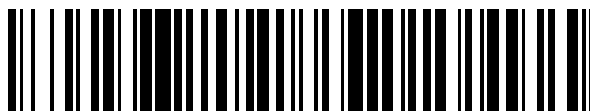


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 349**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2011** **PCT/EP2011/059065**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011** **WO11151386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011** **E 11724603 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2575770**

54 Título: **Procedimiento para obtener composiciones hemostáticas secas y estables**

30 Prioridad:

01.06.2010 US 350237 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2017

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)

One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015, US y

BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

GOESSL, ANDREAS

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 629 349 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

Procedimiento para obtener composiciones hemostáticas secas y estables

5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere a procesos para obtener composiciones hemostáticas en una forma de almacenamiento estable.

Antecedentes de la Invención

10 Son conocidas composiciones hemostáticas secas en formas de almacenamiento estable que comprenden un material biocompatible, biodegradable, granular seco estable, por ejemplo de las WO 98/008550A o WO 2003/007845A. Estos productos han sido aplicados con éxito en la técnica para la hemostasis. Floseal® es un ejemplo de agente hemostático poderoso y versátil que consiste en una matriz de gelatina granular hinchada en una solución que contiene trombina para formar una pasta capaz de fluir.

15 Debido a que dichos productos deben aplicarse en humanos, es necesario proporcionar los estándares de seguridad más altos de calidad, estabilidad de almacenamiento y esterilidad de los productos finales y de sus componentes. Por otra parte, la fabricación y el manejo deben realizarse de la manera más conveniente y eficiente posibles. Si las composiciones hemostáticas requieren un componente de trombina para su uso, dotar de este componente de trombina al producto final es un desafío. Dado que la trombina y el material de matriz normalmente tienen propiedades diferentes en cuanto a los requerimientos de fabricación, deben fabricarse y provisionarse por separado. Por ejemplo, los requisitos de esterilización pueden diferir significativamente entre el material de matriz granular relativamente estable (con frecuencia también reticulado) y los componentes proteicos, como trombina. Mientras que dichos materiales de matriz normalmente pueden esterilizarse por fuertes métodos de esterilización (como autoclave, irradiación gama, etc.), la trombina (como enzima) debe ser tratada con más cuidado. Esos métodos de esterilización fuertes normalmente no son posibles para la trombina debido a la pérdida de actividad enzimática producida por dichos duros tratamientos. Por razones de estabilidad, dichos productos (así como también los productos según la presente invención) normalmente son provistos en una forma seca y se lleva a la forma "lista para su uso" (la cual normalmente es en forma de (hidro)gel, suspensión o solución) inmediatamente antes del uso, necesitando la adición de agentes de humectación o solución (suspensión) y la mezcla del componente del material de matriz con el componente de trombina. La reconstitución de la trombina o el paso de mezclado de una solución de trombina con el material de matriz granular son pasos que normalmente requieren cierto tiempo y manejo y pueden generar problemas, especialmente en el cuidado intensivo de la salud.

35 Un objeto de la presente invención es superar dichos problemas y proporcionar métodos adecuados para obtener una composición hemostática seca y de almacenamiento estable que se puede suministrar y utilizar de forma conveniente. Estos métodos deben proporcionar formatos de producto que permiten una administración conveniente de las composiciones hemostáticas "listas para el uso", especialmente en la medicina de cuidados intensivos, donde el número de pasos de manejo debe mantenerse al mínimo posible.

Sumario de la Invención

40 Así, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener una composición hemostática seca y estable, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar una preparación granular seca de gelatina,
- b) revestir los gránulos de dicha preparación granular seca con una solución de trombina, obteniendo así gránulos de gelatina recubiertos de trombina,
- c) cargar dichos gránulos de gelatina revestidos con trombina en un contenedor final,
- 45 d) acondicionar el contenedor final a un dispositivo farmacéutico almacenable que contiene dichos gránulos de gelatina recubiertos con trombina en forma de una composición hemostática seca y estable.

50 El procedimiento proporciona la composición seca y estable de acuerdo con la presente invención en una forma conveniente que permite que la composición sea reconstituida fácilmente para su uso médico. Además, la presente invención se refiere a un método para suministrar una composición hemostática en un punto diana en el cuerpo de un paciente, comprendiendo dicho método suministrar una composición hemostática producida mediante el procedimiento de la presente invención al sitio diana. De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un contenedor final terminado obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención. La invención también se refiere a un método para proporcionar una composición hemostática lista para el uso que comprende poner en contacto una composición hemostática producida mediante el procedimiento de la presente invención con un diluyente farmacéuticamente aceptable, así como también a un kit que comprende el contenedor final terminado y otros medios para aplicar la composición (por

ejemplo, un contenedor de diluyente). Las composiciones según la presente invención son particularmente útiles para proporcionar hemostasis en puntos de sangrado, incluyendo puntos de sangrado quirúrgico, de sangrado traumático y similares. Un uso ilustrativo de las composiciones puede ser en el sellado de tracto de tejido alrededor de una penetración de vaso sanguíneo originada por la cateterización vascular.

5

Descripción de Realizaciones Específicas de la Invención

La presente invención proporciona una mejora de la administración y manejo de composiciones hemostáticas, principalmente proporcionando un producto de dos componentes en un formato conveniente de una única composición. Las composiciones hemostáticas según la presente invención contienen gránulos recubiertos de gelatina revestidos con trombina, adecuados para su uso en la hemostasis (el "componente polimérico biocompatible hemostático"). Pueden estar presentes otros componentes adicionales. Estos gránulos recubiertos pueden ser reconstituidos en preparaciones hemostáticas "listas para el uso" utilizando diluyentes adecuados (por ejemplo soluciones iónicas acuosas). Preferentemente, las preparaciones "listas para el uso" se proporcionan como hidrogeles. En principio, productos de este tipo son conocidos en la técnica, aunque en un formato diferente. Normalmente, los componentes se proporcionan como entidades separadas en forma seca. Antes de mezclar los componentes para la administración en un paciente, los componentes secos normalmente se ponen en contacto por separado con los diluyentes adecuados. Entonces se mezclan los componentes mezclando los componentes reconstituidos por separado. Por ejemplo, puede preverse un componente de trombina seco que es reconstituido con un diluyente farmacéuticamente aceptable (acuoso). La solución de trombina obtenida tras la reconstitución se emplea entonces para mojar o solubilizar el polímero, normalmente por formación de un hidrogel, que se aplica entonces al paciente. Debido a que este es al menos un procedimiento en dos pasos para el producto "listo el uso utilizarse", sería más conveniente si un producto pudiera necesitar únicamente un paso antes de estar listo el uso. Sin embargo, como se estableció anteriormente, la naturaleza de los dos componentes impide una mezcla simple de los componentes durante el método de producción, principalmente debido a las pérdidas de estabilidad y actividad.

Con la presente invención, se proporcionan procedimientos de producción que permiten que los dos componentes (trombina y gelatina) sean provistos ya en una forma seca combinada listos para ser reconstituidos juntos. Los procedimientos según la presente invención no son únicamente factibles para los experimentos científicos de laboratorio, sino que son adecuados para la producción farmacéutica industrial masiva. Con la presente invención es posible proporcionar esta composición hemostática ya mezclada sin el riesgo de una degradación no deseada o de pérdida de actividad enzimática. Las composiciones resultantes tienen una estabilidad de almacenamiento comparable con la de productos previamente conocidos, pero son más convenientes para el manejo debido a que la reconstitución y mezcla separada antes de la administración médica no es necesaria con los productos que se pueden obtener con la presente invención. Es posible proporcionar un hidrogel, suspensión o solución lista para el uso de la composición hemostática en un procedimiento de un solo paso, agregando simplemente un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado a la composición en el contenedor final. El contenedor final preferentemente es una jeringa diseñada para administrar directamente la composición hemostática después del contacto con el diluyente. Los gránulos poliméricos recubiertos con trombina de acuerdo con la presente invención pueden cargarse en una jeringa y la jeringa puede entonces cerrarse con un tapón.

La "solución de trombina" puede elaborarse a partir de cualquier preparación de trombina que sea adecuada para su uso en humanos (es decir, farmacéuticamente aceptable). Fuentes adecuadas de trombina incluyen sangre, plasma o suero humanos o bovinos (pueden emplearse otras fuentes animales de trombina si no se esperan reacciones inmunes adversas) y trombina de origen recombinante (por ejemplo, trombina recombinante humana); la trombina humana autóloga puede ser preferente para algunas aplicaciones. Preferentemente, la composición hemostática contiene de 10 al 100.000 Unidades internacionales (I.U.) de trombina, más preferentemente de 100 a 10.000 I.U., en especial de 500 a 5.000 I.U. La concentración de trombina en la composición "lista para el uso" preferentemente está en el rango de 10 a 10.000 I.U., más preferentemente de 50 a 5.000 I.U., especialmente de 100 a 1.000 I.U./ml. El diluyente se utiliza en tal cantidad que permita la concentración final deseada en la composición "lista para el uso". La solución de trombina puede contener otros componentes útiles, como iones, tampones, excipientes, estabilizadores, etc. Preferentemente, la solución de trombina contiene albúmina humana, manitol o mezclas de los mismos. Las sales preferentes son NaCl y/o CaCl_2 , ambas utilizadas en las cantidades normales y a las concentraciones aplicadas para la trombina (por ejemplo del 0,5 al 1,5% de NaCl (por ejemplo, 0,9%) y/o de 20 a 80 mM de CaCl_2 (por ejemplo 40 mM)).

La "preparación granular seca de gelatina" ("polímero biocompatible") de acuerdo con la presente invención es conocida, por ejemplo del documento WO 98/08550 A; sin embargo, sin revestimiento de trombina. Preferentemente, el polímero es un material granular estable seco, biocompatible, biodegradable. El polímero de gelatina "seco" de acuerdo con la presente invención normalmente se proporciona con tamaño de partícula de 0,1 a 5.000 μm . Normalmente, las partículas poliméricas tienen un diámetro de partícula medio (el "diámetro de partícula medio" es el tamaño mediano medido por difracción láser; "tamaño mediano" (o diámetro de partícula mediano en masa, el diámetro de partícula que divide la distribución de frecuencia por la mitad; el

- cincuenta por ciento de las partículas de una preparación determinada tienen un diámetro más grande y el cincuenta por ciento de las partículas tienen un diámetro más pequeño) de 10 a 1.000 μm , especialmente de 50 a 500 μm (tamaño mediano). La aplicación de partículas más grandes depende principalmente de las necesidades médicas; partículas con diámetros de partícula medios más pequeños a menudo son más difíciles de manejar durante los procedimientos de producción. Así, el polímero seco es provisto en forma granular.
- 5 Aunque los términos polvo y granular (o granulados) en algunas ocasiones se utilizan para distinguir tipos diferentes de material, los polvos como se definen aquí son una sub-clase especial de material granular. En particular, los polvos se refieren a aquellos materiales granulares que tienen los tamaños de grano más finos y que, por ello, tienen una mayor tendencia a formar aglomeraciones cuando fluyen. Los gránulos incluyen
- 10 materiales granulares más toscos que no tienden a formar aglomeraciones excepto cuando están húmedos. Para la presente aplicación, las partículas utilizadas son aquellas que pueden ser revestidas mediante técnicas de revestimiento adecuadas. Por tanto, el tamaño de partícula de los gránulos poliméricos según la presente invención puede adaptarse y optimizarse fácilmente para ciertas técnicas de revestimiento según las necesidades de esta técnica.
- 15 Una composición hemostática "seca" de acuerdo con la presente invención solo tiene un contenido residual de humedad que puede corresponder aproximadamente al contenido de humedad de productos disponibles comparables, como Floseal® (Floseal, por ejemplo, tiene aproximadamente un 12% de humedad en forma de producto seco). Normalmente, la composición seca según la presente invención tiene un contenido de humedad residual por debajo de estos productos, preferentemente por debajo del 10% de humedad, más
- 20 preferentemente por debajo del 5% de humedad, especialmente por debajo del 1% de humedad. La composición hemostática de acuerdo con la presente invención también puede tener un contenido menor de humedad, por ejemplo del 0,1% o incluso inferior. Los contenidos de humedad preferentes de la composición hemostática seca según la presente invención son del 0,1 al 10%, especialmente del 0,5 al 5%.
- 25 De acuerdo con la presente invención, la composición hemostática se proporciona en forma seca en el contenedor final. En la forma seca, los procesos de degradación o desactivación de los componentes se reducen de manera significativa y adecuada para permitir la estabilidad de almacenamiento. La estabilidad de almacenamiento adecuada puede determinarse en base a la actividad de trombina. Así, una composición hemostática seca del tipo presente es estable en almacenamiento si está presente no menos de 400 I.U./ml (para un producto de 500 I.U./ml) después de la reconstitución pasados 24 meses de almacenamiento en forma
- 30 seca a temperatura ambiente (25°C) (es decir, se mantiene el 80% de la actividad de trombina o más en comparación con la actividad inicial antes de la liofilización). Preferentemente, la composición según la presente invención tiene una estabilidad de almacenamiento superior, es decir, permanece al menos el 90% de la actividad de trombina, especialmente al menos el 95% de actividad de trombina, después de estos 24 meses de almacenamiento.
- 35 Sin embargo, proporcionar una mezcla seca de trombina y gelatina como polímero biocompatible no es trivial, dado que la mezcla tiene que elaborarse en forma seca. Mezclar los componentes en la forma soluble (suspendida) y entonces empezar con el proceso de secado tiene como resultado una degradación intolerable del material. Por ejemplo, incluso si la trombina y la gelatina se mantienen a una temperatura de 4°C, es visible una degradación clara después de 24 horas.
- 40 Por consiguiente, la presente invención utiliza los principios de los procedimientos de revestimiento para superar dichos procesos de degradación de la mezcla. Este procedimiento de revestimiento debe evitar una humectación completa durante el contacto de la trombina con el polímero, lo cual conduce a los procesos de degradación. Durante el procedimiento de revestimiento, debe tenerse cuidado de que únicamente la capa exterior de los gránulos poliméricos se hinche hasta un grado determinado para empaparse con la cantidad
- 45 deseada de trombina. Por consiguiente, el procedimiento de revestimiento preferentemente se lleva a cabo aplicando la trombina en forma de spray, dado que la superficie mojada de los gránulos poliméricos puede manejarse así fácilmente. Una técnica preferente para realizar el procedimiento de revestimiento de acuerdo con la presente invención es un procedimiento de lecho de fluido. En un procedimiento de lecho fluido o revestimiento de lecho de fluido, los gránulos poliméricos son recubiertos con una capa de las proteínas
- 50 contenidas en la solución de trombina (es decir, preferentemente, suero, albúmina y manitol humano). En este procedimiento, los gránulos poliméricos se llevan a un lecho de fluido soplando aire caliente desde la parte inferior a través del lecho de gránulos poliméricos, suspendiendo así éstos en esta corriente de aire para crear un lecho fluido. En este lecho fluido se introduce un spray de la solución de trombina, mezclándose íntimamente con el lecho fluido. Las gotitas de spray cubren las partículas con trombina de forma homogénea.
- 55 Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones de procedimiento que mantienen la actividad de la trombina: la capa exterior de los gránulos poliméricos probablemente se hinchará hasta cierto grado y empaparán parte de la solución de trombina, mientras que la mayoría de las proteínas de la solución de trombina formará una capa sobre la superficie de los gránulos. De acuerdo con una realización especialmente preferente, la preparación de trombina introducida en el procedimiento de revestimiento se obtiene por esprayado, preferentemente esprayado aséptico. El esprayado se puede llevar a cabo con cualquier aparato de esprayado,
- 60 especialmente para material proteico, preferentemente, los aparatos son esterilizados de inmediato antes de llevarlos a la solución de trombina para el esprayado.

Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en ambiente aséptico,

especialmente el paso de revestimiento y el paso de llenado dentro del contenedor final deben realizarse asépticamente. También es preferente empezar el procedimiento por los componentes que ya han sido apropiadamente esterilizados y entonces realizar todos los pasos adicionales de forma aséptica.

- 5 Una realización preferente de la presente invención aplica la técnica de revestimiento Wurster. El procedimiento Wurster es una técnica de revestimiento muy adecuada para recubrir o encapsular uniformemente materiales en partículas individuales y es especialmente popular en la tecnología de la formulación farmacéutica. Esta tecnología se caracteriza por situar una boquilla de pulverización en el fondo de un lecho fluidizado de partículas sólidas. Las partículas se suspenden en la corriente de aire fluidizante diseñada para inducir un flujo cíclico de las partículas tras la boquilla de pulverización. La boquilla rocía un flujo atomizado de una solución de
10 revestimiento, suspensión u otro vehículo de revestimiento (en el presente caso la preparación de trombina).

El material de revestimiento atomizado choca con las partículas a medida que se alejan de la boquilla. Se establece la temperatura del aire fluidizante para evaporar de forma adecuada la solución o suspensión de disolvente o solidificar el material de revestimiento poco tiempo después de chocar con las partículas.

- 15 Todos los sólidos de revestimiento se mantienen sobre las partículas como parte de la película o revestimiento en desarrollo. Este procedimiento se continua hasta que cada partícula queda revestida de forma uniforme hasta el espesor de partícula deseado.

- El proceso Wurster es una técnica de revestimiento reconocida en la industria por su aplicación precisa de la película de revestimiento a materiales particulados tales como polvo, cristales o gránulos. La tecnología puede emplearse para encapsular materiales sólidos de diámetros que varían desde cerca de 50 μm hasta varios centímetros. El procedimiento tiene una mayor capacidad de secado que otros sistemas de revestimiento debido a la velocidad relativamente alta del aire fluidizante. Dado que las partículas en realidad se separan a medida que se alejan de la boquilla, es posible revestir partículas pequeñas sin aglomeración. Las posibilidades de revestimiento son relativamente ilimitadas, incluyendo la capacidad de disponer una cubierta hidrófila sobre un núcleo hidrófobo o una cubierta acuosa sobre un núcleo soluble en agua. Las propiedades de revestimiento
20 pueden optimizarse mediante los parámetros de formulación de cubierta, las condiciones de procesamiento y la formación de capas. Una gran ventaja del revestimiento de lecho fluido es que puede llevarse a cabo como una tecnología en lotes (revestimiento Wurster). Una tecnología en lotes es mucho más preferida para la fabricación. Con un revestimiento de lecho fluido, las partículas son fluidizadas y el fluido de revestimiento se pulveriza sobre ellas y se seca. Gotitas pequeñas y una viscosidad baja del medio de pulverización aseguran un revestimiento uniforme de los productos. Preferentemente, este revestimiento se realiza como un revestimiento de lecho fluido por lotes, especialmente aplicando de un espray desde abajo.

- El paso final del método es el paso de terminado. Durante este paso, el contenedor final se sella de manera adecuada y se deja listo para el almacenamiento y/o la venta. El paso de terminado puede comprender etiquetar el contenedor final, envasar y (adicionalmente) llevar a cabo procedimientos de esterilización (por ejemplo sobre el contenedor final o sobre el producto envasado o el kit que comprende el contenedor final).
35

Preferentemente, el paso d) comprende un paso de esterilización EO (óxido de etileno). La esterilización EO es habitual en este campo de la tecnología. El gas óxido de etileno aniquila las bacterias (y sus endosporas), mohos y hongos. La esterilización EO se emplea para esterilizar sustancias que podrían resultar dañadas por técnicas que utilizan temperaturas altas, como la pasteurización y el autoclave.

- 40 Otras realizaciones preferidas de esterilización son la aplicación de irradiación ionizante, como irradiación β o γ o el uso de peróxido de hidrógeno vaporizado.

- El contenedor final puede ser cualquier contenedor adecuado para el alojamiento (y almacenamiento) de compuestos que se pueden administrar farmacéuticamente. Pueden emplearse jeringas, frascos, tubos, etc.; sin embargo, es especialmente preferente proporcionar las composiciones hemostáticas de acuerdo con la presente invención en una jeringa. Las jeringas han sido un medio de administración preferido para las composiciones hemostáticas, como se describió en la técnica anterior, debido a las ventajas de su manejo en la práctica médica. Así, preferentemente las composiciones pueden ser administradas (después de la reconstitución) mediante agujas específicas de la jeringa o vía los catéteres adecuados. Las composiciones hemostáticas reconstituidas (que son reconstituidas preferentemente para formar un hidrogel) también se
45 pueden administrar mediante otros medios diversos, por ejemplo con una espátula, un cepillo, un espray, manualmente por presión o por cualquier otra técnica convencional. Normalmente, las composiciones hemostáticas reconstituidas según la presente invención se aplicarán utilizando una jeringa o aplicador similar que tiene la capacidad de extrudir la composición reconstituida a través de un orificio, abertura, aguja, tubo u otro paso para formar un lecho, capa o porción similar de material. La alteración mecánica de las composiciones
50 puede realizarse por extrusión a través de un orificio en la jeringa u otro aplicador, que normalmente tiene un tamaño en el intervalo de 0,01 mm a 5,0 mm, preferentemente de 0,5 mm a 2,5 mm. Preferentemente, sin embargo, la composición hemostática se preparada inicialmente a partir de una forma seca que tiene un tamaño de partícula deseado (el cual, a partir de la reconstitución, especialmente por hidratación, produce sub-unidades del tamaño requerido (por ejemplo, sub-unidades de hidrogel)) o se altera mecánicamente ya sea de manera
55 parcial o total al tamaño requerido antes de un paso de extrusión final u otra aplicación. Esto es, desde luego evidente, porque estos componentes mecánicos tienen que ser provistos en forma estéril (dentro y fuera) con
60

el objeto de cumplir los requerimientos de seguridad para uso en humanos.

Las composiciones hemostáticas secas de acuerdo con la presente invención normalmente son reconstituidas (re-hidratadas) antes del uso poniendo en contacto la composición seca con un diluyente adecuado. El diluyente de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier medio de reconstitución adecuado para la

5 composición hemostática seca que permita la humectación adecuada de la composición seca. Preferentemente, la composición hemostática seca es reconstituida en un hidrogel como un formato "listo para el uso".

Los diluyentes adecuados son fluidos acuosos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo agua desionizada de grado farmacéutico (si todos los componentes iónicos o tampones ya son provistos en la composición seca; "agua para inyección") o soluciones acuosas de grado farmacéutico que contienen iones y/o tampones

10 específicos. Estas soluciones acuosas pueden contener además otros ingredientes, tales como excipientes. Un "excipiente" es una sustancia inerte que se agrega a la solución, por ejemplo para asegurar que la trombina mantiene su estabilidad química y su actividad biológica al ser almacenada (o esterilizada (por ejemplo, por irradiación)), o por razones estéticas, por ejemplo por el color. Los excipientes preferentes incluyen albúmina humana, manitol o acetato de sodio. Las concentraciones preferentes para la albúmina en el producto

15 reconstituido son de 0,1 a 100 mg/ml, preferentemente de 1 a 10 mg/ml. Las concentraciones de manitol preferentes pueden estar en el intervalo de concentración de 0,5 a 500 mg/ml, especialmente de 10 a 50 mg/ml. Las concentraciones de acetato de sodio preferentes están en el intervalo de 1 a 10 mg/ml, especialmente de 2 a 5 mg/ml.

20 Por ejemplo, un diluyente adecuado comprende agua para inyección e -independientemente unos de los otros - NaCl (preferentemente de 50 a 150 mM, especialmente 110 mM), CaCl_2 (preferentemente de 10 a 80 mM, especialmente 40 mM), albúmina humana (preferentemente de hasta el 2% p/p, especialmente el 0,5% p/p), acetato de sodio (preferentemente de 0 a 50 mM, especialmente 20 mM) y manitol (preferentemente hasta el 10% p/p, especialmente el 2% p/p). Preferentemente, el diluyente también puede incluir un tampón o un sistema

25 tampón de manera que regule el pH de la composición seca reconstituida, preferentemente a un pH de 6,4 a 7,5, especialmente a un pH de 6,9 a 7,1.

En una realización preferente, el diluyente se proporciona en un contenedor separado. Éste, preferentemente puede ser una jeringa. El diluyente en la jeringa puede entonces aplicarse fácilmente al contenedor final para la reconstitución de las composiciones hemostáticas secas de acuerdo con la presente invención. Si el

30 contenedor final también es una jeringa, ambas jeringas pueden presentarse juntas en un paquete. Por consiguiente, es preferente proporcionar las composiciones hemostáticas secas de acuerdo con la presente invención en una jeringa que se complementa con una jeringa de diluyente con un diluyente farmacéuticamente aceptable para reconstituir dicha composición hemostática seca y estable.

Puede reticularse una gelatina no reticulada junto con un auxiliar de re-hidratación adecuado en cualquier forma adecuada para la reconstitución, por ejemplo para formar una base de hidrogel adecuada. Por ejemplo, las

35 moléculas poliméricas pueden reticularse utilizando agentes de reticulación bifuncionales o polifuncionales que se unen de manera covalente a dos o más cadenas de las moléculas poliméricas. Agentes de reticulación bifuncionales ilustrativos incluyen aldehídos, epóxidos, succinimidas, carbodiimidas, maleimidas, azidas, carbonatos, isocianatos, divinilsulfona, alcoholes, aminas, imidatos, anhídridos, haluros, silanos, diazoacetato, aziridinas y similares. Alternativamente, la reticulación puede lograrse utilizando oxidantes y otros agentes,

40 tales como periodatos, que activan cadenas laterales o restos del polímero de manera que éstos pueden reaccionar con otras cadenas laterales o restos para formar los enlaces de reticulación. Un método adicional de reticulación comprende exponer los polímeros a radiación, tal como radiación gama, para activar las cadenas poliméricas con el fin de permitir las reacciones de reticulación. También son adecuados los métodos

45 de reticulación dehidrotérmicos. Los métodos de reticulación preferentes para las moléculas de gelatina se describen a continuación.

Como se ha mencionado anteriormente, el polímero de gelatina biocompatible adecuado para su uso en la hemostasis es un material granular. Este material granular puede humedecerse rápidamente cuando se expone a un fluido (es decir, el diluyente) y en su forma hinchada tiene la capacidad de contribuir a formar una pasta

50 capaz de fluir que puede aplicarse a un sitio de sangrado. El polímero de gelatina biocompatible puede proporcionarse en forma de película, la cual puede entonces molerse para obtener un material granular. La mayoría de las partículas contenidas en este material granular preferentemente tienen tamaño de partícula de 100 a 1.000 μm , especialmente de 300 a 500 μm .

De acuerdo con una realización preferente, la gelatina es una gelatina reticulada. El polvo de gelatina reticulado

55 seco puede prepararse para volverse a hidratar rápidamente si se pone en contacto con un diluyente adecuado. Los gránulos de gelatina, especialmente en forma de un polvo de gelatina, preferentemente comprenden partículas relativamente grandes, también denominadas fragmentos o sub-unidades, como aquellas descritas en los documentos WO 98/08550 A y WO 2003/007845 A. Un tamaño de partícula preferente (mediano) estará dentro del rango de 20 a 1.000 μm , preferentemente de 100 a 750 μm , especialmente de 150 a 500 μm , aunque

60 tamaños de partícula fuera de este rango preferente pueden ser útiles en muchas circunstancias. Las composiciones secas también mostrarán un "equilibrio de hinchamiento" significativo cuando se exponen a un medio de rehidratación acuoso (= diluyentes). Preferentemente, el hinchamiento estará en el rango del 400%

al 1.000%. "El equilibrio de hinchamiento" puede determinarse restando el peso seco del polvo de hidrogel de gelatina de su peso cuando está hidratado por completo y, por consiguiente, hinchado por completo. La diferencia entonces se divide entre el peso y se multiplica por 100 para calcular la medida de hinchamiento. El peso seco debería medirse después de la exposición del material a una temperatura elevada durante un tiempo suficiente para eliminar esencialmente toda humedad residual, por ejemplo dos horas a una temperatura de 120°C. El equilibrio de hidratación del material puede lograrse sumergiendo el material seco en un diluyente adecuado, tal como una solución salina acuosa, durante un período de tiempo suficiente para que el contenido de agua sea constante, normalmente de 18 a 24 horas a temperatura ambiente.

Una gelatina no reticulada junto con el auxiliar de rehidratación puede reticularse de cualquier forma adecuada para formar una base de hidrogel adecuada. Los polvos de gelatina reticulados secos según esta realización preferente preferentemente se obtienen preparando los polvos en presencia de determinados auxiliares de rehidratación. Dichos auxiliares de rehidratación estarán presentes durante la preparación de los polvos, pero normalmente son eliminados de los productos finales. Por ejemplo, los auxiliares de rehidratación que están presente aproximadamente al 20% del contenido de sólidos total normalmente se reducirán por debajo del 1% en el producto final, con frecuencia por debajo del 0,5% en peso. Auxiliares de rehidratación ilustrativos incluyen polietilenglicol (PEG), preferentemente con un peso molecular de aproximadamente 1.000; polivinilpirrolidona (PVP), preferentemente con un peso molecular promedio de aproximadamente 50.000; y dextrano, que normalmente tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40.000. Es preferente emplear al menos dos de estos auxiliares de rehidratación cuando se preparan las composiciones de la presente invención, y más particularmente es preferente emplear los tres.

Métodos ilustrativos para producir gelatinas reticuladas son los siguientes. Se obtiene la gelatina y se suspende en una solución acuosa para formar un hidrogel no reticulado, típicamente con un contenido en sólidos del 1% al 70% en peso, normalmente del 3% al 10% en peso. La gelatina es reticulada, normalmente por la exposición ya sea a glutaraldehído (por ejemplo del 0,01% al 0,05% p/p, durante una noche a una temperatura de 0°C a 15°C en un tampón acuoso), periodato de sodio (por ejemplo 0,05 M, mantenido a una temperatura de 0°C a 15°C durante 48 horas) o 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida ("EDC") (por ejemplo del 0,5% al 1,5% p/p durante una noche a temperatura ambiente), o mediante la exposición a desde aproximadamente 0,3 hasta 3 megaradios de radiación de rayos gama o haz electrónico. Alternativamente, las partículas de gelatina pueden ser suspendidas en un alcohol, preferentemente alcohol metílico o etílico, con un contenido en sólidos del 1% al 70% en peso, normalmente del 3% al 10% en peso, y reticularse por exposición a un agente de reticulación, normalmente glutaraldehído (por ejemplo del 0,01% al 0,1% p/p, durante una noche a temperatura ambiente). En el caso de los aldehídos, el pH debe mantenerse aproximadamente de 6 a 11, preferentemente de 7 a 10. Cuando se reticula con glutaraldehído, las reticulaciones se forman mediante bases de Schiff, que pueden estabilizarse por reducción subsiguiente, por ejemplo por tratamiento con borohidruro de sodio. Después de la reticulación, los gránulos resultantes pueden lavarse con agua y opcionalmente enjuagarse en alcohol y secarse. Los polvos secos resultantes pueden entonces ser provistos en el contenedor final tal como se describe aquí.

Después de la reticulación, al menos el 50% (p/p) del auxiliar de rehidratación se elimina del hidrogel resultante. Normalmente, el auxiliar de rehidratación se elimina por filtración del hidrogel, seguido por lavado de la torta filtrada resultante. Dichos pasos de filtración/lavado pueden repetirse una o más veces con el objeto de limpiar el producto al nivel deseado y para eliminar al menos el 50% del auxiliar de rehidratación, eliminándose preferentemente al menos el 90% (p/p) del auxiliar de rehidratación presente originalmente. Después de la filtración, la gelatina se seca, normalmente secando la torta de filtrado final producida. La torta de filtrado seca puede entonces romperse o molerse para producir el polvo reticulado con un tamaño de partícula en los rangos deseados antes citados.

De acuerdo con una realización preferente, el contenedor final contiene además una cantidad efectiva de un estabilizador para inhibir la modificación del polímero cuando es expuesto a la radiación de esterilización, preferentemente ácido ascórbico, ascorbato de sodio, otras sales de ácido ascórbico o un antioxidante.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para administrar una composición hemostática que contiene los gránulos revestidos de acuerdo con la presente invención a un sitio objetivo en el cuerpo de un paciente, comprendiendo dicho método administrar una composición hemostática producida mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención al sitio objetivo. Aunque en ciertas realizaciones también la composición seca puede aplicarse directamente al sitio objetivo (y opcionalmente ponerse en contacto con el diluyente en el sitio objetivo, si es necesario), es preferente poner en contacto la composición hemostática seca con un diluyente farmacéuticamente aceptable antes de la administración al sitio objetivo, de manera que se obtiene una composición hemostática en una forma húmeda, especialmente una forma de hidrogel.

La presente invención, también se refiere a un contenedor final terminado obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Este contenedor terminado contiene los componentes combinados en una forma estéril, estable para almacenamiento y comercializable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para proporcionar una composición hemostática lista para el uso que comprende poner en contacto una composición hemostática producida mediante el

procedimiento de acuerdo con la presente invención con un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende la composición hemostática seca y estable de acuerdo con la presente invención en forma terminada y un contenedor con un diluyente adecuado. Otros componentes adicionales del kit pueden ser instrucciones de uso, medios de administración, como jeringas, catéteres, cepillos, etc. (si las composiciones no son provistas ya en el medio de administración) u otros componentes necesarios para utilizar en la práctica médica (quirúrgica), como agujas de repuesto o catéteres, viales extra u otros medios para cubrir heridas. Preferentemente, el kit según la presente invención comprende un alojamiento de jeringa, la composición hemostática seca y estable y una jeringa que contiene el diluyente (o es provista para tomar el diluyente de otro contenedor de diluyente). Preferentemente, estas dos jeringas se proporcionan en una forma adaptada una con la otra, de manera que el diluyente puede suministrarse a la composición hemostática seca mediante otra entrada diferente a la salida para administrar la composición reconstituida.

La presente invención también se refiere a gránulos de gelatina revestidos con trombina como polímero biocompatible adecuado para su uso en la hemostasis. Estos gránulos revestidos se pueden obtener por los métodos aquí descritos. Preferentemente, los gránulos revestidos con trombina se pueden obtener mediante revestimiento en lecho fluido, especialmente mediante revestimiento Wurster. De acuerdo con una realización preferente, los gránulos son polímeros de gelatina revestidos con trombina.

La presente invención se describe adicionalmente en los ejemplos siguientes y en referencia a las figuras, sin limitarse a éstos.

Fig. 1: muestra los principios del revestimiento en lecho fluido por lotes, espray inferior (revestimiento de Wurster).

Fig. 2: muestra una distribución de tamaño de partícula ilustrativa de gránulos de gelatina (A) y gránulos de gelatina revestidos con trombina de acuerdo con la presente invención (B).

Ejemplos

1. Preparación de los gránulos poliméricos revestidos con trombina como composición hemostática seca según la presente invención

Materiales y Métodos

Equipo

MiniGlatt, Wurster, Nitrógeno (N₂) como gas de proceso, pre-filtrado por un filtro de 0,2 µm
Micro-kit mini Glatt de 0,2 µm, boquilla de 0,5 o 0,8 mm, apertura de partición Wurster 10 a 20 mm, placa de distribución de aire estándar, filtro metálico de 2 o 5 µm
GPCG 3, 6" Wurster, aire pre-filtrado (0,2 µm), filtro PA-CF, placa de distribución de aire P2100, abertura de partición Wurster de 20 mm.

Cámara de secado

Revestimiento

Los gránulos de gelatina y los gránulos de gelatina revestidos con trombina fueron almacenados en el refrigerador a una temperatura de 4 a 8°C. Las soluciones de trombina (500 IU/ml, 0,9% de NaCl; 500 IU/ml, 42,9 manitol/l) fueron almacenados en el congelador a una temperatura de -20°C. El procedimiento se realizó en el Mini Glatt proporcionando 81 g de gránulos de gelatina; pre-calentamiento de la máquina a una temperatura de 37°C, pre-calentamiento del material de partida sólido a 37±7°C y manteniendo esta temperatura durante el tiempo completo de proceso. La solución de trombina se pulverizó hasta que se aplicaron 400 g de solución. Entonces, el material revestido se secó durante 15 minutos al final del proceso.

Métodos analíticos.

Pérdida por secado (LOD)

La LOD (pérdida por secado) se determinó con un analizador de humedad de halógeno Mettler Toledo, tipo HB 43. La temperatura de secado fue de 140°C utilizando un criterio de tope específico (< 1mg/60s).

Análisis de criba

El análisis de criba se realizó con una máquina de criba Retsc, tipo AS 200, control g (amplitud: .,5, tiempo 5 minutos).

Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó en un modo angular utilizando un difractómetro Láser (LD) Malvern Mastersizer 2000 Ver. 5.40. Una masa de gránulos de 10 a 15 g se utilizó en estado seco para la medida (desviación media y estándar, n = 3).

Densidad de volumen

La medida de la densidad de volumen se realizó en un cilindro graduado a un volumen de 100 ml.

Jeringa de diluyente

- La jeringa de diluyente contiene un medio de reconstitución adecuado para hidratar el producto. Este puede ser acoplado con la jeringa Floseal, ya sea directamente o por medio de un conector. El diluyente es transferido dentro de la jeringa Floseal y el producto hidratado es transferido de atrás hacia adelante entre las jeringas acopladas repetidamente para generar una pasta que puede fluir. La jeringa de diluyente puede prepararse, por ejemplo, mediante un procedimiento tal como el siguiente: el medio es filtrado estéril y cargado en jeringas adecuadas (jeringas Toppac comunes, Clearshot, ...); y si es necesario, se esterilizan por irradiación.

Granulado de gelatina.

- La fabricación en masa de los gránulos de gelatina se realiza de acuerdo con métodos establecidos (WO 98/08550 A; WO 2003/00785 A; etc.). Los gránulos (gránulos de "Floreal"; matriz de "Floreal") son esterilizados inmediatamente por irradiación gama. Para la esterilización pre-clínica, la matriz de Floreal se carga en botellas de vidrio Schott de tamaño adecuado.
- La dosis de irradiación requerida en el nivel de bio-carga máxima actual (1.000 cfu/muestra) es de 25 a 40 kGy para el producto en el contenedor final. El material en masa es entonces almacenado a una temperatura de -20°C para su posterior manejo.

Resultados

- Se muestra la distribución del tamaño de partícula del gránulo de gelatina revestido con trombina para un gránulo de gelatina revestido con trombina de ejemplo en la figura 2 (la figura 2A muestra el gránulo de gelatina antes del revestimiento ($d(0,1) = 143,2$; $d(0,5) = 304,3$; $d(0,9) = 517,2$); la figura 2B se obtuvo con la solución de trombina de 500 IU + manitol ($d(0,1) = 155,3$; $d(0,5) = 327,1$; $d(0,9) = 543,0$)).

- El proceso era muy estable en todos los experimentos realizados. La temperatura de producto se ajustó a $36,0 \pm 1$, $33,0 \pm 1$ y $39,0 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente. El gránulo final tenía una buena capacidad de flujo en todos los lotes. Se observaron altos rendimientos de alrededor del 95%, indicando la deposición de los sólidos desde la solución de trombina sobre el material de partida sólido. Los recipientes del procedimiento parecían muy limpios después de los pasos de revestimiento. No se adhirió material sobre la pared, únicamente una pocas partículas más grandes podían observarse en el producto final. Se aplicaron índices de pulverización medios de 1,64 g/min y 1,24 g/min; equivalentes a los tiempos de pulverización de 244 min y 323 min, respectivamente. Índices de pulverización inferiores normalmente reducen la pérdida de material (incrementando así los rendimientos).
- El procedimiento podía ser escalado de forma exitosa a 6" Wurster. Se utilizó aire pre-filtrado como gas de proceso en el GPCG 3 en contraste con el nitrógeno del Mini Glatt. Apenas se observaron partículas más grandes en el producto final. El flujo de material fue más homogéneo en el GPCG 3 en comparación con el Mini Glatt.

- La humedad del procedimiento se mantuvo baja en todos los procesos con el objeto de evitar un hinchamiento y la aglomeración de la gelatina. Los valores LOD, entre 5,4 y 8,3%, se determinaron en los gránulos revestidos utilizando una temperatura de secado alta, de 140°C , en un analizador de humedad de halógeno. Los diámetros medios $d(0,5)$ de 290 - 327 μm podían determinarse en el material crudo de gelatina y para todos los lotes recubiertos. Se pudo concluir que apenas se produjeron cambios en la distribución del tamaño de partícula durante el revestimiento del gránulo de gelatina. En total, no se produjo una aglomeración del material de partida de gelatina durante el procedimiento debido a las condiciones de procesamiento seleccionadas.

- En resumen, el procedimiento demostró ser estable en todos los ensayos. Se podrían seleccionar libremente temperaturas de producto entre 33 y 40°C . El procedimiento se escaló de un Mini Glatt a un Wurster de 6". La calidad del producto podría mejorarse todavía a gran escala. La distribución del tamaño de partícula del material de gelatina de partida y la gelatina procesada apenas experimentó cambios, la aglomeración del material de partida en calidad considerable no se observó.

2. Estabilidad de los gránulos de gelatina revestidos con trombina según la presente invención

- El propósito de este estudio era investigar la estabilidad de los gránulos revestidos en lecho fluido obtenidos en 1, abarcando 24 meses. De manera específica, los gránulos de gelatina revestidos con trombina se ensayaron 0, 3, 6, 12, 18 y 24 meses después de la preparación; las muestras fueron analizadas en cuanto al equilibrio de hinchamiento, tromboelastografía (TEG: prueba de coagulación *in vitro*) y alfa- trombina.

- Para este ensayo, los gránulos de gelatina revestidos con trombina, que se obtuvieron con la solución de trombina + manitol, fueron cargados en jeringas como contenedores finales bajo condiciones asépticas. Finalmente, todas las jeringas se envasaron y sellaron en bolsas revestidas de aluminio para evitar la absorción de humedad. Éstas fueron almacenadas a temperatura ambiente (temperatura de 22 a 28°C). Las muestras se recogieron 0, 3, 6, 12, 18 y 24 meses después de la preparación y se analizaron con respecto al equilibrio de hinchamiento de la gelatina y la actividad de alfa-trombina. El ensayo TEG se realizó únicamente después de completarse la preparación (0 meses).

No se dispuso dentro de las bolsas recubiertas de aluminio ningún agente de prevención ante la humedad secundaria, tal como una bolsa de desecante de silica-gel. Para simplificar la recogida de muestras, se envasaron tres jeringas de y se sellaron en una bolsa recubierta de aluminio, ya que la determinación del equilibrio de hinchamiento, etc. requiere tres jeringas en cada caso.

5 *Tampones y soluciones*

0,9% NaCl

9 g de NaCl se disolvieron en 1.000 ml de agua purificada.

40 mM de CaCl_2

5,88 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 1.000 ml de agua purificada.

10 *Tampón imidazol*

0,7 g de imidazol, 8,8 g de NaCl y 4,4 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 800 ml de agua purificada, se ajustó el pH a 7,3 con HCl 1N y finalmente el volumen total del tampón se llevó a 1.000 ml con agua purificada.

Reconstitución de las jeringas de estabilidad

- 15 Las jeringas fueron reconstituidas con 4,0 ml, de solución de CaCl_2 40mM en cada caso como diluyente, extraído en una jeringa. La jeringa de estabilidad y la jeringa llena de la solución de CaCl_2 se acoplaron y los contenidos se mezclaron mediante "zumbido" (transferencia repetida entre las dos jeringas en un total de 21 pases). El procedimiento posterior era dependiente de la determinación respectiva.

Equilibrio de hinchamiento

- 20 El equilibrio de hinchamiento de la gelatina es un parámetro que expresa cuánto fluido pueden absorber los gránulos de gelatina cuando se incuban en un exceso grande de fluido en un período de tiempo de 24 horas, en relación con su peso seco. Se calculó como "peso hinchado/peso seco x 100". El cálculo estadístico para el equilibrio de hinchamiento (regresión, nivel de confianza = 95%) se realizó con el programa software "minitab 15".

25 *TEG*

La prueba fue realizada según el manual prescrito estándar; los cálculos TEG estadísticos (ANOVA de una vía, CI 95%) se realizaron con el programa de software "Minitab 15".

Recuperación de alfa-trombina/trombina

Esta prueba se realizó de acuerdo con los métodos establecidos utilizando un coagulómetro.

- 30 Para la determinación coagulométrica de la actividad de trombina (KC4), la trombina tiene que ser extraída de la pasta obtenida. Esto se realizó pesando aproximadamente 1 g de la pasta en un tubo Falcon de 15 ml, agregando 10 ml de NaCl 1M y agitando los tubos en un agitador de onda a 4°C durante una noche. La mañana siguiente los tubos se centrifugaron a una temperatura de 4°C durante 10 minutos a 3.500 rpm. Entonces se extrajo una alícuota de 5 ml del sobrenadante y se ensayó en busca de la actividad de trombina.

- 35 La recuperación de trombina (en porcentaje) se normalizó para la cantidad total de trombina utilizada inicialmente por g de material durante la preparación de las jeringas. La trombina se extrajo en un exceso de 10 veces de NaCl 1M (1 ml de pasta Floseal + 10 ml de medio de extracción).

- 40 Para mantener la concentración de sal constante entre la referencia y las muestras de ensayo (el sistema de prueba utilizado depende de la sal), la primera disolución de la solución de referencia de trombina (con la cual se prepararon las muestras) se hizo en NaCl 1M (1:10, después 1+10) y el segundo paso de disolución de todas las muestras fue a 1:20 en un tampón imidazol. El factor de disolución completo representó 1:200 (o 1:220, respectivamente).

- 45 En los dos primeros puntos de estabilidad, las soluciones de partida de trombina fueron diluidas a 1:400 en el tampón de imidazol únicamente. Después se consideró el impacto de la sal sobre el tiempo de coagulación y las soluciones de partida se diluyeron como se describió anteriormente. Para corregir los resultados de los primeros puntos de estabilidad, se utilizó el valor medio de las soluciones de partida, se diluyó en NaCl 1M y tampón imidazol, generando en los puntos de estabilidad subsiguientes.

- 50 La actividad de trombina calculada a partir de las soluciones de ensayo diluidas de esta forma fue el valor de referencia para el cálculo de recuperación de trombina. Con propósitos comparativos, las soluciones de partida de trombina fueron diluidas por completo también en tampón imidazol. El factor de disolución completo en este punto era de 1:400.

Cálculo de recuperación de trombina:

1. Cálculo de trombina por g de pasta [IU/g] en las muestras de ensayo: (resultado de la muestra de prueba x

disolución x volumen de extracción)/masa de pasta por extracción.

2. Cálculo de la cantidad total del contenido de sólidos del material en gránulos y la trombina al inicio de los experimentos: masa de gránulos + contenido de sólido de la solución de trombina. La cantidad total del contenido de sólidos es la suma del material de gránulos utilizados para un experimento + el contenido de sal del volumen de la solución de trombina utilizada para el experimento.

3. Corrección del volumen de gelatina: solución de partida media x volumen total de trombina utilizado para el revestimiento en lecho fluidos/cantidad total del contenido de sólidos.

4. Datos de muestra normalizados a los datos de solución de partida (sal ajustada): El cálculo estadístico (regresión = CI 95%) se realizó con el programa de software "minitab 15".

10 **Resultados**

Los resultados ilustrativos para la recuperación de trombina son (en %): 72 ± 3 (3 mo); 75 ± 6 (6 mo) y 74 ± 6 (12 mo); de acuerdo con el análisis estadístico de recuperación de trombina, los gránulos revestidos ensayados se consideraron estables.

15 Los gránulos de gelatina revestidos con trombina eran fáciles de reconstituir durante el periodo de estabilidad completo. El presente ejemplo mostrado vía la recuperación de la trombina demostró que los gránulos obtenidos según la presente invención eran estables.

3. Efectividad en un modelo de abrasión hepática porcino

20 El propósito de este estudio es comparar la efectividad de la composición hemostática seca de acuerdo con la presente invención con un producto estándar establecido (FloSeal VH S/D; Baxter Healthcare) en el modelo de abrasión de hígado porcino. FloSeal VH S/D es una matriz de gelatina que suministra trombina para detener el sangrado activo en un período de 2 minutos desde la aplicación. Este producto requiere de una preparación en 2 pasos, (1) reconstitución de la trombina y (2) hidratación de las partículas de gelatina con la trombina reconstituida. El producto de acuerdo con la presente invención está diseñado para reconstituir las partículas de gelatina recubiertas con trombina en 1 paso y es una mejora principal de la preparación en 2 pasos, que desfavorable cuando se necesita el producto rápidamente o en gran cantidad.

Modelo de abrasión de hígado porcino

30 Seis cerdos hembra domésticos, peso medio 55,0 kg (rango de 52,4 a 58,4 kg) se obtuvieron de Oak Hill Genetics (Ewing, Illinois) y se pesaron en el momento de la cirugía. A la llegada, los animales fueron aislados en cuarentena durante 6 días. En el momento de la cirugía, los seis cerdos no mostraron señales de enfermedad clínica. Se utilizaron etiquetas de oreja para identificar a los animales y se hicieron referencias cruzadas a los números de identificación asignados. Los animales fueron agrupados en corrales. Los cerdos recibieron agua *ad libitum* y una dieta estándar para cerdos una vez al día.

35 Los cerdos son un modelo cardiovascular bien aceptado y son adecuados para este tipo de estudio. Los lóbulos grandes, múltiples, del hígado permitieron lesiones múltiples para comparaciones directas de los diferentes ensayos.

Anestesia y terapia de fluidos

40 Los cerdos son medicados con Midazolam (0,3 mg/kg, 1M) e inducidos con máscara con isoflurano en un vehículo a 2:1 nitrógeno:oxígeno. Los cerdos fueron intubados y ventilados a un índice de 10 a 15 respiraciones por minuto. La anestesia se mantuvo con Isoflurano en un vehículo de oxígeno. Los cerdos recibieron una tasa de infusión continua de Solución de Ringer Lactada calentada.

Procedimiento de abrasión de hígado

45 Se utilizó un modelo de abrasión de hígado porcino para este estudio. Seis cerdos son preparados con el objeto de que se evalúen 120 lesiones (40 por grupo de tratamiento), suficientes para detectar una diferencia en los índices del 80 por ciento contra el 40 por ciento con $\alpha = 0,05$ y potencia = 90%. Cada serie se confina ya sea al lóbulo medial, lateral izquierdo o lateral derecho. Cada serie de lesiones contiene tres abrasiones de hígado de 1 cm de diámetro, 3-4 de profundidad, creadas con un taladro de mano fijo con lija. Se evalúa el sangrado y la lesión se trata de forma aleatoria y ciega con la referencia o el ensayo. El ensayo de referencia y de prueba es aleatorizado utilizando un generador de números aleatorios. Cada artículo es colocado sobre la lesión, mantenido en su lugar con una gasa húmeda durante 2 minutos y se evaluó de forma ciega para la hemostasis a los 2, 5 y 10 minutos después del tratamiento. El exceso de referencia o artículo de prueba es irrigado después de una evaluación de 5 minutos.

Protocolo de heparinización

55 Se tomó el tiempo de coagulación activado de línea de base (ACT) y cada cerdo recibió una dosis de carga de heparina, 200 IU/kg. El ACT se evaluó cada 10 minutos hasta que el ACT era al menos 2 veces la línea base. Si el ACT mide menos que o casi igual a 2 veces la línea base, el cerdo se trató con un bolo de dosis de heparina, 75 I.U./kg.

Una vez que supera 2 veces la línea base, el ACT se midió cada 20 minutos. Si el ACT mide menos que o casi

igual al objetivo de 2 veces la línea base, el cerdo recibe un bolo de dosis de heparina, 40 I.U./kg. Si el ACT mide más que el objetivo de 2 veces la línea base, el cerdo no es tratado o recibe un bolo de dosis de mantenimiento de heparina, limitado a no más de 2.000 IU/hora.

- 5 Toda la heparina se suministra vía un catéter venoso periférico. Todas las muestras de sangre se toman de un catéter yugular. Los valores de referencia de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco son registrados en el momento de las mediciones ACT.

Evaluación de hemostasis

- 10 La hemostasis se evaluó 0, 2, 5 y 10 minutos después de generarse y tratarse la serie de lesiones, siendo 0 minutos antes del tratamiento. Las calificaciones de 0, 1, 2, 3, 4, y 5 son asignadas a no sangrado, exudado, muy suave, suave, moderado y severo, respectivamente. Las tres lesiones son tratadas aproximadamente al mismo tiempo para evitar la diferencia en ubicación y coagulación que puede ser resultado del tratamiento de cada una en forma independiente. La sangre de la lesión se limpia después de cada evaluación según sea necesario.

Mediciones y registros

- 15 Se evaluaron ACT, hemostasis, presión sanguínea y ritmo de acuerdo con métodos estándar.

Análisis estadístico

La unidad de muestra para este estudio es el sitio de lesión del hígado con 40 lesiones por grupo de tratamiento para un total de 120 lesiones.

- 20 Se utilizó la regresión logística múltiple para evaluar el efecto del tratamiento en la clasificación de sangrado (0=no, 1= exudado, 2=muy ligero, 3=ligero, 4=moderado y 5=severo) 2, 5 y 10 minutos tras el tratamiento. Las variables independientes incluyen grupo de tratamiento, cerdo, lóbulo del hígado (medio, derecho o izquierdo) y clasificación de sangrado inicial. Las proporciones de exudado para los efectos de FB/FS, Lyo/FS, FB/Lyo, y sus intervalos de confianza son calculadas en cada punto de tiempo después del tratamiento.

- 25 La ubicación de las lesiones no se distribuye de manera uniforme por los tres lóbulos y los cerdos. El efecto del lóbulo no era significativo y, por consiguiente, los análisis se realizaron nuevamente sin este efecto. Las conclusiones se basan en los análisis sin el efecto del lóbulo en el modelo.

Otros experimentos animales

- 30 Se puede realizar una evaluación pre-clínica para comparar la eficacia *in vivo* de las composiciones hemostáticas secas de acuerdo con la presente invención con Floseal VH en un modelo muy riguroso (altamente anti-coagulado). Este modelo consiste en una perforación hepática de espesor completo de 5 mm con 4 incisiones adicionales que radian desde el punto de perforación de forma transversal. Se utilizaron 6 animales por grupo de estudio, estos animales fueron heparinizados a 4.000 I.U./kg. Después de realizar la lesión, se aplicó Floseal reconstituido y una ligera presión con una gasa húmeda durante 2 minutos. Después de este tiempo, se evalúa la hemostasis primaria. Si no se logra la hemostasis primaria, se vuelve a aplicar el producto hasta que se consigue o se acaba el producto (5 ml)/tiempo (15 minutos). Los puntos finales primarios son el logro de la hemostasis primaria (si/no) y el tiempo de la hemostasis (minutos). Si se logra la hemostasis primaria, los animales son cerrados quirúrgicamente y después de 24 horas son evaluados en búsqueda de nuevos sangrados.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener una composición hemostática seca y estable, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 5 a) proporcionar una preparación granular seca de gelatina,
 - b) revestir los gránulos de dicha preparación granular seca con una solución de trombina, obteniendo así gránulos de gelatina revestidos con trombina,
 - c) cargar dichos gránulos de gelatina revestidos con trombina en un contenedor final,
 - 10 d) acondicionar el contenedor final a un dispositivo farmacéutico almacenable que contiene dichos gránulos de gelatina revestidos como una composición hemostática seca y estable.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso b) se realiza según un proceso en lecho fluido.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicha solución de trombina es una
15 solución de trombina que contiene además excipientes, especialmente albúmina, manitol o mezclas de los mismos.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el paso d) comprende un paso de esterilización con óxido de etileno.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha solución de
20 trombina contiene trombina en el rango de 10 a 10.000 I.U., preferentemente de 50 a 5.000 I.U., especialmente de 100 a 1.000 I.U./ml.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el paso b) se realiza como un procedimiento de revestimiento Wurster, preferentemente donde el procedimiento de revestimiento Wurster se lleva a cabo utilizando nitrógeno como gas de proceso, y preferentemente
25 aplicando boquillas de 0,1 a 1,2 mm, especialmente de 0,4 a 1,0 mm.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se utiliza una jeringa como dicho contenedor final, preferentemente donde dicha jeringa es una jeringa terminada junto con una jeringa de diluyente con un diluyente farmacéuticamente aceptable para reconstituir dicha composición hemostática seca y estable.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicha solución de trombina comprende trombina humana, especialmente trombina humana recombinante.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el paso b) se lleva a cabo de forma que solo la capa externa de los
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque dicha gelatina es una gelatina reticulada.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicho contenedor final contiene además una cantidad de un estabilizador efectiva para inhibir la modificación del polímero cuando es expuesto a radiación de esterilización, preferentemente ácido ascórbico, ascorbato de sodio, otras sales de ácido ascórbico o un antioxidante.
- 40 12. Contenedor final terminado obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Kit para la administración de una composición hemostática que comprende el contenedor terminado según la reivindicación 12 y un contenedor con un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 45 14. Gránulos revestidos de trombina de un polímero biocompatible adecuado para su uso en hemostasis, siendo el polímero gelatina.

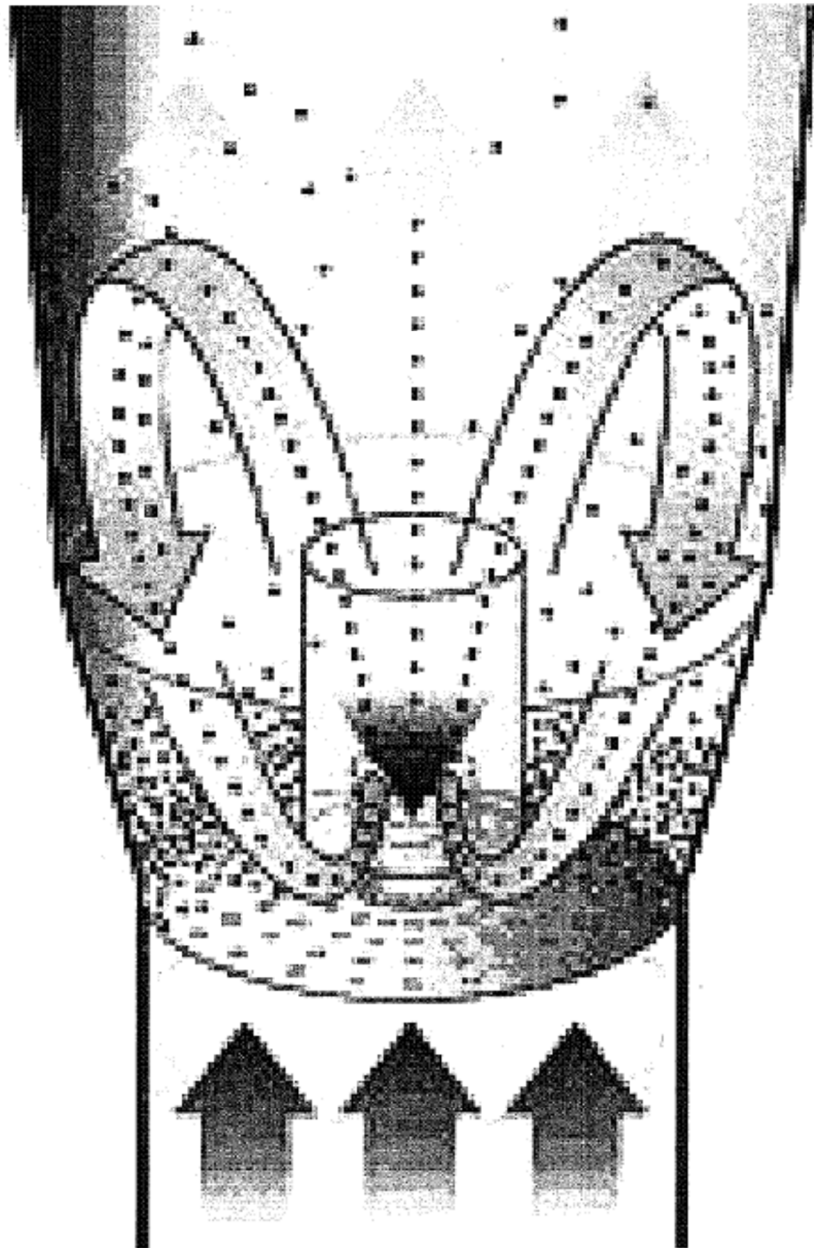


Fig. 1

FIG. 2A

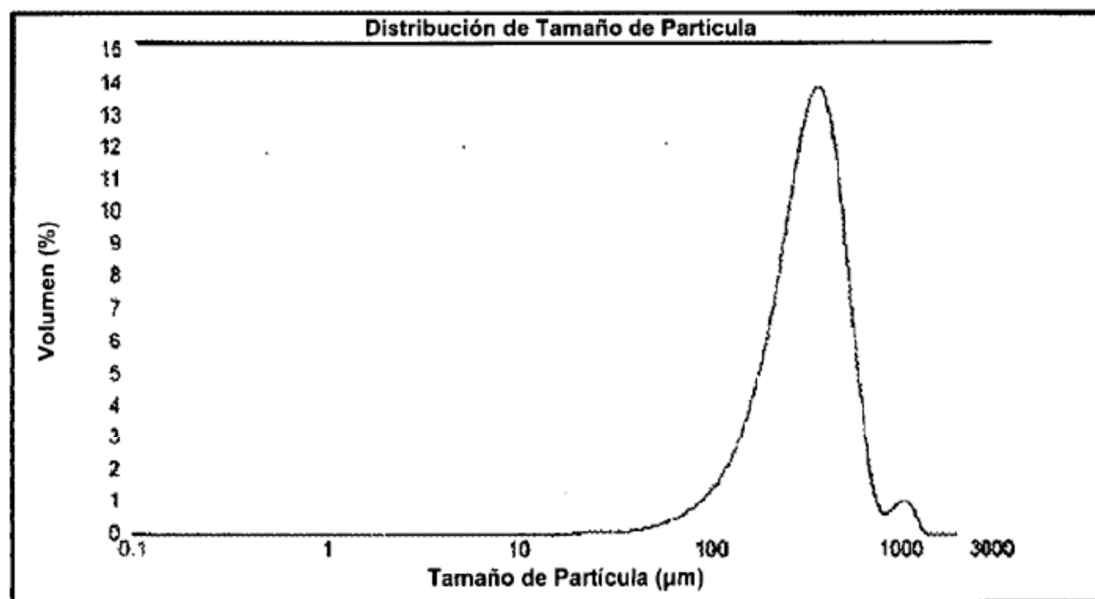
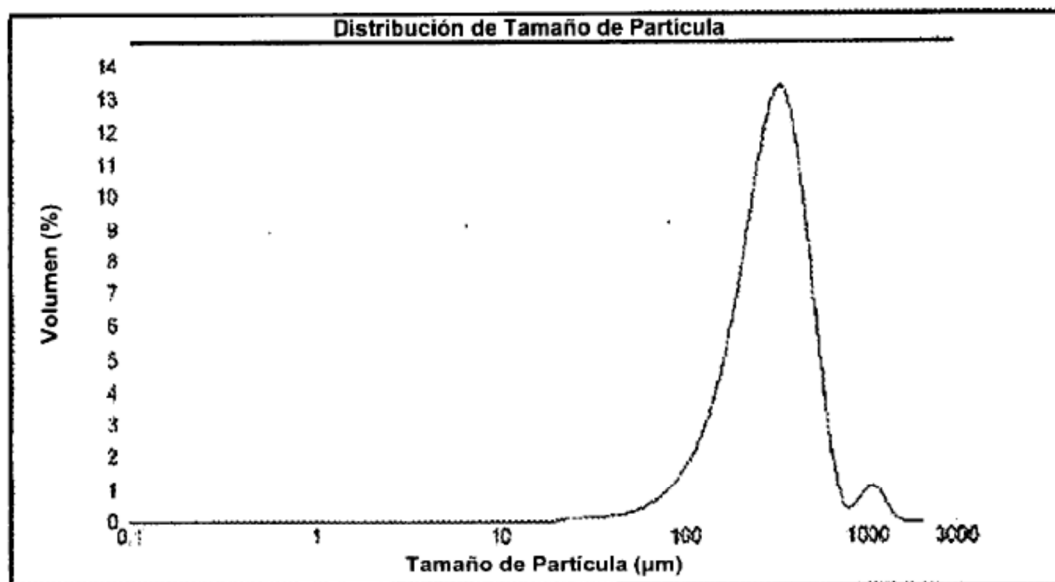


FIG. 2B