

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 516**

51 Int. Cl.:

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2011 E 11706629 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2528631**

54 Título: **Método para un sellado con fibrina mejorado**

30 Prioridad:

28.01.2010 US 299127 P

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

27.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ILAN, EREZ;
NUR, ISRAEL y
REGEV, KFIR**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 513 516 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**Método para un sellado con fibrina mejorado****Campo de la invención**

5 La invención se refiere a una matriz de fibrina con propiedades de sellado mejoradas, su preparación y uso.

Antecedentes de la invención

10 El sellador de fibrina es típicamente un producto de sangre obtenido de fuentes comerciales o de algunos centros regionales de transfusión de sangre. Los componentes que comúnmente se usan en la preparación de selladores de fibrina son predominantemente fibrinógeno complementado con varias cantidades de Factor VIII, Factor XIII, fibronectina, vitronectina y Factor de von Willebrand (FvW). El componente de fibrinógeno se activa típicamente por la última proteasa de la cascada de coagulación-trombina.

15 El sellador de fibrina está formado por una reacción enzimática que incluyen, entre otros, fibrinógeno, trombina y Factor XIII. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina mediante reacción enzimática a una velocidad determinada por la concentración de trombina. El factor XIII, está típicamente presente en el componente fibrinógeno del sellador y es una enzima del sistema de coagulación de sangre que entrecruza y estabiliza el coágulo de fibrina. Este proceso evita la mayoría de las etapas de la coagulación normal e imita su última fase. Algunos fabricantes añaden agentes anti-proteolíticos a la formulación de sellador de fibrina (como se describe en WO 93/05822) o específicamente eliminan el plasminógeno con el fin de parar o retrasar la fibrinólisis (como se describe en US 5.792.835 y US 7.125.569).

25 La patente de Estados Unidos N° 4.427.650 desvela un tejido adhesivo que puede aplicarse en forma de mezcla granulada y seca inmediatamente y directamente a la herida o en el área de la operación. El adhesivo consiste en constituyentes sólidos, granulados y biológicamente activos y contiene de 60 a 96% por peso de fibrinógeno, que se libera en gran parte de globulina crio-insoluble, de 0,05 a 5% por peso de inhibidor de fibrinólisis, y de 0,1 a 15% por peso de trombina y/o protrombina.

30 La patente de Estados Unidos N° 5.962.405 desvela una preparación de fibrinógeno liofilizado para preparar una solución de fibrinógeno para su uso como un adhesivo de tejido. La preparación de fibrinógeno contiene una sustancia que mejora la solubilidad.

35 Durante un periodo de tiempo se ha conocido que el sellador de fibrina puede aplicarse a heridas, tales como heridas abiertas de una persona, para cerrar la herida, parar el sangrado y prevenir otras sustancias, tales como agentes infecciosos, entren en la herida.

40 Se ha descrito el efecto del sellador de fibrina en los defectos de sellado en tejidos que están bajo constante movimiento, por ejemplo, tejido gastrointestinal y tejido del pulmón. Sin embargo, existe discrepancia en estos informes.

45 Una técnica descrita para minimizar los defectos post-operativos tales como fugas en la línea de grapas o sutura (grapas/sutura) después de extirpación gastrointestinal e el uso de refuerzos en el línea de grapas/sutura. Los diferentes productos de refuerzo para la línea de grapas/sutura están disponibles en el mercado. Por ejemplo, los médicos han probado productos de refuerzo para la línea de grapas/sutura no absorbibles o semi-absorbibles tales como Seamguard[®], Peristrips Dry[®] y Surgisis[®]. Sin embargo, en estudios experimentales y clínicos tempranos, el material de refuerzo absorbible para la línea de grapas parece tener considerables inconvenientes en comparación con el material de refuerzo no absorbible o semi-absorbible para la línea de grapas (Yo et al., "Refuerzo de la línea de grapas en anastomosis intestinal: resumen de nueva tecnología diseñada para reducir complicaciones perioperativas". Dig Surg. 2006; 23:283-291). Los informes recientes que usan fibrina como refuerzo absorbible para la línea de grapas para la prevención de fugas gastrointestinales después de la operación (Fullum et al., "Disminución de fugas anastomóticas y en la línea de grapas después de baipás gástrico laparoscopia en Y de Roux-". Surg Endos. 2009; 23:1403-1408; Efthimiou et al. "Sellador de fibrina asociado con una mayor temperatura corporal y leucocitos después de baipás gástrico laparoscópico". Surg Obes Relat Dis. 2009 Mar 17) sugieren que la formulaciones actuales de sellador de fibrina no son adecuadas para el refuerzo de línea de grapas/sutura.

55 La patente de Estados Unidos N° 5.690.675 desvela el cierre de heridas en tejido de pulmón mediante un método de dos etapas que esencialmente consiste en aplicar cierres (por ejemplo, grapas, clips, broches, ganchos) a una región adyacente a la herida, donde los cierres pueden causar penetraciones. Los cierres están presentes en una capa pre-formada de colágeno, fibrina, fibrinógeno, elastina, albúmina o una combinación de las mismas, y se aplica energía a una región para fusionar el material al tejido y sellar perforaciones en el tejido.

60 La patente de Estados Unidos N° 5.883.078 desvela un adhesivo estable de tejido que comprende fibrinógeno y un activador o pro-activador de protrombina. El adhesivo puede estar presente como una preparación líquida o seca. En una realización, un adhesivo de tejido adherente sólido de 2 caras está hecho aplicando el adhesivo seco en forma sólida a una superficie de herida y la segunda superficie de herida (la segunda parte del

tejido) se adapta posteriormente y se presiona poco después. La preparación inmediatamente se disuelve por medio de la secreción de sangre y/o herida presente y posteriormente se solidifica con el comienzo de coagulación, por lo que se consigue el efecto adherente y hemostático. El adhesivo de tejido adherente sólido de 2 caras es especialmente adecuado para unir partes de tejido blando tales como hígado o bazo.

5 Lillmoe et al. [(2004) J Gastrointest Surg., Vol. 8, N° 7, páginas 766-774, un artículo de revista titulado “¿Disminuye el sellador pegamento de fibrina el índice de fístula pancreática después de pancreaticoduodenectomía? Resultados de un ensayo aleatorio prospectivo] mostró que la aplicación tópica de sellador pegamento de fibrina en la superficie de anastomosis pancreática no redujo la incidencia de fístula pancreática o complicaciones totales en pacientes después de pancreaticoduodenectomía y concluyó que parece que no existe beneficio en relación con el uso de esta sustancia en este marco.

15 Otro estudio (“El efecto de sellado de pegamento de fibrina contra fuga de aire alveolar evaluado después de 48 horas; comparación entre diferentes métodos de aplicación” Kawamura et al. (2005) Eur J of Cardiothorac Surg. 28(1):39-42) desvela el efecto de sellado de pegamento de fibrina contra fuga de aire alveolar en un modelo animal y evalúa los diferentes métodos de aplicación. Se usaron una solución A consistente en un concentrado de proteínas que comprendía fibrinógeno y una solución B que comprendía trombina. En el método de frotado y pulverización, la solución A se aplicó en gotas y se frotó suavemente en el área de la fuga de aire. Después ambas soluciones se pulverizaron simultáneamente como un aerosol mezclado. En otro método, se preparó una capa doble aplicando en gotas la solución A a la superficie de fuga de aire después de aplicar en gotas la solución B. En otro método, se usó una lana de colágeno cubierta con fibrinógeno seco y trombina sobre un lado (TachoComb) en modelos animales (perro) y se comprobaron después de 24 horas. De acuerdo con los autores, el efecto de sellado del pegamento de fibrina es relativamente inestable hasta 12 hora después de su aplicación. También, los autores concluyeron que el método de frotado y pulverización puede ayudar al sello de fibrina a alcanzar su fuerza completa más rápido en comparación con los otros dos métodos.

25 Otro estudio por Yo et al (2006) (Dig Surg 23: 283-291) desvela los esfuerzos para reducir las complicaciones anastomóticas como sangrado o fugas en la línea de grapas cuando se realizan extirpaciones gastrointestinales. Yo indicó que en modelos animales de anastomosis colónica de rata, la aplicación de pegamento de fibrina para sellar y prevenir fugas parece no ser una técnica viable. Se desvela que en extirpación gástrica, la aplicación de pegamento de fibrina para sujetar y sellar la línea de grapas pareció más eficaz.

30 La patente de Estados Unidos N° 7.196.054 desvela un método para tratar tejido herido en un paciente, que comprende aplicar al tejido herido una composición en forma de un polvo seco que comprende fibrinógeno en una cantidad que forma una matriz de fibrina en presencia de trombina, Factor XIII, Ca^{2+} y una solución acuosa; proporcionando a la composición trombina, Factor XIII, Ca^{2+} y una solución acuosa en cantidades que forman una matriz de fibrina en presencia de fibrinógeno.

40 Fullum et al. (2009) desvela que las fugas anastomóticas y en líneas de grapas (ASL) ocurren después de baipás gástrico laparoscópico en Y de Roux (LRYGB) en pacientes obesos. El sellador de fibrina se colocó después junto con la línea gástrica de grapas. Los autores concluyeron que la técnica operativa, incluyendo el tamaño adecuado de grapa, el refuerzo de la línea de grapas, el cierre cosido a mano, las suturas de soporte, la prueba de fuga intraoperativa y los selladores de fibrina, fue instrumental en el descenso de incidencia de ASL después de LRYGB. Los autores fueron incapaces de determinar si uno cualquiera de los ingredientes fue el más crucial en la prevención de ASL.

50 Sin embargo, Efthimiou et al. 2009 desvela que el sellador de fibrina no tuvo efecto en el índice de fuga anastomótica o de grapas en LRYGB.

Hay una necesidad no cubierta de una formulación superior de sellador de fibrina para sellar los defectos en tejidos que están en constante movimiento, por ejemplo, tejido gastrointestinal y tejido de pulmón.

Resumen de la invención

55 El principal uso actual de selladores de fibrina es para hemostasia; esta acción puede mejorar mediante factores autólogos de coagulación, por ejemplo, fibrinógeno, presente en la sangre que cubre el área herida.

60 Otro uso del sellador de fibrina es el sellado de fugas de tejido tales como fugas de aire y/o líquidos, por ejemplo, fluidos urinarios, fluidos del intestino, seroma. Típicamente, en estas fugas de tejido están ausentes los factores autólogos de coagulación. La mayoría de selladores, incluyendo selladores sintéticos, no son eficientes en el sellado de fugas de tejidos. Sin estar ligado al mecanismo, el aire/líquido puede actuar como una barrera entre el sellado y el tejido y de este modo prevenir un contacto íntimo entre el sellado y el tejido.

65 Generalmente, los cirujanos secan con frecuencia el tejido herido con fugas lo máximo posible antes de la aplicación del sellador. Con frecuencia, el secado se realiza manualmente usando una esponja/gas y un pulverizador de gas (Hidas et al. “Cirugía con preservación de nefronas sin sutura: uso de adhesivo de tejido de glutaraldehído de

albúmina (BioGlue)". Urology, 2006; 67:697-700). Estos procesos de secado aumentan el riesgo de desarrollar adhesión de tejido (Kamel RM. "Prevención de adhesiones peritoneales post-operativas". Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010; 150(2):111-118).

5 Además, estos procedimientos de secado son también problemáticos en regiones que no son accesibles al cirujano, por ejemplo, cuando se realiza un proceso laparoscópico.

10 La presente invención proporciona una matriz de fibrina de acuerdo con las reivindicaciones que es eficiente en el sellado de fugas de tejido.

15 En un aspecto, la invención proporciona un método para aplicar matriz de fibrina a un tejido húmedo que comprende: aplicar una cantidad efectiva de una mezcla sólida de sellador de fibrina en el tejido húmedo; y aplicar sobre al menos una parte de mezcla sólida de sellador de fibrina una cantidad efectiva de formulación líquida de sellador de fibrina, donde las cantidades efectivas para mezcla sólida de sellador de fibrina y formulación líquida de sellador de fibrina son suficientes para producir una matriz de fibrina en el tejido húmedo que tiene una fuerza mejorada de sellado en relación con la aplicación de una cantidad efectiva de la formulación líquida de sellador de fibrina o la mezcla sólida de sellador de fibrina.

20 En una realización de la presente invención, la fuerza de sellado es al menos 1,2 veces mejor en relación con la aplicación de la formulación líquida de sellador de fibrina.

En otra realización de la presente invención, la fuerza de sellado es al menos 1,7 veces mejor en relación con la aplicación de la formulación líquida de sellador de fibrina.

25 En otra realización más de la presente invención, la aplicación es sobre un tejido que no está enriquecido, tiene pequeña cantidad, está privado o carece de vasos sanguíneos y/o tejidos que rezuman o no sangran.

30 En una realización de la presente invención, la mezcla sólida de sellador de fibrina comprende un componente sólido consistente en fibrinógeno y un componente sólido consistente en un componente de enzima proteolítico que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno.

35 En otra realización más de la invención, el fibrinógeno que comprende el componente de la mezcla sólida de sellador de fibrina se prepara mediante una etapa de secado de fibrinógeno que contiene solución que tiene una concentración de fibrinógeno de menos de 25 mg/ml.

En una realización de la invención, la concentración de fibrinógeno es aproximadamente 20 mg/ml.

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

40 En otra realización adicional de la invención, la aplicación es sobre un defecto del tejido.

Aún en otra realización más de la invención, la aplicación es sobre al menos una parte de un línea de grapas o sutura presente en el tejido.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar una matriz de fibrina sobre una superficie húmeda que comprende las etapas de: proporcionar un componente sólido que comprende fibrinógeno; proporcionar un componente sólido que comprende una enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno; proporcionar una formulación líquida de sellador de fibrina; aplicar una cantidad efectiva de los componentes sólidos sobre al menos una parte de la superficie húmeda; y aplicar sobre al menos una parte de los componentes sólidos aplicados una cantidad efectiva de la formulación líquida de sellador de fibrina.

50 En una realización de la invención, la superficie húmeda está libre de fibrinógeno.

55 En otra realización de la invención, la formulación líquida de sellador de fibrina se proporciona en forma sólida y se reconstituye antes de su aplicación.

En otra realización más de la invención, la formulación líquida de sellador de fibrina se proporciona en forma congelada y se descongela antes de su aplicación.

60 Aún en otra realización de la invención, el componente sólido se proporciona en forma líquida y se seca antes de su aplicación.

Aun en otra realización de la invención, el componente sólido se proporciona en forma congelada y se seca antes de su aplicación.

65 Aún en otra realización más de la invención, los componentes sólidos se aplican simultáneamente o uno

después del otro.

5 En otra realización más de la presente invención, los componentes líquidos se aplican simultáneamente o no después del otro.

En otra realización más de la presente invención, los componentes sólidos se proporcionan en una mezcla.

En otra realización de la presente invención, la superficie es un tejido.

10 En una realización de la presente invención, el tejido no está enriquecido, tiene pequeña cantidad, está privado o carece de vasos sanguíneos y/o tejidos que rezuman o no sangran.

En otro aspecto la invención se refiere a una matriz de fibrina obtenible de acuerdo con la invención.

15 Aún en otro aspecto la invención proporciona un método para tratar o prevenir un defecto en un tejido húmedo de un sujeto que lo necesite que comprende las etapas de:

a) proporcionar un componente que comprende fibrinógeno sólido, proporcionar un componente que comprende una enzima proteolítica sólida que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno; y proporcionar una formulación líquida de sellador de fibrina;

20 b) aplicar una cantidad efectiva de los componentes sólidos de a) sobre al menos una parte del tejido húmedo; y

c) aplicar sobre al menos una parte de los componentes sólidos aplicados una cantidad efectiva de la formulación líquida de sellador de fibrina de a).

25 En una realización de la presente invención, el tejido húmedo no está enriquecido, tiene pequeña cantidad, está privado o carece de vasos sanguíneos y/o tejidos que rezuman o no sangran.

En otra realización de la presente invención, el defecto es una fuga en el tejido.

30 En otra realización más de la presente invención, la sustancia que fuga no está enriquecida, tiene pequeña cantidad, está privada o carece de plasma o componentes sanguíneos.

En una realización de la presente invención, la formulación líquida de sellador de fibrina se proporciona en forma sólida y se reconstituye antes de su aplicación.

35 En otra realización más de la invención, la formulación líquida de sellador de fibrina se proporciona en forma congelada y se descongela antes de su aplicación.

En una realización de la invención, el componente sólido se proporciona en forma líquida y se seca antes de su aplicación.

40 Aún en otra realización de la invención, el componente sólido se proporciona en forma congelada y se seca antes de su aplicación.

45 Aún en otra realización más de la invención, los componentes sólidos se aplican simultáneamente o uno después del otro.

En una realización de la invención, los componentes líquidos se aplican simultáneamente o no después del otro.

50 En otra realización de la invención, los componentes sólidos de a) se proporcionan en una mezcla.

En otra realización más de la invención, el defecto es una grapa o una sutura.

55 En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende: (i) recipiente(s) que comprende(n) componentes sólidos que comprenden (a) – componente de fibrinógeno y (b) – un componente de enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno, donde los componentes (a) y (b) están en recipientes separados o en el mismo recipiente como una mezcla; y (ii) al menos dos recipientes separados, el al menos un recipiente separado comprende un componente de fibrinógeno líquido, congelado o sólido, y el al menos el segundo recipiente separado comprende un componente de enzima proteolítica líquido, congelado o sólido que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno, donde cuando los al menos dos recipientes separados de

60 (ii) comprenden componentes sólidos, entonces los componentes (a) y (b) están en el mismo recipiente como una mezcla.

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

En otra realización de la presente invención, el kit se usa para aplicarse sobre una superficie húmeda.

En otro aspecto más de la presente invención, el kit se usa para sellar fugas en tejidos que no están enriquecidos, tienen pequeña cantidad, y están privados o carecen de vasos sanguíneos y/o tejidos que rezuman o no sangran.

5 La matriz de fibrina o el kit de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar o prevenir un defecto en un tejido húmedo.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra la fuerza necesaria para separar dos capas de tejido del íleon intestinal (fuerza para despegarse) que están unidas usando dos formulaciones diferentes de sellador de fibrina: una mezcla de fibrinógeno y trombina liofilizados contra una formulación líquida de sellador de fibrina de dos componentes.

15 La Figura 2 muestra la fuerza de sellado (medida mediante el ensayo de rotura) de una mezcla de fibrinógeno y trombina liofilizados, una formulación líquida de sellador de fibrina de dos componentes y una matriz de fibrina formada por una aplicación secuencial de fibrinógeno y trombina liofilizados y un componente líquido de sellador de fibrina.

20 La Figura 3 muestra la fuerza de sellado (mediada por el ensayo de rotura) de una fibrina formada por la aplicación de trombina liofilizada seguida de pulverización de un sellador líquido de fibrina; una fibrina formada por la aplicación de fibrinógeno liofilizado seguida de pulverización de un sellador líquido de fibrina; una fibrina formada por la aplicación de una mezcla de fibrinógeno y trombina liofilizados seguida de pulverización de un sellador líquido de fibrina; y una formulación de fibrina formada por la aplicación de polvo de albúmina seguida de pulverización de un sellador líquido de fibrina.

25

Descripción detallada de realizaciones de la invención

30 La invención se refiere a un método para aplicar matriz de fibrina a una mucosa u otro tejido húmedo, el método comprende la aplicación secuencial de una mezcla sólida de sellador de fibrina sobre la superficie del tejido seguida de aplicación de una formulación líquida de sellador de fibrina sobre al menos una parte de la superficie. La invención también se refiere al sellado efectivo de un defecto en una mucosa u otro tejido húmedo por la aplicación secuencial de primero una mezcla sólida de sellador de fibrina seguida de una formulación líquida de sellador de fibrina.

35 La invención se basa en los siguientes hallazgos:

40 La fuerza adhesiva (o fuerza para despegarse) de las diferentes formulaciones de fibrina testadas se evaluó mediante la prueba para despegarse. La prueba mide la fuerza de unión de pegamento de fibrina entre capas de sub-mucosa de intestino delgado porcino. En una realización, la formulación adhesiva testada se aplicó en el lado de serosa de un íleon de cerdo. Después de la aplicación de la formulación de sellador de fibrina testada el tejido del íleon se dobla sobre sí mismo (serosa con serosa) y se dejó que la formulación de sellador de fibrina polimerizase. La fuerza necesaria para separar las dos capas de tejido de íleon adheridas (fuerza para despegarse) se midió usando una máquina de ensayo de tensión universal - Lloyd Instruments LFPLUS. Típicamente, cuando mayor es la fuerza medida para despegarse, mayor será la fuerza adhesiva de la formulación testada. De acuerdo con la

45 presente invención se descubrió que la fuerza adhesiva mejora significativamente cuando se usa una formulación liofilizada de sellador de fibrina en comparación con usar una formulación líquida de sellador de fibrina. Se descubrió que la fuerza adhesiva de la formulación liofilizada de sellador de fibrina fue aproximadamente 2,7 veces más alta en comparación con la fuerza adhesiva de la formulación líquida de sellador de fibrina.

50 Las propiedades de sellado de las diferentes formulaciones de fibrina se midieron con el ensayo de rotura. El ensayo de rotura puede determinar y evaluar la habilidad de un sellador para prevenir fugas. En resumen, una tubería de aluminio que está conectado a una fuente de agua y contiene agujeros se introduce en un segmento tubular de íleon de cerdo y el segmento tubular se sella y se refuerza en ambos extremos de la tubería. Después de dejar que el agua fluya a la tubería de aluminio, el agua entra en el vacío entre el íleon y la tubería de aluminio a través de los agujeros de manera que se prevenga el flujo hacia atrás del agua a la tubería de aluminio. Antes de dejar que el agua fluya, se forma una incisión de 10 mm perpendicular a la longitud del intestino y la incisión primero se sutura en su línea central y después se aplica la formulación testada de sellador de fibrina sobre el área de

55 incisión a través de una estructura plantilla para film de 6 cm² que se coloca alrededor del área de incisión. Después de la aplicación de la formulación testada, se deja curar (o polimerizar) la fibrina durante 10 minutos y el intestino se llena con agua para evaluar su habilidad para soportar presión. Una vez que el agua fluye al vacío entre el íleon y la tubería la presión de agua asciende hasta que el sellado de la incisión se abre y se observa una caída aguda en la presión. El nivel de presión se controla usando un medidor de presión (D-logmate 590 MRC Israel) que está conectado a la línea de flujo líquido. La presión observada antes de la gota se registra y se considera como la presión de rotura. Típicamente, una presión de rotura observada más alta indica una mayor propiedad de sellado de

60 la formulación testada.

65

De acuerdo con la invención, también se descubrió que el sellador liofilizado de fibrina, que había demostrado tener mejores fuerzas adhesivas que el sellador líquido de fibrina, no era efectiva en el sellado. Sin embargo, la formulación líquida de sellador de fibrina tuvo un mejor efecto de sellado que el sellador liofilizado de fibrina.

5 Sorprendentemente también se descubrió que una aplicación secuencial de un sellador liofilizado de fibrina y una formulación líquida de sellador de fibrina demostró un aumento sinérgico en la propiedad de sellado. Se observó un aumento de aproximadamente 1,7 veces en la fuerza de sellado en comparación con la fuerza de sellado de la formulación líquida de sellador de fibrina. Sin embargo, no se encontró un aumento sinérgico en las propiedades de sellado usando la aplicación secuencial de fibrinógeno liofilizado o trombina liofilizada seguido de la administración de una formulación líquida de sellador de fibrina.

10 También, se descubrió que el secado de la capa mucosa antes de la aplicación de la formulación líquida de sellador de fibrina (por ejemplo, aplicando un polvo de proteína tal como polvo de albúmina a la capa mucosa) no aumentó la actuación de sellado de la formulación líquida de sellador de fibrina.

15 Estos hallazgos animaron al desarrollo de un método mejorado para producir una matriz de fibrina con una mayor fuerza de sellado sobre una mucosa u otro tejido húmedo. La matriz de fibrina generada de acuerdo con la invención puede usarse para sellar defectos en la mucosa u otro tejido húmedo, por ejemplo, en tejidos que están en constante movimiento, por ejemplo tejido gastrointestinal y tejido de pulmón.

20 El término “tejido” se refiere a una asociación de células y/o componentes celulares unidos en realizar una función particular. Las células en el tejido pueden ser todas de un tipo o de más de un tipo. El tejido puede ser un tejido artificial en el que crecen células para funcionar de una manera similar como un tejido en un organismo vivo. El tejido puede ser un tejido de cuerpo humano o un tejido de animal.

25 Los términos “matriz de fibrina” se refieren a la fibrina obtenida mediante la aplicación secuencial de la mezcla sólida de sellador de fibrina y la formulación líquida de sellador de fibrina.

30 Los términos “cantidad efectiva de una mezcla sólida de sellador de fibrina” se refieren a una cantidad de un componente sólido que comprende fibrinógeno y una cantidad de un componente sólido que comprende una enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno que después de la hidratación en un tejido húmedo forma un coágulo de fibrina.

35 Los términos “cantidad efectiva de una formación líquida de sellador de fibrina” se refieren a una cantidad de un componente líquido que comprende fibrinógeno y una cantidad de un componente líquido que comprende una enzima proteolítica (que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno) que permite la formación de coágulo de fibrina después de mezclar los componente líquidos.

40 Sin estar ligado al mecanismo, parece que la mezcla sólida de sellador se hidrata una vez se aplica al tejido húmedo. La mezcla sólida hidratada de sellador prepara al tejido al solidificar el líquido presente en el tejido húmedo y forman una capa de fibrina muy próxima al tejido. La formulación líquida de sellador de fibrina se aplica después sobre el tejido preparado dando como resultado posteriormente una mejor fuerza de sellado y durabilidad.

45 Ventajosamente, al solidificar la humedad sobre la superficie sin la necesidad de una esponja o una gasa puede descender el riesgo de formación de adhesión post-operativa.

50 El término “adhesión” se refiere a la unión anormal entre tejidos y/u órganos. Típicamente, las adhesiones ocurren después de procesos quirúrgicos como después de una manipulación brusca de tejidos; después del secado de superficie de tejidos; y/o debido a la presencia de cuerpos extraños reactivos (por ejemplo, materiales de sutura, polvo talco o residuos de hilas) en el área operada.

55 Los términos “mucosa” o “tejido de mucosa” se refieren a un tejido húmedo que cubre algunos órganos y cavidades corporales. Típicamente, el tejido de mucosa secreta el material de mucosa. Ejemplo de tejidos de mucosa incluyen, aunque no se limitan a, mucosa oral, por ejemplo, bucal o sublingual; mucosa nasal; mucosa ocular; mucosa genital; mucosa rectal; mucosa auricular; mucosa pulmonar; mucosa bronquial; mucosa gástrica; mucosa intestinal; mucosa olfatoria; mucosa uterina; y mucosa esofágica. El término “mucosa” se refiere a un material mojado/húmedo y viscoso como una sustancia rica en mucinas, albúmina de glicoproteína y/u otro componente que contribuya a su viscosidad.

60 Los términos “otro tejido húmedo” se refieren a un tejido mojado. El tejido puede estar mojado por fluidos corporales tales como suero, infiltrado de suero, sangre y fluidos de inflamación y/o de otros fluidos/líquidos tales como solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En una realización de la invención, el fluido no contiene factores de coagulación (por ejemplo, no contiene fibrinógeno).

65 Como aquí se usa, el término “defecto” se refiere a una rasgadura, abertura, perforación, fisura, pinchazo,

agujero, raja, grieta, hendidura, hueco, fractura o ruptura, fuga, por ejemplo en un tejido. Por ejemplo, el defecto puede formarse después de un procedimiento de anastomosis. El defecto puede ser congénito, por ejemplo, hernia; una condición resultante de una patología relacionada con el cuerpo, por ejemplo, seroma, hernia, infección, inflamación; formada después de cirugía, sutura y/o grapas; o una condición resultante de un factor no corporal, por ejemplo, accidentes, lesiones.

El término “fuga” se refiere al escape o paso de una sustancia, por ejemplo, fluidos, material viscoso y/o aire, por ejemplo, a través de una rasgadura, abertura, perforación, fisura, pinchazo, agujero, raja, grieta, hendidura, hueco, fractura o ruptura de un tejido.

El término “anastomosis” típicamente se refiere a un procedimiento quirúrgico que se usa para reconectar dos o más secciones de un órgano o tejido. El procedimiento puede usarse después de seccionar el tracto urinario (uretra), garganta (esófago) o en cirugía intestinal. El procedimiento también puede usarse después de la extirpación de un tejido enfermo (tal como un tejido inflamado, canceroso o patológico de otra manera, por ejemplo, enfermedad ulcerosa).

La invención también se refiere a un kit que comprende: (i) recipiente(s) que comprende(n) componentes sólidos que comprenden (a) – componente de fibrinógeno y (b) – un componente de enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno, donde los componentes (a) y (b) están en recipientes separados o en el mismo recipiente como una mezcla; y (ii) al menos dos recipientes separados, el al menos un recipiente separado comprende un componente de fibrinógeno líquido, congelado o sólido, y el al menos el segundo recipiente separado comprende un componente de enzima proteolítica líquido, congelado o sólido que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno.

Los componentes (a) y (b) del elemento (i) pueden estar en recipientes separados o en el mismo recipiente como una mezcla. En una realización, cuando los al menos dos recipientes separados de (ii) comprenden componentes sólidos, entonces los componentes (a) y (b) están el mismo recipiente como una mezcla. En otra realización, cuando los al menos dos recipientes separados de (ii) comprenden componentes sólidos, se incluye el al menos un recipiente que comprende una solución acuosa para su hidratación.

A diferencia de los kits comerciales de fibrina que están especialmente previstos para hemostasia, el kit de la invención es también adecuado para sellar fugas en tejidos que no están enriquecidos, tienen pequeñas cantidades y están desprovistos o carecen de vasos sanguíneos. Ejemplos no limitativos de tejidos que no están enriquecidos, tienen pequeñas cantidades o están desprovistos o carecen de vasos sanguíneos son duramadre, vejiga, ojos, pulmones y vesícula biliar.

En una realización de la invención, el kit es para sellar fugas en tejidos que no están enriquecidos, tienen pequeñas cantidades y están desprovistos o carecen de vasos sanguíneos.

El término “hemostasia” se refiere a la habilidad de un agente para parar el sangrado de un vaso sanguíneo dañado y/o para contribuir a mantener la sangre contenida en el vaso sanguíneo.

También, a diferencia de los kits comerciales de fibrina que están especialmente previstos para parar el sangrado de un vaso sanguíneo dañado y/o para contribuir a mantener la sangre contenida en el vaso sanguíneo, el kit de la invención es también adecuado para sellar fugas de sustancias sin sangre o plasma, por ejemplo, fluido cerebroespinal (FCE), aire, contenido intestinal, bilis, fluido linfático y humor vítreo.

En una realización, la matriz de fibrina o el kit de la invención son para sellar fugas en tejidos que rezuman o no sangran. El término rezumar se refiere por ejemplo a un sangrado menor. El término rezumar incluye casos de sangrado donde se pierde un volumen relativamente bajo de sangre a una velocidad relativamente lenta.

El kit también contiene instrucciones para su uso. El kit puede también comprender medios para cortar y/o grapar o suturar un tejido o un órgano tales como dispositivos mecánicos o manuales de corte o grapado. El recipiente puede ser un vial, una jeringa pre-rellenada, una botella pequeña, un tubo o cualquier otro recipiente que contenga los componentes sólidos o líquidos. El recipiente puede tener diferentes tamaños y contener diferentes volúmenes/pesos de la composición, por ejemplo, cada componente líquido puede tener un volumen igual o inferior a aproximadamente 10 ml, y cada componente sólido puede tener un peso de polvo igual o inferior a aproximadamente 3 g. Opcionalmente, el kit también puede incluir un aplicador para la administración de los componentes sólidos y líquidos.

La matriz de fibrina o kit de acuerdo con la invención pueden usarse para cualquier fin terapéutico. Los términos “cualquier fin terapéutico” se refieren a cualquier tratamiento curativo o preventivo en un sujeto. Ejemplos de fines terapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, sellar un agujero perforado en un tejido u órgano, por ejemplo, un hueso; anastomosis en vasos sanguíneos; unir partes de tejido, por ejemplo, partes de tejido blando; tratar o prevenir defectos de la duramadre; por ejemplo, rasgaduras y fugas después de inyecciones en la duramadre, fisuras o rajaduras; tratar o prevenir sangrado; tratar o prevenir fugas de aire tales como después de

5 extirpación pulmonar; tratar o prevenir defectos después de perforación intestinal; tratar o prevenir defectos después de procedimiento de anastomosis realizado en cualquier tejido, por ejemplo, uterino, esófago, estómago, páncreas, conducto pancreático, vesícula biliar, conducto biliar, intestinal (incluyendo el intestino delgado y el intestino grueso), y recto; tratar o prevenir fugas post-operativas en cualquier tejido, por ejemplo, uterino, esófago, estómago, páncreas, conducto pancreático, vesícula biliar, conducto biliar, intestinal (incluyendo el intestino delgado y el intestino grueso), y recto; prevenir o disminuir la ocurrencia de fugas post-operativas en la línea de grapas o sutura, por ejemplo, aplicando la matriz de fibrina de acuerdo con la invención en al menos una parte de un defecto tal como una línea de grapas/sutura; para fijar prótesis fuertemente, por ejemplo, durante una operación de hernia; para refuerzo de línea de grapas/sutura; para prevenir o disminuir fuga de aire alveolar; tratar o prevenir defectos renales; 10 tratar o prevenir fístulas; tratar o prevenir defectos del corazón, por ejemplo, penetrando en heridas del corazón; reforzar una prótesis de injerto vascular; y tratar o prevenir fuga de fluido cerebrospinal.

15 En una realización de la invención, el uso terapéutico es para sellar fugas en tejidos que no están enriquecidos con vasos sanguíneos o carecen de vasos sanguíneos.

En otra realización de la invención, el uso terapéutico es para el refuerzo de la línea de grapas/sutura.

La matriz de fibrina de la invención puede usarse para sellar defectos sin la necesidad de grapas o suturas.

20 Los términos “grapa o sutura” incluyen cualquier cierre que pueda usarse para cerrar una herida, tal como, pero sin limitarse a, grapa, clip, broche, gancho, sutura o similares.

25 Los términos “al menos una parte de un defecto”, como aquí se usa, se refiere a un área que es más pequeña, igual o más grande que el defecto. Por ejemplo, el área puede ser 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% incluyendo cualquier rango entre los porcentajes desvelados, del defecto o más grande. En una realización de la invención, la matriz de fibrina o kit de acuerdo con la invención se usa para refuerzo de línea de grapas/sutura. Por ejemplo, primero se sutura o grapa una incisión de 10 mm formada en un sujeto durante una operación quirúrgica. Para el refuerzo se aplica una mezcla sólida de sellador de fibrina de 100 mg (1000 UI trombina por 70 mg fibrinógeno) en la línea de grapas/sutura seguido de pulverización de un formulación líquida de sellador de fibrina. La fibrina líquida se aplica en un volumen total de 2 ml (proporción 1:1 entre los dos componentes) de 1000 UI/ml trombina y 70 mg/ml fibrinógeno. 30

35 El término “sujeto” como aquí se usa incluye animales de origen mamífero, incluyendo humanos. En una realización, el sujeto es un paciente.

40 En un aspecto, la invención proporciona un método para aplicar matriz de fibrina a tejido húmedo. El método comprende las siguientes etapas: aplicar una cantidad efectiva de una mezcla sólida de sellador de fibrina en el tejido húmedo; y aplicar sobre al menos una parte de la mezcla sólida de sellador de fibrina una cantidad efectiva de una formulación líquida de sellador de fibrina, donde las cantidades efectivas de mezcla sólida de sellador de fibrina y formulación líquida de sellador de fibrina son suficientes para producir una matriz de fibrina en el tejido húmedo que tiene una mejor fuerza de sellado en relación con la aplicación de una cantidad efectiva de la formulación líquida de sellador de fibrina o la mezcla sólida de sellador de fibrina. Ventajosamente, la aplicación del sellador sólido de fibrina antes del sellador líquido de fibrina mejora la fuerza de sellado del sellador líquido de fibrina. 45

50 Los términos “tejido húmedo” se refieren a un tejido mojado e incluye por ejemplo, mucosa, tejido de mucosa, y otros tejidos húmedo. En una realización de la invención, el tejido está húmedo por un fluido que está libre de fibrinógenos. Los términos “libre de fibrinógeno” se refieren, por ejemplo, a una concentración de fibrinógenos inferior a 1,5 g/L.

55 Los términos “sobre al menos una parte de la mezcla sólida de sellador de fibrina”, como aquí se usan, se refieren a un área que varía de un área de superficie más pequeña a un área de superficie más grande en comparación con el área donde se aplicaron los componentes sólidos de sellador de fibrina. Por ejemplo, el sellador líquido de fibrina puede aplicarse a 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, incluyendo cualquier rango entre los porcentajes desvelados, del área de superficie donde se aplicaron los componentes sólidos de sellador de fibrina. Alternativamente, la formulación líquida de sellador de fibrina puede aplicarse a un área más grande de superficie que el área donde se aplicaron los componentes sólidos, por ejemplo, el tejido u órgano húmedo entero.

60 Los términos “formulación líquida de sellador de fibrina” se refieren, para fines de esta solicitud, a al menos dos componentes líquidos separados necesarios para la formación del sellador de fibrina. El al menos un componente separado comprende fibrinógeno, y el al menos segundo componente separado comprende una enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno (o una formulación que contiene fibrinógeno). Cuando los al menos dos componentes separados se administran, por ejemplo se inyectan, al sitio objetivo, los componentes líquidos se ponen en contacto, imitando las etapas finales del proceso de cascada de coagulación de sangre, con el fin de formar el coágulo o fibrina bien conocida. 65

Los términos “tejido blando” típicamente se refieren a estructuras del cuerpo que conectan, sujetan, envuelven y/o rodean otras estructuras u órganos. El tejido blando puede ser un tejido conectivo o un tejido no conectivo. Ejemplos de tejido blando incluyen, aunque no se limitan a, tendones, ligamentos, tejidos fibrosos, membrana sinovial, fascia, músculos, pared muscular, nervios, intestino, tejido graso, hígado, piel, bazo y vasos sanguíneos.

Los términos “mezcla sólida de sellador de fibrina” se refieren, para fines de esta solicitud, a una composición sólida que comprende los precursores para la formación de un sellador de fibrina. La composición comprende una enzima proteolítica sólida que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno (o una formulación que contiene fibrinógeno) y fibrinógeno sólido. La mezcla sólida también puede comprender otros componentes tales como albúmina. La enzima proteolítica puede ser trombina y/o una sustancia obtenible de veneno de serpiente. En una realización de la invención, la composición sólida comprende un fibrinógeno y componentes de trombina en su forma liofilizada. En otra realización, las soluciones que contienen trombina y fibrinógeno se secan por separado, por ejemplo, mediante liofilización para producir sus respectivos componentes sólidos en la mezcla total sólida de sellador de fibrina. En otra realización de la invención, los materiales sólidos resultantes se trituran en polvos usando un molino superfino o un molino con cuchilla enfriada o manualmente pasando el material sólido a través de un tamiz, por ejemplo, usando una espátula. En una realización de la invención, el material se tritura con una espátula a través de un tamiz de 200 µm. En otra realización de la invención, los materiales sólidos se trituran en polvos usando un método como el descrito en WO 2008/053475, que aquí se incorpora como referencia.

El tamaño de partícula del material sólido después del triturado puede ser inferior a 1000 µm. En una realización de la invención, el tamaño de partícula del material sólido después del triturado es igual a o inferior a 200 µm. La distribución del tamaño de partícula puede estar en el rango de 10 a 100 µm o en el rango de 10 a 60 µm. La enzima proteolítica sólida y el fibrinógeno sólido pueden proporcionarse juntos. También es posible que los precursores sólidos se proporcionen por separado y se apliquen simultáneamente o uno después de otro en la superficie deseada. En una realización de la invención, la enzima proteolítica sólida y el fibrinógeno sólido se proporcionan como una mezcla.

La invención también proporciona un método para preparar una matriz de fibrina sobre una superficie mojada. El método comprende las etapas de: proporcionar un componente sólido que comprende fibrinógeno; proporcionar un componente sólido que comprende una enzima proteolítica que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno; proporcionar una formulación líquida de sellador de fibrina; aplicar una cantidad efectiva de los componentes sólidos en al menos una parte de la superficie mojada; aplicar sobre al menos una parte de los componentes sólidos una cantidad efectiva de la formulación líquida de sellador de fibrina.

Los términos “superficie mojada” se refieren a una superficie húmeda. La superficie puede ser una mucosa, tejido de mucosa y/o otro tejido húmedo. La superficie puede estar mojada por fluidos corporales tales como infiltrado de suero, sangre y fluidos de inflamación y/o fluidos no corporales tal como PBS.

La superficie húmeda puede ser una superficie de una parte del cuerpo de un paciente, por ejemplo, cualquier tejido que contiene líquidos o aire. El término “superficie” incluyen, aunque no se limita a, el área genital, incluyendo la uretra, vagina y ovarios; los pulmones; el ano; el bazo; el hígado; la duramadre; el renal; el esófago; el estómago; el páncreas; el conducto pancreático; la vesícula biliar; el conducto biliar; el intestino (incluyendo el intestino delgado y el intestino grueso); y el músculo cardíaco. La superficie puede ser un sitio que sangra o que no sangra. En una realización de la invención, la superficie es un sitio que no está sangrando. En otra realización de la invención, la superficie está mojada por un fluido que está libre del factor de coagulación (por ejemplo, libre de fibrinógeno). La superficie también puede ser cualquier superficie, por ejemplo, una superficie de trabajo, una superficie de un dispositivo prostético.

Los términos “al menos una parte de la superficie mojada”, como aquí se usan, se refieren a un área que es más pequeña, igual o más grande que la superficie mojada. Por ejemplo, el área puede ser 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, incluyendo cualquier rango entre los porcentajes desvelados, de la superficie o más grande.

Los términos “sobre al menos una parte de los componentes sólidos” se refieren a un área que varía de un área de superficie más pequeña a un área de superficie más grande en comparación con el área donde se aplicaron los componentes sólidos de sellador de fibrina. Por ejemplo, el sellador líquido de fibrina puede aplicarse a 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, incluyendo cualquier rango entre los porcentajes desvelados, del área de superficie donde se aplicaron los componentes sólidos de sellador de fibrina. Alternativamente, la formulación líquida de sellador de fibrina puede aplicarse a un área más grande de superficie que el área donde se aplicaron los componentes sólidos, por ejemplo, la superficie entera.

Los componentes sólidos en la mezcla sólida de fibrina reacciones una vez se han hidratado, por ejemplo, después del contacto con el tejido húmedo para formar un sellador de fibrina. Típicamente, las preparaciones de fibrinógeno tienen una solubilidad relativamente baja y el tejido mucoso muestra un contenido líquido relativamente bajo. Ventajosamente, el componente de fibrinógeno de la mezcla sólida de sellador de fibrina usada puede disolverse y/o hidratarse rápidamente después de su aplicación al tejido.

De acuerdo con la presente invención se descubrió que un fibrinógeno sólido preparado mediante una etapa de liofilización de una solución que contiene fibrinógeno con una concentración de fibrinógeno de 20 mg/ml se reconstituyó en una solución acuosa a temperatura ambiente en un periodo de tiempo inferior a 10 minutos. En una realización de la invención, el componente fibrinógeno de la mezcla sólida de sellador de fibrina se prepara a partir de una solución que contiene fibrinógeno con una concentración de fibrinógeno igual o inferior a 150 tal como igual a o inferior a 85,25 mg/ml o inferior a 20 mg/ml.

La mezcla sólida de sellador de fibrina puede prepararse secando una formulación líquida de sellador de fibrina. Puede usarse cualquier procedimiento de secado conocido en la técnica incluyendo, aunque sin limitarse a, procedimientos de liofilización (secado por congelación) o secado con pulverización. El secado puede realizarse en dos temperaturas diferentes usando varios equipos de secado, tales como cámara con humedad controlada, horno de secado, túnel de secado, secadora con vacío o en cualquier otro método adecuado que no afecte a la formación de coágulos.

El término "sólido", como se usa a lo largo de esta especificación, se refiere a una composición que comprende un contenido líquido inferior al 5% tal como inferior a 4, 3, 2, 1% o inferior por peso en base al peso total de la composición seca. El término "sólido" es intercambiable con el término "seco" o "polvo".

El sellador sólido de fibrina puede aplicarse al tejido mediante un dispensador. Ejemplos de dispensadores se muestran en la patente de Estados Unidos N° 1.776.489 y patente de Estados Unidos N° 7.455.248, que aquí se incorporan como referencia.

Los términos "fuerza mejorada de sellado" se refieren, por ejemplo, a una fuerza de sellado que es al menos 1,2 veces más alta en comparación con la fuerza de sellado obtenida por el sellador líquido solo. En una realización de la invención, la fuerza de sellado es aproximadamente 1,7 veces más alta en relación con la aplicación de la formulación líquida de sellador de fibrina. La fuerza de sellado puede medirse, por ejemplo, mediante el ensayo de rotura como se ha descrito anteriormente.

"Fuerza mejorada de sellado 1,2 veces más alta" se refiere a una fuerza de sellado que es 20% más alta que la fuerza de sellado conseguida mediante la aplicación de una formulación líquida de sellador de fibrina. "Fuerza mejorada de sellado 1,7 veces más alta" se refiere a una fuerza de sellado que es 70% más alta que la fuerza de sellado conseguida mediante la aplicación de una formulación líquida de sellador de fibrina

La enzima proteolítica puede ser trombina y/o una sustancia obtenible de veneno de serpientes. Los componentes líquidos pueden congelarse hasta su uso (por ejemplo, a una temperatura de -18 °C o más baja) o echarse, por ejemplo, mediante liofilización para un almacenamiento prolongado. Los componentes secados pueden reconstituirse mediante la adición de varios volúmenes de un transportador farmacéuticamente aceptable antes de su uso. Los términos "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier diluyente o un vehículo que sea adecuado para uso con humano u otro animal. El transportador puede seleccionarse de cualquiera de los transportadores conocidos en la técnica tales como, aunque sin limitarse, solución salina amortiguada con fosfato (PBS), solución de cloruro sódico, solución de cloruro cálcico, anillos lactados (AL), 5% dextrosa en solución salina normal y agua para inyección. El fibrinógeno liofilizado puede reconstituirse con agua estéril antes de su uso. La trombina liofilizada puede reconstituirse con solución de cloruro cálcico estéril o agua, tal como agua destilada, antes de su uso. El fibrinógeno y trombina liofilizados reconstituídos pueden usarse en la formulación líquida de sellador de fibrina, que después pueden combinarse para formar la fibrina. Los dos componentes pueden aplicarse en el sitio deseado simultáneamente o uno después del otro.

En una realización de la invención, el componente que comprende fibrinógeno está formado por un componente biológicamente activo (CBA) que es una solución de proteínas derivadas de plasma sanguíneo. Este componente puede además comprender ácido tranexámico y arginina o lisina o mezclas de arginina y lisina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

CBA puede derivarse de crioprecipitado, tal como crioprecipitado concentrado. El término "crioprecipitado" se refiere a un componente sanguíneo que se obtiene de plasma congelado preparado a partir de sangre total. Puede obtenerse un crioprecipitado cuando plasma congelado se descongela en frío, típicamente a una temperatura de 0-4 °C, dando como resultado la formulación de sobrenadante precipitado que contiene fibrinógeno y factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo, mediante centrifugación. Típicamente, CBA comprende Factor VIII, fibronectina, factor de von Willebrand (FvW), vitronectina, etc., por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.121.232 y la solicitud PCT publicada correspondiente WO 98/33533, cada una incorporada aquí como referencia.

CBA comprende estabilizadores tales como hidrocloreto de arginina. Típicamente, la cantidad de fibrinógeno en CBA está en el rango de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml. La cantidad de ácido tranexámico en la solución de CBA puede ser desde aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/ml. La cantidad de hidrocloreto de arginina puede ser desde aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg/ml.

5 Opcionalmente, la solución se amortigua hasta un valor pH fisiológico compatible. El tampón puede estar compuesto por glicina, citrato sódico, cloruro sódico, cloruro cálcico y agua para su inyección como un vehículo. La glicina puede estar presente en la composición en una cantidad de desde aproximadamente 6 a aproximadamente 10 mg/ml, el citrato sódico puede estar en el rango de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml, el cloruro sódico puede estar en el rango de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9 mg/ml y el cloruro cálcico puede estar en la concentración de aproximadamente 0,1-0,2 mg/ml.

10 En otra realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición CBA se reduce a igual o menos de 15 µg/ml como por ejemplo 5 µg/ml o menos plasminógeno, por ejemplo, usando un método como el descrito en la patente de Estados Unidos N° 7.125.569 y la solicitud PCT publicada correspondiente WO 02/095019, cada una incorporada aquí como referencia.

15 También es posible que la formulación de sellador de fibrina comprenda componentes que animan a la formación del coágulo, tal como Ca²⁺, Factor VIII, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand (FvW) que pueden proporcionarse como un componente separado o formulados con los componentes líquidos.

20 La formulación líquida de sellador de fibrina puede aplicarse al tejido usando un dispensador que expulse el sellador directamente sobre el tejido u otro sustrato o superficie de trabajo con o sin pulverización de aire, por ejemplo, mediante baño. En una realización de la invención, el sellador es pulveriza en presión de aire a 15 PSI. Ejemplos de dispensadores selladores de tejido son conocidos en la patentes de Estados Unidos números 4.631.055, 4.846.405, 5.116.315, 5.582.596, 5.665.067, 5.989.215, 6.461.361 y 6.585.696, 6.620.125 y 6.802.822 y publicación PCT N° WO 96/39212, WO 2007/059801 y WO 2010/095128, todas ellas incorporadas aquí como referencias.

25 Una formulación líquida de sellador de fibrina comprende al menos dos componentes antes de la aplicación en operaciones quirúrgicas. En una realización, la formulación líquida de sellador de fibrina comprende dos componentes líquidos, un componente comprende fibrinógeno y después de exposición a un segundo componente que comprende una enzima proteolítica tal como trombina humana s forma un coágulo de fibrina. Durante operaciones quirúrgicas, los componentes líquidos separados, por ejemplo, dos componentes líquidos se aplican, por ejemplo, mediante dos jeringas que se vacían simultáneamente o una después de la otra dando como resultado una mezcla de los dos componentes y la formación de fibrina.

35 En una realización de la invención, la enzima proteolítica es trombina humana que tiene una actividad de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 4.000 UI/ml. La actividad coaguladora de la trombina puede medirse directamente, por ejemplo, de acuerdo al procedimiento del Ensayo de Farmacopea Europea (0903/1997) y/o indirectamente, tal como midiendo la longitud de migración sobre la superficie inclinada (el "test de la gota" como se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2010/0203033) o mediante cualquier otro método conocido en la técnica. Una persona experta entiende que un pegamento de fibrina puede definirse por su contenido de proteína coagulable en lugar de la definición basada en fibrinógeno coagulable

40 En otra realización de la invención, los componentes de fibrinógeno y enzima proteolítica se aplican de tal manera que se mezclan y aplican los mismos volúmenes de los dos componentes en el paciente en el sitio de la herida respectiva. Por supuesto, se entenderá que la matriz de fibrina de la invención puede emplearse durante operaciones quirúrgicas y también en otras situaciones donde deba pararse el sangrado.

45 La mezcla sólida de sellador de fibrina puede prepararse mezclando fibrinógeno sólido y trombina sólida en un rango deseado de proporciones. Por ejemplo, cuando el componente de fibrinógeno sólido se preparó a partir de un fibrinógeno que contenía una solución con una concentración de fibrinógeno de 40-85 mg/ml y el componente de trombina sólida se preparó a partir de trombina que contenía una concentración de trombina de aproximadamente 800-1200 UI/ml los dos componentes sólidos pueden mezclarse en una proporción de 1:1, 2,3:1, 6,4:1, respectivamente, etcétera. La mezcla puede realizarse en un área con humedad controlada (humedad relativa 25%, temperatura de 37 °C). El polvo mezclado puede mantenerse en una cámara cerrada hasta su uso.

50 La solución que contiene fibrinógeno puede diluirse, por ejemplo, para contener 25 mg/ml o 20 mg/ml fibrinógeno antes de la etapa de secado. La mezcla de los dos componentes puede realizarse antes de la aplicación de la mezcla sólida de sellador de fibrina en el tejido o aplicarse en la proporción deseada inmediatamente en el tejido.

55 Durante la aplicación de la formulación líquida de sellador de fibrina en el tejido, el componente que contiene fibrinógeno y el componente que contiene fibrina pueden aplicarse en un rango deseado de proporciones. Por ejemplo, cuando 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 proporción de 1:1; 1:2; 1:3; 1:4, 1:5, 1:6, respectivamente, etcétera. En una realización de la invención, los componentes del sellador líquido de fibrina se aplican en una proporción de 1:1.

60 La matriz de fibrina de la invención puede aplicarse en una cantidad terapéuticamente efectiva. Los

términos “una cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la dosis requerida para prevenir o tratar una enfermedad, trastorno o condición. La dosis efectiva puede cambiar dependiendo de la edad y peso del sujeto, la enfermedad y su severidad (por ejemplo, el tamaño de la incisión) y otros factores que el experto en la técnica puede reconocer. Por ejemplo, la mezcla sólida de sellador de fibrina puede aplicarse en un peso en el rango de 0,1 a 100 mg por cm² tal como un peso de 0,5, 1, 4, 8, 16, 30, 60 o 100 mg por cm². La formulación líquida de sellador de fibrina puede aplicarse en un rango de volumen de desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 ml por cm² tal como en un volumen de 0,01, 0,05, 0,5 o 1 ml por cm².

En una realización, para una incisión de 10 mm, la aplicación secuencial se realiza en un área de 6 cm² dispersando 100 mg de mezcla sólida de sellador de fibrina (1000 UI trombina por 70 mg fibrinógeno), seguido de pulverización de una formulación líquida de sellador de fibrina. La formulación líquida se aplica pulverizando un volumen total de 2 ml (proporción 1:1 entre los dos componentes) de 1000 UI/ml trombina y 70 mg/ml fibrinógeno.

La formulación líquida de sellador de fibrina puede proporcionarse en los métodos de la invención en forma sólida y reconstituirse antes de su aplicación. Las reconstituciones pueden realizarse mediante la adición de varios volúmenes de un transportador farmacéuticamente aceptable. El término “reconstitución” se refiere a un proceso en el que el sólido se convierte en una forma líquida. Un producto reconstituido puede ser un producto líquido hecho añadiendo líquido acuoso a productos secos a los que se les ha eliminado previamente el líquido.

Alternativamente, la formulación líquida de sellador de fibrina puede proporcionarse en forma congelada, por ejemplo, a una temperatura de -18 °C o inferior, y descongelarse antes de su aplicación. La descongelación puede realizarse incubando los recipientes que comprenden los componentes líquidos a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C), a una temperatura de 2 a 8 °C o a una temperatura de 37 °C. En otra realización, los componentes líquidos se aplican simultáneamente. Aún en otra realización más, los componentes líquidos se aplican uno después de otro. El componente sólido puede proporcionarse en forma líquida y secarse antes de su aplicación, por ejemplo, mediante procedimientos de liofilización (secado por congelación) o secado con pulverización. Alternativamente, el componente sólido puede proporcionarse en forma congelada y secarse antes de su aplicación. Los componentes congelados pueden descongelarse o convertirse directamente de congelado a sólido, por ejemplo, mediante sublimación.

El componente sólido puede proporcionarse en una suspensión, por ejemplo, en cualquier disolvente adecuado incluyendo un líquido no acuoso, tal como hidrofluorocarbono (HFE) o cualquier otro fluido transportador en el que el componente sólido no se disuelva, tales como alcoholes, éteres u otros fluidos orgánicos. Los componentes sólidos y/o componentes líquidos pueden aplicarse a los métodos de la invención simultáneamente o uno después de otro. En una realización, los componentes sólidos se proporcionan en una mezcla y se aplican simultáneamente. En otra realización, los componentes sólidos se proporcionan en recipientes separados y se aplican simultáneamente. En otra realización más, los componentes sólidos se proporcionan en recipientes separados y se aplican uno después del otro.

La matriz de fibrina de la invención puede aplicarse por cualquier medio usado por cirujanos para el tratamiento o prevención de defectos que incluyen, aunque no se limitan a, cirugía abierta y procedimiento mínimo invasivo (PMI), tal como en un procedimiento laparoscópico. En una realización de la invención, se hace una incisión en el sitio de la cirugía y la matriz de fibrina se aplica al defecto. En otra realización, se hace una incisión en el sitio de la cirugía, la incisión se grapa o sutura y la matriz de fibrina se aplica a la línea de grapas o sutura. El paciente puede recibir anestesia local, regional o general. Los términos “cirugía abierta” se refieren a cirugía donde el cirujano consigue acceso directo al sitio quirúrgico mediante una incisión relativamente grande.

Como aquí se usan, los términos “procedimiento mínimamente invasivo” se refieren a una cirugía donde el cirujano consigue acceso al sitio quirúrgico por medio de pequeñas incisiones o través de una cavidad corporal o abertura anatómica, por ejemplo, por medio de laparoscopia. Pueden usarse técnicas especializadas para visualizar el área operada tales como, cámaras en miniatura con microscopios, linternas minúsculas con fibra óptica y monitores de alta definición. Los instrumentos que tienen “efectores finales” tales como fórceps, cortadoras, porta-agujas, cauterizadores y similares, pueden introducirse en el sitio quirúrgico.

Los componentes que contienen fibrinógeno y trombina están disponibles en fabricantes tales como OMRIX, por ejemplo, EVICEL®, QUIXIL®, ADHEXIL™; EVITHROM®; Baxter, por ejemplo, TISEEL®; CSL, por ejemplo, Beriplast® y similares. En una realización, los componentes líquidos de sellador de fibrina se fabrican a partir de plasma de fuente humana agrupado y proporcionado como un único kit de uso consistente en dos viales: un vial contiene un Componente Biológico Activo 2 (CBA2) y otro vial contiene trombina. El kit puede además incluir un dispositivo estéril de aplicación e instrucciones para su uso.

En una realización, el componente CBA2 es una solución estéril en pH 6,7-7,2, que consiste principalmente en un concentrado de fibrinógeno humano. El fibrinógeno es una proteína de sangre humana que forma un coágulo cuando se combina con trombina. La formulación líquida de sellador de fibrina, tal como la solución CBA2 puede contener: concentrado de fibrinógeno humano (55-85 mg/ml), hidrocloreuro de arginina, glicina, cloruro sódico, citrato sódico, cloruro cálcico y agua para inyección (API).

En una realización, el componente de trombina es una solución estéril, pH 6,8-7,2, que contiene trombina humana altamente purificada que activa la coagulación del producto combinado final. La trombina es una proteasa muy específica que transforma el fibrinógeno contenido en CBA2 en fibrina. La solución de trombina (800-1200 UI/ml), cloruro cálcico, albúmina humana, manitol, acetato sódico y agua para inyección.

El crioprecipitado, que puede ser un material de partida para CBA2, y plasma pobre en crioprecipitado, que puede ser un material de partida para la producción de trombina pueden hacerse a partir de plasma de fuente humana agrupado. Las etapas para la producción de crioprecipitado y plasma pobre en crioprecipitado son bien conocidas. En una realización, se fabrica trombina mediante purificación cromatográfica de protrombina de plasma pobre en crioprecipitado seguido de activación con cloruro cálcico, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.143.838, que aquí se incorpora como referencia. En otra realización, el componente de fibrinógeno se deriva de crioprecipitado, en particular crioprecipitado concentrado.

Los componentes de fibrinógeno y trombina usados anteriormente como cualquier parte del componente líquido de sellador de fibrina o el componente liofilizado pueden prepararse a partir de plasma de seres humanos o mamíferos. Sin embargo, también es posible que los componentes se preparen mediante métodos recombinantes. Los componentes de fibrinógeno pueden prepararse de acuerdo con los procesos descritos en la patente de Estados Unidos N° 6.121.232 y solicitud PCT publicada WO 98/33533, donde el plasminógeno se extrae, como se describe en la solicitud EP publicada EP 1.390.485 y no se añade ácido tranexámico.

Los componentes de sellador de fibrina, bien como parte de los componentes de sellador líquido de fibrina o de la mezcla sólida de sellador de fibrina, derivados de sangre o fracciones de sangre típicamente se someten al menos a dos etapas distintas de inactivación/extracción de virus. Los procesos de inactivación y extracción pueden realizarse, por ejemplo, mediante los siguientes métodos: nanofiltración; disolvente/detergente; tratamiento con pH bajo; irradiación UV; tratamiento con tiocianato de sodio y/o mediante cualquier otro métodos conocido en la técnica.

Los términos "etapa de inactivación de virus" se refieren a una situación donde los virus se mantienen en la solución pero se convierten en no viables, por ejemplo, disolviendo su capa de lípido. Los términos "etapa de eliminación de virus" se refieren a una situación donde los virus se eliminan físicamente de la solución, por ejemplo, mediante técnicas de exclusión por tamaño.

Los términos "al menos a dos etapas distintas de inactivación/extracción de virus" implica la realización de al menos dos tratamientos diferentes e independientes para inactivar o eliminar virus. Puede usarse una combinación o más de los siguientes ejemplos no limitativos de tratamientos: pasteurización, Disolvente/Detergente (D/D), nanofiltración, tratamiento con pH bajo, irradiación UV y tratamiento con tiocianato de sodio.

El uso de un CBA derivado de crioprecipitado concentrado es ventajoso ya que tal fracción contiene, además de fibrinógeno, componentes sanguíneos valiosos que juegan un papel importante para la coagulación de sangre cuando una enzima proteolítica tal como trombina humana entra en contacto con una solución CBA. Los componentes valiosos son, por ejemplo, factor VIII, factor XIII, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand (FvW), etc.

La aplicación de la composición de mezcla sólida de sellador de fibrina seguido de la composición líquida de sellador de fibrina genera una matriz de fibrina sobre el tejido con una superioridad de sellado no conseguida mediante la aplicación de cualquiera de las composiciones selladoras solas. La matriz de fibrina generada de acuerdo con la invención es especialmente adecuada para sellar defectos en tejidos de mucosa y otros tejidos enterales o húmedos que están en constante movimiento, por ejemplo, tejido gastrointestinal. Por ejemplo, la fibrina de la invención puede usarse para prevenir complicaciones de fugas que ocurren en extirpación con grapas o anastomosis en cirugía gastrointestinal. Además, la fibrina de la invención puede usarse ventajosamente para fijar prótesis fuertemente durante una operación de hernia.

Las divulgaciones de solicitudes, patentes y publicaciones, citadas más arriba y más abajo, aquí se incorporan como referencia.

La presente invención se describe además mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Liofilización

La liofilización se realizó de acuerdo con el siguiente ciclo:

	Etapa	Fase	Tiempo (h:m)	Temp (°C)	Vacío (mBar)
5	1	Valores de inicio	--:--	4	APAGADO
	2	Congelación	1:00	-30	APAGADO
	3	Congelación	1:00	-50	APAGADO
10	4	Congelación	5:40	-50	APAGADO
	5	Preparación	0:20	-45	APAGADO
	6	Sublimación	0:15	-42	0,2
15	7	Sublimación	0:15	-25	0,2
	8	Sublimación	25:00	-25	0,2
	9	Sublimación	1:00	-15	0,2
	10	Sublimación	12:00	-15	0,2
20	11	Sublimación	2:00	20	0,2
	12	Sublimación	5:00	20	0,2
	13	Segundo secado	0:30	25	0,12
25	14	Segundo secado	18:00	25	0,12

Fibrinógeno líquido y trombina.

30 En los experimentos más abajo los dos componentes líquidos de sellador de fibrina EVICEL® (CBA2 y trombina; Omrix Biopharmaceuticals Ltd.) se usaron como los dos componentes del sellador líquido de fibrina. El componente de fibrinógeno (que comprendía 70 mg de fibrinógeno/ml) se usó como es y, a menos que se indique lo contrario, el componente de trombina se usó como es (1000 UI/ml) o diluido 10 veces con un tampón de dilución [0,04 M CaCl₂ en agua destilada desionizada (ADD)]. En todos los experimentos el sellador líquido de fibrina se pulverizó en presión de aire de 15 PSL.

35 Preparación de mezcla de fibrinógeno liofilizado y trombina.
Las composiciones de las soluciones usadas para preparar los polvos liofilizados fueron como los dos componentes líquidos de EVICEL®. Cada uno de los componentes se liofilizó por separado de acuerdo con el ciclo de liofilización descrito anteriormente. El componente de fibrinógeno se diluyó con ADD a una concentración de 20 mg/ml fibrinógeno antes del procedimiento de liofilización.

45 Después de la liofilización, los polvos se trituraron con una espátula a través de un tamiz de 200 µm. Los polvos triturados de fibrinógeno y trombina se mezclaron en una proporción de peso de 3,2:1 (iguales a una proporción de 1000 UI trombina por 70 mg fibrinógeno como en EVICEL) o 6,4:1 (iguales a una proporción de 500 UI trombina por 70 mg fibrinógeno), respectivamente. La mezcla se realizó en un área de control de humedad (humedad relativa 25%, temperatura de 37 °C). El polvo mezclado se mantuvo en una cámara cerrada hasta su uso. Se preparó una mezcla fresca de polvo para cada experimento.

50 **Ejemplo 1 – La fuerza adhesiva de formulaciones de sellador liofilizado de fibrina y sellador líquida de fibrina.**

55 En el siguiente experimento, se midieron las fuerzas adhesivas de formulaciones de sellador liofilizado de fibrina y sellador líquido de fibrina. La evaluación se realizó mediante una prueba de fuerza para despegarse, esencialmente como se describe en Nicoson ZR, Buckley CA. “Fuerza adhesiva de pegamento de fibrina entre capas de sub-mucosa de intestino delgado porcina (SIS)”. Biomed Sci Instrum. 2002; 38:179-184. En resumen, la formulación adhesiva testada se aplicó al lado de serosa de un íleon de cerdo (un segmento de 4 x 10 cm) en una estructura plantilla de parafilm de 4 x 4 cm (16 cm²) (véase manera de aplicación más abajo).

60 Después de la aplicación de las diferentes formulaciones de sellador de fibrina, la plantilla de parafilm se retiró, y el tejido del íleon se dobló sobre sí mismos (serosa con serosa) y se dejó polimerizar durante 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25 °C). Para obtener cuatro réplicas, el segmento se cortó en tira de 1 x 10 cm y la fuerza necesaria para separar las dos capas adheridas de tejido de íleon (conocida como fuerza para despegarse) se midió usando una máquina de ensayo de tensión universal - Lloyd Instruments LFPLUS.

65 Las formulaciones testadas se aplicaron de la siguiente manera:

- Los componentes líquidos de fibrinógeno y trombina se aplicaron mediante pulverización en volúmenes iguales de fibrinógeno y trombina y un volumen total de 2 ml. La trombina se aplicó en dos concentraciones diferentes, 100 o 1000 UI/ml y fibrinógeno en 70 mg/ml; y

5 - Se aplicaron 400 mg de cada mezcla liofilizada (una mezcla que contenía 500 o 1000 UI de trombina por 70 mg de fibrinógeno preparada como se especifica en la sección de materiales y métodos) a la plantilla de parafilm de 16 cm² (se aplicaron 100 g a cada réplica). Después, con el fin de evitar que el tejido se secase, se pulverizó PBS en el polvo hasta que el polvo pareció mojado.

10 Las fuerzas adhesivas de las diferentes formulaciones testadas se muestran en la Fig. 1.

Se observó que era necesaria una fuerza mayor con el fin de despegar las dos capas de tejido de intestino cuando se formó fibrina por la composición liofilizada en comparación con la fuerza necesaria cuando se usó la composición líquida de sellador de fibrina (comparar la fuerza para despegarse de la formulación liofilizada y la formulación líquida cuando se aplicó en la misma concentración de 1000 UI trombina por 70 mg fibrinógeno).

15 Por lo tanto, se descubrió que la fuerza adhesiva entre dos muestras mejora significativamente cuando se usa una formulación liofilizada.

20 También, se observó que un fibrinógeno sólido preparado mediante una etapa de liofilización de una solución que contiene fibrinógeno con una concentración de 20 mg/ml se reconstituyó en una solución acuosa a temperatura ambiente en un periodo de tiempo inferior a 10 minutos. La concentración más baja de fibrinógeno produce una torta liofilizada porosa y partículas más porosas después de triturar la torta. Se cree que el incremento en porosidad permite que el líquido entre de manera más fácil en las partículas dando como resultado un tiempo de hidratación más rápido.

25 **Ejemplo 2 – La propiedad de sellado de formulaciones diferentes de sellador de fibrina**

El ejemplo previo muestra que el uso de una formulación liofilizada aumenta la fuerza adhesiva. En este experimento, se testaron las propiedades de sellado de tres formulaciones diferentes de sellador de fibrina: una mezcla de fibrinógeno liofilizado y trombina, una formulación líquida de sellador de fibrina y un sellador de fibrina formado por la aplicación secuencial de una mezcla de fibrinógeno liofilizado y trombina seguido de una aplicación de una formulación líquida de sellador de fibrina. El ensayo de rotura [esencialmente como se describe en Vilela et al. "¿Qué es importante para estomas continentales cateterizables: angulación o extensión? Int Braz J Urol. 2007; Vol. 33(2): 254-263] se realizó para determinar y evaluar la habilidad de un sellador para sellar de manera efectiva y soportar presión.

40 La presión de rotura en este modelo indica la habilidad de una formulación testada para adherirse al tejido y mantener su integridad mecánica hasta el punto de presión en el que ocurre una rotura del sellado dando como resultado una pérdida inmediata de presión y fuga visible de agua.

45 Como se ha descrito anteriormente, se insertó una tubería de aluminio especialmente diseñada (longitud de 27 cm) que contenía agujeros en un segmento tubular de íleon de cerdo en la longitud de 25-30 cm. El segmento tubular se selló en ambos extremos a la tubería mediante discos de plástico y se apretó usando tornillos de metal. La tubería de aluminio se conectó a una fuente de agua. Después de dejar que el agua fluyera a la tubería de aluminio, el agua entro en el vacío entre el íleon y la tubería de aluminio a través de agujeros presentes alrededor de la tubería, de manera que previno el flujo hacia atrás del agua a la tubería de aluminio.

50 Antes de dejar fluir el agua, se formó una incisión de 10 mm perpendicular a la longitud del intestino usando una cuchilla afilada. Para estimular mejor los ajustes clínicos, la incisión primero se suturó en su línea central (usando una sutura 3x0; ETHICON; Cat. Número ss684), y después se aplicó la formulación testada de sellador de fibrina en el área de incisión a través de una estructura plantilla parafilm (20x30 mm; 6 cm²) que se colocó alrededor del área de incisión. Después de la aplicación de la formulación testada (veas más abajo la aplicación) la fibrina se dejó curar durante 10 minutos, el intestino se llenó con agua y se evaluó su habilidad para soportar presión. Una vez que el agua fluye al vacío entre el íleon y la tubería la presión asciende hasta que el sellado de la incisión se abre y se observa una caída aguda en la presión. El nivel de presión observado se controló usando un medidor de presión (D-logmate 590 MRC Israel) que se conectó a la línea de flujo líquido hasta que se observó una caída aguda en la curva de presión. Se consideró la presión antes de la caída y se consideró como presión de rotura.

60 Las formulaciones testadas se aplicaron de la siguiente manera:

- La fibrina líquida se aplicó mediante pulverización en un total de 2 ml (proporción 1:1 entre los dos componentes). En este experimento solamente se evaluó una concentración de trombina: 1000 UI por 70mg fibrinógeno.

65 - Se dispersaron 100 mg de la mezcla liofilizada en la plantilla de 6 cm². Solamente se evaluó una mezcla: una mezcla que contenía 1000 UI de trombina por 70 mg (un componente liofilizado de fibrinógeno y trombina mezclados en una proporción de 3,2:1 preparado como se ha descrito en la sección de materiales y métodos). Con el fin de prevenir que el tejido se secase, se pulverizó PBS después de la dispersión de la formulación liofilizada.

- La aplicación secuencial se realizó dispersando 100 mg de fibrinógeno y trombina liofilizados (1000 UI por 70 mg), después de pulverizar los componentes de fibrinógeno líquido y trombina (total de 2 ml). Si el polvo liofilizado no estaba completamente mojado por la mucosa que rodeaba el intestino, se pulverizaba después de la dispersión de la formulación liofilizada.

5 Se observó que el sellador liofilizado de fibrina, que tenía mejores fuerzas adhesivas que el sellador líquido de fibrina (véase Fig. 1), no fue efectivo en sellado (se obtuvo un valor bajo de presión de rotura; Fig. 2).

10 El sellador líquido de fibrina mostró un mejor efecto de sellado que el sellador liofilizado de fibrina. Sorprendentemente, la aplicación secuencial de sellador liofilizado de fibrina antes de la pulverización del sellador líquido de fibrina mostró un mayor aumento que meramente la combinación aditiva en la propiedad de sellado. Por lo tanto, se descubrió que la propiedad de sellado de una aplicación secuencial de selladores en polvo y líquidos fue superior en comparación con las propiedades de sellado de cada formulación por separado.

15 Sin estar ligado al mecanismo, parece que el fibrinógeno liofilizado y los polvos de trombina se disuelven en la mucosa que rodea el tejido intestinal formando de este modo una capa de fibrina muy próxima al tejido de serosa. Cuando el sellador líquido de fibrina se pulveriza después de los polvos liofilizados, se observa una mejora sinérgica del sellado de tejido como se ha descrito anteriormente (Fig. 2).

20 **Ejemplo 3 – El efecto superior de sellado de una formulación de fibrina formada mediante la aplicación de mezcla sólida de sellador de fibrina seguido de una formulación líquida de sellado de fibrina.**

25 En los ejemplos previos se ha demostrado que el sellador de fibrina formado mediante una aplicación secuencial de mezcla liofilizada de fibrinógeno y trombina seguido de pulverización de sellador líquido de fibrina tiene una propiedad superior de sellado.

30 El siguiente ejemplo examina la actuación de sellado de la aplicación de solamente uno de los componentes liofilizados (bien fibrina o trombina) seguido de la aplicación del sellador líquido de fibrina usando el método de ensayo de rotura. El siguiente ejemplo también examina si la aplicación de albúmina en la incisión que seca la mucosa que rodea el intestino puede ayudar a que el sellador de fibrina se adhiera mejor al tejido y de esta manera mejorar la actuación de sellado del sellador.

35 Con este fin se realizó el ensayo de rotura anteriormente descrito (Ejemplo 2) y se evaluó la propiedad de sellado de los siguientes selladores de fibrina; una fibrina formada por la aplicación de 25 mg de trombina liofilizada (preparada a partir de una solución que comprendía 1000 UI/ml de trombina como el componente líquido de trombina de EVICEL; se liofilizaron 625 µl de solución) seguido de pulverización de 2 ml de sellador líquido de fibrina; una fibrina formada por la aplicación de 75 mg de fibrinógeno liofilizado (preparado a partir de una solución que comprendía 20 mg/ml de fibrinógeno como se ha descrito anteriormente) seguido de pulverización de 2 ml de sellador líquido de fibrina; una fibrina formada por la aplicación de 100 mg de una mezcla de fibrinógeno y trombina liofilizados (en una proporción de peso de 3,2:1 preparada como se ha descrito anteriormente) seguido de pulverización de 2 ml de sellador líquido de fibrina; y una formulación de fibrina formada por la aplicación de 100 mg de polvo de albúmina (Sigma; Cat. Núm. 0,78k1503) seguido de pulverización de 2 ml de sellador líquido de fibrina. Todos los polvos (incluyendo el polvo de albúmina) se trituraron con una espátula a través de un tamiz de 200 µm antes de su uso.

45 Los resultados se presentan en la Fig. 3. Las estadísticas se realizaron mediante un test Tukey-Kramer ANOVA de una dirección. Las letras iguales representan valores medios que no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) y una letra diferentes representa un valor medio que es significativamente diferente ($p \leq 0,05$). Se observó que la aplicación secuencial de un sellador sólido de fibrina seguido por una formulación líquida de sellador de fibrina generó una matriz de fibrina con una propiedad superior de sellado en comparación con una matriz de fibrina formada por la aplicación individual de solamente uno de los componentes liofilizados (bien fibrinógeno o trombina) seguido por la aplicación de la formulación líquida. También, se descubrió que la aplicación de polvo de proteína (albúmina) que seca la mucosa no aumenta la actuación de sellado de la formulación líquida de sellador de fibrina.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un producto que comprende (a) un componente sólido que comprende fibrinógeno; (b) un componente sólido que comprende trombina; y (c) una formulación líquida de sellador de fibrina; para uso en el sellado de tejido húmedo mediante las etapas de: aplicar una cantidad efectiva de los componentes sólidos en al menos una parte del tejido húmedo; seguido de la aplicación sobre al menos una parte de los componentes sólidos aplicados una cantidad efectiva de la formulación líquida de sellador de fibrina.
- 10 **2.** El producto de acuerdo con la reivindicación 1, donde los componentes sólidos (a) y (b) están presente en dicho producto como una mezcla.
- 15 **3.** Un método para hacer un producto de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la preparación de fibrinógeno de dicho componente sólido mediante la etapa de secado de una solución que contiene fibrinógeno que tiene una concentración de fibrinógeno de menos de 25 mg/ml.
- 20 **4.** El método de la reivindicación 3, donde la concentración de fibrinógeno en dicha solución es aproximadamente 20 mg/ml.
- 25 **5.** Un kit que comprende: (i) recipiente(s) que comprende(n) dichos componentes sólidos que comprenden (a)- componente de fibrinógeno y (b)- un componente de trombina, donde los componentes (a) y (b) están en recipientes separados o en el mismo recipiente como una mezcla; y (ii) al menos dos recipientes separados, el al menos un recipiente separado comprende un componente de fibrinógeno líquido o congelado, y el al menos segundo recipiente separado comprende un componente de trombina líquido o congelado que es capaz de formar fibrina cuando reacciona con fibrinógeno.
- 30 **6.** El kit de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho al menos un recipiente separado contiene dicho componente de fibrinógeno en forma congelada para descongelar antes de su aplicación, y dicho al menos segundo recipiente separado contiene dicho componente de trombina en forma congelada para descongelar antes de su aplicación.
- 35 **7.** Un kit de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6 para la preparación de un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

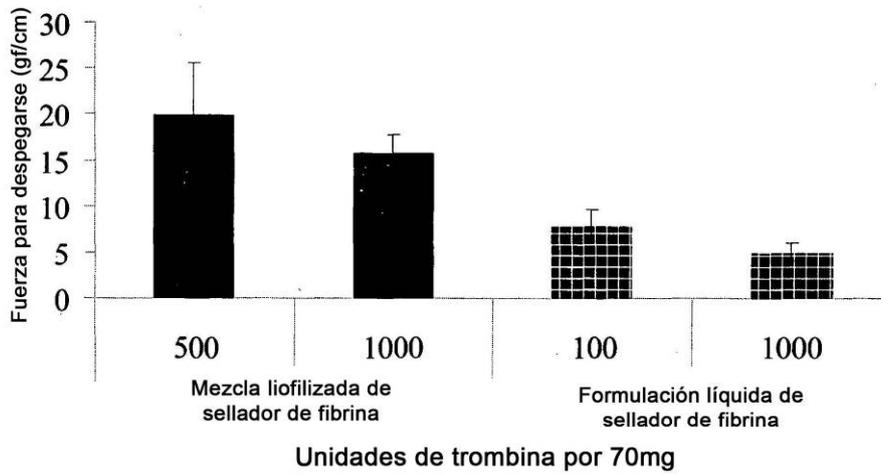


Fig. 1

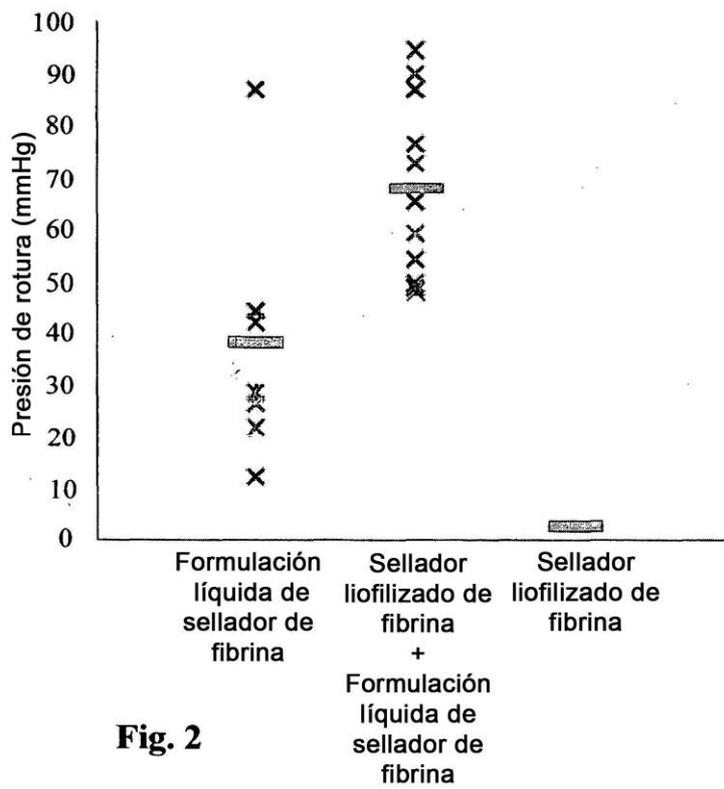


Fig. 2

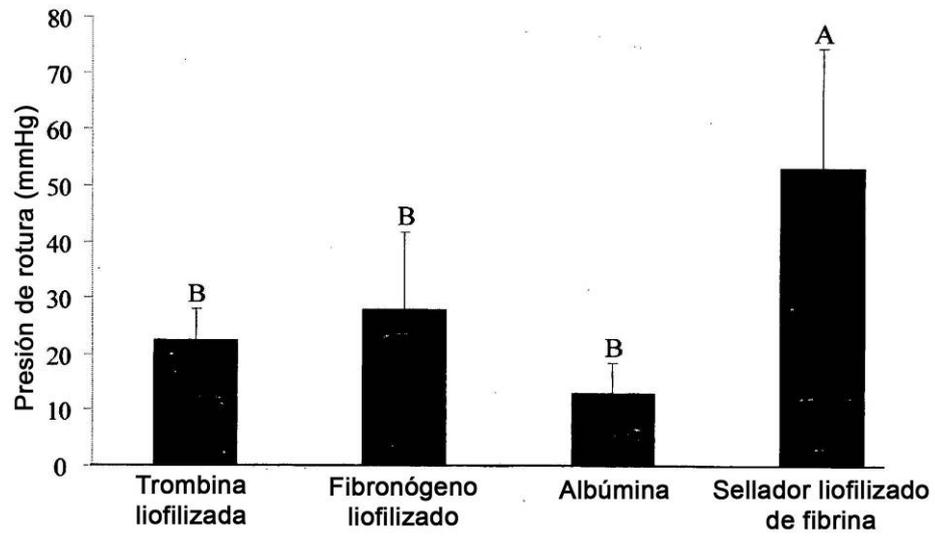


Fig. 3