecte el dispositivo de recubierto. Alternativamente, el recubrimiento aplicado puede secarse al aire. En una realización de la invención, el sustrato es sensible a procedimientos térmicos. En otra

realización de la invención, la temperatura durante la etapa de secado es inferior a 37 °C.

Generalmente, el secado al aire a temperatura ambiente del aire alcanza una disminución relativamente gradual en el contenido de agua produciendo una elevada estabilización del recubrimiento de fibrina. Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna, la acción enzimática de la formación de fibrina y la reticulación de monómeros de fibrina continúa gradualmente durante el procedimiento de secado al aire, produciendo por consiguiente un recubrimiento de fibrina reticulado y estabilizado que tiene una elevada adherencia a la superficie del sustrato.

Como se usa en el presente documento, el término "secado al aire" se refiere a secar a temperatura ambiente del aire a condiciones de atmósfera ambiente. La "temperatura ambiente" significa una temperatura inferior a 37 °C y por encima del punto de congelación del agua tal como 15 °C a 25 °C. En una realización de la invención, la humedad de la atmósfera durante el secado al aire es de aproximadamente hasta el 60%, tal como en el intervalo del 40-55%. Las condiciones medioambientales deseadas también pueden obtenerse usando un dispositivo de control del medioambiente tal como un humidificador/deshumidificador fijado a las condiciones de temperatura y humedad anteriormente citadas. Las condiciones para secar tales como humedad, tiempo, presión y temperatura están seleccionadas para obtener un contenido de agua inferior al 20%, tal como en el intervalo de aproximadamente el 3 al 20%, inferior al 15%, inferior al 10% o superior a aproximadamente el 3% en peso basado en el peso total de la composición de recubrimiento estabilizada secada.

En una realización de la invención, el recubrimiento se seca al aire durante 8 a 24 horas a humedad del 50-60% y a una temperatura de aproximadamente 25 °C. En otra realización de la invención, el recubrimiento se seca a una humedad del 60% y a una temperatura de aproximadamente 25 °C que se define como condición de zona climática II por la Organización Meteorológica Mundial (OMM).

Tras la etapa de secado, el espesor del recubrimiento se reduce. El espesor del recubrimiento de fibrina tras el secado puede estar en el intervalo de 10 a 1000 micrómetros.

Ventajosamente, un soluto que puede unirse a agua libre que tiene un peso molecular de 1.000 Dalton o menos se añade para aumentar la estabilidad del recubrimiento. La inclusión de dicho soluto puede llevarse a cabo antes o después de que se genere la fibrina. En una realización de la invención, el soluto se añade después de que se forme la fibrina. A este respecto puede usarse cualquier soluto. La incorporación de soluto, después de la formación del coágulo, puede llevarse a cabo en cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica tales como adsorción física, inmersión, difusión, compresión del dispositivo recubierto con fibrina contra un rodillo saturado con el soluto, pasar el dispositivo recubierto con fibrina mediante rodillos que transfieren el soluto sobre el dispositivo, pasar el soluto mediante una ranura sobre la superficie del sustrato, o usar un cepillo o pulverizar el dispositivo recubierto con fibrina con el soluto. Alternativamente puede usarse un aparato de goteo o un aplicador que comprende al menos un chorro o un dispensador tal como el procedimiento de recubrimiento BioSpot®.

Alternativamente, la fibrina se forma en presencia de dicho soluto. Como la fibrina se forma por una reacción enzimática, la adición de sustancias químicas a los componentes formadores de fibrina puede afectar la actividad de coagulación de trombina o formación de coágulos. Así, cuando se forma fibrina en presencia de dicho soluto, el soluto y la concentración usados deben ser permisivos para la actividad de trombina o para cualquier otra enzima que pueda formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno, o para cualquier enzima que participa en la polimerización de la fibrina tal como factor XIII.

En una realización de la invención, las propiedades químicas de dicho soluto, si está presente durante la formación de coágulos, permite retener del 50 al 100% de la actividad de coagulación de la enzima en comparación con la actividad en ausencia del soluto, es decir, la actividad de coagulación de la enzima restante tras la adición del soluto está en el intervalo del 50 al 100% de la actividad inicial. En otra realización de la invención, la actividad de coagulación restante después de la adición del soluto está en el intervalo del 90 al 100%. En otra realización de la invención se usa sal de ácido tranexámico.

El soluto puede incluirse en la enzima proteolítica, por ejemplo, trombina, en el componente de fibrinógeno, y/o puede estar como un componente separado.

Ejemplos de solutos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos tales como ácido tranexámico, clorhidrato de arginina, clorhidrato de lisina y sales de los mismos; sales tales como cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de trisodio; sacáridos tales como sacarosa y maltosa; polioles tales como poliglicerol; alcoholes de azúcar tales como manitol y xilitol, y una combinación de los mismos.

La presente invención puede usarse en proporcionar un kit que comprende un primer recipiente que comprende un dispositivo implantable según la invención y un segundo recipiente que comprende una disolución de rehidratación. El kit también puede contener instrucciones para el médico o el profesional sanitario para su uso. La disolución de rehidratación puede ser agua y/o sales tales como solución salina. La disolución de rehidratación puede proporcionarse en un vial o una jeringuilla precargada.

La presente invención puede usarse en proporcionar un procedimiento para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando en un paciente en necesidad, comprendiendo el procedimiento las etapas de: proporcionar un dispositivo implantable según la invención y aplicar el dispositivo de la invención adyacente a dicha abertura y/o defecto. El dispositivo de la invención puede aplicarse con la superficie recubierta orientada hacia los órganos viscerales y la superficie sin recubrir orientada hacia la abertura y/o defecto. En una realización de la invención, la abertura y/o defecto es una hernia como se ha definido anteriormente. En otra realización de la invención, el dispositivo se rehidrata antes de la aplicación del dispositivo.

El término “adyacente” significa que el dispositivo puede aplicarse de tal manera que se cubran sustancialmente toda la abertura y/o el defecto.

El dispositivo implantable puede esterilizarse antes de la implantación. Alternativamente, el dispositivo de la invención puede suministrarse en un envase estéril herméticamente cerrado que permite sacar el dispositivo sin contaminación. Puede usarse cualquier procedimiento de esterilización apropiado conocido en la técnica que no deteriore el dispositivo, tal como fusión del sustrato.

Cuando se realiza la reparación de la pared abdominal, el dispositivo puede unirse a la cara interna de la pared abdominal, por ejemplo, la fascia del paciente. Alternativamente, el dispositivo puede unirse al peritoneo. En una realización de la invención, el dispositivo se une al peritoneo del paciente.

El dispositivo puede fijarse a la localización deseada mediante el uso de suturas, grapas o por medios similares. Alternativamente, el dispositivo puede anclarse usando un adhesivo de tejido. El dispositivo puede unirse alrededor de su perímetro entero o por relación opuesta o en diagonal.

El dispositivo implantable de la invención puede prepararse y proveerse en una variedad de tamaños y formas tales como circular, poligonal, esféricamente, cónicamente, cúbicamente, oval, rectangular o cilíndricamente, dependiendo del uso previsto. El dispositivo de la invención puede dimensionarse para extenderse más allá del defecto o la abertura. El dispositivo de la invención puede ser llano, plano, cóncavo y/o convexo. En una realización de la invención, el dispositivo es una malla que comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada. En otra realización de la invención, la malla recubierta de fibrina estabilizada tiene una forma rectangular plana y se proporciona en los siguientes tamaños: 5 x 10 cm, 10 x 15 cm, 15 x 20 cm, 15 x 30 cm, 20 x 20 cm, 20 x 25 cm, 30 x 30 cm o 40 x 40 cm.

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

## Ejemplos

### **Materiales y procedimientos**

#### *Composiciones de sellante de fibrina:*

Composición CBA1. 40-60 mg/ml de concentrado de fibrinógeno humano; 85-105 mg/ml de ácido tranexámico; 17,0-21,0 mg/ml de clorhidrato de arginina; 7,2-8,6 mg/ml de glicina; 2,4-2,9 mg/ml de citrato de sodio; 6,9-7,1 mg/ml de cloruro sódico; 0,14-0,16 mg/ml de cloruro de calcio; a pH= 6,7-7,2.

Composición CBA2. 55-85 mg/ml de concentrado de fibrinógeno humano; 17,0-21,0 mg/ml de clorhidrato de arginina; 7,2-8,6 mg/ml de glicina; 2,4-2,9 mg/ml de citrato de sodio; 6,9-7,1 mg/ml de cloruro sódico; 0,14-0,16 mg/ml de cloruro de calcio; a pH= 6,7-7,2.

Composición de trombina. 800-1200 UI/ml de trombina; 5,6-6,2 mg/ml de cloruro de calcio; 5,0-6,5 mg/ml de albúmina humana; 18,5-20,5 mg/ml de manitol; 2,5-2,7 mg/ml de acetato sódico; a pH= 6,8-7,2.

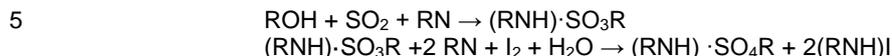
*Procedimiento de liofilización.* El procedimiento de liofilización se llevó a cabo del siguiente modo usando la secadora por congelación CHRIST, EPSILON 2-8D: La temperatura se redujo a - 45 °C durante 2 horas. Después, la temperatura se mantuvo a -50 °C durante un periodo de 5 horas. Esta etapa fue seguida de sublimación a una temperatura de -15 °C y a una presión de 0,14 mbar durante hasta 24 horas. Después de que la temperatura aumentara a +25 °C, la presión se redujo a 0,02 mbar y se llevó a cabo un secado secundario durante hasta 24 horas.

*Procedimiento de secado a vacío.* El procedimiento de secado a vacío se llevó a cabo en una estufa (ShellLab modelo 1430-2E) fijada a temperatura ambiente a una presión de 0,4 mbar o menos durante 2 horas a menos que se indique lo contrario.

*Cuantificación del contenido de agua.* La determinación del contenido de agua se llevó a cabo usando el método de valoración volumétrica de Karl Fischer (KFT) que se basa en el ensayo de la Farmacopea estadounidense (USP 27,

921, P. 2398-2399).

La reacción de base de la valoración de Karl Fischer puede expresarse según la siguiente fórmula:



El alcohol reacciona con dióxido de azufre y base para formar una sal de sulfito de alquilo intermedia, que luego se oxida por yodo. Esta reacción de oxidación consume agua en una relación 1:1.

10 El procedimiento es del siguiente modo: primero, el agua se extrajo de la muestra colocando un trozo previamente pesado de la malla recubierta (0,1-0,2 g) en un tubo y añadiendo aproximadamente 15 ml de metanol seco (nº de cat. de Merck 1.06012). El tubo se agitó entonces durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se tomaron aproximadamente 4-6 ml del sobrenadante para la valoración. El procedimiento de valoración se llevó a cabo por el sistema de valoración automatizado Mettler-Toledo-DL38 o Metrohm®. Brevemente, el reactivo de Karl Fischer (Hydranal, material compuesto 2, nº de cat. de Riedel-de Haen 34806) que contiene yodo se añade gradualmente a la reacción hasta que toda el agua presente se consume y la presencia de yodo en exceso se detecta eléctricamente por el sistema de valoración automatizado. La detección de yodo libre indica el punto final de la valoración. La cantidad de yodo añadida sirve para calcular la cantidad de agua presente en la muestra. La cantidad de yodo añadida se calcula según la cantidad de reactivo de Karl Fischer consumida en la valoración y la concentración de yodo en el reactivo de Karl Fischer. La medición se llevó a cabo por duplicado.

El contenido de agua del metanol seco (20 ml) se prueba y se resta del resultado del contenido de agua promedio de la muestra del siguiente modo:

25 El resultado promedio de la muestra (%) – [el resultado promedio (%) del metanol seco x  
100 mg x el volumen del sobrenadante tomado para la valoración] / (el peso de la muestra de prueba relativo  
30 en mg \* x 20 ml).

\* Es igual al volumen de sobrenadante tomado para la valoración multiplicado por el trozo previamente pesado de la malla recubierta y dividido entre el volumen de metanol seco añadido en la etapa de extracción de agua.

35 *Tejidos de malla.* A menos que se indique lo contrario se usaron los siguientes tipos de tejidos de malla de polipropileno: PPKM403, PPKM404, PPKM601 y PPKM602 fabricados por Textile Development Associates, Inc. Las características de los tejidos de malla se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1: Las características de los tejidos de malla.**

Estilo	Monofilament o Dia. mm (in)	Tamaño Típico Poros mm (in)	Fuerza Explosión kPa (psi)	Fuerza dividida N/25 cm (lbs/in)		Elongación dividida (%)		Grueso. mm (in)	Wt. g/m <sup>2</sup> (oz/yd <sup>1</sup> )
				MD	CMD	MD	CMD		
45 PPKM403	0.10 (.004)	1-4 3 1.1 (.0553. 043)	592 (86)	222 (50)	210 (47)	82	135	0.42 (. 017)	47 (1.4)
50 PPKM404	0.10 (.004)	1.0 3 0.7 (0393. 028)	600 (87)	138 (31)	200 (45)	151	110	0.38 (. 015)	44 (1.3)
55 PPKM601	0.15 (.006)	1.3 3 1.0 (0513. 039)	1172 (162)	526 (118)	492 (111)	107	175	0.59 (. 023)	100 (2.9)
PPKM602	0.15 (.006)	0.8 3 0.6 (.0313. 024)	862 (125)	322 (72)	427 (96)	170	124	0.53 (. 021)	97 (2.9)

60 *Modelo de defecto de la pared abdominal.* Ratas albinas macho Sprague Dawley de estado bacteriológico y viral conocido (Harlan Lab., Rehovot, Israel), que pesaban 250-350 g, se alojaron en una instalación autorizada según los actuales requisitos éticos. Todos los animales se sometieron a una inspección clínica en cuanto llegaron. Los animales se enjaularon y se proveyeron de dieta a voluntad y tuvieron acceso libre a agua de grifo esterilizada. Antes y después de la cirugía, los animales se alojaron en una habitación con aire acondicionado, en un intervalo de temperatura de 22 ± 4 °C, humedad relativa del 30-70% y bajo un ciclo de iluminación artificial (12 horas de luz artificial /12 horas de oscuridad). Los animales se asignaron aleatoriamente a los diferentes grupos antes de la cirugía. La identificación de animales se hizo por marcado con ácido pícrico.

Anestesia: Las ratas se pesaron antes de la cirugía y el día de la autopsia. Los animales se anestesiaron con 80 mg/kg de inyección IM de una mezcla de 85/15 de HCl de ketamina 100 mg/ml (Fort Dodge Pty. Ltd., Australia) y HCl de xilazina, 20 mg/ml (VMD, Bélgica).

5 Las ratas se rasuraron en el sitio quirúrgico y se marcó una incisión de 6 cm sobre la piel que cubrió la línea sobre la línea media ventral. La piel se preparó con disolución de Iodophor y se hizo una incisión. La piel se retiró y se debilitó ligeramente para facilitar la sutura al final del procedimiento. Con la pared muscular expuesta se hizo una incisión de 5 cm en el músculo a lo largo de la línea a lo largo de la cavidad peritoneal. Se expuso la pared abdominal derecha. Se eliminó 2 x 1 cm del peritoneo. El borde medial de este defecto se localizó 1 cm lateral de la incisión de la línea media y paralela a ella. El defecto de la pared abdominal se expuso al aire durante 10 minutos para monitorizar cualquier hemorragia. Se aplicaron diferentes variaciones de malla a las heridas en el modo especificado más adelante. La incisión de la línea media se cerró con una sutura bicolor 2-0 Dexon™ II continua (Covidien syneture, EE.UU.) o con una 3-0 Softsilk continua (Syneture, EE.UU.) y la piel se cerró con la misma sutura de manera que no se produjera sangrado.

15 Aplicación de malla: En cada rata, la malla se aplicó sobre el defecto de la pared abdominal y se unió al área por dos suturas opuestas y en diagonal usando sutura 5-0 AssuCryl® MonoSlow (AssutSutures, Suiza). En el caso de que el dispositivo implantable de la invención se implantara quirúrgicamente, la superficie recubierta se orientó hacia los órganos viscerales y las superficie sin recubrir se dispuso mientras que se orientaba hacia el defecto de la pared abdominal. Tras la implantación de malla, los animales se monitorizaron diariamente para evaluar cualquier irritación o signos de dolor.

25 Los animales se mantuvieron sin anestesia después del procedimiento y se sacrificaron en diferentes momentos de tiempo durante un periodo de hasta 30 días. Los animales se sacrificaron usando CO<sub>2</sub> y se hizo una incisión en forma de V exponiendo la pared abdominal. La malla se fotografió y se evaluaron el grado de las adhesiones y/o el nivel de integración de la malla con el tejido de alrededor. El nivel de adhesión se evaluó según la metodología de puntuación descrita más adelante y el nivel de integración se evaluó por resistencia a aislar la malla integrada del tejido.

30 *Determinación del nivel de adhesión.* El nivel de adhesión se evaluó según una de las siguientes metodologías de puntuación:

1) Metodología de Smith y col. y Diamond y col. \*

35

Grado de Adhesión	**Smith et al.	***Diamond et al.
0	Sin adhesiones	Sin adhesiones
1	Adhesiones tenues	=25
2	Intestinal definitiva y adhesiones omentales	=50
3	Adherencias intestinales densas para la malla	=75
4		>75

45 \* Desvelada en Kayaoglu y col., "Comparison of adhesive properties of five different prosthetic materials used in hernioplasty". J Invest Surg. 2005;18:89-95.  
 \*\* Densidad de adhesiones  
 \*\*\* Porcentaje de la superficie de la malla implicada en la adhesión.

2) Metodología de Toosie y col.\*

55

Grado de Adhesión	Escala de Adhesión de Densidad
0	Sin Adhesión
1	Baja, Adhesión fácilmente eliminada
2	Moderada, Dificultad para separar adhesiones
3	Altamente inseparable, Requiere instrumentos afilados para separar adhesiones

60 \* Toosie y col. "Fibrin glue reduces intra-abdominal adhesions to synthetic mesh in a rat ventral hernia model". Am Surg. 2000;66:41-45.

65 *Colonización bacteriana de la malla y el tejido subyacente.* Este procedimiento se usó si se utiliza el defecto de la pared abdominal como modelo. La mallas se retiraron junto con una delgada capa de tejido de la pared abdominal subyacente y se guardaron a -80 °C hasta que se ensayaron. La mitad de cada malla se colocó en un tubo de

ensayo estéril y se lavó con vórtex con 1 ml de PBS durante aproximadamente 10 s. Esta etapa se llevó a cabo 5 veces. Se combinaron las disoluciones de lavado de cada animal, se diluyeron en serie con PBS y se sembraron en puntos sobre placas de Petri de 90 mm con TSBA + 5% de sangre de oveja desfibrinada (nº de cat. de HyLabs PD049). Las colonias bacterianas se contaron después de la incubación durante la noche a 37 °C. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC) por cm<sup>2</sup> de superficie de malla. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de la t de Student.

*Modelo subcutáneo en ratones.* Ratones Swiss Webster hembra adultos (*Mus musculus*), que pesaban 20-35 g al inicio del estudio, se compraron de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianápolis, Indiana). La identificación de animales se hizo por un número escrito con rotulador permanente sobre la cola. Los animales se aclimataron durante un mínimo de 3 días antes del inicio del estudio. Los ratones se pesaron antes del comienzo de la cirugía. En cuanto llegaron, los ratones se alojaron en grupos en jaulas de fondo sólido a una temperatura diana de aproximadamente 21 °C (18-26 °C) y una humedad relativa diana del 50% (30-70%), y se mantuvieron en un ciclo aproximado de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. Tras la cirugía, los animales se alojaron individualmente. Los animales se alimentaron con una dieta a voluntad (dieta para roedor certificada 5002-Purina, PMI Nutrition) y agua municipal o se proporcionaron envases de gel a voluntad. Los animales se manipularon y se mantuvieron según la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales se observaron al menos una vez al día antes del comienzo del estudio para determinar su estado de salud general basándose en el consumo de alimentos, eliminación y comportamiento general. Después de la cirugía, los animales se observaron dos veces al día durante 5 días para signos de dolor y/o malestar. Anestesia: Los animales estuvieron bajo anestesia general durante el procedimiento de implantación. Todos los ratones se indujeron con isoflurano (3-5%) con una velocidad de flujo de oxígeno de 1-2 litros/minuto mediante una cámara de inducción cargada. Tras la inducción anestésica, los animales se sacaron de la cámara de inducción y recibieron pomada oftálmica en cada ojo. La anestesia se mantuvo durante toda la duración de la cirugía mediante circuito semi-cerrado de isoflurano (1-4%) y oxígeno (1-2 litros/minuto) por máscara al tiempo que bajo una cabina de flujo laminar u otro sistema de evacuación de gas residual.

Analgésicos: Los animales recibieron analgésicos antes del inicio del procedimiento quirúrgico con el fin de minimizar cualquier dolor o sufrimiento (clorhidrato de nuprenorfina; 0,1 mg/kg, SC). Se calculó el peso promedio de todos los animales de ensayo para la dosificación del analgésico. Tras la cirugía, los animales se observaron para signos de dolor y/o sufrimiento dos veces al día durante un periodo de 5 días. Cualquier animal que demostrara cualquier signo de dolor y/o sufrimiento tras la cirugía recibió analgésicos adicionales (clorhidrato de nuprenorfina; 0,05 - 0,1 mg/kg, SC). Los analgésicos se administraron basándose en lo siguiente "Parámetros para la Evaluación de Dolor": intento de proteger, alejarse o morder; chillido cuando se palparon o se forzaron a usar áreas afectadas; lamidos, mordiscos, arañazos, temblores o frotamientos; ritmo, tumbarse y levantarse, o desplazamiento de peso; disminución significativa en la movilidad; longitud de tiempo inusual para posición reclinada; reticencia a moverse o dificultar al levantarse; y cabeza baja, abdomen encogido, encorvado, distorsión facial o palidez.

Procedimiento quirúrgico. Se cortó el pelo del lomo entero del ratón desde el área escapular dorsal hasta el área lumbosacra dorsal usando tijeras eléctricas para animales. El área se frotó con una disolución acuosa de Iodophor, diacetato de clorhexidina y se aclaró con alcohol. El ratón anestesiado y quirúrgicamente preparado se puso en mesa quirúrgica calentada bajo una cabina de flujo laminar, en decúbito esternal. Usando instrumentos estériles para cada ratón se hicieron incisiones bilaterales, aproximadamente 1 cm lateral a la columna vertebral y 1,5 cm en longitud, caudales a la escápula. Entonces, la piel se separó del tejido conjuntivo subyacente creando dos bolsillos que median aproximadamente 1,5 x 1,5 cm. Los bolsillos se crearon aproximadamente a 1 cm de la incisión de la piel. Se tuvo cuidado en garantizar que quedara un puente de tejido intacto entre las dos incisiones de la piel con el fin de prevenir la migración de la malla implantada y las bacterias entre los dos bolsillos. Los diferentes tejidos de malla se colocaron en los bolsillos. Tras la aplicación de las diferentes mallas, las mallas se sometieron a adiciones bacterianas. Mallas SURGISIS® se sometieron a 0,1 ml de solución salina que contenía 3,3 x 10<sup>5</sup> UFC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y las mallas recubiertas con fibrina estabilizada se sometieron a 0,1 ml de solución salina que contenía 4,4 x 10<sup>5</sup> UFC de *Staphylococcus aureus*. Cada animal se implantó con la misma malla en ambos bolsillos creados. Las incisiones de la piel se cerraron con grapas para heridas quirúrgicas o sutura apropiada. Cada grupo probado contuvo 6 animales. Los ratones se monitorizaron visualmente para respiraciones durante todo el procedimiento. La estabilidad del nivel de inóculo se monitorizó durante el procedimiento de implantación. Inmediatamente después de completarse el procedimiento quirúrgico, los ratones se colocaron en un recipiente de recuperación calentado para retener el calor corporal durante este periodo. Los animales se monitorizaron hasta que estuvieron conscientes y ambulantes y entonces se colocaron en sus jaulas en el animalario.

Los animales se sacrificaron en el día 15 por inhalación de 100% de dióxido de carbono durante no menos de 2 minutos. Después de confirmarse la muerte usando cualquier procedimiento apropiado, las arterias femorales u otro vaso sanguíneo principal se cortó transversalmente como confirmación de la muerte. Tras sacrificarlos, la piel sobre el lomo de cada ratón se frotó con 70% de alcohol y se secó. Los bolsillos subcutáneos se expusieron y se evaluaron los siguientes parámetros: 1) el recuento bacteriano sobre la malla implantada y el tejido de alrededor; y 2) el nivel de reacción inflamatoria (puntuación de infección).

La evaluación se llevó a cabo del siguiente modo: El implante se recogió con aproximadamente 2-3 mm de piel

adyacente usando instrumentos esterilizados. El tejido y el implante se colocaron en un tubo estéril hasta que se ensayaron para recuento bacteriano.

5 Evaluación del recuento bacteriano. La malla explantada y el tejido se sumergieron en 10 ml de solución salina al 0,85% con Tween 80 (2,5 ml/l) y lecitina (0,35 g/l) en un tubo estéril. El tejido y el implante se separaron con herramientas estériles dentro del tubo (para permitir la mejor liberación de bacterias). La bacteria colonizada se eliminó por sonicación a 50 a 60 Hz durante 10 minutos usando un VWR Aquasonic 75HT con bandeja auxiliar. El homogeneizado se enumeró por procedimientos de vertido en placa de agar usando solución salina al 0,85% con Tween 80 (2,5 ml/l) y lecitina (0,35 g/l) como medio de dilución y agar TSA que contiene Tween 80 (2,5 ml/l) y lecitina (0,35 g/l). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas y se contaron las colonias bacterianas. El recuento en placa promedio de cada grupo se informa como UFC por implante.

15 Reacción inflamatoria. Este parámetro se evaluó por una inspección visual del explante según la siguiente clasificación: 1 - Sin infección, explante plano, el tejido parece sano; 2 - Alguna infección, explante hinchado, ligeramente necrótico; y 3 - Infección más grave, explantes encapsulados, tejido necrótico.

20 *Determinación cualitativa de la estabilidad de la capa de recubrimiento de fibrina.* Las evaluaciones de estabilidad se llevaron a cabo por una inspección visual de la estructura de recubrimiento teniendo en cuenta la continuidad del recubrimiento y la friabilidad del recubrimiento del dispositivo.

**Ejemplo 1: El efecto de pulverizar sellante de fibrina sobre un tejido de malla dispuesto dentro del área de cirugía sobre el nivel de adhesión.**

25 Las adhesiones entre tejidos son un efecto secundario no deseado en cirugía. Se ha usado sellante de fibrina en diferentes estudios experimentales para reducir la formación de adhesiones (Martin-Cartes y col. 2008; Toosie y col. 2000). Así, en el siguiente ejemplo, la malla se dispuso dentro del área de cirugía, se pulverizó sellante de fibrina sobre la superficie de la malla y el nivel de adhesión se evaluó 14 ó 30 días tras la implantación de la malla. Se usó el modelo de defecto de la pared abdominal como se ha descrito anteriormente. Se usaron tejidos de malla sin recubrir como control.

30 Se cortó tejido de malla PPKM602 en trozos de 1,7 x 2,7 cm, se dispusieron en un dispositivo de moldeo hecho de teflón y se esterilizaron en autoclave. Los tejidos de malla se colocaron en el sitio de cirugía y se pulverizaron con CBA1 y trombina (para la composición véase materiales y procedimientos). Se usaron cantidades iguales de estos dos componentes con un volumen total de 0,3 ó 0,6 ml.

35 La clasificación de adhesiones posoperatorias tras la aplicación de estos dispositivos de malla se resume en la siguiente Tabla 2. Las Fig. 1 y 2 muestran el nivel de adhesión en el área de cirugía en ratas representativas 14 y 30 días tras la cirugía, respectivamente en grupos de control (A), 0,3 ml de sellante de fibrina aplicado (B) y 0,6 ml de sellante de fibrina aplicado (C).

**Tabla 2: El efecto antiadhesión de una malla recubierta con sellante de fibrina en el sitio de cirugía.**

45

Animal	Muestra	Malla (mg)	*FS (ml)	Días in vivo	**Grado de Adhesión	
1	Malla	45.4	-	14	4	
2	Malla	46.7	-	30	4	
3	Malla+FS	48.5	0.3	14	3	
4	Malla+FS	41.9	0.3	30	2	
50	5	Malla+FS	44.0	0.6	14	2
	6	Malla+FS	47.2	0.6	30	1
* SF - Sellante de fibrina						
** La clasificación de adhesiones se asignó basándose en la metodología de puntuación de Smith y col. y Diamond y col. (véase materiales y procedimientos).						

55

60 Los resultados obtenidos indican que pulverizar sellante de fibrina sobre la superficie de malla *in situ* produjo un menor nivel de adhesión con respecto al grupo de control (malla sin recubrir). Después de 30 días fue evidente que ambos recubrimientos de volumen, es decir, 0,3 y 0,6 ml, mostraron una disminución significativa en el nivel de adhesión con respecto a las mallas sin recubrir.

**Ejemplo 2: El efecto antiadhesión de una malla pre-recubierta con sellante de fibrina húmedo.**

65 El ejemplo previo muestra el efecto beneficioso de aplicar sellante de fibrina sobre un tejido de malla dispuesto dentro del área de cirugía en la reducción de las adhesiones en el área operada.

El presente ejemplo tuvo como objetivo determinar el efecto antiadhesivo de una malla pre-recubierta y con sellante de fibrina húmedo en cirugía.

Para este fin, el tejido de malla PPKM602 se cortó en trozos de 1,7 x 2,7 cm, se dispusieron en un dispositivo de moldeo y se esterilizaron en autoclave. Esta etapa se siguió de pulverizar los componentes del sellante de fibrina (CBA1 y trombina en cantidades iguales) sobre un lado de los tejidos de malla (la cantidad total de los componentes se enumera en la Tabla 3 bajo SF). Durante el procedimiento de pulverización, los tejidos de malla se dispusieron en el dispositivo de moldeo. Las muestras pulverizadas se incubaron en el refrigerador (4 °C) durante 3 días [las mallas recubiertas se mantuvieron húmedas durante el almacenamiento debido a la alta humedad relativa (80-95%) en el refrigerador]. Como control se usaron muestras esterilizadas en autoclave sin recubrir.

Se llevó a cabo una evaluación *in vivo* del efecto de los tejidos de malla pre-recubierta con fibrina húmeda sobre la reducción de adhesiones y sobre el nivel de integración de la malla con el tejido de alrededor usando el modelo de defecto de la pared abdominal como se ha descrito anteriormente. Se usaron doce animales, de los que 6 sirvieron de controles y 6 se trataron con la malla pre-recubierta húmeda. Cuando la malla se aplicó a la rata, el lado sin recubrir se orientó hacia el defecto.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3 a continuación y en las Fig. 3-5. Las Fig. muestran el grado de adhesión y la integración de la malla con el tejido de alrededor de ratas representativas en el grupo de control (A) con respecto a los tejidos de malla pre-recubierta con sellante de fibrina húmedo (B) en el día 15 (Fig. 3) y 30 (Fig. 4 y 5) tras la implantación. El área operada está rodeada con un círculo.

**Tabla 3: El efecto antiadhesión de una malla recubierta con sellante de fibrina húmedo**

Animal	Muestra	Malla (mg)	Malla + FS (mg)	*FS (mg)	Días in vivo	**Grado de Adhesión
1	Malla+FS	44	614	570	15	1
2	Malla+FS	44	505	461	15	1
3	Malla+FS	44	532	488	6	4
4	Malla	44.4	-	-	6	4
5	Malla	44.7	-	-	15	4
6	Malla	42.5	-	-	30	3
7	Malla	44.7	-	-	30	3
8	Malla+FS	44	445	401	30	0
9	Malla	42.8	-	-	30	3
10	Malla+FS	44	434	390	30	0
11	Malla	43.5	-	-	30	3
12	Malla+FS	44	583	539	30	0

\* La clasificación de adhesiones se asignó basándose en la metodología de puntuación de Smith y col. y Diamond y col. (véase materiales y procedimientos).

Los resultados obtenidos muestran que una malla pre-recubierta con sellante de fibrina húmedo condujo a una disminución significativa en el nivel de adhesión en el lado visceral con respecto a un tejido de malla sin recubrir (Tabla 3 y Fig. 3-5).

Además, una malla pre-recubierta con sellante de fibrina húmedo produjo una mejor integración del tejido sobre el lado de la fascia (evaluado por la resistencia para aislar la malla integrada del tejido) con respecto a la malla sin recubrir de control.

Los resultados obtenidos también indican que los tejidos de malla pre-recubierta con sellante de fibrina húmedo fueron más eficaces en la reducción de adhesiones con respecto a pulverizar el sellante de fibrina sobre una malla que se coloca en el área de cirugía durante la cirugía (compárense las Fig. 1C y 2C con 3B, 4B, 5B).

### **Ejemplo 3: Efecto del procedimiento de liofilización o secado a vacío sobre la estabilidad de la capa recubierta con sellante de fibrina.**

En el ejemplo previo se mostró que los tejidos de malla pre-recubierta húmeda son mejores en la prevención de la adhesión que la pulverización *in situ* de sellante de fibrina. Para proporcionar una malla pre-recubierta con una estabilidad en almacén prolongada, la malla pre-recubierta puede suministrarse en una forma seca y rehidratarse antes de la aplicación en el tejido herido si se desea. El siguiente ejemplo tuvo como objetivo examinar la estabilidad de una malla pre-recubierta y con sellante de fibrina secado. Se probaron dos procedimientos de secado: congelación o secado a vacío.

Para este fin, los tejidos de malla se cortaron en trozos de 2,54 x 2,54 cm (6,45 cm<sup>2</sup>), se recubrieron con un volumen

igual de trombina y CBA1 (la cantidad de sellante de fibrina total usada para cada malla se enumera en la Tabla 4 y 5 bajo SF húmedo). Entonces, las mallas recubiertas o bien se congelaron o se secaron a vacío como se ha descrito anteriormente. En este experimento las mallas no se sometieron a activación por plasma superficial antes de la etapa de recubrimiento.

5 Los tejidos de malla se pesaron antes de pulverizarlos (malla), después de pulverizarlos (malla + sellante de fibrina húmedo; SF) y después del procedimiento de secado (datos no mostrados).

10 El tipo de malla, peso de malla, el peso de malla + SF húmedo, el peso de SF húmedo, el peso de SF seco, la pérdida de agua y el SF seco por cm<sup>2</sup> se especifican en la Tabla 4 y 5 a continuación para los procedimientos de congelación y secado a vacío, respectivamente.

**Tabla 4: Las características de tejidos de malla recubierta con fibrina después de la liofilización.**

Malla tipo	Malla (mg)	Malla + humedad FS (mg)	*Humedad FS (mg)	**Seco FS (mg)	***Pérdida de agua (%)	****Seco FS/cm <sup>2</sup> (mg)
403	33.8	688.5	654.7	105.5	83.89	16.35
404	22.9	684.3	661.4	104.6	84.19	16.21
601	57.9	715.4	657.5	107.1	83.71	16.60
602	61.5	470.3	408.8	61.8	84.88	9.58

**Tabla 5: Las características de tejidos de malla recubierta con fibrina después del secado a vacío.**

Malla tipo	Malla (mg)	Malla + humedad FS (mg)	*Humedad FS (mg)	**Seco FS (mg)	***Pérdida de agua (%)	****Seco FS/cm <sup>2</sup> (mg)
601	63.6	664.6	601	160.7	73.3	24.91
601	65.8	735.7	669.9	174.7	73.9	27.09
404	24.7	355.7	331	79.3	76.0	12.29
404	24.3	383.3	359	81.9	77.2	12.70
404	23.5	243.3	219.8	63.5	71.1	9.84
404	26	339.4	313.4	79.5	74.6	12.33
404	23.9	238.1	214.2	61.9	71.1	9.60
404	24.6	313.5	288.9	74.6	74.2	11.57
404	23.1	188.8	165.7	51.5	68.9	7.98
404	25.5	193.7	168.2	55.4	67.1	8.59
404	23	176.1	153.1	51.8	66.2	8.03
404	23.4	155.8	132.4	46	65.3	7.13
404	23.6	204.6	181	55.6	69.3	8.62
404	25.3	384.3	359	88.1	75.5	13.66

45 \* El peso del SF húmedo se calculó restando el peso de la malla (columna 2) del peso de la malla + SF húmedo (columna 3).

\*\* El peso del SF húmedo se calculó restando el peso de la malla (columna 2) del peso de la malla secada (datos no presentados).

50 \*\*\* La pérdida de agua se calculó como sigue: [(peso de SF húmedo – peso de SF seco) / peso de SF húmedo] x 100.

\*\*\*\* El sellante de fibrina por cm<sup>2</sup> se calculó como SF seco (columna 5)/6,45 cm<sup>2</sup>.

55 La actividad del agua (medida por el medidor de actividad del agua AquaLab: Series 3TE; Decagon Devices según las instrucciones del fabricante) de estos tejidos de malla recubierta con fibrina fue superior a 0,6.

Una evaluación visual de la estabilidad de la malla pre-recubierta secada reveló que el recubrimiento de fibrina fue inestable en ambos procedimientos de secado, es decir, congelación y secado a vacío, ya que el recubrimiento fue discontinuo y experimentó descascarillamiento.

**Ejemplo 4: El efecto de la reticulación de la capa de fibrina sobre la estabilidad del recubrimiento.**

El ejemplo previo mostró que la congelación o secado a vacío de la malla pre-recubierta con sellante de fibrina produjo una estructura de recubrimiento inestable.

65 El siguiente ejemplo ilustra el efecto de la reticulación del recubrimiento de fibrina sobre la estabilidad del recubrimiento.

Se cortó tejido de malla PPKM403 en trozos de 2,54 x 2,54 cm, se dispusieron en una bandeja y se pulverizaron con aproximadamente 0,3 ml de sellante de fibrina (cantidades iguales de trombina y disoluciones de CBA1). Entonces, los tejidos de malla recubierta húmeda se pusieron en una estufa a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos hasta que se formó un coágulo. Las muestras se colgaron sobre un gancho con el fin de evitar la unión de la malla recubierta sobre la bandeja. Esta etapa se siguió de secado a vacío a 4 mbar durante 1,5 horas y reticulación del recubrimiento de fibrina en una estufa (Carbolit PF200) a 120 °C durante 3 horas. Los grupos de control se prepararon de la misma forma, excepto por el procedimiento de reticulación.

En uso, la malla recubierta secada puede rehidratarse antes de la implantación. Así, la determinación cualitativa de la estabilidad de la capa de recubrimiento de fibrina reticulada secada (véase materiales y procedimientos) se llevó a cabo antes y después de sumergir la malla recubierta con fibrina reticulada en solución salina (las mallas se sumergieron en solución salina durante 5 minutos). Los resultados se presentan como un recubrimiento de fibrina estable (Y) o no estable (N) (Tabla 6).

**Tabla 6: Estabilidad de los tejidos de malla recubierta con fibrina reticulada.**

Muestra	Estabilidad	
	Antes de humedad salina	Después de humedad salina
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta seca	Y	N

Los resultados indican que tras la rehidratación con solución salina, la malla recubierta reticulada presentó elevada estabilidad de la capa de recubrimiento de fibrina en comparación con la malla recubierta que no se sometió a tratamiento de reticulación.

Estos resultados se verificaron en otro conjunto de experimentos. Se cortó tejido de malla PPKM602 en trozos de 2,54 x 2,54 cm y se recubrieron como se ha descrito anteriormente. Después, los tejidos de malla secados se sometieron a irradiación gamma a una dosis de 10 ± 5 kGy. Los grupos de control se prepararon del mismo modo, aparte del procedimiento de irradiación.

La evaluación de la estabilidad cualitativa (véase materiales y procedimientos) de estas mallas pre-recubiertas se llevó a cabo antes y después de humedecer con solución salina como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7: Estabilidad de tejidos de malla recubierta con fibrina reticulada irradiada.**

Muestra	Estabilidad	
	Antes de humedad salina	Después de humedad salina
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y
Malla recubierta con reticulado seco	Y	Y

Los resultados muestran que los procedimientos de reticulación e irradiación produjeron un tejido de malla pre-recubierta secada estable.

**Ejemplo 5: El efecto de la malla recubierta reticulada secada sobre el nivel de adhesión**

El ejemplo previo mostró que la reticulación estabiliza el recubrimiento de fibrina sobre el sustrato. El siguiente experimento se llevó a cabo con el fin de encontrar si el procedimiento de reticulación afectaba o no las propiedades antiadhesivas de la malla pre-recubierta. Para este fin se examinó la clasificación de la adhesión después de la implantación de la malla irradiada y recubierta con fibrina reticulada (mencionada en el ejemplo previo) en el área de cirugía. Como referencia se usaron matrices de malla sin recubrir.

Las Fig. 6 y 7 muestran el nivel de adhesión en el área operada 17 y 30 días tras el procedimiento de cirugía, respectivamente, en animales implantados con una malla sin recubrir (grupos de control; A), y tejidos de malla irradiados y recubiertos con fibrina reticulada (B).

**Tabla 8: El efecto antiadhesivo de la malla recubierta con fibrina reticulada.**

Animal	Muestra	FS (ml)	Días in vivo	*Grado de adhesión
1	Malla sin recubrimiento	-	17	3
2	Malla sin recubrimiento	-	30	3
3	Reticulado de malla recubierto	0.3	17	2
4	Reticulado de malla recubierto	0.3	30	1

\* La clasificación de adhesiones se asignó basándose en la metodología de puntuación de Smith y col. y Diamond y col. (véase materiales y procedimientos).

Los resultados indicaron que las matrices de malla recubierta con fibrina reticulada irradiada fueron superiores a la malla sin recubrir con respecto a la prevención de la adhesión.

**Ejemplo 6: La estabilidad de un tejido de malla pre-recubierta con sellante de fibrina secada a temperatura ambiente.**

El Ejemplo 4 muestra que una malla pre-recubierta con sellante de fibrina reticulada presentó elevada estabilidad de la capa de recubrimiento de fibrina.

El presente ejemplo tuvo como objetivo examinar la estabilidad de un tejido de malla pre-recubierta con sellante de fibrina que contiene aproximadamente 3% de agua, 65% de sal y 32% de proteínas (tales como fibrinógeno, trombina, factor XIII, fibronectina, etc.) que se secó a temperatura ambiente.

Los tejidos de malla se recubrieron con 45  $\mu\text{l}$  de CBA1 por  $\text{cm}^2$ , seguido de recubrimiento con 4,28  $\mu\text{l}$  de trombina por  $\text{cm}^2$  y las mallas se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche. Antes de recubrir las mallas se sometieron a tecnología de activación superficial por plasma. Un ejemplo de una máquina de plasma de laboratorio es Type Nano, de Diener Electronic. El procedimiento incluyó activación de la superficie con oxígeno a una presión de la cámara de 0,4 mbar y una potencia de 200 W durante 300 segundos.

Las mallas pre-recubiertas secadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 a 3 semanas y hasta 6 meses bajo condiciones no estériles y se llevaron a cabo evaluaciones cualitativas de la estabilidad del recubrimiento (véase materiales y procedimientos).

Fue evidente que la capa de recubrimiento de fibrina fue estable, y la capa no experimentó descascarillamiento. No fue evidente deterioro visible.

Estos resultados se corroboraron en otro conjunto de experimentos. Mallas de polipropileno PPKM601 se sometieron a activación superficial por plasma como se ha descrito anteriormente, se recubrieron con 45  $\mu\text{l}$  de CBA1 por  $\text{cm}^2$ , seguido de recubrimiento con 4,28  $\mu\text{l}$  de trombina por  $\text{cm}^2$ . La malla recubierta se dejó secar durante 15 horas a temperatura ambiente bajo aire ambiente. La mallas se colocaron en un envase herméticamente cerrado que contenía desecante de sílice y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se ensayaron.

Se midieron el contenido de agua (medido usando el método de valoración de Karl Fischer como se ha descrito anteriormente) y la actividad del agua (medida por el medidor de actividad del agua AquaLab: Series 3TE; Decagon Devices según las instrucciones del fabricante).

El contenido de agua en este tejido de malla pre-recubierta secada fue inferior al 10% y la actividad del agua fue inferior a 0,6.

Ventajosamente, un dispositivo implantable que tiene un recubrimiento de fibrina estabilizada secada con actividad del agua reducida reduce la susceptibilidad a contaminación microbiana; así puede almacenarse durante un periodo de tiempo prolongado y es superior para aplicaciones médicas.

**Ejemplo 7: El efecto de tejidos de malla recubierta con fibrina secada que contiene una alta concentración de sales sobre complicaciones posoperatorias.**

El ejemplo previo muestra que tejidos de malla recubierta con fibrina secada que contiene una alta concentración de sales son estables bajo condiciones no estériles. El presente ejemplo evalúa el efecto de estas mallas pre-

recubiertas estabilizadas sobre la formación de adhesiones de tejido posoperatorias y sobre la adherencia de bacterias a la malla en un entorno *in vivo*. La inclusión de alta concentración de sales en la fibrina se llevó a cabo para aumentar la estabilización. La inclusión de sal en el recubrimiento se llevó a cabo antes de la formación de coágulos usando CBA (como se ha especificado anteriormente) que comprende 100 mg/ml de ácido tranexámico a pH 7.

Mallas de polipropileno PPKM601 se sometieron a activación superficial por plasma como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 6) y se recubrieron con 45 µl de CBA1 por cm<sup>2</sup>, seguido de recubrimiento con 4,28 µl de trombina por cm<sup>2</sup>. La malla recubierta se dejó secar durante 15 horas a temperatura ambiente bajo aire ambiente. Después, la malla recubierta se colocó en un envase herméticamente cerrado que contenía desecante de sílice y se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se usó. Se usó un modelo de defecto de la pared abdominal en este experimento. Antes de la implantación de los tejidos de malla en el área de cirugía, las mallas se sumergieron en 70% de etanol y se aclararon con PBS estéril en un tubo de ensayo durante 5 minutos. Cuando la malla se aplicó a la rata, el lado sin recubrir se orientó hacia el defecto. Se usaron tejidos de malla sin recubrir como control. El nivel de adhesión se evaluó usando 12 animales de los que 6 se implantaron con la malla recubierta con fibrina estabilizada (es decir, malla recubierta con fibrina secada que contiene una alta concentración de sales) y 6 con la malla sin recubrir. Se implantó una malla de 1,7 x 3,2 cm. Los animales se sacrificaron cuatro semanas después del inicio del estudio y las mallas se fotografiaron. El grado de formación de adhesiones en el área de cirugía se evaluó en cada animal. Los parámetros de evaluación incluyeron el porcentaje de cobertura de la superficie de malla por adhesiones (0-100% de cobertura) y la fuerza de adhesión del tejido entre la malla y el epiplón, hígado e intestino (se clasificó de 0-3 basándose en Toosie y col. 2000).

La Tabla 9 muestra la evaluación de la fuerza de adhesión del tejido a la superficie de la malla. La puntuación de adhesión de los diferentes órganos viscerales se sumó en cada animal (enumerado en la Tabla 9 bajo Total) y se calculó el valor promedio para cada grupo (malla recubierta con fibrina estabilizada y malla sin recubrir). La Fig. 8 muestra la fuerza promedio de adhesiones intestinales a la superficie de la malla (nivel de adhesión promedio) en los animales implantados con la malla sin recubrir y recubierta con fibrina estabilizada. Los resultados se extraen de la Tabla 9 (véase la puntuación para adhesiones intestinales presentada en la Tabla 9).

**Tabla 9: Fuerza de adhesiones intraperitoneales a la superficie de la malla por tejidos de diferentes órganos viscerales.**

	Animal	Epiplón	Hígado	Intestino	Total	Promedio
Malla revestida de fibrina estabilizada	1	2	3	0	5	4.5
	2	1	3	0	4	
	3	3	0	0	3	
	4	1	3	0	4	
	5	2	3 (2 lóbulos)	0	5	
	6	3	3	0	6	
Malla sin revestimiento	7	3	3	0	6	6.3
	8	2	0	2	4	
	9	3	3 (2 lóbulos)	0	6	
	10	3	3	3	9	
	11	1	3	0	4	
	12	3	3	3	9	
* La clasificación de adhesiones se asignó basándose en Toosie y col. 2000 (véase materiales y procedimientos).						

Como se observa en la Tabla 9, la fuerza promedio de uniones a la malla recubierta con fibrina estabilizada fue 4,5 frente a 6,3 de la fuerza promedio de uniones a la malla sin recubrir.

Por tanto, no hubo adhesiones evidentes en las que participara el intestino en los animales implantados con la malla recubierta con fibrina estabilizada. En comparación, las adhesiones intestinales se encontraron en los animales tratados con las mallas sin recubrir (véase la puntuación para adhesiones intestinales en la Tabla 9 y Fig. 8).

Y, lo que es más importante, puede observarse que la malla recubierta con fibrina estabilizada tuvo una eficacia similar en la reducción de adhesiones a la malla pre-recubierta y con sellante de fibrina húmedo cuando se refiere a adhesiones en las que participa el intestino [no se observaron adhesiones en ambas mallas; véase la puntuación de adhesión de adhesiones intestinales en animales tratados con la malla recubierta con fibrina estabilizada en la Tabla 9 y la puntuación de adhesión en animales tratados con la malla pre-recubierta y con sellante de fibrina húmedo en la Tabla 3, 30 días tras la implantación de la malla].

El porcentaje de área de la malla cubierta por las adhesiones en las diferentes mallas se resume en la Tabla 10.

**Tabla 10: El porcentaje de la superficie de la malla cubierta por adhesiones.**

	Animal	Cobertura (%)	Promedio(%)	
5 10	Malla revestida de fibrina estabilizada	1	30	24.1
		2	10	
		3	15	
		4	10	
		5	40	
		6	40	
15	Malla sin revestimiento	7	40	46.2
		8	20	
		9	60	
		10	75	
		11	10	
		12	72	

El promedio de la malla cubierta por adhesiones fue del 24,1% en la malla recubierta con fibrina estabilizada en comparación con el 46,2% en la malla sin recubrir (Tabla 10).

La carga patógena de la malla recubierta con fibrina estabilizada y la malla sin recubrir se evaluó en un modelo de defecto de la pared abdominal como se ha especificado anteriormente (véase Colonización bacteriana de la malla y el tejido subyacente en la sección de materiales y procedimientos). Después de suturar la malla (1,7 x 2,7 cm) sobre el defecto creado, la malla se mantuvo horizontalmente y se aplicaron 0,1 ml de PBS con o sin  $5 \times 10^7$  UFC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) a la superficie de la malla. La malla se mantuvo en la posición horizontal durante 5 minutos. En total se usaron 12 animales, 8 animales se sometieron a adiciones bacterianas (4 animales se implantaron con la malla recubierta con fibrina estabilizada y 4 animales se implantaron con la malla sin recubrir) y 4 animales sin adiciones bacterianas (2 animales se implantaron con la malla recubierta con fibrina estabilizada y 2 animales se implantaron con la malla sin recubrir). Los animales se sacrificaron 5 días después de la implantación de la malla.

La Fig. 9 muestra las unidades formadoras de colonias (UFC) por  $\text{cm}^2$  de superficie de malla 5 días tras la reparación del defecto de la pared abdominal. Las mallas se evaluaron con (+) o sin (-) adiciones bacterianas.

Los resultados muestran que en el grupo sometido a contaminación bacteriana la malla recubierta con fibrina estabilizada produjo un recuento bacteriano significativamente menor en comparación con la malla sin recubrir ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados muestran la ventaja de uso de un dispositivo quirúrgico implantable que comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada, ya que usando este dispositivo se produce reducción de complicaciones quirúrgicamente relacionadas tales como adhesiones intestinales y/o infecciones.

#### **Ejemplo 8: El efecto de la malla recubierta con fibrina estabilizada sobre el nivel de adhesión en el modelo contaminado intra-abdominal.**

La cavidad abdominal tiene un posible riesgo de contaminación bacteriana. Estudios (Brown y col. "Comparison of prosthetic materials for abdominal wall reconstruction in the presence of contamination and infection". Ann Surg. 1985; 201:705-711) indican que la presencia de contaminación bacteriana durante la reconstitución del defecto de la pared abdominal puede producir graves complicaciones clínicas tales como elevado nivel de adhesión.

El ejemplo previo mostró que en el grupo sometido a contaminación bacteriana, la malla recubierta con fibrina estabilizada produjo un menor recuento bacteriano en comparación con la malla sin recubrir. El siguiente ejemplo examina la eficiencia de la malla recubierta con fibrina estabilizada en minimizar adhesiones viscerales y reducir el nivel de infección en el área operada en el ámbito de contaminación bacteriana.

Preparación de malla recubierta con fibrina.

Se sometió malla Prolene Soft (SPM; fabricada por Ethicon) a activación superficial por plasma como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 6) y se recubrió con 90  $\mu\text{l}$  por  $\text{cm}^2$  de CBA1 y 10  $\mu\text{l}$  por  $\text{cm}^2$  de trombina (CBA1 y trombina como se ha citado anteriormente). La malla recubierta se dejó secar a temperatura ambiente en aire ambiente durante la noche. La malla secada se cortó en trozos de 1,7 x 2,7 cm, se cerró herméticamente en una bolsa de papel de aluminio y se mantuvo a 2-8 °C hasta que se usó. Se usó malla SPM laminada con un tejido de celulosa regenerada oxidada (ORC), que se usa ampliamente para reducir el grado y gravedad de la unión de tejido a la malla, como referencia (la SPM se encapsuló usando un polímero de polidioxanona). La malla recubierta con ORC se esterilizó previamente por irradiación gamma y se cortó a 1,7 x 2,7 cm de tamaño bajo condiciones estériles.

Ambas mallas se recubrieron sobre un lado solo.

Se usó el modelo de defecto de la pared abdominal como se ha especificado anteriormente. Antes de la implantación de la malla recubierta con fibrina estabilizada, la malla se esterilizó sumergiéndola en 70% de etanol y se rehidrató poniéndola en remojo en solución salina durante 5 minutos. Los dos tipos de malla se aplicaron sobre el defecto con el lado sin recubrir orientando hacia el defecto. Tras la sutura de la malla sobre el defecto creado, la malla se mantuvo horizontalmente mientras que se aplicaron 0,1 ml de PBS con (n=8) o sin (n=4)  $5 \times 10^8$  UFC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) sobre la superficie de la malla. Las mallas se mantuvieron en posición horizontal durante 5 minutos. La evaluación de la adhesión y el nivel de infección se llevaron a cabo 5 días tras el procedimiento de cirugía. Se evaluaron varios parámetros de adhesión: 1) la fuerza de la unión intra-abdominal a la superficie de la malla (tenacidad de la adhesión); 2) el porcentaje de área de malla cubierta con adhesiones; y 3) la incidencia de adhesiones intestinales.

Los resultados muestran que la fuerza promedio de la unión de tejido intra-abdominal a la superficie de la malla y el porcentaje de área de malla cubierta por adhesiones fueron similares en ambas mallas probadas en el grupo no contaminado (véase la Tabla 11 y 12, respectivamente). Sin embargo, en el grupo contaminado puede verse que la fuerza de unión de tejido a la malla recubierta con fibrina fue inferior con respecto al nivel de la fuerza de unión a la malla recubierta con ORC (Tabla 11). Además, el porcentaje de malla cubierta por adhesiones en el grupo contaminado fue significativamente inferior en la malla recubierta con fibrina con respecto a la malla recubierta con ORC ( $63,13 \pm 34,63$  frente a  $93,13 \pm 12,80$  para la malla recubierta con fibrina y la malla recubierta con ORC, respectivamente;  $p=0,037$ ).

Estos resultados muestran el rendimiento superior de la malla recubierta con fibrina en área contaminada.

Formación de adhesiones intestinales. Las adhesiones intestinales pueden conducir a las complicaciones más graves durante la reparación del defecto de la pared abdominal (Ellis y col. "The causes and prevention of intestinal adhesions". Br J Surg. 1982;69:241-243; y Ellis y col. "The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction". Eur J Surg Suppl. 1997;5-9). Por tanto, se monitorizó la formación de adhesiones intestinales 5 días tras la implantación de las mallas recubiertas. No se observaron adhesiones intestinales en ambas mallas probadas en el grupo no contaminado.

Bajo contaminación bacteriana, el número de animales con adhesiones intestinales fue inferior en el grupo implantado con mallas recubiertas con fibrina con respecto a animales implantados con malla recubierta con ORC (Tabla 13).

Además, la formación de infección en el área de operación se evaluó monitorizando el número de animales que desarrollaron abscesos intra-abdominales.

Los resultados indican que ambas mallas previnieron la formación de abscesos en el grupo no contaminado. Y, lo que es más importante, no se encontró que ninguno de los animales implantados con malla recubierta con fibrina tuviera abscesos o cualquier otro signo de infección en el modelo contaminado. En comparación, todos los animales implantados con malla recubierta con ORC en entorno contaminado desarrollaron abscesos 5 días tras la implantación.

Los resultados anteriores muestran que la malla recubierta con fibrina estabilizada de la invención es eficaz en reducir el nivel de adhesión y/o en prevenir la formación de infección en campos contaminados y así puede usarse eficazmente en áreas que tienen posible riesgo de desarrollar contaminación bacteriana.

**Tabla 11: El efecto de malla recubierta con fibrina estabilizada sobre la tenacidad de la adhesión.**

	Muestra	Grado de adhesión (promedio)
Grupo No contaminado	Malla recubierta de fibrina	0.165
	Malla recubierta de OCR	0.5
Grupo Contaminado	Malla recubierta de fibrina	1.04
	Malla recubierta de OCR	** Superior a la clasificación de adherencia en el grupo de malla revestido de fibrina contaminado por bacterias
* La clasificación de adhesiones se asignó como se indica en Toosie y col. 2000 (véase materiales y procedimientos).		
** Este parámetro fue difícil de evaluar debido a la estructura de la masa de adhesión formada y la presencia de abscesos.		

**Tabla 12: El efecto de malla recubierta con fibrina estabilizada sobre el porcentaje de malla cubierta por adhesiones.**

	Muestra	Malla recubierta por adhesiones (%)
Grupo No contaminado	Malla recubierta de fibrina	15.006 +/- 19.15
	Malla recubierta de OCR	0.00
Grupo Contaminado	Malla recubierta de fibrina	*63.13 +/- 634.63
	Malla recubierta de OCR	93.13 +/- 12.80

\* p = 0,037 en comparación con mallas recubiertas con ORC con contaminación bacteriana.

**Tabla 13: El efecto de malla recubierta con fibrina estabilizada sobre la incidencia de adhesiones intestinales.**

	Muestra	El número de animales con adhesiones intestinales
Grupo No contaminado	Malla recubierta de fibrina	0/4
	Malla recubierta de OCR	0/4
Grupo Contaminado	Malla recubierta de fibrina	3/8
	Malla recubierta de OCR	6/8

**Tabla 14: El efecto de malla recubierta con fibrina estabilizada sobre la formación de abscesos.**

	Muestra	El número de animales con abscesos
Grupo No contaminado	Malla recubierta de fibrina	0/4
	Malla recubierta de OCR	0/4
Grupo Contaminado	Malla recubierta de fibrina	0/8
	Malla recubierta de OCR	8/8

**Ejemplo 9: El efecto de malla recubierta con fibrina sobre la colonización bacteriana y el nivel de infección de la malla y el tejido de alrededor.**

El presente ejemplo tuvo como objetivo examinar la capacidad de la malla recubierta con fibrina estabilizada para minimizar la colonización bacteriana y reducir el nivel de infección de la malla y el tejido de alrededor. El modelo subcutáneo en ratones se usó como se ha descrito anteriormente. La eficacia de la malla recubierta con fibrina estabilizada se comparó con SURGISIS®, una malla comercial que está prevista para reconstrucción de hernia.

Para este fin, mallas de polipropileno ligero de 1 cm de diámetro se sometieron a activación superficial por plasma como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 6) y se recubrieron con 90 µl por cm<sup>2</sup> de CBA1 y 10 µl por cm<sup>2</sup> de trombina (CBA1 y trombina como se ha citado enumerada). Las mallas recubiertas se dejaron secar a temperatura ambiente en aire ambiente durante la noche, se cerraron herméticamente en una bolsa de papel de aluminio y se mantuvieron a 2-8 °C hasta que se usaron. La malla recubierta con fibrina se esterilizó usando irradiación gamma a una dosis de 12 ± 2 kGy y se rehidrató en solución salina antes del procedimiento de implantación. SURGISIS® se suministró en un envase estéril y se aplicó al bolsillo subcutáneo según las instrucciones del fabricante. Se evaluaron los siguientes parámetros (como se ha enumerado anteriormente en la sección de materiales y procedimiento bajo Modelo subcutáneo en ratones): 1) el recuento bacteriano sobre la malla implantada y el tejido de alrededor; y 2) el nivel de reacción inflamatoria.

La Fig. 10 muestra las UFC promedio por malla 15 días tras la implantación de la malla en un modelo subcutáneo. Los resultados muestran que la malla recubierta con fibrina estabilizada produjo una reducción significativa en el recuento bacteriano con respecto a la malla SURGISIS®.

La Fig. 11 muestra la puntuación de infección de los diferentes explantes 15 días tras la operación. Es evidente que la malla recubierta con fibrina produjo una menor puntuación de infección con respecto a la malla SURGISIS® (nivel 1 y nivel 3, respectivamente). De importancia, no se encontró variación en la puntuación de infección de los explantes dentro de cada grupo.

**Ejemplo 10: El contenido de agua y la actividad del agua de la composición de recubrimiento de fibrina secada.**

Un dispositivo implantable que tiene una actividad del agua igual a o inferior a 0,6 tras el procedimiento de secado

puede producir una mayor estabilidad en almacén y características funcionales mejoradas del producto. El contenido de agua cambia a medida que aumenta o disminuye la actividad del agua. Así, el siguiente ejemplo se llevó a cabo para mapear la relación entre el contenido de agua y la actividad del agua del producto y para evaluar cuál es el contenido de agua en una actividad del agua fijada.

5 Para este fin se formó una isoterma de sorción de humedad usando el generador de isotermas AquaSorp (Decagon Devices). AquaSorp produce curvas de isotermas de adsorción y desorción usando el procedimiento de isoterma con punto de rocío dinámico (DDI). En principio se forma la curva de desorción secando la muestra y determinando el contenido de agua en la muestra y la curva de adsorción se forma humedeciendo la muestra y determinando el  
10 contenido de agua en la muestra. El secado y el humedecimiento de la muestra se logran disminuyendo (secando) o aumentando (humedeciendo) la humedad relativa (% de HR=100 x  $a_w$ ) en la cámara. Las isotermas se formaron en los siguientes parámetros: una temperatura de 25 °C, una velocidad de flujo de 100 ml/min y una actividad del agua en el intervalo de aproximadamente 0,08 a aproximadamente 0,9.

15 Las isotermas se formaron para dos tipos de mallas recubiertas con fibrina como se especifica más adelante. Antes de la etapa de recubrimiento, la malla de polipropileno se sometió a tecnología de activación superficial por plasma como se ha descrito anteriormente.

20 Preparación de la muestra 1.

La malla activada por plasma (1,7 x 2,5 cm) se recubrió con 92 µl de CBA1 por cm<sup>2</sup>, seguido de recubrimiento con 9,2 µl de trombina por cm<sup>2</sup> (la CBA1 y la trombina usadas son como se ha enumerado anteriormente). La malla recubierta se dejó secar durante la noche a temperatura ambiente y humedad de ~50%. La malla se cerró herméticamente en un envase de aluminio y se incubó en el refrigerador (4 °C) hasta que se ensayó.

25 Preparación de la muestra 2.

Tras el tratamiento de activación por plasma, la malla (2 x 4,5 cm) se recubrió con CBA2 y componentes de trombina. El componente CBA2 se diluyó con agua purificada (1:6) para reducir la viscosidad del líquido y la malla se  
30 recubrió con 136,73 µl de CBA2 diluido por cm<sup>2</sup>. Entonces, la malla se recubrió con 8,78 µl de trombina por cm<sup>2</sup>. La malla recubierta se secó durante 18 horas a 25 °C y humedad del 60%, se envasó en un envase de aluminio estéril y se incubó en el refrigerador (4 °C) hasta que se ensayó.

35 Ambas mallas se recubrieron usando el procedimiento de recubrimiento BioSpot (BioFluidix, Alemania). La composición CBA1 comprende un mayor contenido de sal que la composición CBA2 (véase la formulación de composiciones anteriormente).

Las curvas de desorción (curva superior de cada muestra) y adsorción (curva inferior de cada muestra) para ambas muestras se muestran en la Fig. 12. El procedimiento de producción incluye secar el dispositivo recubierto, así la  
40 evolución del contenido de agua de la muestra se determinó según la curva de desorción. Puede observarse que una mayor concentración de un soluto produce un menor contenido de agua en una actividad del agua fijada. Por ejemplo, la muestra 1 que contuvo un mayor concentración de sales (aproximadamente 60%) tuvo un contenido de agua del 10% en una actividad del agua de 0,6 mientras que la muestra 2 (que tiene 23% de contenido de sal) tuvo un contenido de agua del 14% en la misma actividad del agua.

45 **Ejemplo 11: El efecto de la concentración de soluto sobre el contenido de agua de fibrina secada.**

El siguiente ejemplo tuvo como objetivo determinar el efecto de la concentración de soluto sobre el contenido de agua de los coágulos de fibrina secados. Se usaron tres solutos diferentes: ácido tranexámico, NaCl y glicina.

50 Cada soluto se añadió a 5 ml de la composición CBA2 con una concentración final del 10% peso/peso. En la siguiente etapa, un componente de trombina (el mismo que se ha enumerado en los materiales) se diluyó en agua para obtener una concentración final de 100 UI/ml. Entonces se formó un coágulo de fibrina sobre una superficie de teflón a partir de cantidades iguales de los dos componentes diluidos (se usó un volumen total de 0,5 ml). También  
55 se formó un coágulo como se ha enumerado anteriormente, excepto por la adición de soluto a la composición CBA2. La superficie de teflón con las diferentes muestras se transfirió a una cámara de humedad fijada al 60% de HR y a una temperatura de 25 °C durante la noche.

60 El contenido de agua de los coágulos de fibrina secados se midió usando el método de valoración de Karl Fischer como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 15.

**Tabla 15: El efecto de la adición de soluto sobre el contenido de agua de coágulos de fibrina secados.**

Muestra	Contenido de agua	Promedio de contenido de agua (%)	*Reducción en contenido de agua (%)
CBA2	17.30	18.7	-
	20.03		
Ácido Tranexámico	14.51	15.5	17%
	16.43		
NaCl	14.49	14.4	23%
	14.24		
Glycina	12.9	13.4	28%
	13.81		
* La reducción en el contenido de agua se calculó en comparación con los coágulos de fibrina preparados con la composición CBA2 pura.			

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de soluto produjo una disminución en el contenido de agua del coágulo de fibrina secado con respecto a coágulos preparados a partir de la composición CBA2 pura.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un dispositivo implantable para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 proporcionar un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie no visceral;  
 formar un recubrimiento de fibrina sobre al menos una parte de dicha superficie visceral aplicando a dicha porción un volumen definido de una disolución que comprende fibrinógeno y una disolución que comprende una enzima proteolítica que puede formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno; y secar el recubrimiento, que comprende además, antes de la etapa de secado, la etapa de añadir un soluto que puede unirse a agua libre y que tiene un
- 10 peso molecular de 1.000 Dalton o menos,  
 obteniéndose así un dispositivo implantable que comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada, pudiendo presentar el dispositivo complicaciones posoperatorias reducidas.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas complicaciones posoperatorias están seleccionadas del grupo que consiste en adhesiones, contaminación bacteriana, infecciones, reaparición de aberturas o defectos y una combinación de los mismos.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la superficie del sustrato se activa antes de formar el recubrimiento de fibrina tal como por tratamiento con plasma.
- 20 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha enzima proteolítica es trombina.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa de formación de fibrina se lleva a cabo aplicando en primer lugar a dicha superficie visceral una disolución que comprende fibrinógeno y aplicando en segundo lugar a dicha superficie visceral una disolución que comprende una enzima proteolítica que puede formar fibrina cuando reacciona con el fibrinógeno.
- 25 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho sustrato es poroso tal como una malla.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha abertura o defecto es una hernia.
- 35 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho soluto se añade antes de la formación de fibrina.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho soluto está seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos tales como ácido tranexámico, clorhidrato de arginina, clorhidrato de lisina y sales de los mismos; sales tales como cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de trisodio; sacáridos tales como sacarosa y maltosa; polioles tales como poliglicerol; alcoholes de azúcar tales como manitol y xilitol, y una combinación de los mismos.
- 40 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el contenido de sal en el recubrimiento de fibrina tras el secado está en el intervalo del 5% - 68%, 20% - 68%, 20% - 32% o 51% - 68%.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas disoluciones se aplican usando un dispensador de líquidos.
- 50 12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho secado se lleva a cabo por secado no intensivo o por secado al aire.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que después de la etapa de secado el recubrimiento de fibrina tiene una actividad del agua igual a o inferior a 0,6.
- 55 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que después de la etapa de secado dicho recubrimiento de fibrina comprende un contenido de agua residual en el intervalo del 3%-20%, 3%-15% o 3%-10%.
- 60 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que después de la etapa de secado el recubrimiento comprende un contenido de agua en el intervalo del 3%-20% y un contenido de sal en el intervalo del 20%-68%.
- 65 16. Un dispositivo implantable para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, el dispositivo comprende un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie no visceral, en el que dicha superficie visceral comprende un recubrimiento de fibrina estabilizada y en el que dicho dispositivo implantable puede obtenerse según

el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. El dispositivo según la reivindicación 16, en el que la mayoría de dicha superficie visceral está recubierta.

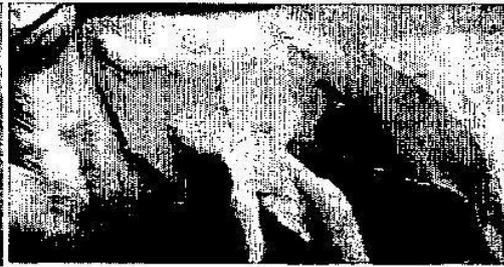
5 18. Un dispositivo implantable quirúrgico para reparar una abertura o un defecto en un tejido blando, pudiendo reducir el dispositivo complicaciones quirúrgicamente relacionadas seleccionadas del grupo que consiste en adhesiones posoperatorias, contaminación bacteriana, reaparición de aberturas o defectos, infecciones y combinación de los mismos, el dispositivo comprende un sustrato que tiene una superficie visceral y una superficie  
10 no visceral, en el que dicha superficie visceral está al menos parcialmente recubierta con un recubrimiento que comprende fibrina estabilizada, en el que dicho recubrimiento comprende un soluto que puede unirse a agua libre que tiene un peso molecular de 1.000 Dalton o menos.

15 19. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que dicho recubrimiento no está completamente seco.

20. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 para su uso en reparar una abertura y/o un defecto en un tejido blando.



**Fig. 1a**



**Fig. 1b**



**Fig. 1c**



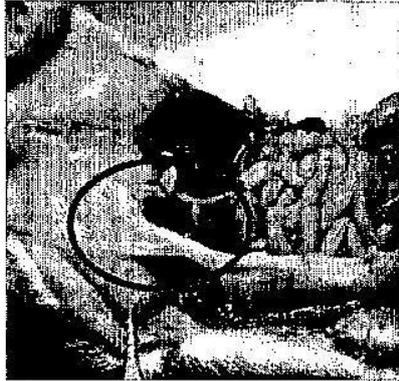
**Fig. 2a**



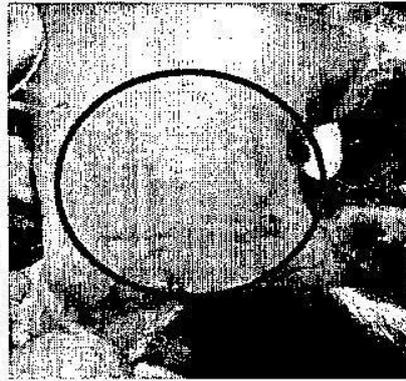
**Fig. 2b**



**Fig. 2c**



**Fig. 3a**



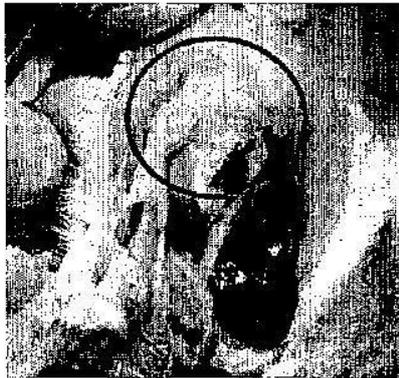
**Fig. 3b**



**Fig. 4a**



**Fig. 4b**



**Fig. 5a**



**Fig. 5b**



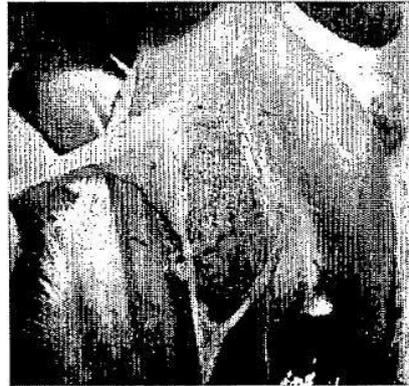
**Fig. 6a**



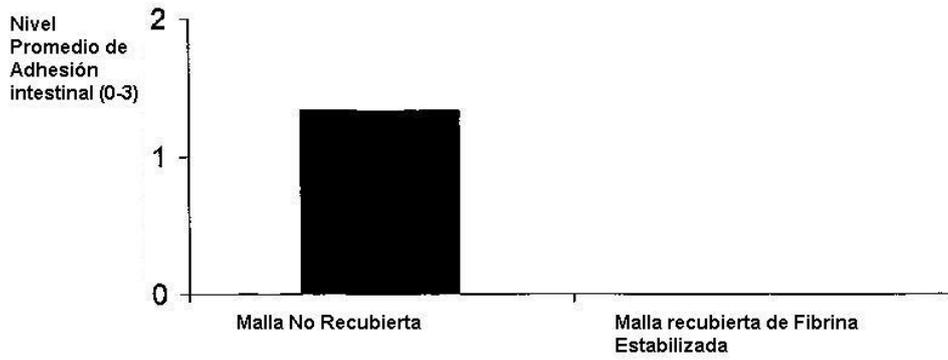
**Fig. 6b**



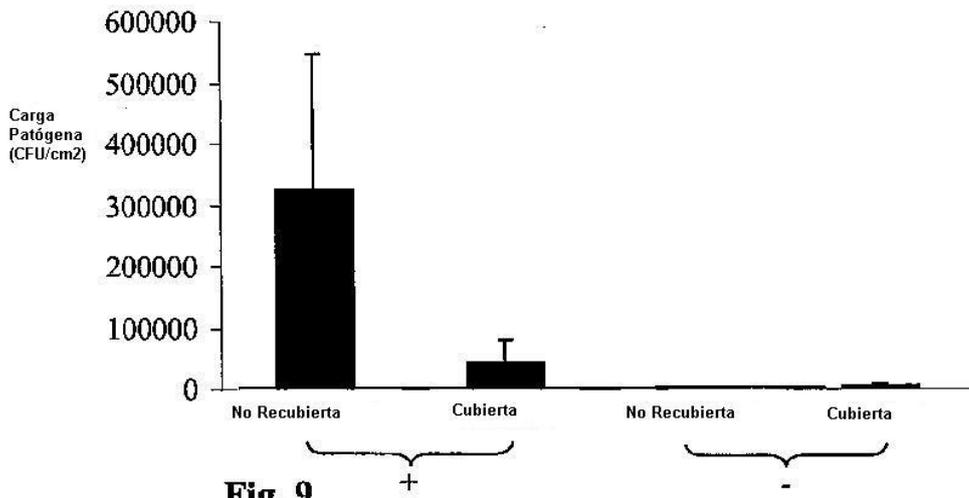
**Fig. 7a**



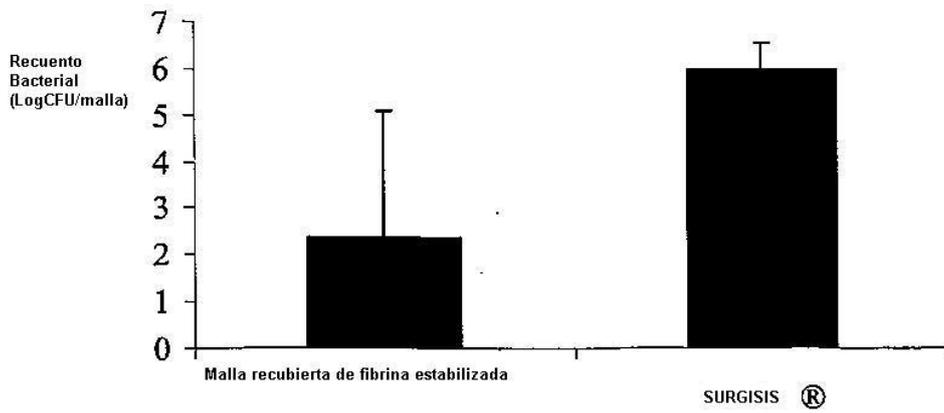
**Fig. 7b**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**

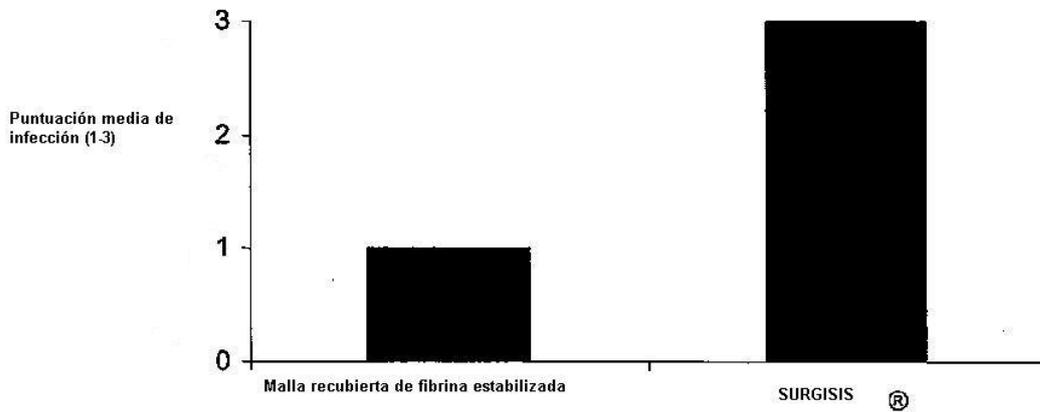


Fig. 11

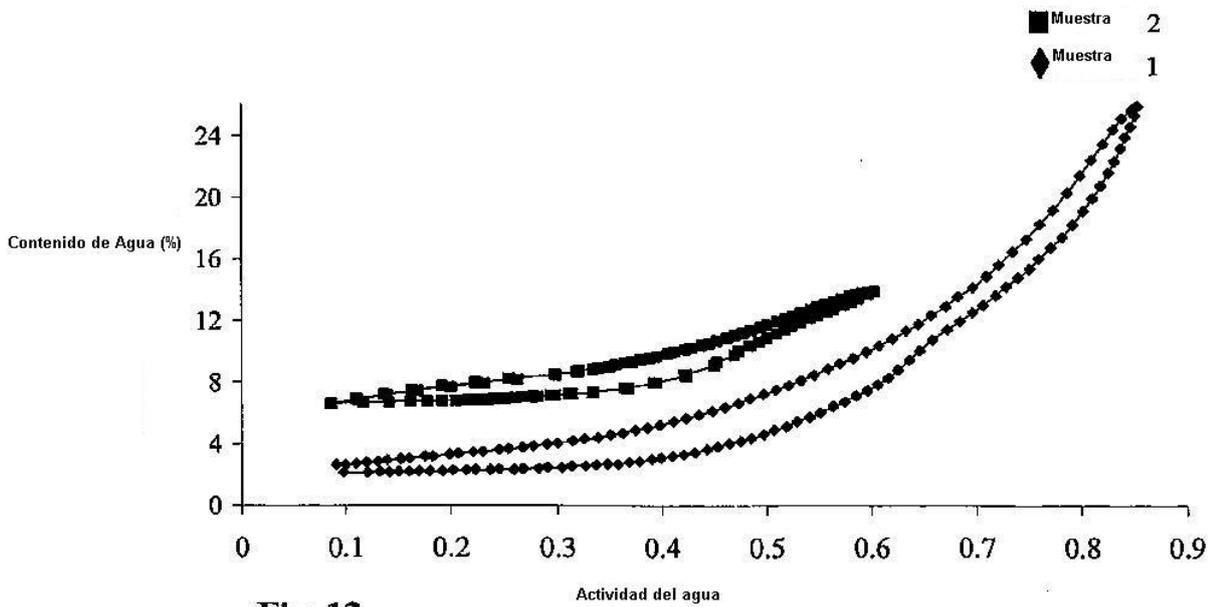


Fig. 12