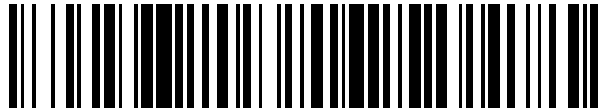


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 174**

51 Int. Cl.:

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 15/38 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11768111 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2600910**

54 Título: **Composición seca en apósitos y adhesivos para heridas**

30 Prioridad:

05.08.2010 US 370821 P

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

20.04.2016

73 Titular/es:

**LIFEBOND LTD (100.0%)
POB 3048, 9 Hafamish Street, Industrial Park
38900 Caesarea, IL**

72 Inventor/es:

**PREISS-BLOOM, ORAHN;
BAYER, THOMAS;
KOMLOS, CHAGAI;
TOMER, GUY y
ZIV, MARIA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 174 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

Composición seca en apósitos y adhesivos para heridas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los apósitos, dispositivos, sellantes, agentes adhesivos para heridas que contienen materiales reabsorbibles o no reabsorbibles y/o proteínas y, en particular, pero no exclusivamente, a dichos dispositivos y agentes que son útiles para el tratamiento de tejido herido, recubrimiento de dispositivos implantables, o adhesión de dispositivos implantables a tejidos.

Antecedentes de la invención

10 El cierre de heridas quirúrgicas actualmente se lleva a cabo mediante suturas y grapas que facilitan la cicatrización por estiramiento de los tejidos a la vez. Sin embargo, muy a menudo estos fallan para producir el completo sellado necesario para prevenir el sangrado y fugas de fluido. Por lo tanto, existe una gran necesidad médica no satisfecha de dispositivos y métodos para prevenir el sangrado y fugas durante y después de la cirugía, incluyendo fugas que frecuentemente ocurren a lo largo del grapado y líneas de sutura. Dichos dispositivos y métodos son necesarios como complemento de suturas o grapas para lograr la hemostasis u otra estasis del fluido en reconstrucciones vasculares periféricas, reconstrucciones de la duramadre, cirugías torácica, cardiovascular, pulmonar, neurológica, y gastrointestinal.

15 Además de la cirugía, el control de hemorragia (sangrado) es un paso crítico en los primeros auxilios y el cuidado del trauma en campo.

20 Un amplio rango de productos ha sido sugerido como soluciones para la hemostasis y estasis de fluidos tanto para primeros auxilios como para dispositivos quirúrgicos. Sin embargo, los productos existentes comprenden soluciones limitadas o parciales que frecuentemente tienen desventajas significativas.

25 Como un ejemplo de productos no óptimos de hemostasis: actualmente ningún dispositivo disponible comercialmente implica dispositivos de redes de gelatina entrecruzable que haya sido capaz de inducir independientemente hemostasis para hemorragia interna vigorosa, incluso con la adición de trombina. Un estudio fue realizado comparando la capacidad hemostática de matriz de gelatina FloSeal (BioSurgery, Fremont, CA) y matriz de gelatina GelFoam humedecida en solución activa de trombina. Ningún dispositivo hemostático mejorado fue capaz de detener el flujo de sangrado caracterizado en más de 2/3 de los pacientes después de 5 minutos. El sangrado arterial pulsátil es mucho más vigoroso que el sangrado y sin duda alguna presentaría un problema para estas matrices humedecidas con trombina (FA Weaver et al. (2002). Ann Vasc Surg 16(3):286-93).

30 En cualquier caso, permanece una clara deficiencia en el cuidado de trauma y quirúrgico, en que no existen apósitos hemostáticos activos o apósitos quirúrgicos novedosos que estén comercialmente disponibles, que puedan controlar la hemorragia y fuga de fluidos sin efectos secundarios significativos. Del mismo modo, permanece una clara deficiencia en el cuidado quirúrgico, en que no existen selladores no tóxicos, disponibles comercialmente, que sean capaces de resistir un sangrado vigoroso y sean capaces de sellar flujos en sitios de la herida con fluidos del cuerpo no sanguíneos.

35 Resumen de la invención

40 Existe una necesidad, y sería útil considerar, un material adhesivo no tóxico que pueda ser usado para una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo, pero no limitando a aplicaciones quirúrgicas, control de hemorragia y control de sangrado de una herida. También existe una necesidad, y que sería útil considerar como un material adhesivo no tóxico que pueda ser usado como parte de un vendaje hemostático. También existe una necesidad y que sería útil considerar como un material adhesivo no tóxico que pueda ser usado como un sellante quirúrgico y que sea disponible como una composición seca.

La presente invención supera los inconvenientes de los antecedentes del arte proporcionando, como se define en la reivindicación 1, un material adhesivo que comprende una proteína entrecruzable y un material no tóxico que induce el entrelazamiento de la proteína entrecruzable. La proteína entrecruzable incluye gelatina.

45 Opcional, y preferiblemente el material no tóxico comprende transglutaminasa (TG), la cual puede opcionalmente comprender una transglutaminasa microbiana (mTG). De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el material adhesivo es proporcionado en un vendaje, el cual es preferiblemente adaptado para su uso como un vendaje hemostático. De acuerdo con otras realizaciones, este es proporcionado como un sellante, el cual es preferiblemente adaptado para su uso como un sellante quirúrgico.

50 Cuando actúa sobre una transglutaminasa, gelatina, que es una forma desnaturalizada de la proteína colágeno, experimenta entrelazamiento rápido para formar un gel vibrante. La Solicitud PCT No. PCT/US07/25726, presentada el 17 de diciembre de 2007 y publicada como WO2008/076407A2, propiedad en común con la presente solicitud y que

tiene al menos algunos inventores en común con la presente solicitud, describe algunas realizaciones de un material adhesivo sobre este mecanismo.

5 También, como se discutió en profundidad en la Solicitud PCT No. PCT/US07/25726, una variedad de productos de fibrino- trombina han sido sugeridos para solicitudes similares a las indicaciones quirúrgicas y médicas sugeridas en este documento (por ejemplo, controlando la hemorragia y sellado de fugas). Sin embargo, las realizaciones descritas de la presente invención evitan en los productos importantes inconvenientes inherentes, como fibrina y trombina, los cuales son directamente derivados de la sangre o modelados sobre derivados de proteínas de la sangre. Dichos inconvenientes incluyen alto coste, estabilidad insuficiente, riesgo viral, e insuficiente disponibilidad.

10 A diferencia de una red de fibrina coagulada, la red de gelatina-TG tiene un beneficio adicional porque puede ser disuelta específicamente, utilizando una proteasa especificada que no sea fisiológicamente reactiva (T. Chen, Biomacromolecules. 2003 Dic;4(6):1558-63). Así, mientras un apósito hemostático de gelatina-mTG o sellante mejora el rendimiento de un apósito hemostático fibrino-trombina o sellante, está también puede ser removida como se desee sin complicación.

15 La presente invención, en al menos algunas realizaciones comprende una gelatina-TG basada en un dispositivo hemostático, que tiene gran potencial como un apósito de campo hemostático para el cuidado de trauma, además de la utilidad en el control de sangrado vigoroso, arterial durante la cirugía, sangrado después de cauterización endovascular, o fuga de otros fluidos corporales después de lesiones o durante la cirugía.

20 El término "dispositivo", como se denomina en este documento, puede incluir cualquier material o pluralidad de materiales apropiados para su uso en el cuidado médico, por ejemplo, en el tratamiento de trauma al cuerpo, sangrado y/o fugas de fluidos corporales a partir de una lesión y/o durante la cirugía. El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más de un vendaje, un parche, un apósito, un yeso, un adhesivo o elástico que cubra la herida y similares. Como se describe en este documento, el término "parche" puede opcionalmente referirse a cualquier tipo de refuerzo y/o dispositivo de fijación, así como opcionalmente a un dispositivo de cierre de herida y/o manejo, sin limitación en geometría, forma y en cualquier dimensión apropiada.

25 Estas composiciones, métodos de tratamiento y dispositivos superan los inconvenientes de los antecedentes del arte, algunos aspectos se describen a continuación sin desear estar limitados a una lista cerrada. Previa soluciones anteriores usaron demasiadas formas de redes de gelatina modificadas y no modificadas para la hemostasis de leve a moderada. Sin embargo, ha faltado un método de formación, *in situ*, una red de gelatina fuertemente entrelazada que puede controlar el sangrado vigoroso y hemorragia arterial u otras importantes fugas de fluido corporal.

30 En algunas realizaciones demostrativas, se proporciona un método y/o un dispositivo, que puede incluir entrelazamiento gelatina-TG, por ejemplo, con el fin de formar una fuerte red de gelatina *in vivo*, por ejemplo, aumentando la fuerza mecánica de una matriz de gelatina y/o haciendo esta apropiada para controlar el sangrado arterial de alta presión y/o otras fugas de líquido corporal.

35 De acuerdo con algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir entrelazamiento *in situ* entre cadenas de gelatina y colágeno endógeno de ECM (matriz extracelular) del tejido, por ejemplo, para crear una barrera hemostática, fuerte para fluidos.

40 En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir hemostasis y/o estasis del fluido que afectan efectivamente, por ejemplo, teniendo Gelatina y TG aplicados en una forma liofilizada, por ejemplo, en donde la Gelatina y TG puedan ser reconstituidas por la sangre u otros fluidos corporales. Como se utiliza en este documento, el término "liofilización" puede opcionalmente referirse a cualquier tipo de secado, incluyendo, pero no limitando a secado a vacío. Opcional y preferiblemente, el secado se realiza a una temperatura que es inferior a la temperatura de transición sol-gel (el punto de gelación físico) de la matriz de la proteína de las composiciones.

45 En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir una mezcla de gelatina-TG en forma liofilizada, caracterizada, por ejemplo, por tener un aumento de vida útil.

En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir Gelatina y TG en capas, forma liofilizada, por ejemplo, para proporcionar una reconstitución más rápida, la cual, de conformidad con algunas realizaciones, pueden ser útiles para un ambiente de flujo de líquido a alta presión.

50 En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir una composición seca basada en tecnología de entrelazamiento de gelatina que pueden imitar la cascada natural de coagulación sanguínea y/o puede ser utilizada para efectuar hemostasis, cierre y/o sellado de heridas y/o incisiones, reforzar el grapado y/o líneas de sutura, reforzar el tejido natural, y/o para cualquier otra aplicación médica y/o quirúrgica apropiada.

En algunas realizaciones demostrativas, la composición puede incluir una matriz de gelatina con un entrelazador enzimático, preferiblemente transglutaminasa microbiana, por ejemplo, integrada en la matriz.

En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir composición seca de gelatina-enzima, por ejemplo, en donde la composición puede formar un parche.

5 En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir la adición de una capa de refuerzo mecánica a la mezcla básica de gelatina-TG, por ejemplo, para aumentar la capacidad hemostática y/o la capacidad de control de fluido de la mezcla, por ejemplo, mediante retraso del fluido y/o permitiendo a la gelatina-TG más tiempo para entrelazar y/o bloquear la fuga de fluido.

10 En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir composición seca de gelatina-enzima que puede incluir un dispositivo degradable y/o no-degradable incorporado en la matriz de gelatina, por ejemplo, de tal manera que cuando la composición entra en contacto con el fluido, el dispositivo puede ser adherido a una superficie de tejido.

15 En algunas realizaciones demostrativas, los métodos y/o dispositivos descritos en este documento pueden incluir composición seca de gelatina-enzima que puede incluir un dispositivo degradable y/o no-degradable donde el dispositivo puede ser una malla quirúrgica, por ejemplo, para el refuerzo del tejido dañado.

De acuerdo con algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la mezcla de gelatina-mTG puede ser parcialmente entrelazada previo a la aplicación a un sitio de la herida o previo a liofilización. En otra realización, la gelatina o mTG no entrelazada puede estar presente junto con gelatina-mTG parcialmente entrelazada. En otra realización, una gelatina no entrelazada está presente junto con una mTG.

20 Mientras un número de hemostáticos absorbibles quirúrgicos son actualmente utilizados en el ámbito quirúrgico, no existe un producto disponible comercialmente es suficientemente fuerte para proporcionar el soporte mecánico y biológico necesario para controlar la hemorragia grave o el flujo vigoroso de otros fluidos biológicos. Además, no existe un producto disponible comercialmente que pueda proporcionar la suficiente fuerza adhesiva para adherirse firmemente en los dispositivos médicos implantables para sitios de tejidos.

25 Aunque se ha utilizado gelatina en una variedad de apósitos de heridas, las redes de gelatina por sí solas no proporcionan las propiedades mecánicas necesarias para controlar el sangrado vigoroso.

30 Ejemplos de apósitos de gelatina para la hemostasis son revelados en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos 20110045034 y 20110021964, en donde el apósito de gelatina absorbe fluidos y un ingrediente biológicamente activo (preferiblemente trombina) se adiciona para adicionalmente estimular la hemostasis. Como nos enseñan estas referencias, la propia matriz de gelatina es insuficiente para controlar el sangrado vigoroso y el ingrediente biológicamente activo no tiene ningún efecto mecánico sobre el apósito de gelatina, de tal forma que la matriz de gelatina no proporciona ningún soporte estructural o mecánico para hemostasis, sellado y/o cierre de herida.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de una herida de tejido, que comprende la aplicación al tejido de una composición compuesta de colágeno o un derivado del colágeno y un agente de entrelazamiento no tóxico.

40 Opcionalmente, el agente de entrelazamiento no tóxico puede incluir una o más enzimas y/o una composición enzimática. En algunas realizaciones demostrativas, la una o más enzimas pueden incluir transglutaminasa o una composición de transglutaminasa. Preferiblemente, la relación en peso de gelatina con transglutaminasa está en un rango desde aproximadamente 50:1 a aproximadamente 500:1. Más preferiblemente, la composición de transglutaminasa tiene un nivel de actividad específica (unidades de enzima/contenido de proteína) de aproximadamente al menos 15 U/mg. Más preferiblemente, la transglutaminasa tiene un nivel de actividad específica de al menos 25 U/mg.

45 Opcional, y preferiblemente el nivel de actividad de la transglutaminasa en la composición de gelatina- transglutaminasa es de aproximadamente 25 a aproximadamente 1000 U/g de gelatina. Más preferiblemente, el nivel de actividad es de 50 a 400 U/g de gelatina.

Opcionalmente, la composición de transglutaminasa puede comprender una transglutaminasa derivada de planta, animal recombinante, y/o microbio, distinta del Factor XIII derivado de sangre. Preferiblemente, la composición tiene un pH en un rango desde aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

50 Opcionalmente, el derivado de colágeno puede ser producido de origen animal, origen recombinante o una combinación de los mismos. Preferiblemente, el de origen animal se selecciona del grupo que consiste en peces y mamíferos. Más preferiblemente, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en cerdos y vacas.

El derivado de colágeno es una gelatina

ES 2 567 174 T3

Opcionalmente, la gelatina es del tipo A (Tratada con Acido) o del tipo B (Tratada con Álcali). Más preferiblemente, la gelatina comprende gelatina de alto peso molecular.

Opcionalmente, el tejido herido se selecciona del grupo que consiste en tejido cortado quirúrgicamente, tejido reparado quirúrgicamente y tejido traumatizado.

- 5 Opcionalmente, el método puede comprender además reducción de sangrado y/o fuga de otros líquidos corporales de los tejidos. Opcionalmente, un fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en líquido cefalorraquídeo, fluido intestinal, aire, bilis y orina. Preferiblemente, el método comprende además inductores de hemostasis o estasis de otras fugas de fluidos corporales en el tejido.

- 10 Opcionalmente, la herida está sangrando o tiene fuga de otro fluido corporal y tratamiento del tejido herido comprende la aplicación de la composición en el sitio de la herida para fomentar *in situ* el entrelazamiento entre las cadenas de gelatina y colágeno endógeno de la matriz de tejido extracelular para crear una barrera de fugas de fluidos o sangrado.

Opcionalmente, el método comprendiendo además la formación de un gel adhesivo.

Opcionalmente, la aplicación de la composición comprende: Mezcla de la gelatina y la transglutaminasa para formar una mezcla; y aplicación de la mezcla al tejido.

- 15 De acuerdo aun con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una combinación de gelatina y transglutaminasa, en donde una relación de una cantidad de la gelatina y una cantidad de la transglutaminasa se selecciona para inducir la formación de un adhesivo de sellado en un mamífero.

- 20 De acuerdo aún con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una combinación de gelatina y agente de entrelazamiento no tóxico, en donde una relación de una cantidad de la gelatina y una cantidad del agente de entrelazamiento no tóxico es suficiente para reducir el sangrado en una herida de un mamífero.

- 25 Preferiblemente, el agente de entrelazamiento no tóxico comprende transglutaminasa. Más preferiblemente la relación en peso de gelatina con la transglutaminasa está en un rango desde aproximadamente 50:1 a aproximadamente 500:1. Incluso más preferiblemente, la composición de transglutaminasa tiene un nivel de actividad específica (unidades de enzima/contenido de proteína) de aproximadamente al menos 15 U/mg. Más preferiblemente, la transglutaminasa tiene un nivel de actividad específica de al menos aproximadamente 25 U/gm.

Opcionalmente la actividad de la transglutaminasa en la composición gelatina-transglutaminasa es de aproximadamente 25 a aproximadamente 1000 U/g de gelatina. Preferiblemente, la actividad es de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 U/g de gelatina.

- 30 Opcionalmente, la transglutaminasa comprende una transglutaminasa derivada de planta, recombinante, animal o microbio distinta a la del Factor XIII derivado de sangre. Preferiblemente, la composición comprende además un estabilizador o agente de carga. Preferiblemente también, la composición tiene un pH en un rango desde aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

- 35 Opcionalmente, la gelatina se produce de origen animal, origen recombinante o una combinación de los mismos. Preferiblemente, de origen animal se selecciona del grupo que consiste en peces y mamíferos. Más preferiblemente, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en cerdos y vacas. Más preferiblemente, la gelatina comprende pieles de cerdo o huesos de cerdo, o una combinación de los mismos. También más preferiblemente, la gelatina es de tipo A (tratada con ácido) o de tipo B (tratada con álcali). También más preferiblemente, la gelatina comprende gelatina de alto peso molecular.

- 40 Opcionalmente, la gelatina tiene una floración de al menos 250. Preferiblemente, los peces comprenden una especie de peces de agua fría.

Opcionalmente, la gelatina recombinante se produce utilizando bacterias, levaduras, animales, insectos, o sistemas de plantas o cualquier tipo de cultivo celular.

Opcionalmente, la gelatina es purificada para remover sales.

- 45 Opcionalmente, la gelatina tiene al menos una característica ajustada, adaptada o predeterminada.

De acuerdo aún con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona un agente hemostático o sellador de fluidos corporales que comprende una combinación de gelatina y un agente de entrelazamiento no-tóxico. Opcionalmente, el agente de entrelazamiento no-tóxico comprende la transglutaminasa. Preferiblemente, la combinación comprende agregados de gelatina y transglutaminasa.

Como se describe en este documento, un método o composición en la cual la transglutaminasa pueda opcionalmente ser extraída de una o más cepas de *Streptovercillium mobaraense*, *Streptovercillium Baldaccii*, *Streptomyces Hygroscopicus*, o *Escherichia Coli*.

5 De acuerdo aun con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de inducción de hemostasis en y/o sellamiento de tejido herido, comprendiendo la aplicación al tejido de una composición que comprende un sustrato de proteína de entrelazamiento y un agente de entrelazamiento no-tóxico. Opcionalmente, el agente de entrelazamiento no tóxico comprende transglutaminasa.

10 Opcionalmente la composición comprende además un agente hemostático adicional. Preferiblemente el agente hemostático adicional comprende además uno o más de albúmina, colágeno, fibrina, trombina, chitosán, sulfato férrico, u otros sulfatos metálicos.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un apósito de sellado o hemostático el cual comprende: (i) una primera capa de gelatina; (ii) una capa de transglutaminasa adyacente a la primera capa de gelatina; y (iii) una segunda capa de gelatina adyacente a la capa de transglutaminasa, en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la primera capa de gelatina y/o la segunda capa de gelatina.

15 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un apósito de sellado o hemostático el cual comprende: (i) una capa de material reabsorbible o no reabsorbible; (ii) una primera capa de gelatina adyacente a la capa de material; (iii) una capa de transglutaminasa adyacente a la primera capa de gelatina; y (iv) una segunda capa de gelatina adyacente a la capa de transglutaminasa, en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la primera capa de gelatina y/o la segunda capa de gelatina.

20 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un apósito de sellado o hemostático el cual comprende: i) una capa de gelatina; (ii) una capa de transglutaminasa adyacente a la capa de gelatina; en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la capa de gelatina.

25 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un apósito de sellado o hemostático el cual comprende: (i) una capa de material reabsorbible o no reabsorbible; (ii) una capa de gelatina adyacente a la capa de material; (iii) una capa de transglutaminasa adyacente a la capa de gelatina; en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la capa de gelatina.

30 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un apósito de sellado o hemostático el cual comprende: i) una capa de gelatina; (ii) una capa de material reabsorbible o no reabsorbible adyacente a la primera capa de gelatina; (iii) una capa de transglutaminasa adyacente a la capa de material; en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la capa de gelatina.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un dispositivo de sellado o hemostático el cual comprende: (i) una matriz reabsorbible no reabsorbible; (ii) gelatina (iii) una transglutaminasa; en donde la gelatina y la transglutaminasa están incorporadas dentro de la matriz.

35 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un dispositivo de sellado o hemostático el cual comprende: (i) una matriz de gelatina reabsorbible; (ii) una transglutaminasa; en donde la transglutaminasa se incorpora dentro de la matriz de gelatina.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un dispositivo de sellado o hemostático el cual comprende (i) una matriz porosa reabsorbible o no reabsorbible; (ii) gelatina; (iii) una transglutaminasa; en donde la gelatina y la transglutaminasa están adheridas a la matriz.

40 La capa de gelatina descrita anteriormente se espuma, por ejemplo, por mezclado de la solución de gelatina con aire presurizado y/u otro gas antes del secado. La espuma de gelatina está en un rango de densidad de 5 a 100 mg/cm³ y preferiblemente en el rango de 10 a 50 mg/cm³.

Opcionalmente, el apósito o dispositivo comprende además un material de soporte.

Preferiblemente, el material de soporte es reabsorbible.

45 Más preferiblemente, el material de soporte es un colágeno entrelazado o derivados de colágeno.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona un dispositivo médico para la inserción en un cuerpo de un humano o mamífero inferior, comprendiendo un agente hemostático o de sellado o la composición como se describe en este documento. Preferiblemente el dispositivo comprende un catéter vascular.

50 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una malla adhesiva quirúrgica para el refuerzo del tejido herido en el cuerpo de un humano o mamífero inferior, comprendiendo una malla implantable

reabsorbible o no reabsorbible cubierta con un agente hemostático o de sellado o la composición como se describe en este documento.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un parche que comprende una malla quirúrgica implantable, una matriz de proteína entrecruzable y una enzima de entrelazamiento de proteína en contacto con dicha matriz para el entrelazamiento de dicha proteína entrelazada, en donde dicha matriz se incorpora en, por capas o rodeando dicha malla, con la condición de que dicha enzima no es trombina.

10 Dicha proteína entrecruzable comprende gelatina. Dicha matriz de proteína entrecruzable es porosa. Dicha matriz porosa comprende espuma. Opcionalmente dicha enzima está presente en una capa que es coextensiva o no coextensiva con dicha matriz. Opcionalmente dicha enzima es incorporada ya sea de forma homogénea a través de la matriz o presente en la matriz a una profundidad de al menos 0.5 mm de la superficie de matriz. Opcionalmente dicha enzima está presente en dicha matriz a una profundidad de al menos 1 mm.

Opcionalmente dicha enzima está presente en dicha matriz a una profundidad de hasta 20 mm.

15 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un apósito que comprende una capa de proteína entrecruzable y una enzima de entrelazamiento dicha proteína entrecruzable, en donde dicha enzima está presente a una profundidad de al menos 0.5 mm en dicha capa de proteína y en donde dicha enzima no es una enzima derivada de la sangre.

20 Opcionalmente dicha enzima está presente en dicha capa de proteína a una profundidad de al menos 1 mm. Opcionalmente dicha enzima está presente en dicha capa de proteína a una profundidad de hasta 20 mm. Opcionalmente dicha proteína comprende gelatina, en donde dicha capa de proteína es opcionalmente espumada o porosa. Opcionalmente el parche o apósito comprende además una capa posterior de refuerzo.

25 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un parche, que comprende una capa de gelatina y una capa posterior de refuerzo, en donde dicha capa de gelatina comprende gelatina y una enzima integrada en un portador seleccionado de un grupo que consiste en: HPC (hidroxipropil celulosa), HPMC (hidroxipropil metilcelulosa), carboximetilcelulosa, hidroxietil celulosa, etilcelulosa, PVP (polivinil pirrolidona), (PVA) alcohol polivinílico, PEG (polietilenglicol), PEI (polietilenimina), almidón, celulosa microcristalina, celulosa oxidada.

30 Dicha gelatina comprende gelatina en espuma. Dicha gelatina en espuma comprende solución de gelatina secada o solución de gelatina liofilizada espumada. Opcionalmente dicha enzima está presente en una capa de enzima y en donde dicha gelatina se encuentra en una o más de las siguientes ubicaciones: dentro de dicho parche o apósito, sobre dicha capa de enzima, en dicha capa de enzima, en dicha capa posterior de refuerzo, sobre dicha capa posterior de refuerzo, en dicha capa posterior de refuerzo o entre dicha capa de enzima y en dicha capa posterior de refuerzo.

Opcionalmente dicha gelatina es gelatina en espuma y en donde antes de la formación de espuma, la concentración de la solución de gelatina es entre 0.1% y 30% p/p. Opcionalmente, antes de la espumación, la concentración de la solución de gelatina es entre 1% y 20% p/p. Opcionalmente, antes de la espumación, la concentración de la solución de gelatina es entre 5% y 15% p/p.

35 Dicha proteína entrecruzable está presente en una matriz de proteína y en donde dicha matriz tiene una densidad en un rango desde 5 a 100 mg/cm³. Opcionalmente dicha densidad está en un rango desde 10 a 50 mg/cm³.

Opcionalmente dicha gelatina en espuma se produce de acuerdo con un método seleccionado del grupo que consiste en un proceso de mezcla en lote, un proceso de mezcla continuo, un proceso químico de espumado o un proceso Venturi de espumado

40 Opcionalmente dicha proteína comprende gelatina y en donde dicha enzima comprende transglutaminasa (TG). Opcionalmente, la gelatina se incorpora en una matriz de gelatina con dicha transglutaminasa de tal manera que uno o más de los siguiente ocurre: una mayoría de la actividad enzimática es preservado a lo largo de un proceso de preparación; la enzima se distribuye igualmente alrededor de la superficie de la matriz de gelatina; y/o la enzima es incorporada en la profundidad de la matriz de gelatina (distribución gradiente o igual). Opcionalmente dicha transglutaminasa es incorporada en dicha matriz de gelatina de acuerdo con una o más mezcla antes del secado de dicha matriz o después del secado de dicha matriz, opcionalmente en donde dicha matriz se seca para comprender no más del 10% de contenido de humedad. Opcionalmente una densidad de dicha matriz está en un rango de 5 a 100 mg/cm³, o transglutaminasa está presente en una concentración de 0.05 a 2 mg transglutaminasa/cm³ de matriz de gelatina.

50 Opcionalmente el parche o apósito comprende además una capa posterior de refuerzo y en donde una malla quirúrgica está presente, en donde dicha malla quirúrgica se localiza en una o más de entre las capas de refuerzo y la matriz de gelatina; en el medio de la matriz de gelatina; o en la parte superior de la matriz de gelatina; o una combinación de los mismos.

- Opcionalmente la proteína entrecruzable incluye una pluralidad de unidades estructurales, y en donde más del 50% de dichas unidades estructurales son no-entrelazadas. Opcionalmente el parche o apósito comprendiendo además una capa posterior de refuerzo, en donde dicha capa posterior de refuerzo comprende un material reabsorbible.
- 5 Opcionalmente dicho material reabsorbible es seleccionado del grupo que consiste en celulosa, celulosa oxidada, sustancia proteica, tal como fibrina, queratina, colágeno y/o gelatina, o una sustancia carbohidrato, tales como alginatos, quitina, celulosa, proteoglicanos (por ejemplo, poli-N-acetil glucosamina), polímeros de ácido glicólico, polímeros de ácido láctico, o copolímeros de ácido glicólico/ácido láctico.
- Opcionalmente dicho parche puede cerrar una herida del tejido teniendo una presión de estallido de al menos 200 mmHg.
- 10 Opcionalmente el parche o apósito presenta una malla y está adaptado para la fijación de mallas quirúrgicas donde la malla puede ser adherida a la superficie de un órgano, superficie de un tejido o cavidad.
- Opcionalmente el parche o apósito está adaptado para cirugías inguinal, femoral, umbilical o reparación incisional de hernia ventral, u otros tipos de reconstrucción de mallas quirúrgicas.
- Opcionalmente el parche o apósito está adaptado para usar con un procedimiento de sutura reducido o grapado.
- 15 Opcionalmente el parche o apósito está adaptado para usar con una o más de grapas, clavos, o suturas para complementar la adherencia a la malla.
- Opcionalmente el parche o apósito comprende además un dispositivo médico integrado con dicho parche.
- Opcionalmente el parche o apósito está adaptado para cualquier reparación de grandes hernias diafragmáticas, para fijación de malla para rectopexia (prolapso rectal), para reconstrucción de un prolapso de bóveda vaginal, o para otras operaciones de refuerzo de malla del piso pélvico (procedimientos ginecológicos).
- 20 Opcionalmente dicha malla comprende cualquiera de una malla sintética, una malla biológica o una combinación de malla sintética -biológica.
- Opcionalmente el parche o apósito comprende además un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en: un antibiótico, un anticoagulante, un esteroide, un fármaco cardiovascular, un anestésico local, un fármaco antiproliferativo/antitumor, un antiviral, una citoquina, factores estimulantes de colonias; eritropoyetina; un antifúngico; un agente antiparasitario; agentes antiinflamatorios; anestésicos, tales como bupivacaína; analgésicos; antisépticos; y hormonas.
- 25 Opcionalmente el parche o apósito comprende además un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en vitaminas y otros suplementos nutricionales; glicoproteínas; fibronectina; péptidos y proteínas; carbohidratos (tanto simple y/o complejo); proteoglicanos; antiangiogénicas; antígenos; lípidos o liposomas; y oligonucleótidos (ADN o ARN sentido y/o antisentido).
- 30 Opcionalmente dicha citoquina se selecciona del grupo que consiste en alfa o beta o gamma interferón, factor de necrosis tumoral alfa o beta, e interleucinas.
- Opcionalmente dicho antiviral se selecciona del grupo que consiste en gangciclovir, zidovudina amantidina, vidarabina, ribaravina, trifluridina, aciclovir, dideoxiuridina y anticuerpos a componentes virales o productos de genes.
- 35 Opcionalmente dicho fármaco antitumoral se selecciona del grupo que consiste en 5-fluorouracilo (5-FU), taxol y/o taxotere.
- Opcionalmente dicho fármaco cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en bloqueadores del canal de calcio, vasodilatadores y vasoconstrictores; quimiotáticos
- 40 Opcionalmente dicho esteroide se selecciona del grupo que consiste en dexametasona, inhibidores de prostaciclina, prostaglandinas, leucotrienos y/o quininas para inhibir la inflamación.
- Opcionalmente dicho anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en proteína C activada, heparina, prostraciclina (PGI₂), prostaglandinas, leucotrienos, antitransglutaminasa III, ADPasa, y un activador de plasminógeno.
- 45 Opcionalmente dicho antibiótico se selecciona del grupo que consiste en tetraciclina, ciprofloxacina, amoxicilina y metronidazol.
- Opcionalmente el parche o apósito comprende además un agente de cicatrización de heridas.
- Opcionalmente el parche o apósito comprende además un agente hemostático.

- 5 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de producción de un parche o un apósito que comprende: producción de una matriz de proteína entrecruzable, comprendiendo una proteína entrecruzable; depositando una composición enzimática en dicha matriz de proteína a una profundidad de al menos 0.5 mm, en donde dicha composición enzimática comprende una enzima capaz de entrelazar dicha proteína entrecruzable; produciendo así el parche o apósito.
- Opcionalmente dicha proteína entrecruzable comprende gelatina en la forma de una solución de gelatina, que comprende la mezcla de dicha solución de gelatina en un mezclador a una velocidad para formar una solución de espuma, secando dicha solución de espuma para formar una solución seca y combinación de dicha solución seca con dicha enzima.
- 10 Opcionalmente dicho mezclado en dicha solución de gelatina comprende la mezcla de dicha solución de gelatina en un mezclador con aire presurizado, a una velocidad de mezcla y presión de aire para espumar la solución; en donde dicho método comprende además la liofilización de la solución de gelatina en espuma para formar una capa liofilizada de solución de gelatina.
- 15 Opcionalmente dicha velocidad es desde 100 RPM a 10.000 RPM. Opcionalmente dicha velocidad es desde 1000 RPM a 6000 RPM.
- Opcionalmente dicha velocidad es desde 0.1 cm³/segundo a 10.000 cm³/segundo por volumen de espuma.
- 20 Opcionalmente dicha proteína entrecruzable comprende gelatina en la forma de una solución de gelatina, que comprende la mezcla de dicha solución de gelatina con un agente químico espumante con el fin de espumar la solución; en donde dicho método comprende además el secado de la solución de gelatina en espuma a una capa seca de solución de gelatina.
- Opcionalmente dicho agente químico espumante comprende bicarbonato de sodio y en donde la mezcla de la solución de gelatina y el bicarbonato de sodio tiene un pH inferior a 7.
- 25 Opcionalmente dicha proteína entrecruzable comprende gelatina en la forma de una solución de gelatina, comprendiendo el forzado de dicha solución de gelatina a través de un tubo que presenta una pluralidad de orificios a una velocidad y presión con el fin de espumar la solución; en donde dicho método comprende además el secado de la solución de gelatina en espuma para formar una capa seca de la solución de gelatina.
- 30 Opcionalmente el método comprende además la producción de una capa de gelatina mezclando una solución de gelatina con dicha enzima, dicha enzima comprende transglutaminasa, para formar una solución de gelatina en espuma; en donde dicho método comprende además la liofilización de la solución de gelatina en espuma para formar una solución de gelatina liofilizada en espuma y adicionando dicha solución de gelatina liofilizada en espuma a dicho parche o apósito.
- Opcionalmente dicha transglutaminasa es adicionada a dicha solución de gelatina antes de dicha mezcla o durante dicha mezcla. Opcionalmente dicha transglutaminasa se adiciona a dicha solución de gelatina a través de transmisión continuo durante la mezcla.
- 35 Opcionalmente el método comprende además el enfriamiento de dicha solución de gelatina en espuma antes de que dicha liofilización sea realizada. Opcionalmente el método comprende además el espumado de una solución de gelatina para formar una solución de gelatina en espuma; secando la solución de gelatina en espuma para formar dicha solución de gelatina en espuma; y adicionando dicha transglutaminasa en una solución a dicha solución de gelatina seca en espuma para formar una espuma que contiene espuma.
- 40 Opcionalmente dicha transglutaminasa en dicha solución seca comprende una o más de atomizadores de una solución enzimática sobre la superficie de la matriz de gelatina seca; inyectando una solución de enzimas en la matriz de gelatina a través de agujas o matriz de agujas; sumergiendo la matriz de gelatina seca en una mezcla de solvente que contiene a la enzima; y/o dispensando una mezcla de solvente que contiene a la enzima sobre la matriz seca de gelatina.
- Opcionalmente el método comprende además el secado de dicha enzima que contiene espuma.
- 45 Opcionalmente dicho secado de dicha espuma que contiene la enzima comprende de uno o más secado al aire, secado al vacío, liofilización y/o secado por calor
- Opcionalmente dicha enzima comprende transglutaminasa y dicha transglutaminasa comprende cualquier tipo de transglutaminasa (mTG) dependiente o independiente del calcio. Opcionalmente dicha transglutaminasa comprende una transglutaminasa microbiana.

- Opcionalmente el secado se produce a una temperatura de hasta 30 °C. Opcionalmente dicho secado se produce a una temperatura de hasta 20 °C. Opcionalmente dicho secado se produce en una pluralidad de temperaturas que oscilan entre 0 °C a 20 °C.
- 5 Opcionalmente el parche o apósito comprende una pluralidad de capas de gelatina y en donde opcionalmente cada una de dichas capas de gelatina tiene un porcentaje diferente de concentración de gelatina. Opcionalmente al menos una capa de gelatina comprende un porcentaje de gelatina de 1% p/p a 15% p/p. Opcionalmente al menos una capa de gelatina comprende un porcentaje de gelatina de 2.5% p/p a 10% p/p. Opcionalmente al menos una capa de gelatina comprende un porcentaje de gelatina de al menos 5% p/p.
- 10 Opcionalmente al menos una capa de gelatina comprende un lubricante. Opcionalmente dicho lubricante comprende glicerina. Opcionalmente dicha glicerina está presente en una cantidad desde 0.1% y 10%. Opcionalmente dicha glicerina está presente en una cantidad de 2% a 6%.
- El uso de un parche o apósito como se describe en este documento, para el tratamiento de heridas crónicas. Opcionalmente dichas heridas crónicas incluyen úlceras diabéticas cutáneas
- 15 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de heridas crónicas en un paciente en necesidad de las mismas que comprende la adhesión a dichas heridas crónicas un parche o apósito de acuerdo con alguna de las anteriores reivindicaciones. Opcionalmente dichas heridas crónicas incluyen úlceras diabéticas en la piel.
- 20 De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un apósito hemostático, adhesivo tisular o composición de cierre de herida comprendiendo una matriz de proteína porosa entrecruzable y una enzima no derivada de la sangre que induce entrelazamiento de la proteína entrecruzable, en donde la densidad de la matriz está en el rango de 5 a 100 mg/cm³. Opcionalmente dicha densidad está en un rango desde 40-70 mg/cm³. Opcionalmente el parche o apósito tiene un contenido de humedad total inferior al 30%, un contenido total de humedad inferior al 20% o un contenido total de humedad inferior al 10%.
- 25 Opcionalmente una relación de enzima con la matriz es de 0.05 a 5 mg/cm³ enzima/ cm³ de matriz. Opcionalmente dicha relación es 0.5 a 2.5 mg/cm³ enzima/ cm³ de matriz.
- Opcionalmente la solución comprende una emulsión o suspensión.
- Opcionalmente el parche o apósito comprende además una capa posterior de refuerzo, en donde dicha capa posterior de refuerzo comprende un material no reabsorbible.
- 30 Opcionalmente dicho material no reabsorbible se selecciona del grupo que consiste en silicona, látex, poliuretano, polipropileno, polietileno, silastic, tereftalato de polietileno (PET), dacrón, dacrón de punto, dacrón velour, poliglacina, nylon, elastómero silástico de cloruro de polivinilo, [poli-(metil metacrilato de metilo) PMMA, poliolefina, celulosa, alcohol polivinílico (PVA), poli(hidroxiethyl metacrilato (PHEMA), poli(ácido glicólico), poli(acrilonitrilo) (PAN), fluoroetilen-cohexafluoropropileno (FEP), Teflón (PTFE), aleaciones Co-Cr, copolímeros de las mismas y mezclas de los mismos.
- 35 Opcionalmente dicha proteína entrecruzable se proporciona como una matriz de proteína, que comprende además una capa posterior de refuerzo, en donde dicha capa posterior de refuerzo es modificada mecánicamente para aumentar el área superficial de la interface de la matriz de proteína con la capa posterior.
- Opcionalmente dicha modificación mecánica comprende uno o más de grabado, tallado, cortado, grabado, o texturizado.
- 40 De acuerdo con al menos algunas realizaciones, se proporciona un método de producción de un parche o apósito de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de enzima o solución de solvente que contiene la enzima comprende la enzima en una solución o suspensión incorporando uno o más solventes volátiles.
- 45 Opcionalmente el solvente volátil comprende uno o más de acetato de etilo, benceno, cloruro de metileno, acetona, acetonitrilo, cloroformo, siliconas líquidas volátiles (hexametildisiloxano(HMDS), octametilclotetrasiloxano, decametilciclopentasiloxano, octametiltrisiloxanos), alcanos volátiles (n-hexano, isooctano, octano, neopentano), fluorocarbonos volátiles (pentafluoropropano, perfluoroheptano, perfluorometilciclohexano), alcoholes (1-propanol, 2-propanol, etanol) y mezclas de los mismos.
- Opcionalmente, la enzima está encapsulada antes de la incorporación en el parche o recubrimiento. Opcionalmente, la enzima está encapsulada en un material seleccionado del grupo que consiste de: PLA, PGA, PLGA, k-carragenano, liposomas, gelatina, colágeno, fibrinógeno, albúmina, polietilenglicol, polivinil alcohol, éteres de celulosa.
- 50 Opcionalmente la enzima es encapsulada por una técnica seleccionada del grupo que consiste en: boquilla vibracional y secado por pulverización, recubrimiento en bandeja, recubrimiento de suspensión de aire, extrusión centrifuga (co-

extrusión), métodos fisicoquímicos (gelación inotrópica o coacervación), métodos químicos (policondensación interfacial, entrelazamiento interfacial, polimerización *in situ* y matriz de polimerización).

Opcionalmente la enzima es modificada químicamente antes de incorporarla en el parche o apósito.

5 Opcionalmente el parche o apósito es esterilizado para garantizar un nivel de esterilidad de 10^{-6} a través de la exposición a radiación de haz de electrones. Opcionalmente la dosis de radiación está en el rango de 10 a 50 kGy. Opcionalmente, la dosis de radiación está en el rango de 20 a 40 kGy.

10 Opcionalmente el parche o apósito comprende además una radioprotector seleccionado del grupo que consiste en ascorbato, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, hidroxianisol butilado (BHA), clorobutanol, cisteína, manitol, metil parabeno, niacinamida, fenol, propilenglicol, propilgalato, propil parabeno, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, salicilato de sodio, tiosulfato de sodio, tocoferol, trehalosa.

Opcionalmente el parche o apósito comprende además un regulador opcionalmente seleccionado del grupo incluyendo acetato de sodio, HEPES, citrato de sodio, benzoato de sodio.

15 Opcionalmente el parche o apósito comprende además de uno o más plastificantes y/o potenciadores de flexibilidad, opcionalmente seleccionados del grupo que consiste en glicerol, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), polisorbato 20, polisorbato 80;

Opcionalmente el parche o apósito comprende además uno o más estabilizantes de espuma, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en surfactantes iónicos (i.e. SDS), hidroxipropilmetil celulosa, ácido hialurónico, glicina, dextrano.

20 Opcionalmente una pluralidad de segmentos de matriz de proteína que contienen enzimas discretas juntos forman un solo parche o apósito. Opcionalmente cada segmento es de un diámetro en rango de 0.1 a 10 cm. Opcionalmente cada segmento es de un diámetro en el rango de 1 - 5 cm.

Se debe entender que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son solamente de ejemplo y explicativas y están destinadas a dar una explicación más detallada de la invención como se reivindica.

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que es comúnmente entendido por un experto normal en el arte al cual pertenece esta invención. Todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones mencionadas en este documento son incorporadas en este documento por referencia.

30 Como se usa en este documento, una capa de transglutaminasa que se dice ser "no coextensiva" con una capa de gelatina es una en la cual los límites espaciales de la capa de transglutaminasa en dos dimensiones son más pequeñas que los límites espaciales de una o ambas capas de gelatina tal como la capa de transglutaminasas es coextensiva solamente con solo aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área superficial de la primera capa de gelatina del apósito hemostático y/o coextensiva con aproximadamente 5% a aproximadamente 95% de la segunda capa de gelatina del apósito hemostático, independientemente. Por ejemplo, la capa de transglutaminasa puede ser coextensiva con cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, o 90% del área superficial de cada una de las primeras y segundas capas de gelatina independientemente. Una capa de transglutaminasa que es "coextensiva" con una capa de gelatina proporciona cobertura completa de la capa de gelatina y es coextensiva con 100% del área superficial de la capa de gelatina. Una capa de transglutaminasa puede ser no coextensiva con la primera capa de gelatina y aun ser coextensiva con la segunda capa de gelatina, o viceversa, por ejemplo, por empleo de capas de gelatina que tengan diferentes áreas totales de superficie o formas.

40 "Paciente" como se utiliza en este documento se refiere a individuos humanos o animales que necesitan cuidado médico y/o tratamiento.

45 "Herida" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier daño a cualquier tejido de un paciente lo que resulta en pérdida de sangre del sistema circulatorio o pérdida de cualquier líquido corporal desde su ruta fisiológica. El tejido puede ser un tejido interno, tal como un órgano o un vaso sanguíneo o un tejido externo, tal como la piel. La pérdida de sangre o fluidos corporales pueden ser internas, tal como la ruptura de un órgano, o externa, tal como de una laceración. Una herida puede estar en un tejido blando, como un órgano, o en un tejido duro, tal como el hueso. El daño puede haber sido causado por cualquier agente o fuente, incluyendo una lesión traumática, infección o intervención quirúrgica. El daño puede ser mortal o no mortal.

50 "Material reabsorbible" como se utiliza en este documento se refiere a un material que se descompone espontáneamente y/o por el cuerpo de los mamíferos en componentes los cuales son consumidos o eliminados de tal manera que no interfieran significativamente con la cicatrización de la herida y/o la regeneración de los tejidos, y sin causar cualquier alteración metabólica significativa.

"Estabilidad" como se utiliza en este documento se refiere a la retención de esas características de un material que determina actividad y/o función.

5 "Agente aglutinante" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que mejora la adherencia de una capa de un apósito hemostático para una o más capas diferentes y/o a la adherencia de los componentes de una capa dada a otros componentes de esa capa.

"Agentes solubilizantes" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que mejoran la disolución de una proteína o proteínas en un solvente acuoso (preferiblemente).

"Agente de carga" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que proporcionan volumen y/o porosidad a una o más capas de los apósitos hemostáticos.

10 "Agente de Liberación" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que facilitan la extracción de un apósito hemostático desde un molde de fabricación.

"Agente Espumante" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que producen gas cuando son hidratados en condiciones apropiadas.

15 "TG" se refiere a la transglutaminasa de cualquier tipo; "mTG" también se puede referir a transglutaminasa microbiana y/o a cualquier tipo de transglutaminasa, dependiendo del contexto (a continuación, en los ejemplos experimentales específicos el término se refiere a transglutaminasa microbiana).

El término "mamífero", particularmente por cuanto respecta al método de tratamiento y/o uso o aplicación de un dispositivo y/o composición, se refiere tanto a seres humanos como a mamíferos inferiores, a menos que se especifique lo contrario.

20 Como se usa en este documento, "aproximadamente" significa más o menos aproximadamente el diez por ciento del valor indicado.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes desde la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

25 La invención se describe en este documento, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos acompañantes. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que las particulares mostradas son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y son presentadas con el fin de proporcionar lo que se considera sea la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se intenta mostrar detalles
30 estructurales de la invención en más detalles que sean necesarios para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en el arte cómo las diferentes formas de la invención pueden ser realizadas en la práctica.

En los dibujos:

35 La figura 1 muestra los resultados de las pruebas de presión de estallido de las composiciones de los ejemplos 1-6; los resultados del ejemplo #1 están de acuerdo con las pruebas básicas de presión de estallido, mientras que los resultados de los ejemplos #2-6 están de acuerdo con la prueba avanzada de BP.

La figura 2 muestra un diagrama esquemático de bloques de un sistema de prueba de presión de estallido de instron de ejemplo

La figura 3 muestra el perforador utilizado en el ejemplo # 4.

40 La figura 4 muestra el diagrama de flujo para el ejemplo #4.

La figura 5 muestra el diagrama de flujo para el ejemplo #6.

La figura 6 muestra un vendaje de ejemplo como se construye para el ejemplo # 8

La figura 7 muestra un vendaje de ejemplo como se construye para el ejemplo # 3.

45 La figura 8 demuestra una malla parietene, como se utiliza en el ejemplo # 22, de conformidad con algunas realizaciones demostrativas.

La figura 9 demuestra una malla parietene unida a una abrazadera móvil, como se utiliza en el ejemplo # 22, de conformidad con algunas realizaciones demostrativas.

La figura 10 es un gráfico ilustrativo que demuestra los resultados presentados en la Tabla # 8.

La figura 11 es un gráfico ilustrativo que demuestra los resultados presentados en la Tabla # 8.

5 La figura 12 es un gráfico ilustrativo que muestra los resultados de la prueba de estallido de los ejemplos 1-18.

La figura 13 muestra un patrón grabado en una hoja de silicona.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención, como se definió en las reivindicaciones, es de un material adhesivo que comprende una proteína entrecruzable y un material no tóxico el cual induce el entrelazamiento de la proteína entrecruzable. La proteína entrecruzable incluye gelatina y cualquier variante de gelatina o variante de proteína como se describe en este documento. El material no tóxico comprende una enzima, más preferiblemente, el material no tóxico comprende transglutaminasa (TG), la cual puede opcionalmente comprender cualquier tipo de transglutaminasa (mTG) dependiente de o independiente de calcio, la cual puede por ejemplo ser opcionalmente una transglutaminasa microbiana. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el material adhesivo se proporciona en un vendaje, que es preferencia es adaptado para su uso como un vendaje hemostático. Diversas realizaciones de la presente invención se describen con mayor detalle a continuación, en los encabezados de sección que se proporcionan en aras únicamente de la claridad, y sin ninguna intención de ser limitantes en modo alguno.

Gelatina y transglutaminasa

20 De acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, se proporciona una composición para la hemostasis y sellado de tejido en la cual el material de entrelazamiento comprende transglutaminasa y la proteína entrecruzable comprende gelatina.

De acuerdo con una realización preferida, la transglutaminasa está presente en un nivel de actividad específica de al menos aproximadamente 15 U/mg.

25 La gelatina apropiada y la transglutaminasa pueden ser obtenidas mediante cualquiera de los métodos conocidos y disponibles para aquellos expertos en el arte. La gelatina opcionalmente puede comprender cualquier tipo de gelatina que comprenda proteína que sea conocida en el arte, preferiblemente incluyendo pero no limitando a gelatina obtenida por hidrólisis parcial de tejidos animales y/o colágeno obtenido a partir de tejido animal, incluyendo pero no limitando a piel de animal, tejido conectivo (incluyendo pero no limitando a ligamentos, cartílagos y similares), cornamentas o cuernos y similares, y/o huesos y/o escamas de pescado y/o huesos u otros componentes; y/o una gelatina recombinante producida utilizando bacterias, levaduras, animales, insectos, o sistemas de plantas o cualquier tipo de cultivo celular.

30 De acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, la gelatina de origen animal preferiblemente comprende gelatina de orígenes de mamíferos y más preferiblemente comprende una o más pieles de cerdo, huesos de cerdo y ganado, o pieles de ganado divididas, o cualquier otra fuente bovina o porcina. Más preferiblemente, dicha gelatina comprende de gelatina porcina, dado que esta tiene una velocidad más baja de anafilaxis. La gelatina de origen animal puede opcionalmente ser de tipo A (tratamiento con ácido) o de tipo B (tratamiento con álcali), aunque es preferiblemente de tipo A.

35 Preferiblemente, la gelatina de origen animal comprende gelatina obtenida durante la primera extracción, la cual generalmente se realiza a temperaturas más bajas (50-60 °C, aunque este rango de temperatura exacto no es necesariamente una limitación). La gelatina producida de esta manera estará en el rango de floración de 250-300 y tendrá un alto peso molecular de al menos 95-100 kDa. Preferiblemente, la gelatina se usará en floración de 275-300.

Un ejemplo sin limitación de un productor de dichas gelatinas es PB Gelatins (Tessenderlo Group, Bélgica).

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la gelatina de origen animal opcionalmente comprende gelatina de pescado. Opcionalmente cualquier tipo de pescado puede ser utilizado, preferiblemente una variedad de peces de agua fría tales como carpa, bacalao, o lucio o atún. El pH de esta gelatina (medido en una solución al 10%) preferiblemente oscila entre 4-6.

45 La gelatina de peces de agua fría forma una solución en agua a 10 °C y así toda la gelatina de peces de agua es considerada de floración 0. Para la actual invención, un alto peso molecular de la gelatina de peces de agua fría es preferiblemente usada, más preferiblemente incluyendo un peso molecular de al menos aproximadamente 95-100 kDa. Esto es equivalente al peso molecular de gelatina animal de una floración de 250-300. Un ejemplo sin limitación de un productor de dicha gelatina es Norland Productos (Cranbury, NJ).

5 En una realización preferida de la invención, la gelatina es purificada para remover sales. Esto se puede llevar a cabo de acuerdo con las técnicas descritas anteriormente. Una de estas técnicas implica formación de una solución al 20% p/v de gelatina en agua y calentamiento a 60 °C bajo agitación. A continuación, la mezcla se deja en reposo durante toda la noche. El gel obtenido es dializado frente a cambios repetidos de agua desionizada para eliminar sales, agitado y calentado a 50 °C para disgregar la red física. La solución final fue filtrada y liofilizada. (Crescenzi V, Francescangeli A, Taglienti A. (2002 Biomacromolecules. 3:1384-1391). Alternativamente, la gelatina puede ser desalificada mediante exclusión de tamaño por columna.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, una gelatina recombinante es utilizada. Las Gelatinas recombinantes son actualmente producidas y comercializadas por FibroGen (San Francisco, CA). Actualmente, el método preferido es usar un sistema de levadura recombinante (*Pichia pastoris*) para expresar fragmentos especificados de colágeno de secuencia humano alfa1, Tipo I.

15 En una realización preferida opcional de la presente invención, las gelatinas recombinantes son moléculas completamente sintéticas, que no contienen componentes contaminantes procedentes de humanos o animales. Por "sintéticas" se entiende que la gelatina es preferiblemente producida de acuerdo con un método seleccionado a partir de síntesis química, síntesis de proteína de células libres, cultivo de tejidos celulares, cualquier tipo cultivos de bacterias, insectos, o levaduras, o en plantas. El uso de gelatinas sintéticas elimina muchas de las variables e inconvenientes asociados con materiales derivados de tejidos, incluyendo respuestas inmunes indeseadas provocadas. Por ejemplo, las gelatinas de pescado demuestran gran alergenicidad y gelatinas animales demuestran baja a moderada alergenicidad, mientras que gelatinas recombinantes puede tener cero alergenicidad. En estudios de seguridad humana, 20 ningún evento adverso relacionado con la gelatina recombinante fue encontrado.

Los métodos de creación de gelatinas recombinantes y los beneficios de su uso están completamente descritos en las Patentes de los Estados Unidos 6,413,742 y 6,992,172, las cuales son por este medio incorporadas mediante la referencia como está completamente establecido en este documento.

25 Las gelatinas recombinantes pueden ser producidas para ser altamente purificadas (99%). La producción de gelatina recombinante permite la producción opcional de gelatinas con al menos una característica definida y predeterminada, incluyendo, pero no limitando a pesos moleculares definidos, pi (punto isoeléctrico), garantizando la reproducibilidad lote a lote, y la capacidad de adaptar la molécula para coincidir una aplicación específica.

30 Un ejemplo de adaptación de una molécula para coincidir con una aplicación específica ha sido previamente descrito en donde una gelatina fue creada para ser altamente hidrofílica (Werten MWT, et al. (2001). Protein Engineering. 14 (6): 447-454). Opcionalmente y preferiblemente una gelatina de acuerdo con la presente invención comprende una gelatina que tiene al menos una característica ajustada, adaptada o predeterminada.

35 La gelatina empleada en el apósito hemostático puede ser un complejo de gelatina o cualquier gelatina, o un derivado o metabolito de la misma, o una gelatina producida de acuerdo con un proceso único o una pluralidad de procesos. Por ejemplo, la gelatina puede opcionalmente comprender gelatina Tipo A o gelatina Tipo B, o una combinación de las mismas.

La transglutaminasa puede opcionalmente comprender cualquier transglutaminasa derivada de planta, animal o microbio, preferiblemente distinto al de los derivados de sangre Factor XIII Preferiblemente, la transglutaminasa microbiana derivada de *Streptoverticillium mobaraensis* es utilizada.

40 La transglutaminasa puede estar opcionalmente en una composición que comprenda al menos una otra sustancia, tal como un estabilizador o agente de carga, por ejemplo. Ejemplos sin limitaciones de tales materiales incluyen maltodextrina, proteína de leche desnatada hidrolizada o cualquier otra sustancia proteica, cloruro de sodio, aceite de cártamo, fosfato trisódico, caseinato de sodio o lactosa, o una combinación de los mismos.

45 Aunque el pH óptimo para la actividad de la transglutaminasa en bruto es 6.0, también funciona esta con alta actividad en el rango de pH 5.0 a pH 8.0. Por lo tanto, una composición de acuerdo con la presente invención para hemostasis preferiblemente tiene un valor de pH en un rango desde aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

50 La transglutaminasa presenta un coeficiente negativo de temperatura. Sobre el rango de temperatura de la actividad de la transglutaminasa, esta toma un tiempo más corto para reaccionar a temperaturas más altas y mayor cantidad de tiempo para comenzar a funcionar a temperaturas más bajas. La siguiente tabla muestra los diferentes tiempos de reacción a diferentes temperaturas en comparación con el mismo grado de reacción a 50 °C, con un pH de 6.0 que se produce en 10 minutos:

Tabla 1- Temperatura de reacción de transglutaminasa

Temperatura	5°C	15°C	20°C	30°C	40°C
-------------	-----	------	------	------	------

Tiempo (minutos) 240 105 70 35 20

- Ejemplos sin limitaciones de productos comercialmente disponibles de transglutaminasa incluyen aquellos producidos por Ajinomoto Co. (Kawasaki, Japón). Un ejemplo preferido de dicho producto de esta compañía es la TG-TI Activa (En Europa: Activa WM) - Ingredientes: mTG y maltodextrina; Actividad: 81-135 U/g de Activa. Otros ejemplos no limitantes de productos apropiados de esta compañía incluyen Activa TG-FP (ingredientes: proteína de leche descremada hidrolizada, mTG; actividad: 34-65 U/g de Activa TG-FP); Activa TG-GS (ingredientes: cloruro de sodio, gelatina, fosfato trisódico, maltodextrina, mTG, y aceite de cártamo (auxiliar de proceso); actividad: 47-82 U/g de Activa TG-GS); Activa TG-RM (en Europa: Activa EB) - Ingredientes: caseinato de sodio, maltodextrina y mTG; actividad: 34-65 U/g de Activa; Activa MP (ingredientes: mTG, Lactosa y Maltodextrina; actividad: 78 - 126 U/g de Activa).
- 5
- 10 Otros ejemplos no limitantes de los productos de transglutaminasa disponibles comercialmente incluyen aquellos producidos por Yiming Biological Products Co. (Jiangsu, China). Un ejemplo preferido en dicho producto de esta compañía es la TGB (ingredientes: 1% de mTG, 99% de co-proteína; actividad: 80 -130 U/g de TG-B). Otros ejemplos no limitantes de productos apropiados de esta compañía incluyen TG-A (ingredientes: 0.5% de mTG, 99,5% de co-proteína; actividad: 40 - 65 U/g de TG-A).
- 15 Para ambos ejemplos, los productos de transglutaminasa preferidos son aquellos con mayor actividad específica y co-ingredientes más simples, ya que se cree (sin desear estar limitados por una sola hipótesis) que tienen mejor reactividad después de la aplicación y un bajo potencial de efectos secundarios indeseados.
- En otra realización, una transglutaminasa puede opcionalmente ser extraída de *Streptovercillium Baldaccii* o una cepa de *Streptomyces Hygroscopicus* para producir variantes de enzimas que han sido mostradas para funcionar óptimamente a temperaturas más bajas (aproximadamente 37°C y 37°C-45°C, respectivamente) (Negus SS. A Novel Microbial Transglutaminase Derived From Streptovercillium Baldaccii. PhD Thesis. School of Biomolecular and Biomedical Science. Griffith University, Queensland, Australia and Cui L et al. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated Streptomyces hygroscopicus. 2007: 105(2). p. 612-618.). La mayor actividad específica a bajas temperaturas es deseable para alcanzar un rápido y más fuerte entrelazamiento de la gelatina bajo condiciones ambiente.
- 20
- 25 De acuerdo con algunas realizaciones, la transglutaminasa se puede utilizar en la forma de alguna de las composiciones anteriormente descritas, opcionalmente incluyendo algunas de las mezclas comercialmente disponibles que incluyan transglutaminasa.
- En otra realización, cualquiera de las mezclas de transglutaminasa anteriormente citadas opcionalmente pueden ser purificadas por medio de filtración en gel, cromatografía de intercambio catiónico, filtración en fibra hueca o filtración de flujo tangencial para remover sus proteínas portadoras y/o carbohidratos. Algunos de estos métodos han sido previamente descritos (Bertoni F, Barbani N, Giusti P, Ciardelli G. Transglutaminase reactivity with gelatine: perspective applications in tissue engineering. Biotechnol Lett (2006) 28:697-702) (Broderick EP, et al. Enzymatic Stabilization of Gelatin-Based Scaffolds J Biomed Mater Res 72B: 37-42, 2005). El tamaño de poro del filtro preferiblemente utilizado para la filtración es de aproximadamente 10 kDA.
- 30
- 35 Preferiblemente, la transglutaminasa es purificada en un proceso que incluye cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía hidrófoba, y ultrafiltración, como se describe más completamente en la Solicitud PCT No. PCT/IB2009/052605, presentada el 18 de junio de 2009, propiedad en común con la presente solicitud y que tiene al menos algunos inventores en común con la presente solicitud.
- 40 Independientemente, la actividad de transglutaminasa es preferiblemente medida antes del uso y/o fabricación de una composición de acuerdo con la presente invención con un ensayo de reactividad de transglutaminasa. Dicho ensayo puede opcionalmente incluir, pero no está limitado al Método del Hidroxamato, Ensayo de Nessler, un Ensayo Colorimétrico, o cualquier otro ensayo de actividad de transglutaminasa (véase, por ejemplo, Folk JE, Cole PW. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. Biochim Biophys Acta. 1966; 122:244-64; o el Ensayo de Nessler como se describe en: Bertoni F, Barbani N, Giusti P, Ciardelli G. Transglutaminase reactivity with gelatine: perspective applications in tissue engineering. Biotechnol Lett (2006) 28:697-702).
- 45
- 50 En general, la pureza y/o la calidad de la gelatina y/o la transglutaminasa para uso en la composición hemostática será de una pureza apropiada conocida para un experto en el arte relevante para llevar a la eficacia y estabilidad de la proteína.
- Uno o más suplementos también pueden estar contenidos en el hemostático o producto sellante, por ejemplo, drogas tales como factores de crecimiento, anticuerpos policlonales y monoclonales y otros componentes. Ejemplos ilustrativos de tales suplementos incluyen, pero no están limitados a: antibióticos tales como la tetraciclina y ciprofloxacina, amoxicilina y metronidazol, anticoagulantes, tales como la proteína C activada, heparina, prostraciclina (PGI₂), prostaglandinas, leucotrienos, antitransglutaminasa III, ADPasa y activador del plasminógeno; esteroides, tales como
- 55

5 dexametasona, inhibidores de la prostaciclina, prostaglandinas, leucotrienos y/o quininas para inhibir la inflamación; fármacos cardiovasculares, tales como bloqueadores de los canales de calcio, vasodilatadores y vasoconstrictores; quimioatrayentes; anestésicos locales tales como la bupivacaína; y fármacos antiproliferativos/ antitumorales tales como 5-fluorouracilo (5-FU), taxol y/o taxoter; antivirales, tales como ganciclovir, zidovudina, amantidina, vidarabina, ribavavina, trifluridina, aciclovir, dideoxiuridina y anticuerpos a componentes virales o productos génicos; citoquinas, tales como interferón alfa o beta o gamma, factor de necrosis tumoral alfa o beta, e interleucinas; factores estimulantes de colonias; eritropoyetina; antifúngicos, tales como diflucan, ketaconazol y nistatina; agentes antiparasitarios, tales como pentamidina; agentes antiinflamatorios, tales como -alfa-1-anti-tripsina y alfa-1-antiquimotripsina; anestésicos, tales como la bupivacaína; analgésicos; antisépticos; y hormonas. Otros suplementos ilustrativos incluyen, pero no están limitados a: vitaminas y otros suplementos nutricionales; glicoproteínas; fibronectina; péptidos y proteínas; carbohidratos (tanto simples y/o complejos); proteoglicanos; antiangiogénicas; antígenos; lípidos o liposomas; y oligonucleótidos (ADN o ARN sentido y/o antisentido).

Integración de la Enzima

15 La enzima opcionalmente puede ser integrada en un portador, incluyendo sin limitación un portador seco (incluyendo, pero no limitando a un polvo o una matriz) o un portador líquido (incluyendo sin limitación cualquier tipo de apropiado solvente).

20 Con respecto al portador, la enzima puede opcionalmente estar integrada a uno o más materiales portadores, incluyendo, pero no limitando a cualquier tipo de polímero celulósico (incluyendo, pero no limitando a uno o más de HPC (hidroxipropil celulosa), HPMC (hidroxipropil metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa o etilcelulosa); PVP (polivinil pirrolidona); almidón; celulosa microcristalina; y similares.

Opcionalmente el portador puede también comprender un agente de carga. Ejemplos de agentes de carga apropiados incluyen celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, acetato de celulosa, almidón, lactosa, glucosa, fructosa, sacarosa, fosfato dicálcico, sorbitol, manitol, mantitol, lactitol, xilitol, isomalta, eritritol, e hidrolizados de almidón hidrogenado, o una mezcla de éstos.

25 En algunas realizaciones demostrativas la enzima opcionalmente puede ser integrada en un portador (por ejemplo, HPMC) que luego pueden ser superpuesto o integrado en y/o sobre la matriz de gelatina, por ejemplo, antes y/o después del secado de la matriz de gelatina.

30 El portador también puede opcionalmente comprender uno o más solventes, incluyendo, pero no limitando a etanol y acetonitrilo, opcionalmente en combinación. Estos solventes se pueden utilizar opcionalmente como portadores para la enzima, la cual puede luego ser opcionalmente goteada, rociada o de otra manera combinada con una o más capas de un vendaje, parche u otra composición (por ejemplo, mediante goteo, rociado o de otra manera combinado con una capa de gelatina).

35 Otros ejemplos de solventes volátiles que pueden ser opcionalmente empleados incluyen pero no se limitan a uno o más de acetato de etilo, benceno, cloruro de metileno, acetona, cloroformo, siliconas líquidas volátiles (hexametildisiloxana (HMDS), octametilciclotetrasiloxano, decametilciclopentasiloxano, octametiltrisiloxanos), alcanos volátiles (n-hexano, isooctano, octano, neopentano), fluorocarbonos volátiles (pentafluoropropano, perfluoroheptano, perfluorometilciclohexano), alcoholes (incluyendo pero no limitando a uno o más de 1-propanol, 2-propanol, etanol) y mezclas de los mismos

40 En algunas realizaciones demostrativas la enzima puede opcionalmente ser suministrada como un polvo que luego es combinado con un portador, tal como etanol (ya sea disuelta o en suspensión) para pulverizado, goteado y así sucesivamente.

Preparación de la composición

45 En otra realización de la invención, la gelatina en la mezcla de gelatina-mTG es sometida a uno o más métodos de secado que implican el uso de liofilización antes de su mezcla con la mTG. Estos métodos de secado aumentan la solubilidad de la gelatina mediante el aumento del área de superficie de la matriz de gelatina seca. Los métodos de secado pueden aumentar la solubilidad de gelatina sin cualquier aditivo y sin alterar las condiciones ambientales bajo los cuales se forman las soluciones de gelatina o gelatina-mTG. No obstante, la adición de determinados aditivos, como plastificantes o estabilizantes, o la manipulación de ciertos factores ambientales, tales como la temperatura, concentración iónica, y la presión osmótica, de las soluciones de gelatina o gelatina-mTG pueden ser utilizadas para mejorar además las propiedades de una mezcla de gelatina-mTG que ya incorporan la gelatina secada utilizando una técnica de liofilización que reduce su punto de fusión.

Pre-Mezclado de la Gelatina-mTG liofilizada

En otra realización de la invención, la mezcla de gelatina-mTG es sometida a liofilización una vez la gelatina y mTG ya han sido mezclados en solución. Esto resulta en una mezcla uniforme, una mezcla de gelatina-mTG liofilizada donde la

5 gelatina en forma seca está en contacto con la mTG en forma seca. En esta realización, la gelatina y mTG son simultáneamente reconstituidas a partir del estado liofilizado e inmediatamente forman una solución en el sitio de la reconstitución. Esta técnica puede preferencialmente ser usada con gelatina o una mezcla de gelatina que ya tiene un punto de fusión inferior a la de la gelatina estándar dado que la actividad de mTG disminuye exponencialmente a bajas temperaturas (por debajo de 37 °C).

10 Por lo tanto, una solución que consiste en gelatina y mTG de reducido punto de fusión puede ser formado a baja temperatura sin rápido entrelazamiento y sin la aparición de gelación. Esta solución puede ser entonces liofilizada, resultando en una mezcla seca de gelatina y mTG distribuidas homogéneamente. Dicha mezcla puede ser rápidamente reconstituida para formar un gel cuando se pone en contacto con un solvente más cálido. Dicha técnica podría preferencialmente ser utilizada en un apósito de herida, donde los fluidos corporales en su temperatura natural de 37 °C pueden reconstituir la gelatina y mTG.

15 En otra realización de la actual invención, una o más de las técnicas descritas anteriormente para mejorar un producto que contiene gelatina y mTG se utilizan en unísono o en serie. Esto puede preferencialmente incluir el uso de dos o más plastificantes juntos en una solución de gelatina o gelatina-mTG, utilizando uno o más de los plastificantes en una solución de gelatina o gelatina-mTG antes del secado de esta. Esto también puede incluir el secado de la gelatina o gelatina-mTG, disolviendo la gelatina seca o gelatina-mTG en la solución y luego volver a secar la gelatina o gelatina-mTG.

Vendajes

20 Una realización de ejemplo de la presente invención está dirigida a un apósito hemostático, por ejemplo, para el tratamiento de tejidos heridos de un paciente, el cual comprende la gelatina y la transglutaminasa, preferiblemente separadas hasta su interacción se requiera o desee para la actividad del vendaje. El vendaje puede opcionalmente presentar un soporte no absorbente, tal como una película de soporte. El vendaje puede también presentar opcionalmente una capa de material reabsorbible.

25 Otra realización de la presente invención se dirige a un apósito hemostático para el tratamiento de tejidos heridos en un paciente que opcional y preferiblemente comprende: (i) una capa de gelatina; (ii) una capa de transglutaminasa adyacente a dicha capa de gelatina; en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la capa de gelatina.

30 Otra realización de la presente invención se dirige a un apósito hemostático para el tratamiento de tejidos heridos en un paciente que opcional y preferiblemente comprende: (i) una capa de material reabsorbible y no reabsorbible; (ii) una capa de gelatina adyacente a dicha capa de material; (iii) una capa de transglutaminasa adyacente a dicha capa de gelatina; en donde la capa de transglutaminasa es coextensiva o no coextensiva con la capa de gelatina.

35 Otra realización de la presente invención se dirige a un apósito hemostático para tratamiento de tejidos heridos en un paciente que comprende: (i) una primera capa de gelatina; (ii) una capa de material reabsorbible adyacente a la primera capa de gelatina; (iii) una capa de transglutaminasa adyacente a la capa de material reabsorbible; y (iv) una segunda capa de gelatina adyacente a la capa de transglutaminasa, en donde la capa de transglutaminasa es no coextensiva con la primera y/o segunda capas de gelatina.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, la presente invención proporciona un apósito hemostático (por ejemplo, un vendaje) que incluye una capa de transglutaminasa emparedada entre una primera y una segunda capa de gelatina, en donde la capa de transglutaminasa puede ser coextensiva o no coextensiva con la primera y/o segunda capa de gelatina. Dicho apósito hemostático es útil para el tratamiento de heridas.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona un apósito de la invención, el cual opcional y preferiblemente comprende: (i) una matriz reabsorbible o no reabsorbible; (ii) gelatina, (iii) una transglutaminasa; en donde la gelatina y la transglutaminasa están incorporados dentro de dicha matriz.

45 En otra realización, el dispositivo hemostático comprende: (i) una matriz porosa reabsorbible o no reabsorbible; (ii) gelatina; (iii) una transglutaminasa; en donde la gelatina y transglutaminasa están adheridas a dicha matriz.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona un apósito de la invención, el cual opcional y preferiblemente comprende: (i) una matriz de gelatina reabsorbible; (ii) una transglutaminasa; en donde la transglutaminasa se incorpora dentro de dicha matriz de gelatina.

50 En diversas realizaciones, la capa de transglutaminasa puede ser configurada en cualquier variedad de formas y patrones. Por ejemplo, y sin limitación, la capa de transglutaminasa puede ser configurada como una matriz de puntos que comprende la transglutaminasa, o como un único punto que comprende la transglutaminasa. Alternativamente, la capa de transglutaminasa puede configurarse como una pluralidad de líneas que comprenden transglutaminasa.

Cada capa de los apósitos hemostáticos también puede contener uno o más agentes de carga apropiados, agentes aglutinantes y/o agentes solubilizantes. Además, cada uno de los apósitos hemostáticos pueden también opcionalmente comprender una capa de liberación la cual contiene un agente de liberación y/o un material de refuerzo.

5 De acuerdo con las realizaciones preferidas, cada capa de los apósitos hemostáticos puede opcionalmente contener uno o más agentes de carga apropiados, tales como sacarosa. Cada capa de los apósitos hemostáticos también puede contener opcionalmente uno o más agentes aglutinantes, tales como la sacarosa. Cada uno de los apósitos hemostáticos puede también comprender una capa de liberación que contiene un agente de liberación. Un agente de liberación de ejemplo es la sacarosa. Cada capa de los apósitos hemostáticos también puede contener uno o más agentes solubilizantes apropiados, tales como la sacarosa.

10 Cada capa de los apósitos hemostáticos también puede opcionalmente contener uno o más agentes espumantes apropiados, tales como una mezcla de ácido cítrico y bicarbonato de sodio.

15 De acuerdo con algunas realizaciones demostrativas, la capa de gelatina descrita anteriormente en este documento opcionalmente puede ser espumada, por ejemplo, mezclando la solución de gelatina con aire presurizado y/u otro gas antes del secado. En algunas realizaciones, la espuma de gelatina puede estar en un rango de densidad de 5 a 100 mg/cm³ y preferiblemente en el rango de 10 a 50 mg/cm³.

20 Cada uno de los apósitos hemostáticos puede también comprender un material de refuerzo en el lado del apósito opuesto de cara hacia el lado de la herida cuando el apósito está en uso. El material de soporte puede ser fijado con un adhesivo fisiológicamente aceptable o puede ser auto-adherido (por ejemplo, con una superficie de carga estática o accesorio mecánico). El material de soporte puede ser un material reabsorbible o un material no reabsorbible, tal como un parche de silicona o parche plástico, y/o un dispositivo, tal como un catéter vascular y/u otro tipo de dispositivo médico que opcionalmente puede ser insertado en el cuerpo.

Métodos de refuerzo de parches

25 La integración de capa posterior de refuerzo mejora la resistencia mecánica del apósito para proporcionar una fuerza óptima de distribución alrededor del apósito para procedimientos donde el apósito se aplica a sitios de sangrado pesado y/o activamente. El soporte también reduce la adherencia de la parte posterior del apósito de tal forma que el apósito no se pega a las manos del cirujano.

30 En algunas realizaciones demostrativas, la capa de soporte puede incluir uno o más materiales apropiados, capaces, por ejemplo, de aumentar la capacidad hemostática y/o de control de fluido además a una mezcla básica de gelatina-TG. De acuerdo con algunas realizaciones, aumentando el hemostático y/o la capacidad de control de fluido se puede lograr una vía desacelerada del fluido y permitiendo a la gelatina-TG más tiempo para entrelazar y bloquear la fuga de líquido

Opcionalmente, el apósito es reforzado por un soporte compuesto de gelatina.

35 Opcionalmente, el soporte de gelatina está comprendido de una capa de gelatina no entrelazada en donde la capa de gelatina está formada a partir de una capa liofilizada de solución de gelatina donde la solución de gelatina está en una concentración inicial de 1-25% p/p y preferiblemente de 5-15%.

En una realización alternativa, el soporte de gelatina está comprendido de una capa de gelatina entrelazada en donde la capa de gelatina está formada por entrelazamiento químico, entrelazamiento por radiación, entrelazamiento físico.

40 En una realización preferida, el entrelazamiento se realiza utilizando un azúcar de aldehído, mediante un método análogo al método de entrelazamiento descrito para el colágeno en la Patente de los Estados Unidos 4971954, que se incorpora por este documento por referencia como se establece completamente en este documento en la medida necesaria para proporcionar habilitación a esta realización de ejemplo de entrelazamiento de la presente invención y como un ejemplo no limitado de dicho método de entrelazamiento.

En otra realización preferida, el entrelazamiento se realiza utilizando calor seco entrelazamiento en donde la capa de gelatina se calienta con calor seco bajo vacío.

45 En una realización alternativa opcional, el soporte del apósito se comprende de un material hemostático reabsorbible, tal como celulosa o celulosa oxidada.

50 Cualquiera de una variedad de materiales reabsorbibles conocidos para los expertos en el arte pueden ser opcionalmente empleados en la presente invención. Por ejemplo, el material reabsorbible puede ser una sustancia proteica, tal como fibrina, queratina, colágeno y/o gelatina, o una sustancia carbohidrato, tal como alginatos, quitina, celulosa, proteoglicanos (por ejemplo, poli-Nacetil glucosamina), polímeros de ácido glicólico, polímeros de ácido láctico, o copolímeros del ácido glicólico/ ácido láctico. Por ejemplo, el material reabsorbible puede ser una sustancia

carbohidrato. Ejemplos ilustrativos de los materiales reabsorbibles se venden bajo los nombres comerciales VICRYL.TM. y DEXON.TM

- 5 Cualquiera de una variedad de materiales no reabsorbibles conocidos para los expertos en el arte se pueden emplear opcionalmente en la presente invención. Ejemplos no limitantes de materiales no reabsorbibles incluyen silicona, látex, poliuretano, polipropileno, polietileno, silastic, tereftalato de polietileno (PET), dacrón, dacrón tejido, dacrón velour, poliglacina, nylon, elastómero silástico de cloruro de polivinilo, caucho de silicona, PMMA [poli(metil metacrilato)], poliolefina, celulosa, alcohol polivinílico (PVA), poli(hidroxietil Metacrilato (PHEMA), poli(ácido glicólico), poli(acrilonitrilo) (PAN), fluoroetilenecohexa- fluoropropileno (FEP), teflón (PTFE), aleaciones Co-Cr, copolímeros de los mismos y mezclas de los mismos. Estos soportes pueden ser porosos o sólidos.
- 10 En una realización opcional, un patrón está grabado, tallado, cortado con láser, o de otra manera creado sobre el soporte con el fin de aumentar el área de superficie de la interfase entre el soporte y el apósito. Esto puede tener el efecto de unión parcial o totalmente de la matriz del apósito al soporte. El ejemplo 23 describe un ejemplo de un patrón grabado sobre el soporte de silicona que se utiliza para incrementar su adhesión a una matriz del apósito de gelatina.

Montaje del apósito sellante o hemostático

- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la capa de transglutaminasa se puede aplicar a la primera capa de gelatina de tal manera que esta sea no coextensiva con la primera capa de gelatina y/o será no coextensiva con la segunda capa de gelatina con aplicación de la segunda capa de gelatina. Por ejemplo, la capa de transglutaminasa puede ocupar aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la primera capa de gelatina y/o aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la segunda capa de gelatina. La transglutaminasa se puede aplicar a la capa de gelatina en un único punto o como una serie de puntos en la capa de gelatina de tal manera que el área total de superficie de los puntos de transglutaminasa ocupen aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la primera capa de gelatina y/o aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la segunda capa de gelatina.
- 20 Tal punto o puntos de transglutaminasa pueden tener cualquier forma geométrica, por ejemplo, círculos llenos o vacíos, rectángulos, triángulos, líneas, formas amorfas, o combinaciones de las mismas. Tales puntos se pueden aplicar a la primera capa de gelatina en un orden o patrón aleatorio. Una pluralidad de puntos puede formar cualquier variedad de formas y patrones, tales como una matriz, una red, una serie de puntos concéntricos (por ejemplo, círculos concéntricos o cuadrados), una serie de puntos superpuestos (por ejemplo, círculos superpuestos), radios emanados de un eje, o cualquier otra configuración, siempre que el área de superficie total de la transglutaminasa sea aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la primera capa de gelatina y/o aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la segunda capa de gelatina. En general, un gran número de pequeños puntos es preferible por encima de un pequeño número de grandes puntos. Por ejemplo, unas 20 veces, 20 matrices de puntos generalmente son preferibles sobre unas 10 veces. 10 matrices de puntos ocupando la misma área de superficie total. Sin embargo, los puntos pueden ser de cualquier tamaño, siempre que el área de superficie total de la transglutaminasa sea aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la primera capa de gelatina y/o aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del área de la superficie de la segunda capa de gelatina. Por ejemplo, dependiendo del tamaño total del apósito, los puntos pueden ser, sin limitación alguna, al menos aproximadamente 0.01, 0. 1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mm o más en diámetro, anchura o longitud. En una realización, por ejemplo, 4 puntos circulares que tienen un diámetro de 2-3 mm cada uno pueden ocupar un centímetro cuadrado de un apósito. Una variedad de otras configuraciones está dentro del alcance de la invención y puede fácilmente ser utilizada por los expertos en el arte
- 25
- 30
- 35
- 40

- Opcionalmente, el apósito se puede preparar en cualquiera de las variedades de tamaños y formas. Por lo general, los apósitos son de un tamaño y una forma que pueden fácilmente ser manejados por los expertos en el arte, por lo general menos de 12" de longitud a lo largo de cualquier lado, por ejemplo, 1"x1" y 1"x2" y 4"x4", etc. El nivel de humedad del apósito es generalmente menor del 8% (por ejemplo, menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1%).
- 45

- Generalmente, las diferentes capas del apósito hemostático pueden ser fijadas una a otra por cualquier medio conocido y disponible para aquellos expertos en el arte. Por ejemplo, opcional y preferiblemente la(s) capa(s) de gelatina y/o la(s) capa(s) de transglutaminasa es (son), aplicada(s) como una serie de capas de soluciones acuosa ultracongeladas y posteriormente liofilizadas o ultracongeladas, por ejemplo, después de la aplicación de cada capa, y en general en el montaje de todo el apósito. Las capas se pueden aplicar por cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo la atomización, pipeteado (por ejemplo, con una pipeta multi-canal), rociado, utilizando una máscara, deposición electrostática, utilizando un sistema de matriz de microjeringas, o dispensando mediante un colector de dispensación que contiene puertos para producir una matriz de alta densidad.
- 50

- En ciertas realizaciones de la presente invención, cuando los apósitos son preparados utilizando un molde, un agente de liberación, tal como la sacarosa, se aplica al molde antes de que la primera capa del apósito se aplica. En tales realizaciones, el apósito hemostático comprende además una capa de liberación, la cual contiene dicho agente de liberación.
- 55

Alternativamente, un adhesivo fisiológicamente aceptable se puede aplicar al material reabsorbible y/o el material de refuerzo (cuando esté presente) y la(s) capa(s) de gelatina(s) y/o la(s) capa(s) de transglutaminasa posteriormente fijadas al mismo.

5 En una realización del apósito, el adhesivo fisiológicamente aceptable tiene una fuerza de cizallamiento y/o estructura de tal manera que el material reabsorbible y/o material de soporte puedan ser separados de la capa de gelatina después de la aplicación del apósito para tejido herido. En otra realización, el adhesivo fisiológicamente aceptable tiene una fuerza de cizallamiento de tal manera que el material reabsorbible y/o material de soporte no se pueden separar de la capa de gelatina después de la aplicación del apósito al tejido herido.

10 La concentración de gelatina por área de la herida depende de un gran número de factores, incluyendo, pero no limitando a la construcción final del vendaje, los materiales empleados y así sucesivamente.

15 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos para preparar un apósito hemostático opcional y preferiblemente proporcionando una primera capa de gelatina, aplicando una capa de transglutaminasa a la primera capa de gelatina, y aplicando una segunda capa de gelatina a la capa de transglutaminasa, en donde la capa de la transglutaminasa es no coextensiva con la primera capa de gelatina y/o no coextensiva con la segunda capa de gelatina.

20 Del mismo modo, otras realizaciones de la invención incluyen un método para preparar un apósito hemostático proporcionando una capa de soporte reabsorbible o no reabsorbible habiéndose adherido a la primera capa de gelatina; aplicando una capa de transglutaminasa a dicha primera capa de gelatina en un lado de la capa de gelatina que está opuesta al lado en el cual la capa de soporte reabsorbible o no reabsorbible está adherida; y aplicando una segunda capa de gelatina a la capa de transglutaminasa, en donde la capa de transglutaminasa es no coextensiva con la primera capa de gelatina y/o no coextensiva con la segunda capa de gelatina.

25 En algunas realizaciones demostrativas, los apósitos y/o parches se pueden preparar por diversos métodos, incluyendo, por ejemplo, parche "sándwich" con soporte entrelazado, en donde el parche puede incluir una fina capa de gelatina en espuma, una enzima en polvo y al menos otra capa de gelatina en espuma con o sin atomización en la parte superior. La enzima puede opcionalmente ser de cualquier tipo de enzima de entrelazamiento, capaz de entrelazar la gelatina, pero preferiblemente comprende una transglutaminasa.

30 Ejemplos no limitantes de otras realizaciones de configuraciones de apósitos sándwich pueden opcionalmente incluir lo siguiente. Opcionalmente, el sándwich presenta una capa de soporte entrelazada en calor espumada, con enzima en polvo integrada en el soporte, seguido por una capa de gelatina liofilizada espumada y luego por una capa atomizada de enzima. El término "espumado" se utiliza en este documento para relacionar una gelatina en espuma.

Alternativamente, el sándwich puede opcionalmente presentar una capa de soporte entrelazada con calor espumada, de nuevo con enzima en polvo integrada en el soporte, seguido por una capa de gelatina liofilizada en espuma, pero en esta realización ilustrativa no limitante, la siguiente capa comprende enzima en polvo, seguido por una capa de gelatina liofilizada en espuma y seguida por una capa de enzima atomizada.

35 Alternativamente, el sándwich puede opcionalmente presentar una capa de soporte de cualquier tipo (por ejemplo, opcionalmente una de las capas de refuerzo descritas previamente comprendiendo poliuretano, silicona, o, de hecho, cualquiera de los plásticos médicos y/o materiales de caucho descritos previamente), seguido por una capa de gelatina liofilizada en espuma, seguido por una capa de enzima en el portador (por ejemplo HPMC o cualquier otro material celulósico u otro material polimérico como se describió anteriormente), seguido por una capa de gelatina liofilizada en espuma y seguida por una capa de enzima atomizada.

40 Alternativamente, el sándwich puede opcionalmente presentar una capa de soporte entrelazada con calor espumada seguida por una capa de enzima en polvo integrada en el soporte, seguida por una capa de gelatina liofilizada en espuma, seguida por una capa de enzima basado en un portador (opcionalmente con cualquier polímero portador tal como se describe en este documento), seguida por una capa de gelatina liofilizada en espuma y seguida por una capa de enzima atomizada.

Métodos de producción de la matriz de gelatina

45 En algunas realizaciones del apósito de sellado y hemostático descritos anteriormente, la capa de gelatina o la matriz de gelatina se componen de solución liofilizada de gelatina en espuma (también denominada en este documento como "espuma de gelatina" o simplemente como "espuma"). Antes de la formación de espuma, la concentración de la solución de gelatina esta opcionalmente entre el 0.1% y el 30% p/p y preferiblemente entre 5% y 15% p/p.

La espuma de gelatina está en el rango de densidad de 5 a 100 mg/cm³, preferiblemente en el rango de 10 a 50 mg/cm³ y más preferiblemente en el rango de 20 a 40 mg/cm³.

5 En algunas realizaciones demostrativas, la espuma de gelatina opcionalmente se puede producir utilizando, por ejemplo, un proceso de mezcla en lotes. De acuerdo con algunas realizaciones, la solución de gelatina se puede mezclar intensamente en un mezclador estándar, por ejemplo, del tipo producido por Bosch™, Kenwood™, y KitchenAid™, a velocidades que oscilan entre 100 y 10.000 RPM y preferiblemente a velocidades que oscilan entre 1000 rpm y 6000 rpm o 2000 a 4000 RPM. De acuerdo con algunas realizaciones, la velocidad preferiblemente se ajusta de acuerdo con la viscosidad y otras propiedades de la solución de gelatina, con el fin de inducir la producción de espuma (burbujas) pero sin destruir la estructura de la espuma. De acuerdo con algunas realizaciones, después de la mezcla, la espuma resultante se puede llenar en bandejas y liofilizada.

10 En algunas realizaciones demostrativas, la espuma de gelatina opcionalmente se puede producir utilizando, por ejemplo, un mezclador de proceso continuo. De acuerdo con estas realizaciones, la solución de gelatina y aire presurizado se puede transmitir simultáneamente a través de un mezclador estático esférico para formar una espuma de gelatina directamente en bandejas, las cuales luego pueden ser liofilizadas. De acuerdo con algunas realizaciones, la presión de aire y/o velocidad de mezcla preferiblemente se pueden ajustar de acuerdo con la viscosidad y otras propiedades de la solución de gelatina, con el fin de inducir la producción de espuma (burbujas) pero sin destruir la estructura de la espuma.

15 En algunas realizaciones demostrativas, la espuma de gelatina opcionalmente se puede producir utilizando, por ejemplo, espumado químico. De acuerdo con estas realizaciones, la formación de la espuma de gelatina se puede lograr mediante la adición de un agente espumante.

20 De acuerdo con algunas realizaciones, el agente espumante puede incluir cualquier surfactante que sea capaz de facilitar la formación de una espuma y/o mejorar la estabilidad coloidal de la espuma, por ejemplo, mediante inhibición de la coalescencia de burbujas. Por ejemplo, el bicarbonato de calcio se puede adicionar a la matriz acidificada, por ejemplo, provocar la formación de dióxido de carbono gaseoso en la solución de gelatina, creando espuma.

25 En algunas realizaciones demostrativas, la espuma de gelatina opcionalmente se puede producir utilizando, por ejemplo, espuma de Venturi. De acuerdo con estas realizaciones, - la solución de gelatina se puede introducir en el tubo perforado. La solución de gelatina puede fluir a través del tubo a alta velocidad, por ejemplo, para causar presión del aire negativa en el sitio de la punción. De acuerdo con algunas realizaciones, esto puede conducir a la aspiración del aire en la corriente de gelatina y posterior formación de espuma de la gelatina en el interior del tubo (se puede lograr una mejor formación de espuma, mediante la adición de elementos de mezcla estáticos).

30 En algunas realizaciones demostrativas, diversas formas y/o tamaños de gelatina en espuma pueden ser utilizadas en la preparación de un parche en conformidad con algunas realizaciones demostrativas descritas en este documento, incluyendo, por ejemplo, pequeñas piezas de gelatina en espuma, gelatina en un fluido o forma fluida, gelatina en partículas y/o almohadilla de gelatina molida humedecida con enzima, por ejemplo, y sin limitación de vacíos tales como heridas en forma de cavidad.

35 En algunas realizaciones demostrativas de la presente invención, piezas discretas, partículas, partes, segmentos o gránulos de matriz de proteína no entrelazada con enzima incrustada son aplicadas a un sitio de la herida de tal manera que se unen para formar una sola matriz entrelazada sobre el sitio de la herida, por ejemplo, como se describe para vacíos.

40 Estas realizaciones opcionalmente se pueden utilizar para el tratamiento de heridas en la cavidad de tal manera que las piezas de la matriz se puedan fijar en una cavidad irregular para efectuar hemostasia o por otra parte tratar la herida en cavidades irregulares, donde un apósito completo no podría ser capaz de alcanzar a todas las superficies del sitio de la herida.

En una realización opcional, las piezas de la matriz de proteína (gelatina) son de menos de 10 cm en diámetro.

Preferiblemente, las piezas son de menos de 1 cm en diámetro.

Más preferiblemente, las piezas son de menos de 5 mm en diámetro.

45 En una realización opcional, la matriz de proteína es una matriz porosa en el rango de densidad de 5 a 100 mg/cm³ y preferiblemente en el rango de 10 a 50 mg/cm³.

Un ejemplo del uso de piezas de matriz de proteína embebidas en una enzima que se unen para formar una sola matriz entrelazada para tratar una herida simulada se describe en el Ejemplo 15.

50 Diversas formas y/o tamaños de gelatina en espuma se pueden utilizar en la preparación de un apósito o composición para un tratamiento de heridas en conformidad con algunas realizaciones demostrativas descritas en este documento.

Métodos de incorporación de enzimas

En algunas realizaciones del apósito de sellado y el hemostático descrito anteriormente, la transglutaminasa ("la enzima") se puede incorporar, integrar, o incrustar en una matriz de gelatina de tal manera que (sin desear estar limitado por una lista cerrada):

- La actividad de la enzima se puede preservar durante el proceso
- 5 • La enzima se puede distribuir igualmente alrededor de la superficie de la matriz de gelatina
- La enzima se puede incrustar en la profundidad de la matriz de gelatina (distribución en gradiente o igual)

Dicha incorporación, integración o incrustación también se denomina en este documento como "la incorporación de la enzima".

10 En algunas realizaciones demostrativas, la incorporación de la enzima en la matriz de gelatina se puede lograr utilizando incorporación de enzimas premezcladas. De acuerdo con estas realizaciones, la solución de gelatina se puede mezclar con aire presurizado, por ejemplo, para formar una espuma en ya sea proceso en lote o continuo, descrito anteriormente.

15 En algunas realizaciones, la enzima puede ser simultáneamente transmitida en el flujo de la solución. Con el espumado en lote, la enzima se puede adicionar a la solución de gelatina antes o durante la mezcla. De acuerdo con algunas realizaciones, con formación de espuma continua, la enzima puede ser adicionada a la solución de gelatina en línea como la solución entra al mezclador estático. Después la espuma contendrá la gelatina y la enzima se forma, esta se puede enfriar lentamente para prevenir el entrelazamiento y luego se liofiliza de tal manera que la mayoría del entrelazamiento ocurre solamente cuando la espuma liofilizada entra en contacto con los fluidos fisiológicos sobre la aplicación de una herida.

20 En algunas realizaciones demostrativas, la incorporación de la enzima en la matriz de gelatina se puede lograr utilizando la incorporación de la solución de enzima después de la liofilización. De acuerdo con estas realizaciones, la matriz de gelatina se puede formar y liofilizar en espuma seca.

25 De acuerdo con algunas realizaciones, la solución de enzima se puede incorporar en la matriz mediante la atomización de la solución de enzima sobre la superficie de la matriz seca de gelatina, por ejemplo, donde la enzima pueda ser disuelta en solvente o mezcla de agua/solvente antes de la atomización.

De acuerdo con algunas realizaciones, la solución de enzimas se puede incorporar en la matriz utilizando inyección de la solución de enzima en la matriz de gelatina, por ejemplo, a través de agujas o matriz de agujas.

30 De acuerdo con algunas realizaciones, la solución de enzima se puede incorporar en la matriz utilizando sumergiendo la matriz seca de gelatina en la mezcla de solvente que contiene la enzima, por ejemplo, EtOH/agua, acetonitrilo/agua, acetonitrilo/agua/EtOH y similares.

De acuerdo con algunas realizaciones, la solución de enzima se puede incorporar en la matriz mediante la aplicación de una mezcla de solventes que contenga las enzimas sobre la matriz seca de gelatina.

35 Otros ejemplos de solventes volátiles aplicables para este propósito pueden adicionalmente ser seleccionados del grupo que consiste en acetato de etilo, benceno, cloruro de metileno, acetona, cloroformo, siliconas volátiles líquidas (hexametildisiloxano (HMDS), octametilciclotetrasiloxano, decametilciclopentasiloxano, octametiltrisiloxanos), alcanos volátiles (n-hexano, isooctano, octano, neopentano), fluorocarbonos volátiles (pentafluoropropano, perfluoroheptano, perfluorometilciclohexano), alcoholes (incluyendo pero no limitando a uno o más de 1-propanol, 2-propanol, etanol) y mezclas de los mismos.

40 De acuerdo con algunas realizaciones demostrativas, después de que la solución de enzima se aplica en y/o sobre la matriz de gelatina, la solución se puede evaporar, por ejemplo, por secado al aire, secado a vacío, secado por calor, u otro método.

De acuerdo con algunas realizaciones, la solución de enzima se puede incorporar en la matriz utilizando incorporación de enzima en polvo después de la liofilización. De acuerdo con estas realizaciones, la matriz de gelatina se puede formar y liofilizar en espuma seca.

45 En algunas realizaciones demostrativas, a continuación, la espuma puede ser incorporada en la matriz utilizando la incrustación de enzima en polvo en la matriz seca de gelatina por métodos mecánicos, por ejemplo, cepillando la enzima en polvo sobre la superficie y/o propagando el polvo de la enzima utilizando un rodillo de agujas.

De acuerdo con otras realizaciones demostrativas, la enzima se puede incorporar en la matriz mediante perforación y/o punción de la matriz de gelatina con rodillo mecánico de agujas antes de la aplicación del polvo de las enzimas.

De acuerdo con incluso otras realizaciones demostrativas, la enzima se puede incorporar en la matriz utilizando aire presurizado apoyando la aplicación de enzima en polvo, por ejemplo, utilizando un método similar al pulido con chorro de arena.

5 Opcionalmente, después de la aplicación de enzima en polvo seco, el polvo se puede sellar en el interior de la matriz de gelatina, por ejemplo, atomizando la superficie de la matriz con una mezcla de solvente orgánico /agua y luego secando la matriz.

De acuerdo con algunas realizaciones demostrativas, dos o más métodos se pueden combinar para producir la integración de la enzima, por ejemplo, tal como se describe anteriormente en este documento.

Profundidad de la enzima en la matriz de proteína

10 En una realización opcional pero preferida de la invención en este documento, la enzima se incrusta en la matriz de proteína de tal manera que la enzima este presente a una profundidad de al menos 0.5 mm de la superficie de la matriz, preferiblemente en al menos 1 mm y opcionalmente hasta 20 mm de profundidad.

15 La técnica previa describe los apósitos de heridas que comprenden un material adhesivo de tejido sobre la superficie de un biomaterial o matriz de biomaterial de proteína. Ejemplos de esto se describen en las solicitudes PCT WO/2011/079336A1 y WO/2010/145817. Sin embargo, estas soluciones tienen importantes inconvenientes en cuanto el mecanismo de adhesión del tejido sobre la superficie de la matriz de la proteína no es inherentemente integrado en la propia matriz. Por lo tanto, esfuerzos adicionales se deben realizar para reparar la capa adhesiva del tejido a la matriz. Además, ya que la misma matriz no participa en la adhesión del tejido o en el mecanismo de cierre de la herida, esta se puede separar de la capa adhesiva del tejido una vez que el apósito se aplica a un sitio del tejido o al sitio de la herida.

20 Existe un significativo beneficio en la utilización de un mecanismo de adhesión basado en el entrelazamiento de la misma matriz de la proteína, como se describe en este documento, ya que este enfoque asegura que la misma matriz de la proteína estará participando directamente en la unión del parche, dispositivo o apósito de la herida sobre un sitio del tejido o sitio de la herida no se separe de la capa superior adherida de la composición.

25 Además, es beneficioso tener la enzima de entrelazamiento presente más allá de la superficie de la matriz para habilitar el entrelazamiento de la matriz de la proteína solo más allá de la capa superficial de la matriz. Mientras que la capa superficial puede adherirse a un sitio de herida o tejido, la capa superficial entrelazada de la matriz sola será frecuentemente insuficiente para cerrar heridas o fijar el apósito a un sitio del tejido. Cuando la enzima está presente más allá de la superficie del apósito, a una profundidad de 0.5 mm y más allá, la cantidad de la matriz de proteína será incorporada en la reacción de adhesivo de entrelazamiento es mayor y, por lo tanto, la barrera de cierre de la herida o
30 capa de fijación del dispositivo pueden ser más gruesos y robustos. Además, la inclusión de la enzima en las profundidades de la matriz de la proteína reduce la posibilidad de que partes de la matriz permanezcan sin entrelazar después de la aplicación a un sitio de tejido y se desprenda de las partes de la matriz que se adhieren al sitio del tejido.

35 Ejemplos proporcionados a continuación describen los apósitos de heridas en donde la enzima está presente hasta profundidades diferentes de la matriz. En todos los ejemplos, excepto para los ejemplos 8 y 12, la enzima incrustada está presente desde la superficie de la matriz hacia abajo a través de la máxima profundidad enumerada en la tabla a continuación. En los ejemplos 8 y 12, la enzima incrustada estaba presente una capa debajo de una capa de matriz de proteína sin enzima. La máxima profundidad de la enzima fue medida utilizando un calibrador digital para medir la profundidad a la cual el color azul de la solución de enzima penetró los poros de la matriz de proteína. En todos los casos, el espesor aproximado de la matriz fue de 15 mm.

Ejemplo #	Máxima profundidad de la enzima a partir de la superficie de la matriz
1.	0.5mm
2.	7mm
3.	0.5mm
4.	4mm
5.	15mm
6.	10mm
7.	3mm

Ejemplo #	Máxima profundidad de la enzima a partir de la superficie de la matriz
8.	7mm
9.	0.5mm
10.	3mm
11.	3.5mm
12.	7mm
13.	8mm
14.	3mm
15.	10mm
16.	0.5mm
17.	3.5mm
18.	3.5mm
19.	0.5mm
20.	8mm
21.	8mm
22.	3mm

En una realización opcional, la enzima está presente en la matriz de proteína a una profundidad de 0.5 a 50 mm.

Preferiblemente, la enzima está presente en la matriz de proteína a una profundidad de 0.5 a 10 mm.

Más preferiblemente, la enzima está presente en la matriz de proteína a una profundidad de 0.5 a 5 mm.

- 5 En una realización opcional, la enzima está presente en la matriz de proteína a una profundidad de 1% a 100% del espesor total de la matriz.

En una realización opcional, la enzima es penetrada a una profundidad de matriz de proteína en al menos 0.5 mm utilizando una o más de las técnicas de incrustación de enzimas enumeradas anteriormente.

- 10 En otra realización opcional, la enzima es depositada y luego cubierta por una capa de matriz de proteína entrecruzable tal que la profundidad efectiva de la enzima sea de al menos 0.5 mm desde la superficie superior de la matriz de proteína entrecruzable.

Incrustación de enzima encapsulada

En algunas realizaciones demostrativas, la enzima descrita en este documento puede ser una enzima encapsulada.

- 15 Sin desear estar limitado por una lista cerrada, existen varios beneficios del encapsulado de la enzima para uso con al menos algunas realizaciones de la presente invención:

1. La encapsulación de una enzima puede incrementar la estabilidad de la enzima por protección de esta, permitiendo que la enzima sea incrustada en una matriz de proteína sin que sea potencialmente perjudicial por el proceso de incrustación.

- 20 2. La encapsulación de la enzima puede proteger la actividad de la enzima rodeando el sustrato entrecruzable, permitiendo así que la enzima sea incrustada en una matriz de proteína sin reaccionar completamente con la matriz entrecruzable. Preferiblemente, el material encapsulado es soluble o parcialmente soluble por el fluido corporal o

solución salina de tal manera que la encapsulación se disuelva cuando esta se aplica a un sitio de la herida y la enzima pueda entonces reaccionar con la matriz de la proteína.

5 De acuerdo con algunas realizaciones, la enzima encapsulada se puede producir y/o incorporar en el parche descrito en este documento utilizando diversos métodos, incluyendo, por ejemplo, la aspersion de la enzima incrustada, goteo coacervación de polímeros cargados opuestamente con enzimas incrustadas, PLGA, microesferas, secado por atomización, liberación por estallido y similares.

10 De acuerdo con algunas realizaciones demostrativas, la enzima puede ser encapsulada utilizando cualquier método conocido en el arte, incluyendo, por ejemplo, métodos físicos, tales como recubrimiento con cubierta, recubrimiento de suspensión neumática, extrusión centrífuga (co-extrusión), boquilla vibracional y secado por atomización, métodos fisicoquímicos tales como gelatinización inotrópica o coacervación, y métodos químicos tales como policondensación interfacial, entrelazamiento interfacial, polimerización *in situ* y Polimerización de Matriz.

Se demostró que las enzimas conservan su actividad después de ser encapsuladas utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, encapsulación de lipasa en carragenina-k utilizando co-extrusión (Raman K., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58: 78-83)

15 En otra realización, la enzima puede ser encapsulada en liposomas.

En otra realización, la enzima puede ser microencapsulada en microcápsulas de gelatina en una técnica que ha sido previamente documentada (Burgess D.J., International Journal of Pharmaceutics, 27: 61-70). Las microcápsulas pueden ser integradas en la matriz y cuando se calientan por la sangre o por la temperatura corporal pueden fundirse y el polvo de enzima atrapado dentro puede ser reconstituido.

20 De acuerdo con algunas realizaciones, la enzima encapsulada puede estar en una forma sólida o una forma líquida.

En algunas realizaciones demostrativas, los materiales utilizados para el recubrimiento de la enzima pueden ser polímeros (polietilenglicol, alcohol polivinílico, éteres de celulosa, ácido poliláctico, ácido poliglutarica PLGA, etc.) o proteínas (gelatina, colágeno, fibrinógeno, albúmina, etc.).

Esterilización de la matriz de la proteína con enzima incrustada

25 En algunas realizaciones demostrativas, las matrices pueden ser esterilizadas, utilizando, por ejemplo, esterilización por radiación y, preferiblemente, esterilización por haz de electrones ("E-beam")

Preferiblemente, la esterilización E-beam de las matrices o los apósitos se realiza exponiendo el apósito a un rango de dosis en el rango de 10 - 50 kGy, y preferiblemente 20-40 kGy.

30 Opcionalmente, un radioprotector es incluido para minimizar cambios efectuados por esterilización por radiación. Un radioprotector puede incluir cualquier material con la capacidad de unir radicales libres y puede ser escogido de cualquiera de los materiales enumerados en la tabla 4, a continuación.

Dispositivo de sellado de tejido y hemostático adhesivo

35 Otra realización de ejemplo de la presente invención se dirige a un dispositivo de sellado de tejido y hemostático, para hemostasis en un ambiente quirúrgico de un paciente con sangrado vigoroso o para el sellado de otro tejido en un paciente, que comprende: (i) una matriz porosa reabsorbible o no reabsorbibles; (ii) gelatina en polvo, partícula u otra forma sólida, y (iii) transglutaminasa en polvo, partícula u otra forma sólida; en donde la gelatina y la transglutaminasa se incorporan dentro de dicha matriz.

40 Otra realización de ejemplo de la presente invención se dirige a un dispositivo hemostático, por ejemplo, para hemostasis en un ambiente quirúrgico de un paciente con sangrado vigoroso, que comprende: (i) una matriz porosa reabsorbible o no reabsorbible; (ii) gelatina; (iii) una transglutaminasa; en donde la gelatina y la transglutaminasa están adheridas a dicha matriz.

45 Otra realización de ejemplo de la presente invención se dirige a un dispositivo hemostático, por ejemplo, para hemostasis en un ambiente quirúrgico de un paciente con sangrado vigoroso, que comprende: (i) una matriz de gelatina porosa reabsorbible; (ii) transglutaminasa en polvo, partícula u otra forma sólida; en donde la transglutaminasa se incorpora dentro de dicha matriz de gelatina.

Otra realización de ejemplo de la presente invención se dirige a un dispositivo hemostático, por ejemplo, para hemostasis en un ambiente quirúrgico de un paciente con sangrado vigoroso, que comprende: (i) una matriz porosa reabsorbible de gelatina; (ii) transglutaminasa en polvo, partícula u otra forma sólida; en donde la transglutaminasa se incorpora dentro de dicha matriz de gelatina; (iii) soporte mecánico o de refuerzo.

Dispositivo de sellado/ hemostático adhesivo usado en conjunción con el dispositivo médico

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, técnica de deshidrocongelación y/o liofilización puede opcionalmente ser aplicada para adherir o fijar la composición del sellante de acuerdo con la presente invención sobre la superficie de algunos catéteres, trocares o implantes, o de hecho en cualquier otro dispositivo médico. Esto puede opcionalmente facilitar la hemostasis en la penetración de la herida y su cierre, lo cual puede opcionalmente ser útil para dispositivos/catéteres arteriales, por ejemplo. La hemostasis después del procedimiento arterial es crítica para los pacientes que han sido tratados con medicamentos anti-coagulantes y quienes son más propensos a complicaciones hemorrágicas. La composición hemostática de la presente invención es independiente de la coagulación de la sangre y entonces proporciona asistencia adicional para evitar el sangrado excesivo.

10 Dispositivo hemostático usado para la fijación de dispositivos médicos implantables

15 En otra realización de la presente invención, el dispositivo de sellante y hemostático o apósito se integra con un dispositivo médico implantable, tal como una malla quirúrgica de tal manera que la malla puede ser adherida a una superficie de tejido. Como un ejemplo no limitante de dicha realización, el dispositivo o apósito es opcionalmente integrado con la malla, la cual a continuación es luego recubierta con una capa de gelatina como un recubrimiento adhesivo. Dicha malla integrada de recubrimiento adhesivo podría ser útil para solicitudes tales como fijación de malla de hernias sin grapado o procedimientos de sutura donde la malla se puede adherir a la pared abdominal.

Dicho recubrimiento adhesivo para entrelazar también puede opcionalmente ser usada junto con una o más grapas, clavos, o suturas para complementar la adherencia de la malla.

20 Adicionalmente, la implantación de una malla quirúrgica en una matriz de gelatina-transglutaminasa puede proporcionar el camuflaje a corto plazo de una malla de hernia no degradable para reducir la extraña reacción del cuerpo frente a la malla.

En una realización, la malla quirúrgica se incorpora en una matriz de espuma de gelatina y la enzima se incorpora homogéneamente en toda la matriz o más concentrada en la matriz cerrada de la superficie de malla.

25 En algunas realizaciones de la malla quirúrgica incrustada en el apósito hemostático o dispositivo, una capa posterior de refuerzo se incorpora.

De acuerdo con algunas realizaciones, la malla quirúrgica puede estar localizada en cualquier posición apropiada con relación a la capa de refuerzo y/o la matriz de gelatina, incluyendo, por ejemplo, entre la capa de refuerzo y la matriz de gelatina, en el medio de la matriz de gelatina y/o en la parte superior de la matriz de gelatina.

30 De acuerdo con algunas realizaciones, la enzima puede estar localizada en cualquier posición apropiada con relación a la malla y/o la matriz de gelatina, incluyendo, por ejemplo, en el medio y/o en la parte superior de la matriz de gelatina y/o igualmente dispersa en el interior de la matriz de gelatina y/o cubriendo la malla, por ejemplo, antes de que sea incrustada en la matriz de gelatina.

35 En algunas realizaciones de la presente invención, una malla quirúrgica es recubierta con una composición de gelatina-transglutaminasa adhesiva, de tal manera que la composición gelatina-transglutaminasa sea opcionalmente implementada como un recubrimiento adhesivo que opcionalmente puede ser usada para un procedimiento quirúrgico, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a hernia inguinal, femoral, umbilical, incisional y otros tipos de reparación de hernias ventrales. Alternativamente, la malla de recubrimiento puede opcionalmente ser usada para grandes reparaciones de hernia diafragmática, para fijación de malla para rectopexia (prolapso rectal), para reconstrucción de un prolapso de bóveda vaginal, o para otras operaciones de refuerzo de malla del piso pélvico (procedimientos ginecológicos).

La malla quirúrgica para usar en estas realizaciones no limitadas de la presente invención pueden opcionalmente ser una malla sintética, una malla biológica o una combinación de mallas sintética-biológica.

Ejemplos no limitantes de apropiadas mallas quirúrgicas se enumeran a continuación:

Tabla 2 - Mallas quirúrgicas sintéticas

	Nombre comercial de la malla	Material	Fabricante
1.	Malla tejida VICRYL™	Poliglactina 910 (ácido Poliglicólico)	Ethicon (Somerville, NJ)
2.	Malla de Polipropileno Parche 3D PROLENE	Polipropileno	Ethicon

ES 2 567 174 T3

	Nombre comercial de la malla	Material	Fabricante
3.	Malla de Polipropileno PROLENE™	Polipropileno	Ethicon
4.	Sistema de hernia de polipropileno PROLENE™	Polipropileno	Ethicon
5.	Malla en fibra de poliéster MERSILENE™	PolietilenoTereftalato	Ethicon
6.	Malla ligera parcialmente absorbible ULTRAPRO™	Monocril (Poliglecaprone 25) y polipropileno	Ethicon
7.	Tapón ULTRAPRO™	Monocril (Poliglecaprone 25) y polipropileno	Ethicon
8.	Sistema de hernia ULTRAPRO™	Monocril(Poliglecaprone 25) y Polipropileno	Ethicon
9.	Dispositivo PVP™	Celulosa regenerada oxidada (ORC) y Polipropileno	Ethicon
10.	Malla quirúrgica PROCEED™	Celulosa regenerada oxidada(ORC) y polipropileno	Ethicon
11.	Malla compuesta Parietex™ (PCO)	Macroporos de Poliéster, con un material tejido tridimensional con película de colágeno reabsorbible	Covidien (Mansfield, MA)
12.	Malla (PCO OS) de falda abierta compuesta Parietex™	Macroporos de Poliéster, con un material tejido tridimensional con película de colágeno reabsorbible	Covidien
13.	Malla (PCO) compuesta Parastomal Parietex™	macroporos de poliéster, material monofilamento	Covidien
14.	Malla Hiatal (PCO) compuesta Parietex™	Macroporos de Poliéster, con un material tejido tridimensional con película de colágeno reabsorbible	Covidien
15.	Malla anatómica Parietex™	macroporos, poliéster tejido 2D con tejido 3D	Covidien
16.	Malla plegada Parietex™	Macroporosos Poliéster	Covidien
17.	Malla Parietex Easegrip™	Poliéster, Material tejido con una combinación de dos y tres dimensiones	Covidien
18.	Malla monofilamento ligera Parietex™	tejido monofilamento, macroporosos de poliéster	Covidien
19.	Malla de hoja plana Parietex™	Poliéster, con opciones de tejido de dos y tres dimensiones	Covidien
20.	Malla de hoja plana Surgipro™	Polipropileno	Covidien
21.	Tapón ligero PERFIX™	Monofilamento de polipropileno	Davol (Bard) (Warwick, RI)
22.	Tapón PerFix™	Monofilamento de polipropileno	Davol (Bard)

ES 2 567 174 T3

	Nombre comercial de la malla	Material	Fabricante
23.	Parche Kugel™	Monofilamento de polipropileno	Davol (Bard)
24.	Malla ligera 3DMax™	monofilamento de polipropileno	Davol (Bard)
25.	Bard™ Malla suave	monofilamento de polipropileno de gran porosidad	Davol (Bard)
26.	Malla Bard™	monofilamento de polipropileno	Davol (Bard)
27.	Malla Bard™ Visilex	monofilamento de polipropileno	Davol (Bard)
28.	Parche de hernia Ventrio™	Monofilamento de polipropileno y polidioxanona, con lado ePTFE submicrónico	Davol (Bard)
29.	Malla Composix™ L/P	Malla suave Bard de polipropileno de bajo perfil y lado ePTFE submicrónico	Davol (Bard)
30.	Composix™ E/X	Malla suave Bard de polipropileno de bajo perfil y lado ePTFE submicrónico	Davol (Bard)
31.	Parche Composix™ Kugel™	Malla de auto-expansión de polipropileno/ ePTFE	Davol (Bard)
32.	Malla Dulex™	Malla de doble cara, ePTFE	Davol (Bard)
33.	Parche Hernia VENTRALEX™	auto-expandible de polipropileno ePTFE	Davol (Bard)
34.	Compuesto Sepramesh™ IP	Malla de polipropileno con recubrimiento de seguridad de hidrogel	Davol (Bard)
35.	Parche C-QUR™ V-	Malla de polipropileno con un ácido graso de Omega 3 Atrium de grado farmacéutico, todo natural	Atrium (Hudson, NH)
36.	Malla C-QUR™	Malla de polipropileno con un ácido graso de Omega 3 Atrium de grado farmacéutico, todo natural	Atrium
37.	Malla C-QUR Lite™	Malla de polipropileno con un ácido graso omega 3, fina 30 días	Atrium
38.	C-QUR Edge™	Malla recubierta con aceite bioabsorbible (O3FA) presenta un diseño de borde reforzado	Atrium
39.	Malla ProLoop™	Tapón tridimensional, no absorbible, ligero, pre-formado, construida de filas de tejidos monofilamento de polipropileno con múltiples bucles de monofilamento sobresalientes	Atrium
40.	Malla ProLite™	Malla de polipropileno	Atrium
41.	Malla ProLite™ Ultra™	Malla de pared delgada de polipropileno	Atrium
42.	BIO-A™ tejido de refuerzo	Fibras de ácido poliglicólico: Trimetileno carbonato (PGA:TMC) forman una red no tejida con poros abiertos, altamente interconectados	Gore Medical (Flagstaff, AZ)

	Nombre comercial de la malla	Material	Fabricante
43.	Biomaterial DUALMESH™ PLUS	Material de reparación de hernia de dos-superficies con tecnología antimicrobiana	Gore
44.	Biomaterial DUALMESH™	material PTFEE que ofrece diseño de dos- superficies destinada a minimizar el tejido unido a lo largo de otra superficie.	Gore
45.	Biomaterial MYCROMESH™	Nodo de microporoso y estructura de fibrilla con macroporos regularmente espaciados	Gore
46.	Biomaterial MYCROMESH™ PLUS	Incluye tecnología antimicrobiana	Gore
47.	Parches de tejido suave GORE-TEX	Politetrafluoroetileno expandido (ePTFE)	Gore
48.	Tapón Hernia BIO-A™	estructura fibrosa porosa compuesta de copolímero sintético	Gore
49.	Malla INFINIT™	100% de monofilamento PTFE, malla quirúrgica tejida de gran porosidad	Gore

Tabla 3 - Mallas quirúrgicas biológicas

	Nombre comercial de la malla	Material	Fabricante
1.	Dermis Acelular hidratada FLEXHD™	Piel humana acelular	Ethicon
2.	Implantes biológicos Permacol™	Derivados de colágeno dérmico porcino	Covidien
3.	Injerto quirúrgico XENMATRIX™	Matriz de colágeno no entrecruzada	Davol (Bard)
4.	COLLAMEND™ FM	Implantes de colágeno de porcino todo-natural	Davol (Bard)
5.	Injerto quirúrgico AlloMax™	Implante biológico todo-natural derivado del colágeno dérmico humano	Davol (Bard)
6.	Injerto de hernia Biodesign™ (Surgisis™)	Submucosa de intestino pequeño de porcino acelular, seca	Cook Biotech (Lafayette, IN)
7.	Injerto de hernia hiatal Biodesign™ (Surgisis™)	Submucosa de intestino pequeño de porcino acelular, seca	Cook Biotech
8.	Injerto de hernia Inguinal Biodesign™ (Surgisis™)	Submucosa de intestino pequeño de porcino acelular, seca	Cook Biotech
9.	Injerto de hernia umbilical Biodesign™ (Surgisis™)	Submucosa de intestino pequeño de porcino acelular, seca	Cook Biotech
10	Injerto de bloqueo abdominal Biodesign™ (Surgisis™)	Submucosa de intestino pequeño de porcino acelular, seca	Cook Biotech

	Nombre comercial de la malla	Material	Fabricante
11.	injerto de tejido de 8-capas Biodesign™ (Surgisis™)	Submucosa de intestino pequeño de porcino acelular, seca	Cook Biotech
12.	Matriz de tejido reconstructiva Strattice™	Piel porcina descelularizada	LifeCell - Genzyme Corp (Branchburg, NJ)
13.	AlloDerm™	Piel descelularizada de cadáver humano	LifeCell

Uso del dispositivo, composición o vendaje

5 Durante el uso del apósito, dispositivo o agente hemostático, la gelatina y la transglutaminasa pueden ser activadas en el momento que el apósito, dispositivo o mezcla de partículas se aplica al tejido herido por los fluidos endógenos (por ejemplo, sangre, aire, bilis, fluido intestinal) del paciente escapando de la hemorragia o fugas de herida. Alternativamente, en situaciones donde la pérdida de fluidos del tejido de la herida es insuficiente para proporcionar una apropiada hidratación de las capas de proteína, la gelatina y/o la transglutaminasa pueden ser activadas por una aplicación de un líquido fisiológicamente aceptable (por ejemplo, agua, solución reguladora, salina), opcionalmente
10 conteniendo cualquier co-factor y/o enzima necesaria, antes de o en el momento de la aplicación del apósito, dispositivo o agente hemostático al tejido herido.

Aditivos para usar con composiciones de dispositivo y apósito anterior

15 En una realización opcional de cualquiera de los dispositivos y/o apósitos mencionados, los aditivos composicionales apropiados se pueden utilizar para la modificación y/o mejoramiento de las propiedades mecánicas, de estabilidad o manipulación del dispositivo y/o apósito.

20 De acuerdo con algunas realizaciones demostrativas, tales aditivos pueden incluir soluciones reguladoras para la estabilización de proteínas, incluyendo, por ejemplo, acetato de sodio, HEPES, citrato de sodio, plastificantes y/o potenciadores de flexibilidad, incluyendo, por ejemplo, glicerol, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), tween; estabilizantes de espuma, incluyendo, por ejemplo, surfactantes iónicos (por ejemplo SDS), hidroxipropilmetil celulosa, ácido hialurónico, glicina, dextrina y similares; radioprotectores, como es demostrado, por ejemplo, en la tabla 4 a continuación y antioxidantes, como se muestra, por ejemplo, en la tabla 4 a continuación.

Ingrediente	Función
Ascorbato	Antioxidante
Alcohol Bencílico	Conservante
benzoato de Bencilo	Conservante
Hidroxianisol Butilado(BHA)	Antioxidante
Clorobutanol	Conservante
Cisteína	Antioxidante
Etanol	Cosolvente
Glicerina	Humectante
Manitol	Ajustador de Isotonicidad
Metil parabeno	Conservante

Ingrediente	Función
Niacinamida	Activo
Fenol	Conservante
Propilenglicol	Cosolvente
Propilgalato	Antioxidante
Propilparabeno	Conservante
Benzoato de Sodio	Regulador (pH 7.4)
Bisulfato de Sodio	Antioxidante
Metabisulfito de Sodio	Antioxidante
Salicilato de Sodio	Activo
Tiosulfato de Sodio	Activo
Tocoferol	Antioxidante
Trehalosa	Ajustador de Isotonicidad

Enzima modificada

La enzima de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención puede ser modificada de una manera tal que afectará su actividad, estructura o tanto estructura como actividad

- 5 Por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigida puede resultar en una enzima con una actividad reducida, actividad aumentada, actividad selectiva hacia un subconjunto de sustratos, aumento o disminución de la afinidad hacia un subconjunto de sustratos etc.

- 10 La modificación química de mTG puede estar dirigida contra aminoácidos activos específicos. Por ejemplo, grupos amino de cadenas laterales de lisina pueden ser modificados utilizando reacciones tales como PEGilación, acetilación, succinilación, carbamilación, alquilación reductiva, etc. Los grupos tiol de las cadenas laterales de cisteína pueden ser modificados con reactivos tiol específicos tales como yodoacetamida, N-etilmaleimida o PEG-maleimida activada. Los grupos carboxílicos de cadenas laterales de glutamato y aspartato pueden ser modificados por carbodiimidas.

La modificación anterior también puede resultar en un aumento o disminución en la carga de superficie de la enzima que a su vez puede afectar la actividad, preferencia de sustrato, movilidad y otras funciones de la enzima modificada.

- 15 La enzima también puede ser acoplada a otra molécula, tal como albúmina, carboximetilcelulosa, dextrano etc. Este acoplamiento puede servir para controlar la actividad, preferencia de sustrato, movilidad y otras funciones de la enzima.

Ejemplos no limitantes de una enzima modificada usada para entrelazamiento de proteínas se revela en la Solicitud PCT No. WO 2011/077388, teniendo al menos un inventor en común con la presente solicitud y siendo propiedad en común con la presente solicitud.

- 20 Ejemplos

Métodos de Prueba

Prueba básica de presión de estallido

La prueba es hecha utilizando un instrumento de ensayo de materiales Instron 3343.

- 25 Una hoja de colágeno húmeda (10x10cm; Nitta, envoltura de colágeno de porcino) se rehidratada con aproximadamente 5ml de solución salina (cloruro de sodio 0.15M, Sigma, Lote #: 078K01272) a temperatura ambiente (RT) y perforada en el centro con una aguja de 14G. Un parche seco (tamaño 2x2cm) con la capa que contiene la enzima o parte que mira hacia la hoja de colágeno se coloca en la hoja de colágeno húmeda cubriendo la punción centralmente. La presión

sobre el parche se aplica utilizando un peso estándar de 1kg durante 3 min. Después de la extracción del peso estándar de 1kg, la hoja de colágeno con la cara del parche mirando hacia abajo se coloca en una posición como se muestra gráficamente en la figura 1. La célula de presión de estallido consiste de un soporte de anillo, que permite a la hoja de colágeno estar fijada mecánicamente mientras que permite que al área cubierta el parche levite en el centro del anillo.

5 Un cilindro hueco (diámetro interior de 36.5mm) se coloca en la parte superior del soporte de la hoja de colágeno dejándola al descubierto y se fija mecánicamente. El cilindro hueco es llenado con agua a RT. El cilindro hueco está sellado con un pistón O-anillo dejado al descubierto en la parte superior del cilindro hueco. Después de colocar la célula en el estado del Instron, el pistón se mueve en el sello del cilindro por la célula de carga dejando al descubierto el sello del instrumento, creando un aumento de presión sobre la hoja de colágeno con la punción y el parche ubicado entre la

10 hoja de colágeno. La fuerza máxima medida se refiere a la presión de estallido del parche

Prueba avanzada de presión de estallido

La prueba se realiza utilizando un instrumento de prueba de materiales, Instron 3343.

Un agujero circular con un diámetro de 3mm es perforado en la mitad de una hoja de colágeno húmeda (10x10cm; Nitta, envoltura de colágeno de porcino). La hoja de colágeno punzada es sumergida en una solución salina (cloruro de sodio 0.15M, Sigma, Lote #: 078K01272) a 40°C. El nivel de solución salina en la caja de Petri es aproximadamente 15mm. Un parche de gelatina seca (tamaño 2x2cm) se coloca en la parte superior de la punción y se aplicó presión utilizando un peso estándar de 1kg durante 3 min. Después de remover el peso estándar de 1kg, la hoja de colágeno con la cara del parche adherida mirando hacia abajo se coloca en una posición como se muestra gráficamente en la Figura 1. La presión de estallido de la célula consiste de un soporte de anillo, el cual permite que la hoja de colágeno se fije mecánicamente mientras permite al área cubierta del parche levite en medio del anillo.

15

20

Un cilindro hueco (diámetro interior de 36.5mm) se coloca en la parte superior dejando al descubierto la hoja de colágeno y se fija mecánicamente. El cilindro hueco es llenado con agua en RT. El cilindro hueco es sellado con un pistón O-anillo dejado al descubierto en la parte superior del cilindro hueco. Después de colocar la célula en el estado de Instron el pistón se mueve en el cilindro de sello por la célula de carga dejando al descubierto el sello del instrumento, creando un aumento de presión sobre la hoja de colágeno con la punción y el parche ubicado entre la hoja de colágeno. La fuerza máxima medida se refiere a la presión de estallido del parche

25

Ahora se hace referencia a la figura 2, que demuestra un diagrama de bloques esquemático de un sistema de prueba de presión de estallido de ejemplo Instron, por ejemplo, como se describe anteriormente, de conformidad con algunas realizaciones demostrativas.

De acuerdo con algunas realizaciones, el sistema de pruebas de presión de estallido Instron puede incluir un conector Instron 1; un pistón 2; un cilindro 3; un baño Perspex 4, usado, por ejemplo, para coleccionar las fugas de agua; una hoja de colágeno perforada 5; un parche 6 y/o un soporte 7.

30

La figura 12 es un gráfico ilustrativo que muestra los resultados de la prueba de estallido de los ejemplos 1-18.

Proceso de espumado

35 Proceso de espumado en lotes

La solución de gelatina se estabiliza a 38°C. La gelatina es espumada utilizando el mezclador mecánico (Greatz, modelo # GR-3060A) durante 2 minutos a una velocidad #2 y 1.5 minutos a velocidad #5. Posteriormente, la gelatina en espuma se transfiere en las bandejas de liofilización (100mmx100mm).

Proceso de espumado continuo

40 La entrada de aire, entrada de la solución de gelatina y entrada de solución enzimática están conectadas a un mezclador estático (mezcladores en espiral Nordson EFD - 24 elementos de mezcla con un diámetro de 12.7 mm de longitud cada una; largo del alojamiento es 33.53cm). Las velocidades de flujo son 6.5L/hr de solución de gelatina, 1L/min de aire y 5ml/min de solución de enzima. La temperatura de la solución de gelatina en la entrada del mezclador es de aproximadamente 30°C.

45 Materiales, soluciones y herramientas

Solución de enzima dializada -

Una solución enzimática al 15% (p/v) se preparó disolviendo el polvo de Transglutaminasa microbiana (mTG) (Activa TG en polvo, Ajinomoto, Lote # 100727) en 0.1M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) y dializando dos veces contra Na-Ac 0.1M (acetato de sodio trihidrato, Merck mucho# A902812 014) por 24 horas.

50 Polvo de enzima liofilizada

Una solución de enzima al 2% (p/v) se preparó disolviendo polvo de enzima mTG en bruto (polvo, Ajinomoto, Lote # 100727) en Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote #902812 014). La solución MB fue adicionada a la solución de la enzima en relación de 3:100. La solución fue filtrada a través de un filtro de 200 micras y luego liofilizada hasta sequedad a 0.01 mbar y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

5 Solución de azul de metileno (MB)

La solución se preparó por disolución de polvo de azul de metileno (Riedel-de Haen lote # 23120) en Na- ca 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014).

Liofilizador

Christ modelo epsilon 2-60

10 Ejemplo 1- Prueba de presión de estallido de parche atomizado

La gelatina 5% (p/v) (Gelita, Lote # 601089) fue disuelta en solución 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# 902812 014). La solución de gelatina fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. La espuma fue cargada en bandejas 10X10X1.5cm. Las bandejas fueron liofilizadas utilizando el liofilizador.

15 La solución de enzima dializada fue mezclada con etanol (Frutarom, lote # 9306482 No.015) en relación de 3:2. Una solución de MB fue adicionada a la mezcla en relación de 3:50 (MB: enzima). La solución fue atomizada sobre la gelatina liofilizada utilizando una pistola atomizadora (Profxene, PR-103, Mfg SN 14200226). Los parches atomizados fueron secados en el liofilizador Christ a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 2 - Prueba de presión de estallido de parche con la enzima integrada durante el espumado de los lotes

20 Dos soluciones de gelatina fueron preparadas: gelatina 8% (p/v) (Gelita, lote # 601089) en 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) y 2.5% (p/v) gelatina (Gelita, lote # 601089) en 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote #902812 014). La solución de gelatina al 8% fue estabilizada a 38°C. Una capa fina de la solución no espumada fue cargada en cada bandeja (cerca de 10ml para una superficie de 10x10cm). La gelatina fue enfriada a temperatura ambiente y mantenida durante aproximadamente 30min. La solución de gelatina al 8% fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. Cerca de 60 ml de la espuma fueron cargados sobre la capa previa de gelatina en bandejas de 10X10X1.5cm. Posteriormente, las bandejas fueron colocadas en el congelador durante 25 minutos.

25 El 2.5% de la solución de gelatina fue espumada utilizando el mezclador mecánico durante 30 segundos a una velocidad #5. Una solución de enzima dializada fue mezclada con la solución MB a RT y enfriada a 6°C. La mezcla fue adicionada a la espuma de gelatina en relación de 3:200. La mezcla resultante fue espumada por otros 2 minutos a velocidad #5. 60 ml de la mezcla final espumada fue vertida sobre las capas de gelatina congelada/ gelatina en espuma de cada bandeja liofilizada. Las bandejas fueron liofilizadas utilizando liofilizador Christ hasta sequedad de 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 3 - Prueba de presión de estallido de parche con enzima integrada por atomizado y soporte químicamente entrelazado

35 Una solución de gelatina al 9% (p/v) (Gelita, lote # 601089) en solución reguladora 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote # A902812 014) fue calentada a 38°C y espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. Una fina capa de la espuma fue cargada en las bandejas (cerca de 4mm de espesor). La espuma fue liofilizada hasta sequedad. Posteriormente, las almohadillas de gelatina fueron entrelazadas químicamente.

40 El entrelazado de la solución consistió de 70% de etanol (Frutarom, lote # 9306482 No.015) y 0.05% (p/v) DL-gliceraldehído (Biosynth chemistry and biology, lote# 121006/9) en agua purificada. Cada almohadilla fue colocada en un recipiente, cubierta con una cantidad suficiente de solución de entrelazado y sellada. Los recipientes fueron colocados en la incubadora durante 72 horas a 37°C.

Posteriormente, las almohadillas fueron lavadas con agua purificada, extensivamente.

45 Una solución de gelatina al 9% (Gelita, lote # 601089) en solución reguladora Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) 0.01M fue preparada y espumada bajo las mismas condiciones que el parche entrelazado. Las almohadillas entrelazadas fueron colocadas en bandejas de liofilización y cubiertas con la espuma preparada. Las almohadillas fueron liofilizadas hasta sequedad a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

50 Una solución de enzima se preparó mezclando la enzima purificada 300 u/ml (Lote # 27-27) con etanol (Frutarom, lote # 9306482 No.015), en relación 3:2. La solución de MB fue adicionada a la mezcla en relación de 3:50 (MB: solución enzimática).

La solución de enzima fue igualmente atomizada sobre las almohadillas liofilizadas. Los parches atomizados fueron secados por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C. Se hace referencia ahora a la figura 7, que muestra un vendaje de ejemplo como se construye para el ejemplo # 3, de acuerdo con algunas realizaciones demostrativas.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones, el vendaje de la figura 7 puede incluir una capa 1 de gelatina en espuma entrelazada de gliceraldehído; una capa 2 de gelatina en espuma; y una capa 3 de enzima atomizada.

Ejemplo 4 - Prueba de presión de estallido del parche con enzima en polvo integrada en el parche perforado con soporte de fibras de celulosa

- 10 Las fibras de celulosa oxidada fueron adicionadas a una gelatina al 9% (p/v) (Gelita, lote # 601089) en solución 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A 902812 014) en relación de 1:2. Aproximadamente 10 ml de la papilla fue vertida a las bandejas de liofilización (10x10cm). Las bandejas fueron mantenidas a RT durante 30 minutos hasta la estabilización de la papilla

- 15 Una gelatina al 9% (p/v) (Gelita, lote # 601089) en solución 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) fue calentada a 38°C y espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. La espuma fue transferida a las bandejas de liofilización cubriendo la papilla estabilizada de gelatina /celulosa oxidada. Las bandejas cargadas fueron liofilizadas hasta sequedad.

Posteriormente, las almohadillas secas fueron perforadas desde su lado que no contenía celulosa utilizando un modelo hecho en impresora 3D (Connex500™, Objet Geometry Ltd.). El modelo consiste de una matriz de agujas de 1.2mm de diámetro con 5 mm de distancia entre ellos. Las agujas fueron de 3 diferentes longitudes - 4mm, 8mm y 12mm

- 20 El parche perforado estaba cubierto con la enzima en bruto en polvo e incorporada en la matriz de espuma por cepillado suave.

El lado del parche tratado con la enzima fue rociado con solución 40% de etanol (Frutarom, lote# 9306482 No.015)/ acuosa para sellar la superficie de la almohadilla evitando una remoción de enzima no controlada y liofilizada a 0.01 mbar de presión y rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

- 25 Ejemplo 5 - Prueba de presión de estallido de parche con enzima integrada por sumergido del parche en solución enzimática

Aproximadamente 10 ml de gelatina al 9% (p/v) (Gelita, lote # 601089) en solución Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) fue vertida en las bandejas de liofilización (10x10cm). Las bandejas se mantuvieron a RT durante 30 minutos hasta la estabilización de la solución.

- 30 Se preparó una solución espumante de 9% de gelatina (Gelita, lot # 601089) en solución Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) y ascorbato de sodio 0.06M (Sigma, lote # 038K0046) y calentó a 38°C. La solución fue espumada utilizando espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas para cubrir la capa de gelatina no espumada. El parche fue liofilizado hasta sequedad a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

- 35 Una solución de enzima se preparó por mezclado de la enzima purificada 750U/ml (Lote # 27-37), etanol (Frutarom, lote # 9306482 No.015) y acetonitrilo (Sigma, lote # STBB1581K9) en una relación de 1:4:5. 25ml de solución fueron vertidos en la bandeja de liofilización y el parche de gelatina seco fue sumergido en la solución; la capa no espumosa hacia arriba. Los parches fueron secados utilizando el liofilizador a 0.01 mbar de presión y a una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

- 40 Ejemplo 6 - Prueba de presión de estallido de parche de gelatina espumado de forma continua con la enzima integrada durante el procedimiento de espumación con soporte de gelatina entrelazada por calor

- 45 Una gelatina al 9% (p/v) (Gelita, lote # 601089) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) fue calentada a 38°C y espumada utilizando espumado por lotes. Una capa de 4 mm de espuma fue cargada en las bandejas de liofilización. La espuma fue liofilizada hasta sequedad en 0.01 mbar y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C. Los parches secos fueron entrelazados por calor en vacío (Nuve, EV 108, Mfg SN 03-0250) el a una la temperatura de horno de160°C durante 7 horas a vacío de ~ 2mbar (Ilmvac, MPC 201 TMfg SN 4ek6f56CX).

- 50 Una gelatina al 9% (Gelita, lote # 601089) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) se preparó y espumada con solución de enzima dializada mezclada con solución de MB (relación 2:1) utilizando el proceso continuo de espumado. Las almohadillas entrelazadas por calor fueron colocadas en bandejas de liofilización, humedecidas con agua atomizada y cubiertas con espuma de gelatina. El conjunto de capas fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 7- Parche de gelatina y glicerol con malla de refuerzo para hernia con enzima en polvo integrada y un soporte

5 Una solución de gelatina (Gelita, lote # 601089) al 9% (p/v) con un 3% (p/v de glicerina (Frutarom, lote # 26319005) en solución reguladora 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) fue calentada a 38°C. 10ml de la solución fueron cargados en cada bandeja de liofilización y mantenidos durante 30min a RT para estabilizar la solución. La solución de gelatina restante fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. Una capa aproximadamente de 5mm de la gelatina en espuma fue vertida en las bandejas cubriendo la primera capa de gelatina no espumada. La espuma fue liofilizada hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

10 El enzima en polvo liofilizada fue igualmente dispersado sobre el parche de gelatina seco e incorporado en la matriz de gelatina mediante un rodillo de aguja (Derma Microneedle therapy needle roller, 3.0mm 3-row, DR30-3R).

Una malla de polipropileno (Gynecare, Gynemesh*PS, Ethicon) de tamaño 8x8cm fue colocada en la parte superior y recubierta con espuma de gelatina preparada como se describe anteriormente. El parche ensamblado fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 8- Parche de Gelatina y glicerina con malla de refuerzo para hernia, enzima incrustada en la propia malla

15 Una gelatina (Gelita, lote #601089) al 9% (p/v) con 3% (p/v) de glicerina (Frutarom, lote # 26319005) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck lote # A902812 014) fue calentada a 38°C. La solución fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. Una capa de 5 mm de espuma fue vertida en las bandejas de liofilización. La enzima purificada 750 u/ml (lote # 27-37) fue mezclada con 2.5% (p/v) HPMC (ShinEtsu 8025107) en relación 1:2. La malla de polipropileno (Gynecare, Gynemesh*PS, Ethicon) fue sumergida en HPMC /solución de enzima, removida e inmediatamente colocada en la parte superior de la espuma de gelatina. Una capa de espuma de gelatina adicional fue igualmente dispersada en la parte superior del polipropileno.

20 El parche ensamblado fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

25 Se hace referencia ahora a la figura 6, la cual muestra un vendaje de ejemplo construido de acuerdo con este Ejemplo, en conformidad con algunas realizaciones demostrativas. De acuerdo con algunas realizaciones, el vendaje de la figura 6 puede incluir una gelatina no-espumada y soporte de glicerol 1; una gelatina en espuma y glicerol 2, y una malla para hernia con HPMC y enzima 3.

Ejemplo 9- Parche de gelatina con soporte de gelatina, malla de refuerzo para hernia y gelatina en espuma, recubierto atomizada con enzima

30 Una gelatina al 8% (w/W) (Gelita lot #601089) en solución 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) fue calentada a 38°C. La solución fue espumada utilizando el mezclador mecánico durante 2 minutos a velocidad #2 y además 1.5 minutos a velocidad #5. La espuma fue vertida en las bandejas de liofilización y cubierta con una malla de polipropileno (Gynecare, Gynemesh*PS, Ethicon). El parche ensamblado fue secado por liofilización hasta sequedad a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

35 Una solución de enzimática dializada fue mezclada con una solución MB en relación de 50:1 (enzima:MB). Etanol (Frutarom, lote # 9306482 No.015) fue adicionado a la solución en relación de 2:3 (etanol: solución de enzima).

Los parches de gelatina seca/ polipropileno fueron atomizados con la mezcla de enzima/ etanol y secados a 0.01 mbar y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 10- Parche de gelatina y PEG con enzima en polvo integrada y soporte entrelazado por calor

40 Una gelatina al 9% (p/v) (Gelita, lote # 601089) con 3% (p/v) de PEG 400 (Sigma, lote # 036K0046) en solución 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck lote# A902812 014) fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. Una capa delgada de 4 mm de espuma de gelatina fue vertida en las bandejas de liofilización. La espuma fue liofilizada. Los parches secos fueron entrelazados por calor en una estufa de vacío (Nuve, EV 108, Mfg SN 03-0250) manteniendo la temperatura del horno a 160°C durante 7 horas en vacío por aproximadamente 2mbar (Ilmvac, 40017, Mfg SN 4ek6f56cx).

45 Los parches entrelazados fueron igualmente humedecidos con agua y colocados en las bandejas de liofilización. La mezcla de gelatina/PEG fue espumada en el proceso de espumado en lotes y vertida en la parte superior de los parches entrelazados. El parche ensamblado fue liofilizado hasta sequedad.

50 El polvo de la enzima liofilizada en polvo fue igualmente dispersado en el parche e incorporado en la matriz de la espuma de gelatina utilizando un rodillo de agujas (Derma Microneedle therapy needle roller, 3.0mm 3-row, DR30-3R).

El parche fue atomizado con mezcla agua y etanol (Frutarom, lote # 9306482 No.015) en relación 1:9.

El parche ensamblado fue secado a 0.01 mbar y a una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 11 - Prueba de presión de estallido de la capa de gelatina espumosa secada por calor con enzima incrustada

5 Una solución de enzima se preparó mezclando 95% de etanol con agua purificada, polvo de color azul (Univar Limited, 37005 Azul FD&C No. 1) y la solución de enzima purificada (550 u/ml) a una concentración final de 80% de etanol, 30 mg/L de color azul en polvo y actividad final de la enzima de 41 u/ml.

10 La capa de gelatina en espuma seca por calor de tamaño 90x90x10mm³ fue colocada en una bandeja y cubierta con 4ml de etanol basada en la solución de enzima utilizando una bomba de jeringa (Kd Scientific, Mfg S/N RS 232) con un ajuste de velocidad de 15ml/min y una jeringa de 26mm de diámetro. La bandeja con la gelatina en espuma fue trasladada bajo la boquilla de la jeringa para lograr una cubierta homogénea.

La espuma de gelatina fue secada por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Los resultados de la presión de estallido se muestran en la Tabla 7 para este ejemplo y para ejemplos posteriores; por favor también véase las figuras 10-12, según corresponda.

15 Ejemplo 12- Parche "sándwich" de gelatina con enzima en polvo integrada y enzima atomizada con soporte de gelatina entrelazada por calor

20 Una solución al 11% de gelatina (p/v) (Gelita) en solución 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C. La solución de gelatina fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. En aproximadamente 3 mm de la capa de la gelatina en espuma fue vertida en las bandejas. La espuma fue liofilizada hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C. Los parches secos fueron entrelazados por calor en horno de vacío (Nuve, EV 108, Mfg SN 03-0250) a una temperatura de horno de 160°C, durante 7 horas en vacío de ~ 2mbar (Ilmvac, MPC 201 TMfg SN 4ek6f56cx).

25 Gelatina al 9% (p/v) (Gelita) en solución 0.1M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C. La solución de gelatina fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. La almohadilla de la gelatina previamente entrelazada fue cubierta con una capa de aproximadamente 3 mm de gelatina en espuma y liofilizada utilizando las mismas condiciones como se describen anteriormente. El polvo liofilizado de enzima fue igualmente dispersado sobre el parche de gelatina seco e incorporado en la matriz de gelatina mediante un rodillo de agujas (Derma Microneedle therapy needle roller, 3.0mm 3-row, DR30-3R).

30 El parche con el polvo de la enzima incrustada estaba recubierto con un 9% (p/v) de espuma de gelatina preparada como se ha descrito anteriormente. El parche ensamblado fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Una solución de enzima se preparó mezclando la enzima purificada (300 u/ml) con etanol (Frutarom), en relación de 3:2. Una solución MB fue adicionada a la mezcla en relación de 3:50 (MB: solución de enzima).

35 La solución de enzima fue atomizada igualmente sobre las almohadillas liofilizadas. Los parches atomizados fueron secados por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Ejemplo 13 - Prueba de presión de estallido de parche de gelatina con 2 pasos de integración de enzima y soporte de gelatina de doble capa entrelazada por calor

40 10 ml de gelatina al 11% (p/v) (Gelita) en solución 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue vertida en las bandejas de liofilización (10x10cm). Las bandejas fueron mantenidas a RT por aproximadamente 30 minutos hasta la estabilización de la solución.

45 La solución de gelatina al 11% (Gelita) en 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) se preparó y calentó a una temperatura de 38°C. La solución fue espumada utilizando espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas, cubriendo la capa de gelatina no espumada, espesor total de 5mm. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C. Los parches secos fueron entrelazados por calor en horno de vacío (Nuve, EV 108, Mfg SN 03-0250) a una la temperatura de horno de 160°C, durante 7 horas a vacío de ~ 2mbar (Ilmvac, MPC 201 TMfg SN 4ek6f56cx).

Las almohadillas entrelazadas fueron humedecidas durante 19 horas en Tween20 (Merck) 0.07% (v/v) en solución acuosa. Los residuos de la solución fueron removidos de las bandejas. La solución de gelatina al 9% (p/v) (Gelita) en 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C. La solución de gelatina fue espumada utilizando

- el proceso de espumado en lotes y vertida en la parte superior de las almohadillas entrelazadas humedecidas. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C. °
- 5 Una solución de enzima se preparó mezclando la enzima purificada (750 u/ml), etanol (Frutarom) y acetonitrilo (Sigma) en relación de 1:4:5. 15ml de la solución fue filtrada sobre la parte superior de las almohadillas secas. Los parches fueron secados con el liofilizador a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- Otra solución de enzima se preparó mezclando la enzima purificada (300 u/ml) con etanol (Frutarom), en relación de 3:2. Una de solución MB fue adicionada a la mezcla en relación de 3:50 (MB: solución de enzima).
- La solución de enzima fue atomizada igualmente en las almohadillas liofilizadas. Los parches atomizados fueron secados por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- 10 Ejemplo 14 - Prueba de presión de estallido de parche de gelatina con polvo de enzima integrado sellado con enzima atomizada y soporte de gelatina de doble capa entrelazada químicamente
- 15 Una gelatina al 9% (p/v) (Gelita) en 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C y espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. Una fina capa de espuma fue cargada en las bandejas (cerca de 4mm de espesor). La espuma fue liofilizada hasta sequedad. Posteriormente, las almohadillas de gelatina fueron entrelazadas químicamente.
- La solución entrelazada consiste de 70% de etanol (Frutarom) y 0.05% (p/V) DL- gliceraldehido (Biosynth chemistry and biology) en agua purificada. Cada almohadilla fue colocada en un recipiente, cubierta con una cantidad suficiente de solución de entrelazado y sellada. Los recipientes fueron colocados en la incubadora durante 72 horas a 37°C.
- Posteriormente, las almohadillas fueron lavadas con agua purificada, extensivamente.
- 20 Una gelatina al 9% (Gelita) en solución 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) se preparó y fue espumada bajo las mismas condiciones que el parche entrelazado. Las almohadillas entrelazadas fueron colocadas en las bandejas de liofilización y cubiertas con la espuma preparada. Las almohadillas fueron liofilizadas hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- 25 La enzima en polvo liofilizado fue igualmente dispersada sobre el parche e incorporada en la matriz de espuma de gelatina utilizando un rodillo de agujas (Derma Microneedle therapy needle roller, 3.0mm 3-row, DR30-3R).
- Otra solución de enzima se preparó mezclando la enzima purificada (300 U/ml) con etanol (Frutarom), en relación 3:2. Una solución MB fue adicionada a la mezcla en relación de 3:50 (MB: solución de enzima).
- La solución de enzima fue atomizada igualmente en las almohadillas liofilizadas. Los parches atomizados fueron secados por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- 30 Ejemplo 15 - Prueba de presión de estallido de almohadilla de gelatina en partículas humedecida con enzima, para heridas en forma de cavidad
- Una gelatina al 9% (Gelita) en 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) se preparó y calentó a 38°C. La solución fue espumada utilizando espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas y liofilizada hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- 35 Las almohadillas secas fueron cortadas en pedazos de tamaño 8x10x10 mm³.
- Una solución de enzima se preparó por mezclado de etanol de 95% con agua purificada, polvo de color azul (Univar Limited, 37005 Azul FD&C No. 1) y solución de enzima purificada (550 u/ml) a una concentración final de 70% de etanol, 15 mg/L de polvo de color azul y actividad final de la enzima 87 u/ml.
- 40 La gelatina en partículas estaba humedecida en la solución de enzima en etanol basada en una relación de 15 ml de la solución por 1g de gelatina en partículas. La gelatina fue secada por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- Ejemplo 16 - Prueba de presión de estallido de parche de gelatina con refuerzo entrelazado por calor y enzima inscrutada
- 45 Esponjas de gelatina entrecruzable por calor con 1mm de espesor fueron ligeramente humedecidas y colocadas en bandejas de liofilización.

- Solución de gelatina (Gelita) al 9% en agua purificada se preparó y calentó a 38°C. La solución fue espumada utilizando el espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas, cubriendo las esponjas de gelatina de 1mm. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- 5 Una solución enzimática se preparó por mezclado de etanol al 95% con agua purificada, polvo de color azul (Univar Limited, 37005 Azul FD&C No. 1) y solución de enzima purificada (550 u/ml) a una concentración final de 80% de etanol, 30 mg/L de polvo de color azul y actividad final de la enzima de 41 u/ml.
- Los parches de gelatina seca fueron cubiertos con 10 ml de etanol basado en la solución de enzima utilizando una bomba de jeringa (Kd científico, Mfg S/N RS 232) con ajuste de velocidad de 15ml/min y una jeringa de diámetro 26mm. Cada bandeja fue movida bajo la boquilla de la jeringa para lograr una cubierta homogénea.
- 10 La gelatina en espuma fue secada por liofilización en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- Ejemplo 17 - Prueba de presión de estallido de parche de gelatina con refuerzo de gelatina entrelazada enzimática y enzima incrustada
- 15 La solución de enzima purificada (550U/ml) fue diluida a 50 u/ml en 0.1M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato). La solución de gelatina y solución de enzima fueron juntas mezcladas y 30 ml de la mezcla fueron vertidos en las bandejas de liofilización.
- 20 La solución de gelatina al 9% (Gelita) en agua purificada se preparó y calentó a una temperatura de 38°C. Durante la mezcla de la enzima con la solución de gelatina, la solución de gelatina al 9% fue espumada utilizando espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas, cubriendo los 30 ml de la mezcla de gelatina y enzima, antes de completar el proceso de curación de la gelatina. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- Una solución de enzima se preparó mezclando el 99.98% de etanol, con agua purificada, polvo de color azul (Univar Limited, 37005 Azul FD&C No. 1) y solución de enzima purificada (550U/ml) a una concentración final de 80% de etanol, 30 mg/L de polvo de color azul y actividad final de enzima de 41U/ml.
- 25 Los parches de gelatina seca fueron cubiertos con 10 ml de etanol basado en la solución de enzima utilizando una bomba de jeringa (Kd científico, Mfg S/N RS 232) con ajuste de velocidad de 15ml/min y diámetro de jeringa de 26mm. Cada bandeja fue movida bajo la boquilla de la jeringa para lograr una cubierta homogénea.
- La espuma de gelatina fue secada por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- 30 Ejemplo 18: Prueba de presión de estallido de parche de gelatina con refuerzo no absorbible (poliuretano) y enzima incrustada
- Hojas de poliuretano de 1 mm de espesor (DermaMed) fueron colocadas en las bandejas de liofilización.
- 35 Solución de gelatina al 9% (Gelita) en agua purificada se preparó y calentó a 38°C. La solución fue espumada utilizando el proceso de espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas, cubriendo las esponjas de gelatina de 1mm. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- Una solución de enzima fue preparada mezclando 99.98% de etanol con agua purificada, polvo de color azul (Univar Limited, 37005 Azul FD&C No. 1) y la solución de enzima purificada (550U/ml) a una concentración final de 80% de etanol, 30 mg/L de polvo de color azul y actividad final de la enzima de 41U/ml.
- 40 Los parches secos de gelatina fueron cubiertos con 10 ml de etanol basado en la solución de enzima utilizando una bomba de jeringa (Kd científico, Mfg S/N RS 232) con una velocidad de ajuste de 15ml/min y jeringa de diámetro 26mm. Cada bandeja fue movida bajo la boquilla de la jeringa para lograr la homogeneidad de la cubierta.
- La espuma de gelatina fue secada por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.
- Ejemplo 19- Prueba *In-vivo* de adherencia de la malla a hernias a pared abdominal
- 45 3 clases de parches incorporados de mallas de hernia, fueron preparados de acuerdo con la siguiente descripción-
- Tipo 1: Una gelatina al 8% (p/v) (Gelita) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato) fue calentada a 38°C. La solución fue espumada utilizando el método de los lotes. 60 ml de la espuma fueron vertidos en las bandejas de liofilización y cubiertos con una malla de polipropileno (Gynecare,*Gynemesh PS, Ethicon). La malla fue cubierta con

otra capa de gelatina en espuma. El parche ensamblado fue secado por liofilización hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

5 Tipo 2: Una gelatina al 8% (p/v) (Gelita) y glicerol (Frutarom) 3% (v/v) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato) fue calentada a 38°C. 10ml de solución fueron vertidos en las bandejas de liofilización y mantenida por aproximadamente 25min a 10°C para su estabilización. Una malla de polipropileno (Gynecare,*Gynemesh PS, Ethicon) fue colocada en la parte superior de la gelatina y la capa glicerol. La gelatina al 8% (p/v) (Gelita) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C.

10 La solución fue espumada utilizando el método de los lotes. La espuma fue vertida en las bandejas en la parte superior de la malla de la hernia. El parche ensamblado fue secado por liofilización hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

15 Tipo 3: Una gelatina al 8% (p/v) (Gelita) y glicerol (Frutarom) al 3% (v/v) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C. 10ml de la solución fueron vertidos en las bandejas de liofilización y mantenida por aproximadamente 25min a 10°C para su estabilización. Gelatina al 8% (p/v) (Gelita) en solución de Na-Ac 0.01M (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C. La solución fue espumada utilizando el método de lotes. 60 ml de la espuma fueron vertidos en las bandejas liofilización y cubiertas con una malla de polipropileno (Gynecare,*Gynemesh PS, Ethicon). La malla fue cubierta con otra capa de solución de espuma. El parche ensamblado fue secado por liofilización hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Una solución dializada de enzima fue mezclada con una solución MB en relación de 50:1 (enzima:MB). Etanol (Frutarom) fue adicionada a la solución en relación de 2:3 (etanol: solución de enzima).

20 Todas las tres composiciones de parches de gelatina seca/polipropileno fueron atomizados con mezcla de enzima/ etanol y secados a 0.01 mbar y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

25 Los parches fueron probados *in-vivo*. Los tres tipos de parches fueron aplicados sobre pared abdominal porcina, en cirugía abierta. Los parches fueron cubiertos con una pequeña cantidad de solución salina y la pared abdominal fue cubierta al soporte con tejido graso. La presión fue aplicada sobre los parches por 4 minutos. Después de remover la presión, se probó la adhesión de la malla hernia tanto en la pared abdominal como en el tejido graso.

Tabla 5 –

	Adhesión a la pared abdominal	Adhesión sobre tejido adiposo
Tipo 1	Buena adhesión. La fuerza fue aplicada al desprender la malla del tejido	Poca adhesión
Tipo 2	Media adhesión al tejido	Poca adhesión
Tipo 3	Pobre adhesión al tejido	Muy poca adhesión

Ejemplo 20 - Prueba de presión de estallido de parche de gelatina con 2 pasos de integración de enzima y soporte de gelatina entrelazada por calor

30 Solución al 20% de gelatina (Gelita) en 0.01M Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) se preparó y calentó a 38°C. La solución fue espumada utilizando espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas, creando una capa de 3mm de espesor. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C. Los parches secos fueron entrelazados por calor en el horno de vacío (Nuve, EV 108, Mfg SN 03-0250) manteniendo el horno de temperatura a 160°C durante, 7 horas en vacío de ~ 2mbar (Ilmvac, MPC 201 TMfg SN 4ek6f56cx).

35 Las almohadillas entrelazadas fueron humedecidas por 19 horas en solución acuosa de Tween20 al 0.07% (v/v) de (Merck). Los residuos de la solución fueron removidos de las bandejas. La gelatina al 9% (p/v) (Gelita) en solución 0.01M de Na-Ac (acetato de sodio trihidrato, Merck) fue calentada a 38°C. La solución de gelatina fue espumada utilizando el proceso de espumado en lotes y vertida en la parte superior de las almohadillas entrelazadas humedecidas. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

40 Una solución de enzima se preparó mezclando enzima purificada (750U/ml), etanol (Frutarom) y acetnitrilo (Sigma) en relación de 1:4:5. 15ml de la solución fue goteada en la parte superior de las almohadillas secas. Los parches fueron secados utilizando el liofilizador en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Otra solución de enzima se preparó por mezclado de la enzima purificada (300 U/ml) con etanol (Frutarom), en relación de 3:2. Una solución MB fue adicionada a la mezcla en relación de 3:50 (MB: solución de enzima).

La solución de enzima fue atomizada igualmente sobre las almohadillas liofilizadas. Los parches atomizados fueron secados por liofilización a 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

5 Ejemplo 20- Esterilización de parches por haz de electrones

Diferentes parches fueron esterilizados utilizando radiación E-beam.

Tres dosis de radiación fueron probadas- 25kGy, 30 kGy, 35kGy. Los materiales que fueron preparadas de acuerdo al ejemplo #20 fueron irradiados a 35 kGy y probados posteriormente. Los materiales fueron probados utilizando la avanzada prueba de la presión de estallido antes de la radiación, inmediatamente después de la radiación y posteriormente una vez al mes después.

Tabla 6 –

Punto en el Tiempo	# de repeticiones	Resultado de la presión de estallido
Control (no fue irradiada)	5	204±83 mmHg
t= 0 (inmediatamente después de la radiación)	6	230±103 mmHg
t=1 mes	6	276±108 mmHg
t=2 meses	5	201±97 mmHg
t=3 meses	5	220±54 mmHg

Ejemplo 21- Parche de gelatina con la enzima integrada en el portador (HPMC) que es en capas o incrustada en la matriz de gelatina

15 La solución de gelatina al 9% (Gelita) en agua purificada se preparó y calentó a una temperatura de 38°C. La solución fue espumada utilizando espumado por lotes. La espuma fue cargada en las bandejas de liofilización. La enzima purificada (550U/ml) fue diluida a 40U/ml en una solución de HPMC al 1.5%. El color fue adicionado a la solución de enzima - 14mg/l de solución de polvo de color azul (Univar Limited, 37005 FD&C Blue No. 1). 15ml de solución de enzima fueron esparcidos en la superficie de gelatina en espuma. El parche fue liofilizado hasta sequedad en 0.01 mbar de presión y una rampa de temperatura desde 0°C a 20°C.

Tabla 7 –

Ejemplo	# El modelo de prueba	# de repeticiones	Resultado
1	presión de estallido básica	5	187±11mmHg
2	Prueba avanzada de presión de estallido	8	180±44 mmHg
3	Prueba avanzada de presión de estallido	8	278±80mmHg
4	Prueba avanzada de presión de estallido	7	291±59 mmHg
5	Prueba avanzada de presión de estallido	10	350±38 mmHg
6	Prueba avanzada de presión de estallido	6	214±36mmHg
11	Prueba avanzada de presión de	4	211±12mmHg

	estallido		
13	Prueba avanzada de presión de estallido	7	214±80 mmHg
14	Prueba avanzada de presión de estallido	6	189±60mmHg
15	Prueba avanzada de presión de estallido	5	192±86 mmHg
16	Prueba avanzada de presión de estallido	3	238±88 mmHg
17	Prueba avanzada de presión de estallido	4	220±34 mmHg
18	Prueba avanzada de presión de estallido	4	190±92 mmHg

Ejemplo 22- Prueba *in vitro* de adhesión de malla de hernia a pared abdominal

Materiales utilizados y herramientas:

Parietene™ (Covidien) - corte de malla Polipropileno en franjas de tamaño de 1x6 cm²

5 Parietene™ ProGrip™ (Covidien) – corte de malla de polipropileno y ácido poliláctico en franjas de tamaño de 1x6 cm²

Componentes del Sellante:

Solución de gelatina al 25% (p/v) (Gelita)

Solución PEGlicolada de transglutaminasa microbiana (60 U/ml)

Tres llaves de paso de vías ("SURUWAY")

10 Jeringas de 3ml con seguro ("Medi-Plus")

La pared abdominal de rata, se conservó a -20°C después de la cosecha de tejidos. Antes de usar el tejido fue descongelado y mantenido a 37°C.

Preparación del material:

La solución de gelatina fue llenada en las jeringas de 2ml en cada jeringa

15 La solución de enzima fue llenada en las jeringas de -1ml en cada jeringa

Las jeringas fueron mantenidas en un baño circulante a 25°C para la estabilización de temperatura antes del uso.

Cada conjunto de materiales (jeringa con gelatina y jeringa con enzima) fue conectado a la llave de paso de tres vías y jeringa a jeringa mezclado 9 veces, inmediatamente antes de la aplicación.

Método de prueba:

20 3 pruebas fueron hechas para probar las capacidades adhesivas de las mallas.

Prueba 1:

25 La malla Parietene estaba cubierta con sellante en un área de 4x3cm², como se demuestra en la figura 8. La cantidad de sellante utilizado para esta prueba es de 0.2 ml/cm². 7 minutos después de la aplicación el tejido fue colocado en la máquina de ensayo de tracción (Instron Tensile Testing System modelo 3343). El tejido colocado en una abrazadera fija y la malla adherida a una abrazadera móvil (como se muestra en la figura 9). La abrazadera móvil se mueve hacia arriba a una velocidad constante de 100mm/min.

Prueba 2:

5 La malla Parietene estaba cubierta con sellante en un área de 4x3cm², como se demuestra en la figura 8. La Cantidad de sellante utilizada para esta prueba es de 0.2 ml/cm². Inmediatamente después de la aplicación una hoja de silicona con peso total de 65g fue colocada en la parte superior de la capa sellante. 7 minutos después de la aplicación del tejido fue colocado en la máquina de ensayo de tracción (Instron Tensile Testing System modelo 3343), el tejido es estacionario, y la malla es adherida a una abrazadera móvil (como se muestra en la figura 9). La abrazadera móvil se mueve hacia arriba a una velocidad constante de 100mm/min.

Prueba 3:

10 La malla Parietene ProGrip y el tejido de la pared abdominal fueron humedecidos con solución salina y luego adheridos manualmente para una óptima adherencia. Después de la aplicación el tejido fue colocado en la máquina de ensayo de tracción, el tejido es estacionario, y la malla es adherida a una abrazadera móvil. La abrazadera móvil se mueve hacia arriba a una velocidad constante de 100mm/min.

Tabla 8 - Resultados de la prueba:

Prueba #	# de repeticiones	# Fuerza máxima aplicada [N]	Fuerza máxima aplicada/Área activa el [N/cm ²]
1	8	4.69±0.86	0.39±0.07
2	5	2.88±0.44	0.24±0.04
3	10	0.4±0.19	0.13±0.06

15 Las figuras 10 y 11 muestran los resultados de la prueba gráficamente.

Ejemplo 23-- Soporte de silicona patrón grabado con matriz de gelatina en espuma seca

20 Un patrón fue grabado en una hoja de silicona de 4mm de espesor y 20 orillas utilizando un láser (Universal Laser Systems. PLS6.150D; la orilla es una unidad de medida para la dureza del caucho). Agujeros circulares de 1mm de profundidad y 5mm de diámetro con 1.6 mm de distancia uno del otro fueron grabados (mostrados en la figura 13). Las hojas de silicona grabadas fueron colocadas en bandejas de liofilización. La solución de gelatina al 9% (Gelita) en agua purificada se preparó y calentó a 38°C. La solución fue espumada utilizando espumado en lotes. La espuma fue cargada en las bandejas, en la parte superior de la hoja de silicona grabada de tamaño 75mm x 75mm. El parche fue liofilizado.

25 Después de la liofilización, la matriz de gelatina fue muy bien adherida al soporte de la silicona. La matriz de gelatina y el soporte de silicona pueden ser doblados juntos sin dehiscencia y una considerable fuerza manual tuvo que ser ejercida con el fin de separar la matriz de gelatina desde el soporte de silicona.

Cuando el experimento fue repetido con una hoja de silicona idéntica sin patrón, la hoja de silicona no se adhiere bien a la matriz de gelatina. Tras la leve manipulación, la hoja de silicona y la matriz de gelatina se separaron.

Reivindicaciones

- 5 1. Un parche que comprende una malla quirúrgica implantable, una matriz de proteína entrecruzable y una enzima de entrelazamiento de proteína en contacto con dicha matriz para el entrelazamiento de dicha proteína entrecruzable, en donde dicha matriz se incorpora en, por capas o alrededor de dicha malla, con la condición de que dicha enzima no sea trombina, en donde dicha proteína entrecruzable comprende gelatina, en donde dicha gelatina está presente en una matriz de proteína, en donde dicha matriz tiene una densidad en un rango desde 5 a 100 mg/cm³ y en donde dicha matriz de proteína entrecruzable comprende espuma de gelatina porosa, en donde dicha espuma de gelatina comprende solución de gelatina en espuma seca o liofilizada.
- 10 2. El parche de la reivindicación 1, en donde dicha enzima está presente a una profundidad de al menos 0.5 mm en dicha capa de proteína, en donde dicha enzima no es una enzima derivada de sangre.
3. El parche de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha enzima es incorporada ya sea de forma homogénea en toda la matriz o presente en la matriz a una profundidad de al menos uno de 0.5 mm, 1 mm o hasta 20 mm desde la superficie de la matriz.
- 15 4. El parche de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además una capa posterior de refuerzo, en donde dicha malla quirúrgica se localiza entre una o más capas de refuerzo y la matriz de gelatina; en el medio de la matriz de gelatina; o en la parte superior de la matriz de gelatina; o una combinación de los mismos.
- 20 5. El parche de la reivindicación 4, en donde dicha enzima está presente en una capa de enzima y en donde dicha gelatina se encuentra en una o más de las siguientes ubicaciones:
dentro de dicho parche, sobre dicha capa de enzima, en dicha capa de enzima, sobre dicha capa posterior de refuerzo, en dicha capa posterior de refuerzo, o entre dicha capa de enzima y dicha capa posterior de refuerzo.
6. El parche de cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde dicha gelatina tiene una densidad en un rango desde 10 a 50 mg/cm³.
- 25 7. El parche de cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde dicha enzima comprende transglutaminasa (TG), y en donde la gelatina se incorpora en una matriz de gelatina con dicha transglutaminasa de tal manera que uno o más de lo siguiente ocurra:
una mayoría de actividad de la enzima se conserva a lo largo de un proceso de preparación; la enzima se distribuye igualmente alrededor de la superficie de la matriz de gelatina; y/o la enzima se incrusta a la profundidad de la matriz de gelatina (distribución en gradiente o igual).
- 30 8. El parche de la reivindicación 7, en donde dicha transglutaminasa se incorpora en dicha matriz de gelatina de acuerdo con uno o más de las mezclas antes del secado de dicha matriz o después del secado de dicha matriz, opcionalmente en donde dicha matriz se seca para comprender no más del 10% de contenido de humedad
9. El parche de las reivindicaciones 7 o 8, en donde la transglutaminasa está presente en una concentración de 0.05 a 2 mg de transglutaminasa/cm³ de matriz de gelatina.
- 35 10. El parche de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la gelatina incluye una pluralidad de unidades estructurales, y en donde más del 50% de dichas unidades estructurales no son entrecruzables
11. El parche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho parche puede cerrar una herida de tejido teniendo una presión de estallido de al menos 200 mmHg.
- 40 12. Un método de producción de un parche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína entrecruzable comprende gelatina en forma de una solución de gelatina, que comprende la mezcla de dicha solución de gelatina en un mezclador a una velocidad para formar una solución de espuma, secado de dicha solución de espuma para formar una solución seca y combinación de dicha solución seca con dicha enzima.
13. El parche o método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha transglutaminasa comprende una transglutaminasa microbiana
- 45 14. El parche de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enzima es encapsulada antes de la incorporación en el parche, y en donde la enzima está encapsulada en un material seleccionado del grupo que consiste en: PLA, PGA, PLGA, carragenina-k, liposomas, gelatina, colágeno, fibrinógeno, albúmina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, éteres de celulosa y/o en donde la enzima es modificada químicamente antes de la incorporación en el parche o apósito.

- 5 15. El parche de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el parche es esterilizado para asegurar un nivel de esterilidad de 10^{-6} a través de la exposición a la radiación de haz de electrones, en donde las dosis de radiación están en el rango de 20 a 40 kGy, opcionalmente incorporando además un radioprotector seleccionado del grupo que consiste en ascorbato, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, hidroxianisol butilado(BHA), clorobutanol, cisteína, manitol, metilparabeno, niacinamida, fenol, propilenglicol, propilgalato, propilparabeno, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, salicilato de sodio, tiosulfato de sodio, tocoferol, trehalosa.

Figura 1

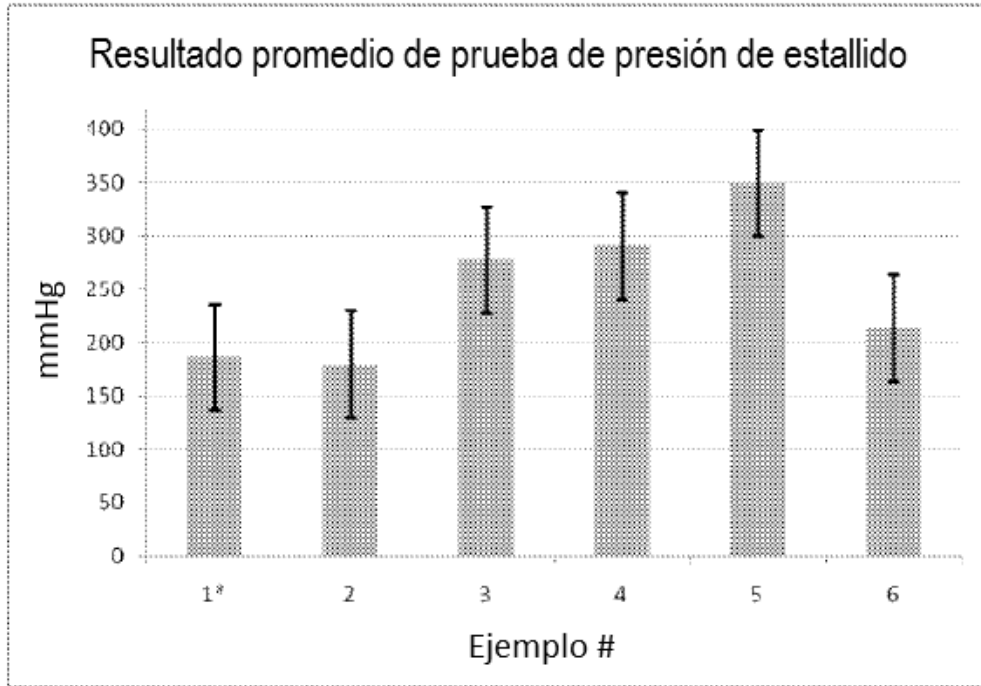


Figura 2

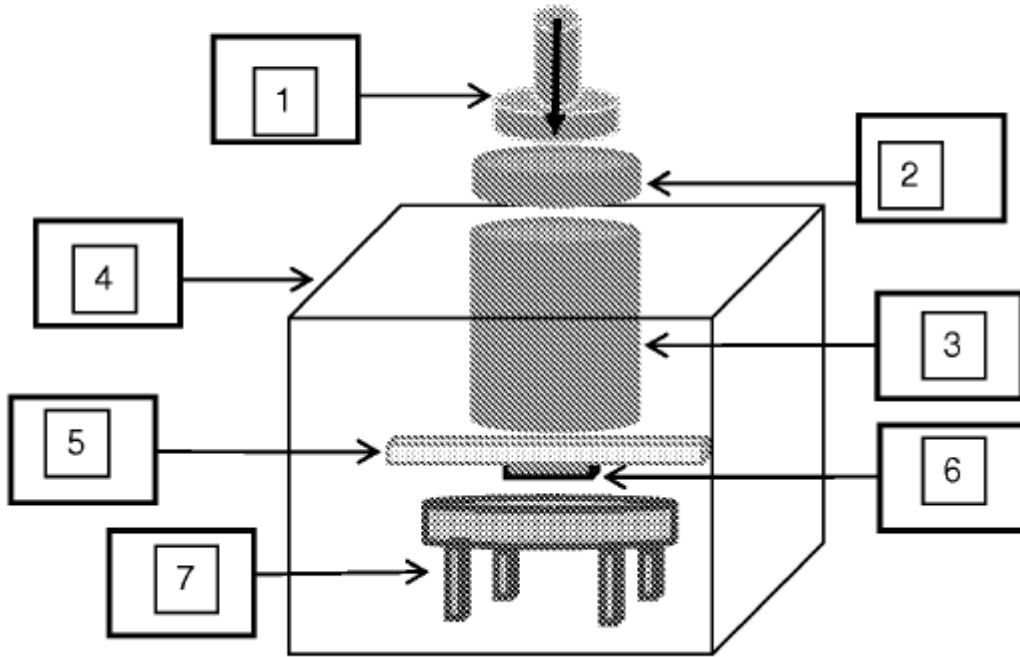
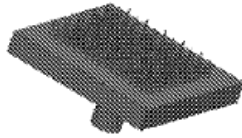


Figura 3



El perforador utilizado en el ejemplo #4

Figura 4. Diagrama de flujo para ejemplo #4

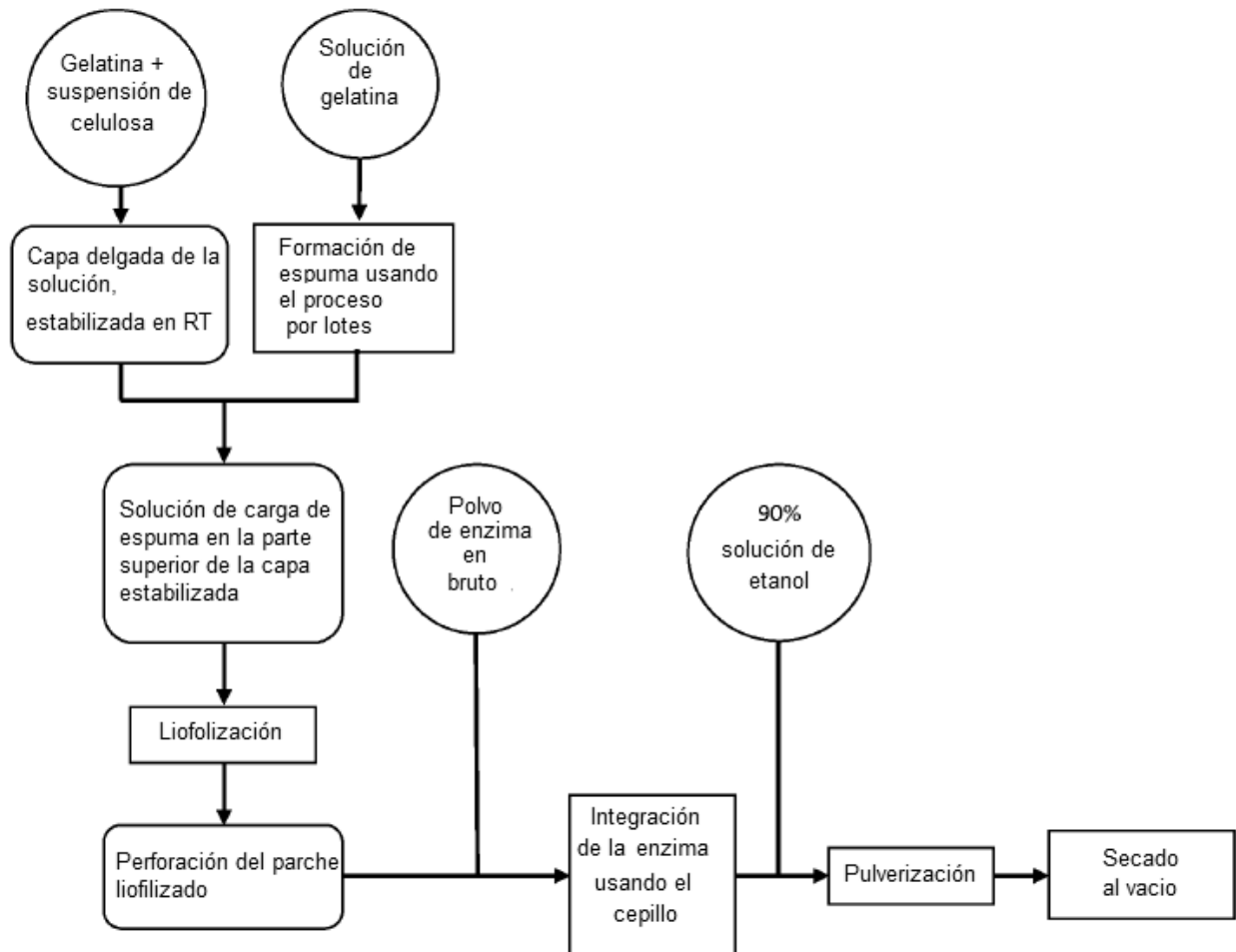


Figura 5.

Diagrama de flujo para ejemplo #6

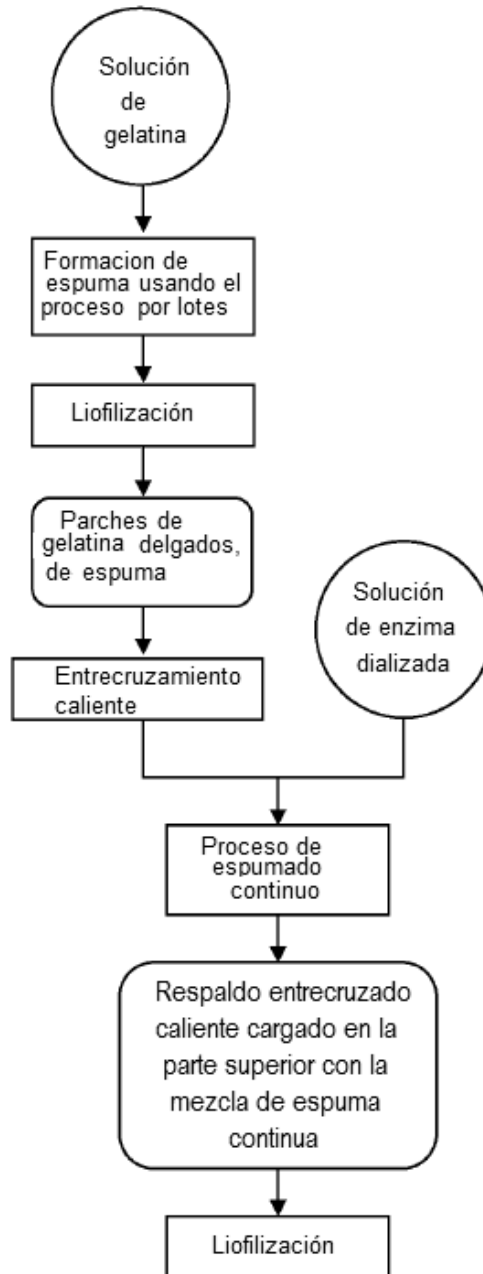


Figura 6

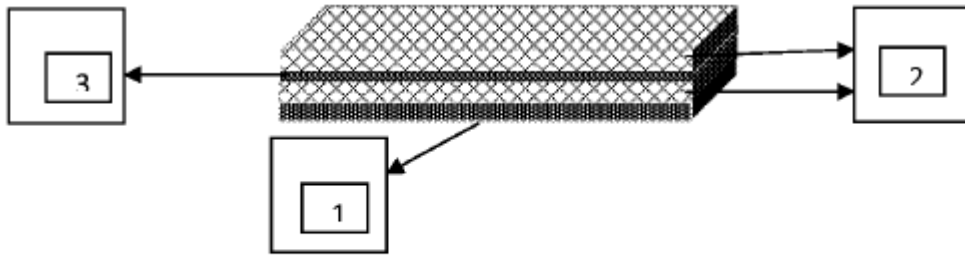
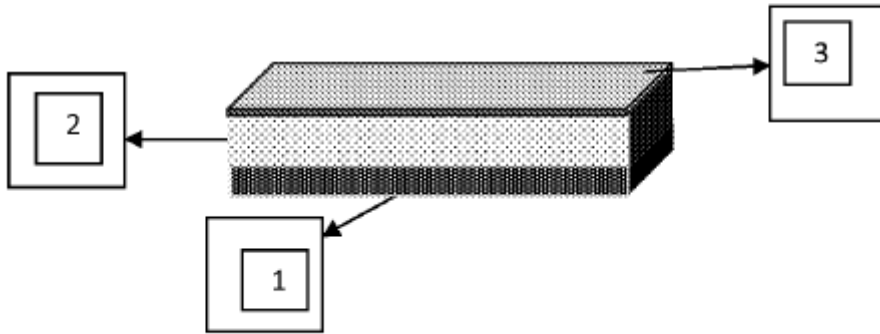


Figura 7



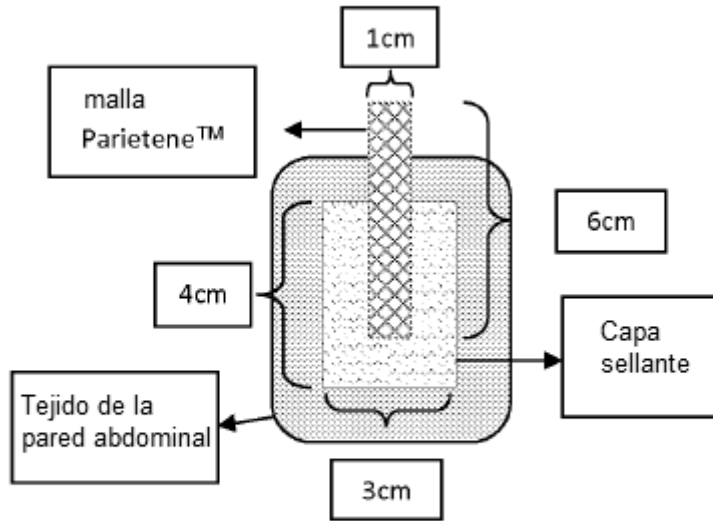


Figura 8

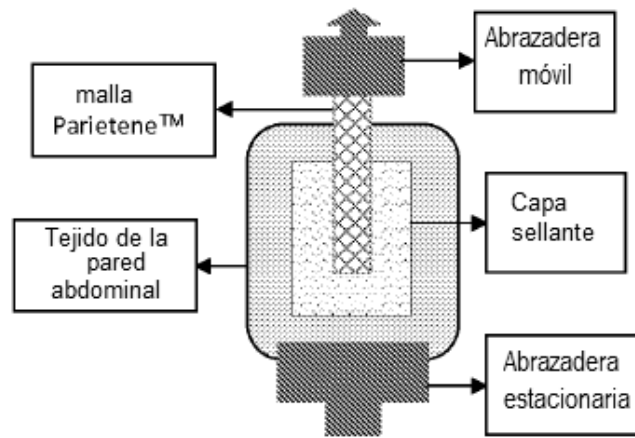


Figura 9

Figura 10

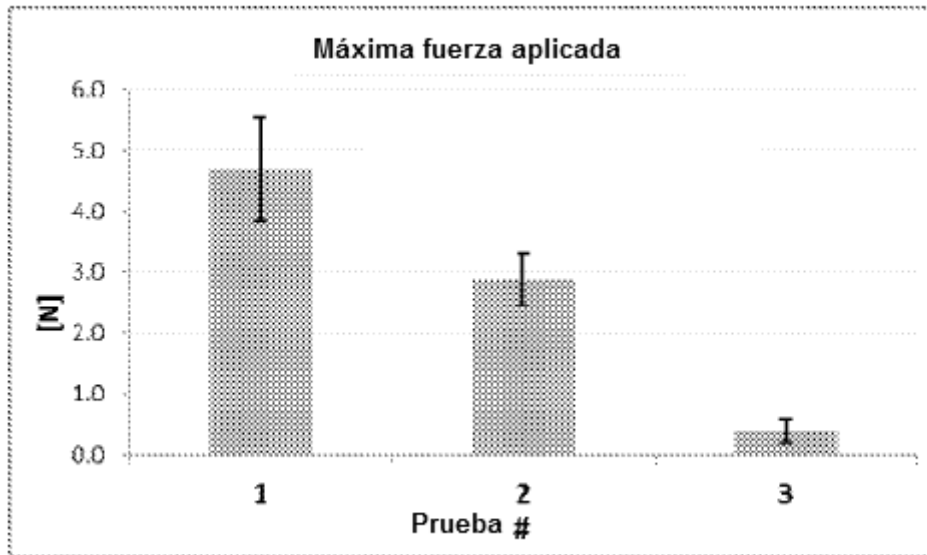


Figura 11

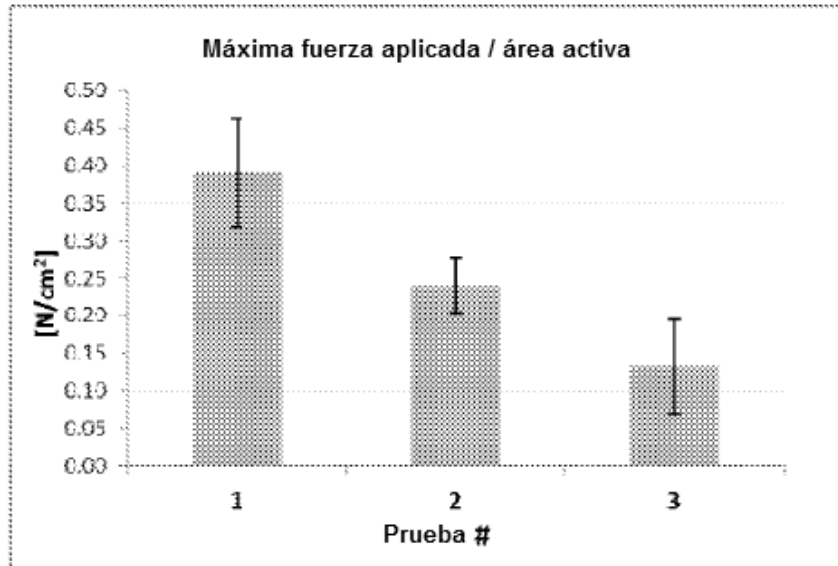


Figura 12

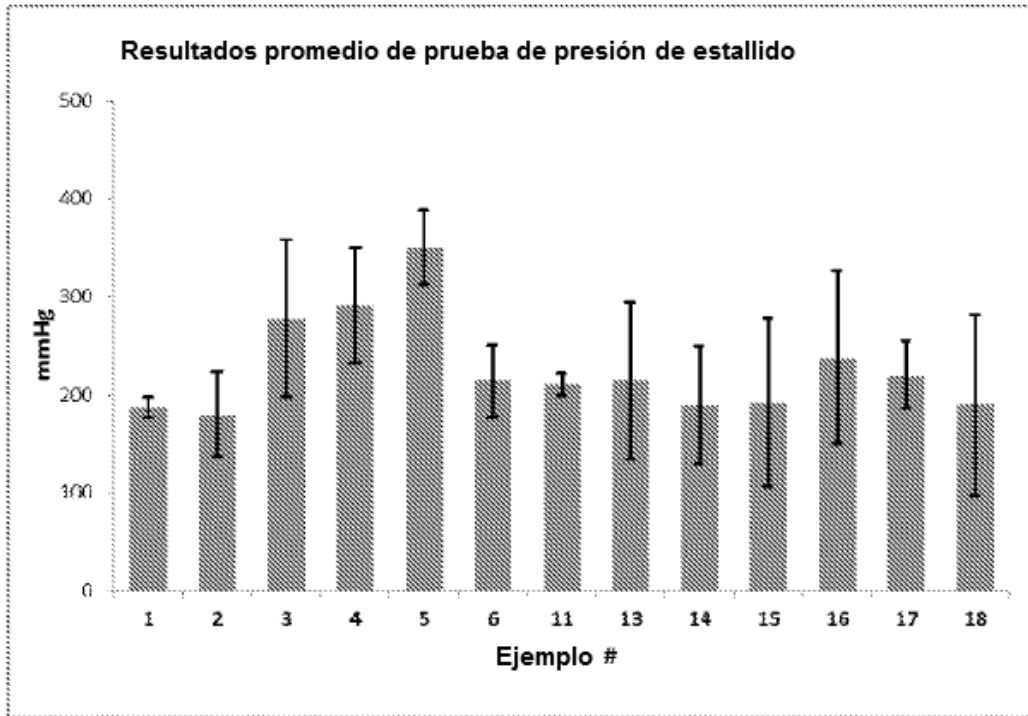


Figura 13

