

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 082**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/US2013/030213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13760878 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2838546**

54 Título: **Métodos y composiciones de tratamiento de heridas y reducción del riesgo de hernias incisionales**

30 Prioridad:

12.03.2012 US 201261609766 P

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

HARRIS, HOBART W.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 645 082 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

Métodos y composiciones de tratamiento de heridas y reducción del riesgo de hernias incisionales

5 Introducción

Las hernias incisionales son una complicación frecuente de la cirugía abdominal, lo que resulta en una considerable morbilidad del paciente y un aumento de los costes sanitarios. Se realizan anualmente en los Estados Unidos 4-5 millones de incisiones abdominales (laparotomías) con hernias resultantes tras el 11-23 % de estos procedimientos. Las hernias incisionales pueden resultar en una morbilidad grave más allá de la deformidad cosmética de una protusión visible en la pared abdominal anterior, incluyendo obstrucción intestinal, isquemia intestinal, fístula enterocutánea y limitaciones significativas en la actividad física del paciente y el empleo remunerado. En consecuencia, cada año se realizan más de 400.000 reparaciones de hernias incisionales por lo que es uno de los procedimientos más comunes realizados por los cirujanos generales. Se estima que el aumento en los EE.UU. de los costes sanitarios debido a la reparación de la hernia incisional excede actualmente ocho mil millones de dólares por año, sin incluir los costes de las prestaciones por desempleo para esta población de pacientes moderadamente joven. Las investigaciones indican que las hernias incisionales son el resultado de una curación inadecuada o deficiente de la pared abdominal miosfascial tras la cirugía. Por consiguiente, cada uno de los factores de riesgo reconocidos para la formación de una hernia inhibe la cicatrización, incluyendo obesidad mórbida, diabetes, tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica, infección del sitio quirúrgico y una deficiente técnica quirúrgica. Dado que la incidencia de los principales factores de riesgo va en aumento, se prevé que aumente también la prevalencia de las hernias incisionales.

A pesar de la magnitud e importancia de la condición clínica, la investigación centrada en la prevención de las hernias incisionales es escasa. Si bien los estudios actuales y los esfuerzos de investigación se centran en la mejora de los materiales de reparación y las técnicas quirúrgicas, la solución óptima al problema de las hernias incisionales es la prevención.

El documento WO 01/97826 desvela una composición hemostática que comprende al menos un ion procoagulante metálico y al menos un biopolímero procoagulante. El documento WO 99/42146 desvela un producto que comprende trombina y micropartículas que tienen fibrinógeno unido, como una preparación para su uso en terapia de heridas o reparación quirúrgica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un sitio de la incisión abdominal en un sujeto, la composición farmacéutica comprende un primer agente de material precursor que comprende fibrinógeno, un segundo agente de material precursor, que comprende trombina, y partículas de plata.

En una realización, en la composición farmacéutica, el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata se adaptan para combinarse *in situ*.

En una realización, el primer agente de material precursor se aplica antes de la aplicación del segundo agente de material precursor. En una realización, el segundo agente de material precursor se aplica antes de la aplicación del primer agente de material precursor.

En un aspecto, en la composición farmacéutica, las partículas de plata son micropartículas de plata. En un aspecto adicional, las partículas de plata son esféricas.

En realizaciones adicionales, las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 5 μm o más. En aspectos adicionales, las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 200 μm o más.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende 25 mg/ml de partículas de plata. En aspectos adicionales, la composición farmacéutica comprende 250 mg/ml de partículas de plata.

Se proporciona asimismo un dispositivo para aplicar una composición farmacéutica para tratar una herida en un sujeto, comprendiendo el dispositivo, un recipiente estéril que contiene un primer agente de material precursor que comprende fibrinógeno, un segundo agente de material precursor, que comprende trombina, y partículas de plata en una cantidad eficaz para tratar un sitio de la incisión abdominal.

En una realización, el recipiente estéril comprende una primera cámara que contiene el primer agente de material precursor, una segunda cámara que contiene el segundo agente de material precursor y una tercera cámara que contiene las partículas de plata. En una realización adicional, el recipiente estéril comprende una jeringa.

La invención también proporciona un kit que comprende un recipiente estéril que contiene el primer agente de material precursor que comprende fibrinógeno, un segundo agente de material precursor, que comprende trombina, y partículas de plata en una cantidad eficaz para tratar un sitio de la incisión abdominal y un paquete sellado configurado para mantener la esterilidad del recipiente estéril.

5

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra gráficos de: FIG. 1A, el porcentaje de hernias incisionales clínicas en ratas Sprague-Dawley (machos, 250-300 g) tratadas con diferentes dosis de micropartículas de plata frente a una solución salina y solamente pegamento de fibrina (controles); y FIG. 1B, las áreas de hernia anatómica con dosis variables de controles de micropartículas de plata, solución salina y pegamento de fibrina, de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. Los resultados son la desviación media y estándar.

10

La FIG. 2 muestra una fotomicrografía de una sección transversal teñida con hematoxilina-eosina de una incisión fascial que se está curando tratada con plata en el día post-operatorio 28, que reveló micropartículas de plata, una reacción a cuerpos extraños (p. ej., infiltrado inflamatorio que consiste en células gigantes sin histiocitos epiteloides), y fibrosis de la herida precoz que consiste en fibras de colágeno y no hay granulomas evidentes (aumento de 40X), de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación.

15

La FIG. 3 muestra un gráfico del tamaño de la herida (%) frente al tiempo (semanas) de experimentos de cicatrización de ratón diabético para las composiciones de la presente divulgación en comparación con un control negativo, de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación.

20

Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, queda entendido que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, y como tal, pueden por supuesto, variar. Queda entendido también que la terminología usada en la presente memoria es meramente para el fin de describir realizaciones particulares, y no tiene por objeto ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se materializa en las reivindicaciones adjuntas.

25

Cuando se proporciona un intervalo de valores, queda entendido que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y están abarcados también dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno cualquiera o ambos de esos límites incluidos están incluidos también en la invención.

30

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse también cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales ilustrativos y representativos.

35

Cabe señalar que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el", y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cabe señalar además que las reclamaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene por objeto servir como base antecedente para el uso de una terminología tan exclusiva como "únicamente", "sólo" y similares en relación con la recitación de los elementos de la reivindicación o el uso de una limitación "negativa".

45

Como resultará evidente para los expertos en la materia tras la lectura de la presente divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes distintos y características que pueden separarse con facilidad o combinarse con las características de cualquiera de las muchas otras realizaciones. Cualquier método indicado puede llevarse a cabo en el orden de eventos indicados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

50

La referencia a cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de una invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación vigentes que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

55

Descripción detallada

60

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento de un sitio de la incisión abdominal en un sujeto, conforme se describe en las reivindicaciones.

Asimismo se desvela en la presente memoria métodos y composiciones de tratamiento de una herida en un sujeto. Los métodos incluyen la aplicación de una composición farmacéutica que incluye un primer agente de material

65

precursor que incluye fibrinógeno, un segundo agente de material precursor que incluye trombina y partículas de plata en un sitio de la incisión abdominal en una cantidad eficaz para tratar el sitio de la incisión abdominal. También se proporcionan composiciones farmacéuticas y dispositivos para su uso en los métodos en cuestión.

- 5 A continuación, se describen en primer lugar los métodos en cuestión con mayor detalle para tratar una herida en un sujeto, seguido de un examen de las composiciones y dispositivos que encuentran uso en los métodos en cuestión, así como una discusión de diversas aplicaciones representativas en las que los métodos en cuestión, composiciones y dispositivos encuentran uso.

10 MÉTODOS

Los aspectos de la presente divulgación incluyen un método de tratamiento de una herida en un sujeto. El método incluye la aplicación de una composición farmacéutica que incluye un primer agente de material precursor que incluye fibrinógeno, un segundo agente de material precursor que incluye trombina y partículas de plata a un sitio de la incisión abdominal en una cantidad eficaz para tratar el sitio de la incisión abdominal. Como tal, en algunos casos, el tratamiento de una herida en un sujeto incluye la aplicación de la composición farmacéutica a una herida en el sujeto, tal como un sitio de la incisión abdominal en el sujeto.

Por "tratamiento" o "tratar" se entiende aliviar, prevenir, curar, reducir la aparición, etc., de una afección en un sujeto. En algunos casos, la reducción de la aparición incluye la disminución de la gravedad y/o incidencia de una afección en un sujeto. En algunos casos, la reducción de la aparición incluye la reducción del riesgo de aparición de una afección en un sujeto o grupo de sujetos. Por ejemplo, en un grupo de sujetos, una reducción del 50 % en el riesgo de aparición de una afección significa que, en promedio, la afección es detectable en el 50 % de los sujetos en el grupo, mientras la afección no sea significativamente detectable en el otro 50 % de los sujetos del grupo. Los porcentajes pueden usarse cuando se hace referencia a un grupo de sujetos o a un sujeto individual. En ciertos casos, la afección incluye una hernia, tal como una hernia incisional. Por ejemplo, la hernia incisional puede encontrarse en un sitio de la incisión abdominal, tal como un sitio de la incisión abdominal realizada en un procedimiento quirúrgico.

En ciertos casos, el tratamiento de una herida incluye la promoción de la curación de la herida. En algunos casos, la promoción de la curación de una herida incluye un aumento en la eficacia de la cicatrización y/o un aumento en la resistencia del sitio de la herida curada resultante en comparación con una herida que no ha sido tratada con los métodos y composiciones de la presente divulgación. En algunos casos, la promoción de curación de una herida incluye la reducción de la aparición de una cicatrización defectuosa y/o reducción de la gravedad de la cicatrización anormal en comparación con una herida que no ha sido tratada con los métodos y composiciones de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, el método de tratamiento de una herida en un sujeto reduce el riesgo de hernia incisional en el sujeto. Por "hernia incisional" se entiende una hernia que se produce en un sitio de la incisión e implica la cicatrización anormal o incompleta a nivel subcutáneo (p. ej., a nivel del músculo o fascia). En algunos casos, la cicatrización anormal o incompleta puede dar lugar a una mayor susceptibilidad a una hernia incisional. Por "reducir el riesgo" se entiende que el riesgo de la aparición de una hernia incisional en un sujeto tratado por el método de la presente divulgación es menor que en un sujeto que no ha sido tratado por el método de la presente divulgación. En algunos casos, el método reduce el riesgo de hernia incisional en un 30 % o más, tal como 35 % o más, incluyendo 40 % o más, o 45 % o más, o 50 % o más, o 55 % o más, o 60 % o más, o 65 % o más, o 70 % o más, o 75 % o más, u 80 % o más, u 85 % o más, o 90 % o más, o 95 % o más, por ejemplo, en un 99 % o más. En ciertos casos, el método reduce el riesgo de hernia incisional en un 60 % o más. Por ejemplo, el método puede reducir el riesgo de una hernia clínica en un sujeto. Por "hernia clínica" se entiende una hernia que se observa (p. ej., por la vista, tacto, sonido, olor, etc.) durante el tratamiento de un paciente, en lugar de determinarse a través de estudios de laboratorio. Por ejemplo, una hernia clínica puede observarse como una protusión visible en la pared abdominal.

En ciertas realizaciones, el método de tratamiento de una herida en un sujeto que reduce la gravedad de una hernia en un sujeto debería producir una hernia en el sujeto. En algunos casos, una reducción en la gravedad de la hernia corresponde a una reducción en el tamaño de la hernia en el sujeto. Por ejemplo, el método puede reducir el tamaño de una hernia anatómica en un sujeto. Por "hernia anatómica" se entiende una hernia que es detectable por métodos distintos, o además de, la observación clínica (p. ej., por disección del sujeto, IRM, TC, ultrasonidos y similares). El tamaño de una hernia anatómica se puede medir mediante la determinación de la separación entre los músculos abdominales (p. ej., músculos rectos) en el sitio de la incisión. Por ejemplo, el tamaño de una hernia anatómica puede estimarse multiplicando el diámetro craneocaudal máximo por el promedio de dos mediciones de diámetro transversal (p. ej., aproximación de una elipse). En algunos casos, el método reduce el tamaño de una hernia incisional en un 15 % o más, tal como 20 % o más, incluyendo 25 % o más, o 30 % o más, tal como 35 % o más, incluyendo 40 % o más, o 45 % o más, o 50 % o más, o 55 % o más, o 60 % o más, o 65 % o más, o 70 % o más, o 75 % o más, u 80 % o más, u 85 % o más, o 90 % o más, o 95 % o más, por ejemplo, en un 99 % o más. En ciertos casos, el método reduce el riesgo de hernia incisional en un 55 % o más.

En ciertas realizaciones, el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata se adaptan para combinarse *in situ*. Por ejemplo, el primer agente de material precursor, el

segundo agente de material precursor y las partículas de plata pueden adaptarse para combinarse en el sitio de la incisión abdominal a medida que el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata se aplican al sitio de la incisión abdominal. Por consiguiente, en algunos casos, el método incluye la combinación del primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata *in situ* (p. ej., en el sitio de la incisión abdominal). Por ejemplo, la aplicación de la composición farmacéutica puede incluir la aplicación del primer agente de material precursor antes de la aplicación del segundo agente de material precursor. En algunos casos, el primer agente de material precursor se aplica inmediatamente antes de la aplicación del segundo agente de material precursor. En otros casos, la aplicación de la composición farmacéutica incluye la aplicación del segundo agente de material precursor antes de la aplicación del primer agente de material precursor. Por ejemplo, el segundo agente de material precursor se puede aplicar inmediatamente antes de la aplicación del primer agente de material precursor. En otras realizaciones, el primer y segundo agentes de material precursor se aplican de forma esencialmente simultánea. En otras realizaciones, el primer y segundo agentes de material precursor se combinan entre sí para formar la composición farmacéutica antes de la aplicación de la composición farmacéutica en el sitio de la incisión abdominal. Por ejemplo, el primer y segundo agentes de material precursor se combinan entre sí para formar la composición farmacéutica inmediatamente antes de la aplicación de la composición farmacéutica en el sitio de la incisión abdominal.

Las partículas de plata pueden combinarse con el primer y segundo agentes de material precursor en cualquier etapa deseada del proceso de aplicación. Por ejemplo, las partículas de plata pueden combinarse con el primer agente de material precursor antes de la combinación del primer agente de material precursor con el segundo agente de material precursor, como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, las partículas de plata pueden combinarse con el segundo agente de material precursor antes de la combinación del primer agente de material precursor con el segundo agente de material precursor, como se ha descrito anteriormente. En algunas otras realizaciones, las partículas de plata pueden combinarse con el primer y segundo agentes de material precursor después de la combinación del primer agente de material precursor con el segundo agente de material precursor entre sí, como se ha descrito anteriormente. En algunas otras realizaciones, el primer y segundo agentes de material precursor y las partículas de plata se combinan esencialmente al mismo tiempo. Por ejemplo, el primer y segundo agentes de material precursor y las partículas de plata pueden combinarse *in situ* como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, las partículas de plata se combinan con el primer y segundo agentes de material precursor para formar la composición farmacéutica antes de la aplicación de la composición farmacéutica en el sitio de la incisión abdominal. Por ejemplo, el primer y segundo agentes de material precursor y las partículas de plata pueden combinarse entre sí para formar la composición farmacéutica inmediatamente antes de la aplicación de la composición farmacéutica en el sitio de la incisión abdominal. En otras realizaciones, las partículas de plata se combinan con tanto el primer como el segundo agente de material precursor antes de la combinación del primer y segundo agentes de material precursor entre sí para formar la composición farmacéutica.

En ciertas realizaciones, el método incluye la administración de la composición farmacéutica en una cantidad eficaz para tratar el sitio de la incisión abdominal. Por "cantidad eficaz" se entiende una dosificación suficiente como para causar un efecto significativamente detectable en el sujeto diana, según se desee. En algunos casos, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica es una cantidad de la composición farmacéutica suficiente para inducir una reacción a cuerpos extraños en el sujeto en el sitio de aplicación. En ciertos casos, la reacción a cuerpos extraños incluye infiltrado inflamatorio que consiste en células gigantes sin histiocitos epiteloides. En ciertos casos, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica incluye 10 mg/ml de partículas de plata o más, tal como 25 mg/ml de partículas de plata o más, incluyendo 50 mg/ml de partículas de plata o más, o 75 mg/ml de partículas de plata o más, o 100 mg/ml de partículas de plata o más, o 150 mg/ml de partículas de plata o más, o 200 mg/ml de partículas de plata o más, o 250 mg/ml de partículas de plata o más, o 300 mg/ml de partículas de plata o más, o 350 mg/ml de partículas de plata o más, o 400 mg/ml de partículas de plata o más, o 450 mg/ml de partículas de plata o más, o 500 mg/ml de partículas de plata o más, o 550 mg/ml de partículas de plata o más, o 600 mg/ml de partículas de plata o más, o 650 mg/ml de partículas de plata o más, o 700 mg/ml de partículas de plata o más, o 750 mg/ml de partículas de plata o más. En ciertos casos, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica incluye 50 mg/ml de partículas de plata. En algunos casos, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica incluye 500 mg/ml de partículas de plata.

En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica incluye una relación peso/peso de partículas de plata a fibrinógeno de 0,1 (peso/peso) o más, o 0,2 (peso/peso) o más, o 0,3 (peso/peso) o más, o 0,4 (peso/peso) o más, o 0,5 (peso/peso) o más, o 0,6 (peso/peso) o más, o 0,7 (peso/peso) o más, o 0,8 (peso/peso) o más, o 0,9 (peso/peso) o más, o 1 (peso/peso) o más, o 1,1 (peso/peso) o más, o 1,2 (peso/peso) o más, o 1,3 (peso/peso) o más, o 1,4 (peso/peso) o más, o 1,5 (peso/peso) o más, o 1,6 (peso/peso) o más, o 1,7 (peso/peso) o más, o 1,8 (peso/peso) o más, o 1,9 (peso/peso) o más, o 2 (peso/peso) o más, o 2,1 (peso/peso) o más, o 2,2 (peso/peso) o más, o 2,3 (peso/peso) o más, o 2,4 (peso/peso) o más, o 2,5 (peso/peso) o más, o 2,6 (peso/peso) o más, o 2,7 (peso/peso) o más, o 2,8 (peso/peso) o más, o 2,9 (peso/peso) o más, o 3 (peso/peso) o más. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica puede incluir una relación en peso/peso de partículas de plata a fibrinógeno de 2,2 (peso/peso) o más.

En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica incluye una cantidad de partículas de plata, como se describe en la presente memoria, aplicada a una determinada superficie de la herida, tal como 0,5

cm² o más, o 1 cm² o más, o 2 cm² o más, o 3 cm² o más, o 4 cm² o más, o 5 cm² o más, o 6 cm² o más, o 7 cm² o más, u 8 cm² o más, o 9 cm² o más, o 10 cm² o más, u 11 cm² o más, o 12 cm² o más, o 13 cm² o más, o 14 cm² o más, o 15 cm² o más, o 16 cm² o más, o 17 cm² o más, o 18 cm² o más, o 19 cm² o más, o 20 cm² o más, o 25 cm² o más, o 30 cm² o más, o 35 cm² o más, o 40 cm² o más, o 45 cm² o más, o 50 cm² o más. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica puede incluir una cantidad de partículas de plata, tal como 250 mg/ml, aplicada a una superficie de la herida de 10 cm² o más. En algunos casos, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica puede incluir una cantidad de partículas de plata, tal como 2,2 (peso/peso), aplicada a una superficie de la herida de 10 cm² o más.

10 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Los aspectos de la presente divulgación incluyen una composición farmacéutica para el tratamiento de una herida en un sujeto. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye un pegamento de fibrina y partículas de plata en una cantidad eficaz para tratar un sitio de la incisión abdominal. Por "composición farmacéutica" se entiende una composición que incluye uno o más agentes terapéuticos usados en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de una enfermedad o afección en un sujeto (p. ej., un sujeto animal o humano).

En ciertas realizaciones, el pegamento de fibrina incluye al menos un primer agente de material precursor y un segundo agente de material precursor. El primer agente de material precursor puede incluir fibrinógeno y el segundo agente de material precursor puede incluir trombina. El pegamento de fibrina es un biopolímero formado por la adición de trombina a fibrinógeno. La trombina es un iniciador o catalizador que escinde enzimáticamente el fibrinógeno que altera la carga y conformación de la molécula, formando un monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina se agregan entonces formando el biopolímero de fibrina. Después de la combinación de los dos componentes de trombina y fibrinógeno, la solución permanece en estado líquido durante varios segundos antes de la polimerización. El agente de pegamento de fibrina, ya sea inmediatamente después de la mezcla de los materiales precursores o mediante la administración de los materiales por separado para su mezcla *in situ*, se adapta por lo tanto para administrarse en el sitio de la herida en el sujeto a través de una jeringa, catéter u otros inyectores, requiriendo así solamente un procedimiento mínimamente invasivo. El pegamento de fibrina también es biocompatible y no tóxico para el sujeto. Otros ejemplos de pegamento de fibrina que pueden ser útiles de acuerdo con diversos aspectos de la presente divulgación se describen en las siguientes referencias: "*Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications.*" *J Biomater Appl.* 1993;7:309-52 y patente de Estados Unidos n.º 5.962.405. En ciertas realizaciones, el pegamento de fibrina incluye componentes adicionales, tales como, entre otros, un inhibidor de la fibrinolisis, albúmina (p. ej., albúmina humana), citrato de tri-sodio, histidina, niacinamida, polisorbato 80, agua (p. ej., agua estéril, tal como agua para inyección), cloruro de calcio, cloruro de sodio, combinaciones de los mismos, y similares. Por ejemplo, el primer agente de material precursor puede incluir, además de fibrinógeno, uno o más de un inhibidor de la fibrinolisis, albúmina (p. ej., albúmina humana), citrato de tri-sodio, histidina, niacinamida, polisorbato 80, agua (p. ej., agua estéril, tal como agua para inyección), y similares. En algunos casos, el segundo agente de material precursor puede incluir, además de trombina, uno o más de albúmina (p. ej., albúmina humana), agua (p. ej., agua estéril, tal como agua para inyección), cloruro de calcio, cloruro de sodio, y similares. Ejemplos adicionales de componentes que pueden incluirse en el pegamento de fibrina incluyen, entre otros, inhibidores de la proteasa, tales como aprotinina.

Como se ha descrito anteriormente, en ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye partículas de plata. Las partículas de plata pueden ser micropartículas de plata. En algunos casos, el tamaño de las micropartículas de plata es suficiente para inducir una reacción a cuerpos extraños en el sujeto en el sitio de aplicación. Por ejemplo, las micropartículas tienen un diámetro medio que oscila de 2 µm a 1.000 µm. En comparación, las nanopartículas tienen un diámetro medio de 1 nm a 1.000 nm. En algunos casos, las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 2 µm o más, tal como 3 µm o más, incluyendo 4 µm o más, o 5 µm o más, o 7 µm o más, o 10 µm o más, o 15 µm o más, o 20 µm o más, o 25 µm o más, o 50 µm o más, o 75 µm o más, o 100 µm o más, o 150 µm o más, o 200 µm o más, o 250 µm o más o 500 µm o más. Por ejemplo, las micropartículas de plata pueden tener un diámetro medio que oscila de 2 µm a 1.000 µm, tal como de 2 µm a 750 µm, incluyendo de 3 µm a 500 µm, o de 5 µm a 250 µm. En ciertos casos, las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 5 µm o más. En algunos casos, las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 200 µm o más. En algunas realizaciones, las micropartículas de plata incluyen una mezcla de micropartículas de plata que tienen un intervalo de diferentes tamaños en los tamaños que se han descrito anteriormente. Como se usa en la presente memoria, el término "medio" es la media aritmética.

En ciertos casos, las partículas de plata tienen una forma esencialmente simétrica. Por ejemplo, las partículas de plata pueden tener una forma que es esencialmente esférica, elíptica, cilíndrica, y similares. En algunas realizaciones, las partículas de plata tienen una forma esencialmente esférica. En otras realizaciones, las partículas de plata pueden tener una forma irregular. En ciertos casos, las partículas de plata tienen una superficie exterior esencialmente lisa. En otros casos, las partículas de plata tienen una superficie exterior con textura (p. ej., rugosa). En algunos casos, las partículas de plata incluyen una mezcla de partículas de plata que tienen diferentes formas y/o texturas como se ha descrito anteriormente. En ciertos casos, las partículas de plata tienen una forma y/o textura suficientes para inducir una reacción a cuerpos extraños en el sujeto en el sitio de aplicación. Por ejemplo, las partículas de plata pueden tener una forma esférica, una forma de barra, una forma de estrella, una forma irregular,

combinaciones de las mismas, y similares.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye 10 mg/ml de partículas de plata o más, tal como 25 mg/ml de partículas de plata o más, incluyendo 50 mg/ml de partículas de plata o más, o 75 mg/ml de partículas de plata o más, o 100 mg/ml de partículas de plata o más, o 150 mg/ml de partículas de plata o más, o 200 mg/ml de partículas de plata o más, o 250 mg/ml de partículas de plata o más, o 300 mg/ml de partículas de plata o más, o 350 mg/ml de partículas de plata o más, o 400 mg/ml de partículas de plata o más, o 450 mg/ml de partículas de plata o más, o 500 mg/ml de partículas de plata o más, o 550 mg/ml de partículas de plata o más, o 600 mg/ml de partículas de plata o más, o 650 mg/ml de partículas de plata o más, o 700 mg/ml de partículas de plata o más, o 750 mg/ml de partículas de plata o más. En ciertos casos, la composición farmacéutica incluye 50 mg/ml de partículas de plata. En algunos casos, la composición farmacéutica incluye 500 mg/ml de partículas de plata.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una relación en peso/peso de partículas de plata a fibrinógeno de 0,1 (peso/peso) o más, o 0,2 (peso/peso) o más, o 0,3 (peso/peso) o más, o 0,4 (peso/peso) o más, o 0,5 (peso/peso) o más, o 0,6 (peso/peso) o más, o 0,7 (peso/peso) o más, o 0,8 (peso/peso) o más, o 0,9 (peso/peso) o más, o 1 (peso/peso) o más, o 1,1 (peso/peso) o más, o 1,2 (peso/peso) o más, o 1,3 (peso/peso) o más, o 1,4 (peso/peso) o más, o 1,5 (peso/peso) o más, o 1,6 (peso/peso) o más, o 1,7 (peso/peso) o más, o 1,8 (peso/peso) o más, o 1,9 (peso/peso) o más, o 2 (peso/peso) o más, o 2,1 (peso/peso) o más, o 2,2 (peso/peso) o más, o 2,3 (peso/peso) o más, o 2,4 (peso/peso) o más, o 2,5 (peso/peso) o más, o 2,6 (peso/peso) o más, o 2,7 (peso/peso) o más, o 2,8 (peso/peso) o más, o 2,9 (peso/peso) o más, o 3 (peso/peso) o más. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir una relación en peso/peso de partículas de plata a fibrinógeno de 2,2 (peso/peso) o más.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una cantidad de partículas de plata, como se describe en la presente memoria, aplicada a una determinada superficie de la herida, tal como 0,5 cm² o más, o 1 cm o más, o 2 cm o más, o 3 cm o más, o 4 cm o más, o 5 cm o más, o 6 cm o más, o 7 cm o más, o 8 cm o más, o 9 cm o más, o 10 cm o más, o 11 cm² o más, o 12 cm² o más, o 13 cm² o más, o 14 cm² o más, o 15 cm² o más, o 16 cm² o más, o 17 cm² o más, o 18 cm² o más, o 19 cm o más, o 20 cm² o más, o 25 cm² o más, o 30 cm² o más, o 35 cm² o más, o 40 cm² o más, o 45 cm² o más, o 50 cm² o más. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir una cantidad de partículas de plata, tal como 250 mg/ml, aplicada a una superficie de la herida de 10 cm² o más. Se pueden utilizar otras cantidades de partículas de plata por superficie de la herida, tal como cualquiera de varios mg/ml de partículas de plata descrita en la presente memoria aplicada a cualquier variedad de superficies de la herida como se describe en la presente memoria. En algunos casos, la composición farmacéutica puede incluir una cantidad de partículas de plata, tal como 2,2 (peso/peso), aplicada a una superficie de la herida de 10 cm² o más.

En ciertas realizaciones, las partículas de plata son esencialmente sólidas. Las partículas esencialmente sólidas pueden, en algunos casos, ser porosas (p. ej., microporosas, nanoporosas, etc.). No obstante, las partículas esencialmente sólidas no abarcan partículas huecas que tengan un espacio vacío rodeado por un recubrimiento. En estas realizaciones, las partículas de plata no incluyen partículas huecas. En ciertos casos, las partículas de plata no incluyen un material polimérico. Por ejemplo, las partículas de plata pueden incluir solamente plata (p. ej., plata, óxido de plata, iones de plata, etc.).

DISPOSITIVOS

Aspectos de la presente divulgación incluyen un dispositivo para aplicar una composición farmacéutica para el tratamiento de una herida en un sujeto. El dispositivo incluye un recipiente estéril que contiene un primer agente de material precursor que incluye fibrinógeno, un segundo agente de material precursor que incluye trombina y partículas de plata en una cantidad eficaz para tratar un sitio de la incisión abdominal. Por "estéril" se entiende que no existen prácticamente microbios (tales como hongos, bacterias, virus, esporas, etc.).

En ciertas realizaciones, el recipiente estéril se configura para mantener el primer y segundo agentes de material precursor en cámaras separadas durante el almacenamiento y hasta su uso. En algunos casos, el recipiente estéril incluye dos o más cámaras que incluyen los agentes de material precursor para el pegamento de fibrina. Por ejemplo, el recipiente estéril puede incluir una primera cámara que incluye un primer agente de material precursor (p. ej., fibrinógeno) y una segunda cámara que incluye un segundo agente de material precursor, (p. ej., trombina). La primera y segunda cámaras pueden ser cámaras distintas que no permiten que el primer y segundo agentes de material precursor se pongan en contacto entre sí hasta su uso.

En algunos casos, el recipiente estéril se configura para mantener el primer y segundo agentes de material precursor y las partículas de plata en cámaras separadas durante el almacenamiento y hasta su uso. Por ejemplo, el recipiente estéril puede incluir la primera y segunda cámaras como se ha descrito anteriormente y una tercera cámara que contiene las partículas de plata. Las partículas de plata pueden proporcionarse en un disolvente apropiado. Por ejemplo, las partículas de plata pueden proporcionarse en un disolvente, tal como, entre otros, agua, una solución (p. ej., solución de cloruro de calcio), un tampón, y similares. La primera, segunda y tercera cámaras pueden ser cámaras distintas que no permiten que el primer y segundo agentes de material precursor y las partículas de plata se pongan en contacto entre sí hasta su uso.

En algunos casos, el recipiente estéril incluye una boquilla. La boquilla puede estar en comunicación fluida con las dos o más cámaras del recipiente estéril. Por ejemplo, la boquilla puede estar en comunicación fluida con la primera, segunda y tercera cámaras como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el recipiente estéril se configura para dispensar el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata a través de una única boquilla. En estas realizaciones, el recipiente estéril puede configurarse para mezclar el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata a medida que el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata se dispensen desde el contenedor estéril a través la boquilla. Las realizaciones del recipiente estéril que incluye una boquilla como se ha descrito anteriormente pueden facilitar la mezcla y aplicación *in situ* del primer agente de material precursor, del segundo agente de material precursor y de las partículas de plata a un sitio de la incisión abdominal.

En ciertas realizaciones, el recipiente estéril incluye una jeringa. La jeringa puede incluir una primera cámara, una segunda cámara y una tercera cámara como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la jeringa puede configurarse como una jeringa de tres cilindros con cada tubo separado que contiene uno del primer agente de material precursor, del segundo agente de material precursor o de las partículas de plata.

Las realizaciones del dispositivo para la aplicación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una herida en un sujeto también pueden incluir otros tipos de dispositivos convenientemente adaptados para aplicar la composición farmacéutica al sujeto. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir un recipiente presurizado. El recipiente presurizado puede incluir una o más cámaras como se ha descrito anteriormente (p. ej., una primera cámara, una segunda cámara, una tercera cámara, etc.). El recipiente presurizado puede configurarse para mantener el contenido de las una o más cámaras a una presión mayor que la presión atmosférica convencional. En algunos casos, el recipiente presurizado incluye una válvula, y puede configurarse para dispensar el contenido de las una o más cámaras cuando la válvula está en una posición abierta permitiendo de este modo que el contenido presurizado del recipiente sea liberado del recipiente. Por ejemplo, el recipiente presurizado puede configurarse como un recipiente pulverizador (p. ej., un recipiente pulverizador con palanca de bomba), un recipiente en aerosol y similares.

UTILIDAD

Los métodos y composiciones en cuestión encuentran uso en varias aplicaciones diferentes en las que se desea el tratamiento de una herida en un sujeto. En algunos casos, la herida puede ser una herida crónica, tal como una úlcera (p. ej., una úlcera por presión, una úlcera de pie diabético, y similares). En ciertos casos, la herida puede ser una herida quirúrgica o una herida por traumatismo, tal como, entre otros, una herida de tejido blando quirúrgica o traumática (p. ej., una herida muscular quirúrgica o traumática, una herida fascial quirúrgica o traumática, etc.).

Por ejemplo, la herida puede ser una herida en un sitio de la incisión en un sujeto, tal como un sitio de la incisión abdominal. En ciertas realizaciones, los métodos y composiciones encuentran uso en el tratamiento de una herida en un sujeto, en el que el tratamiento incluye la promoción de la curación de la herida en el sujeto. Los métodos y composiciones en cuestión también encuentran uso en la prevención o reducción del riesgo de aparición de efectos secundarios no deseados asociados con una herida en un sujeto. Por ejemplo, las composiciones en cuestión de la invención encuentran uso como agente terapéutico indicado para su uso profiláctico en la prevención y/o reducción en el riesgo de aparición de efectos secundarios no deseados asociados con una herida, tal como un sitio de la incisión abdominal. Por lo tanto, los métodos y composiciones en cuestión encuentran uso en protocolos de cirugía abdominal para promover la curación de un sitio de la incisión abdominal en un sujeto.

KITS

También se proporcionan kits que encuentran uso en la práctica de los métodos en cuestión, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, kits para la práctica de los métodos en cuestión pueden incluir un recipiente estéril que contiene un primer agente de material precursor, un segundo agente de material precursor y partículas de plata en una cantidad eficaz para promover la curación en un sitio de la incisión abdominal. Como se ha descrito anteriormente, el primer agente de material precursor puede incluir fibrinógeno y el segundo agente de material precursor puede incluir trombina. En ciertas realizaciones, los kits incluyen un paquete sellado configurado para mantener la esterilidad del recipiente estéril. El paquete sellado puede sellarse de modo que esencialmente no haya contaminantes externos, tales como suciedad, microbios (p. ej., hongos, bacterias, virus, esporas, etc.), líquidos, gases, y similares, que son capaces de entrar en el paquete sellado. Por ejemplo, el paquete sellado puede sellarse de modo que el paquete sea estanco y/o hermético.

En ciertas realizaciones, el kit puede incluir uno o más recipientes distintos. Uno o más recipientes distintos pueden incluir cada uno un componente diferente de la composición farmacéutica, tal como el primer agente de material precursor en un primer recipiente, un segundo agente de material precursor en un segundo recipiente y las partículas de plata en un tercer recipiente. Uno o más recipientes pueden proporcionarse como recipientes individuales distintos o pueden estar conectados o formados como una sola unidad. En algunos casos, los

recipientes están configurados para ser congelados durante el almacenamiento. En ciertos casos, los recipientes están configurados para contener un componente liofilizado, tal como el primer agente de material precursor o el segundo agente de material precursor. Por ejemplo, el recipiente puede ser un vial, una botella y similares.

- 5 Además de los componentes anteriores, los kits en cuestión pueden incluir adicionalmente instrucciones para la práctica de los métodos en cuestión. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión de diversas formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una hoja u hojas de papel en el que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un prospecto, etc. Otros medios serían un medio legible por ordenador, p. ej., CD, DVD, Blu-ray, memoria legible por ordenador, etc., sobre el que se ha grabado o almacenado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede usarse a través de Internet para tener acceso a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.
- 10
- 15 Como puede apreciarse a partir de la divulgación proporcionada anteriormente, la presente divulgación tiene una amplia variedad de aplicaciones. Por consiguiente, los siguientes ejemplos se ofrecen para fines de ilustración y no tienen por objeto interpretarse como una limitación de la invención de ninguna manera. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente varios parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares. Así, los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni tienen por objeto representar que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura se representa en grados Celsius y la presión es la atmosférica o está cerca de la atmosférica.
- 20
- 25

Ejemplos

30 EJEMPLO 1

MÉTODOS

Modelos de animal

- 35 Todos los procedimientos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de San Francisco, Universidad de California. Los animales se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante un mínimo de 5 días antes de someterse a cirugía y se les proporcionó acceso al agua y alimento equilibrado comercial convencional para ratas *ad libitum*.

40 *Modelo de hernia incisional*

- Las ratas Sprague-Dawley (macho, 250-300 g, Charles River, Cambridge, MA) se sometieron a un procedimiento de modelo de hernia incisional establecido, en el que > 80 % de los animales desarrollan hernias incisionales en un periodo de 28 días. Los animales se colocaron bajo anestesia con isoflurano, el cabello de la pared abdominal ventral se afeitó con una maquinilla eléctrica y el campo quirúrgico se preparó con alcohol al 70 %. Un colgajo cutáneo de grosor completo, rectangular de 6 cm x 3 cm, basado en 2 cm de lateral a la línea media ventral se elevó a través del plano prefascial avascular, separando de ese modo la incisión en la piel del entorno de cicatrización fascial subyacente. La relación 1:2 de longitud del colgajo a la anchura se mantuvo para prevenir la isquemia del colgajo cutáneo. Se realizó una incisión por laparotomía en la línea media de 5 cm, los intestinos se manipularon y luego la incisión miofascial se cerró con 2 suturas interrumpidas (rápidamente absorbibles) con catgut 5-0 simple colocadas a 5 mm de los bordes miofasciales cortados y a un tercio de la distancia de los extremos craneal y caudal de la incisión por laparotomía en la línea media, respectivamente, antes de que el colgajo cutáneo se cierre con una sutura continua con vicryl 4-0 para evitar la evisceración intestinal. Inmediatamente después de la cirugía, se infundieron 0,4 ml de bupivacaína al 0,25 % por vía subcutánea en torno a la incisión abdominal y las ratas se observaron cada 2 minutos hasta que despertaron y reanudaron la actividad normal. Las ratas se regresaron a jaulas individuales y se realizó un seguimiento dos veces al día. A las 12 y 18 horas después de la operación, se les inyectó por vía subcutánea 0,05 mg/kg de buprenorfina.
- 45
- 50
- 55

60 *Modelo modificado de hernia incisional*

- Las ratas Sprague-Dawley (macho, 250-300 g) se sometieron a un modelo modificado de hernia incisional en el que los animales se colocaron bajo anestesia con isoflurano y la pared abdominal ventral se preparó y abrió como se ha descrito anteriormente. En estos animales, la incisión por laparotomía en la línea con un grosor completo de 5 cm, se cerró con una sutura continua con vicryl 4-0 colocada a 5 mm de los bordes miofasciales cortados para promover la cicatrización normal. El cierre de la piel y el tratamiento post-quirúrgico de los animales eran idénticos a lo descrito
- 65

previamente.

Diseños del estudio

5 *Prevención de las hernias incisionales*

Se realizó el primer conjunto de experimentos para determinar si una combinación de micropartículas metálicas de plata y pegamento de fibrina podría reducir el riesgo de aparición de hernias incisionales en ratas usando un modelo experimental establecido. En los experimentos descritos en la presente memoria, se administraron tres dosis de micropartículas de plata (0,25, y 250 mg/ml) en combinación con pegamento de fibrina estéril (TISSEEL®, Baxter Healthcare Corp., Hayward, CA). Estas dosificaciones fueron aproximadamente 10 a 100 veces menores que la dosis de referencia oral crónica (DRf) para la plata administrada por vía oral en seres humanos. Se utilizaron micropartículas de plata con un diámetro medio de 250 µm.

Cincuenta y tres animales fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los dos grupos de tratamiento y dos grupos de control, solución salina y solo pegamento de fibrina (vehículo). Los animales en los grupos de tratamiento tenían 25 mg/ml (dosis baja) o 250 mg/ml (dosis alta) de micropartículas de plata dispersadas en pegamento de fibrina (0,1 ml aplicados por cm² de la incisión miofascial) aplicado tópicamente a las incisiones miofasciales suturadas antes del cierre de la piel. Los animales en los grupos de control tenían un volumen idéntico de solución salina estéril (0,5 ml) o solo pegamento de fibrina aplicado a sus incisiones miofasciales suturadas antes del cierre de la piel. Para los grupos de tratamiento, el pegamento de fibrina se mezcló con las micropartículas de plata apirógenas (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) en el momento de la administración tópica. En el día 28, todos los animales se eutanasiaron por sobredosis de anestésicos y toracotomía bilateral, toda la pared abdominal ventral se extirpó y la piel se separó del tejido miofascial. El músculo de la pared abdominal se fotografió y se evaluó para la presencia de un defecto herniario y las secciones de tejido que se incluían en la interfase de cicatrización junto con el tejido normal adyacente se fijaron inmediatamente en formalina tamponada neutra al 10 % en preparación para la histología. Se tomaron biopsias de la interfase de incisión del músculo herniado/curación y se congelaron en nitrógeno líquido para el análisis de ARNm de colágeno. Las ratas con una protusión visible en la pared abdominal antes de la eutanasia se clasificaron por tener una hernia clínica. Una vez que se extirpó la pared abdominal, se examinó cuidadosamente para la separación visible entre los músculos rectos. Si está presente, el área total de separación se estimó multiplicando el diámetro craneocaudal máximo x el promedio de dos mediciones de diámetro transversal (p. ej., aproximación de una elipse) y clasificándose como una hernia anatómica.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar si la combinación de otro tipo de micropartículas metálicas (oro) y pegamento de fibrina o micropartículas metálicas de plata y otra matriz proteica natural (Matrigel™) tuvieron el mismo efecto en la prevención de hernias incisionales en ratas usando el mismo modelo experimental descrito anteriormente. En este conjunto de experimentos descritos en la presente memoria, tres dosificaciones de micropartículas de oro se administraron en combinación con pegamento de fibrina estéril (0,25, y 250 mg/ml de micropartículas de oro dispersadas en TISSEEL® con 0,1 ml aplicados por cm² de la incisión miofascial). Estas dosificaciones fueron las mismas que las usadas anteriormente en los experimentos que implican micropartículas metálicas de plata. Se usaron micropartículas de oro con un diámetro medio de 45 µm.

Treinta y dos animales se asignaron aleatoriamente a cada uno de los dos grupos de tratamiento y recibieron o bien 25 mg/ml (dosis baja) o 250 mg/ml (dosis alta) de micropartículas de oro dispersadas en pegamento de fibrina (0,1 ml aplicados por cm² de la incisión miofascial) aplicado por vía tópica a las incisiones miofasciales suturadas antes del cierre de la piel. El pegamento de fibrina se mezcló con micropartículas de oro apirógenas (Sigma Chemicals) en el momento de la administración tópica. En el día 28, todos los animales se eutanasiaron por sobredosis de anestésicos y toracotomía bilateral, toda la pared abdominal ventral se extirpó y la piel se separó del tejido miofascial. Se evaluaron los animales como se ha descrito anteriormente.

Veinticinco animales adicionales fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los tres grupos de tratamiento que recibieron 0,25 mg/ml (dosis baja) o 250 mg/ml (dosis alta) de micropartículas de plata dispersadas en Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA, 0,1 ml aplicados por cm² de la incisión miofascial) aplicadas por vía tópica a las incisiones miofasciales suturadas antes del cierre de la piel. El Matrigel™ se mezcló con las micropartículas de plata en el momento de la administración tópica. En el día 28, todos los animales se eutanasiaron por sobredosis de anestésicos y toracotomía bilateral, toda la pared abdominal ventral se extirpó, la piel se separó del tejido miofascial y los animales se evaluaron como se ha descrito previamente.

Cicatrización normal miofascial

Se realizó un segundo conjunto de experimentos para determinar el efecto de las micropartículas de plata en la cicatrización normal miofascial, como se mide por la fuerza tensil, la histología y la expresión génica de colágeno I de la incisión, usando un modelo modificado de hernia incisional.

Sesenta animales fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los dos grupos de tratamiento y dos grupos de control (solución salina o pegamento de fibrina solo) antes de cerrar el colgajo cutáneo con una sutura continua con vicryl 4-0. Los animales en los grupos de tratamiento tenían o bien una dosis baja o una dosis alta de micropartículas de plata combinada con pegamento de fibrina (incisión miofascial de 1 ml/10 cm² o 0,5 ml/5 cm) aplicado por vía tópica en sus incisiones miofasciales suturadas antes del cierre de la piel, cubriendo una superficie total de 5 cm². Los animales en los grupos de control tenían un volumen idéntico de solución salina estéril (0,5 ml) o pegamento de fibrina aplicado a sus incisiones miofasciales suturadas antes del cierre de la piel. En el día 28, todos los animales se eutanasiaron, la pared abdominal ventral se extirpó y la piel se separó del tejido miofascial. Las suturas fasciales se retiraron y dos tiras fasciales que miden 5 cm x 2 cm (orientación craneocaudal x transversal) se cortaron de cada pared abdominal resecada usando una plantilla de corte para minimizar la variabilidad entre los especímenes resecados. Las tiras fasciales se sometieron a análisis mecánico tensiométrico. El tejido muscular adicional que incluía la interfase de incisión músculo-curación fue tomado para histología junto con biopsias que se congelaron en nitrógeno líquido para el análisis de colágeno.

Histología

Las biopsias recientes de la interfase fascia-fascia de la pared abdominal se fijaron en formalina, se embebieron en parafina, se seccionaron, y se tiñeron con hematoxilina y eosina o tricromo. Un patólogo independiente de los diferentes grupos de tratamiento analizó a ciegas las secciones tisulares.

Expresión de ARNm de colágeno, citoquinas inflamatorias y factor de crecimiento

La expresión de ARNm del colágeno (tipos I y III), las citoquinas inflamatorias (interleucina (IL)-1, IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF- α) y factores de crecimiento específicos para la cicatrización (factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)) se analizaron usando transcriptasa inversa-PCR. El ARN total se extrajo a partir de especímenes fasciales homogeneizados usando un reactivo TRIZOL. Después de la extracción con precipitación con cloroformo e isopropanol, el sedimento de ARN se lavó con etanol al 75 % y luego se volvió a suspender en 40,5 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Se tomó entonces un microlitro de la solución de ARN para la verificación espectrofotométrica de la presencia de ARN usando NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE). Todas las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizaron simultáneamente usando una mezcla maestra para eliminar la variabilidad y asegurar la fidelidad de la eficiencia de RT. El ADNc se sintetizó usando el kit GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) en volúmenes de 20 μ l, que contenía menos de 1 μ g de ARN total, 2, 5 μ M de hexámeros aleatorios, 1U/ μ l de inhibidor de RNasa, 1 mM de cada dNTP, 5 mM de solución de MgCl₂, y 2,5 U/ μ l de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina. Esta reacción se incubó a 42 °C durante 15 minutos, 99 °C durante 5 minutos y 5 °C durante 5 minutos. El colágeno I y III, IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , PDGF, VEGF, FGF, IGF, y cebadores de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se diseñaron usando las secuencias conservadas de las secuencias de ARNm publicadas de GenBank completas y parciales de diversas especies. Los cebadores usados fueron: Col1 directo: CGGTGGTTATGACTTCAGCTTC; Col1 inverso: TCAGGCTCTTGAGGGTAGTGTC; Col3 directo: GGTCTGCAGGTAACAGTGGT; Col3 inverso: CATCACCTTTTGGTCCAGCTAC; IL-1 directo: ACAATGAGTGACACTGCCTTCC; IL-1 inverso: AGCATCCAGCTTCAAATCTCAC; IL-6 directo: AAGCACAATAGTGCCAGTG; IL-6 inverso: TGTACTCAGGCTCACAGAGCAG; TNF- α directo: CAGCAGATGGGCTGTACCTTAT; TNF- α inverso: CCTGTCCCTTGAAGAGAACCT; TGF- β directo: GACATGAACCGACCCTTCTC; TGF- β inverso: TAGTTGGTATCCAGGGCTCTCC; PDGF directo: CAAGACCAGGACGGTCATTTAC; PDGF inverso: GATCAAGAAGTTGGCCGATGT; VEGF directo: ACGTCTACCAGCGCAGCTATT; VEGF inverso: ATCGGGGTACTCCTGGAAGAT; FGF directo: TGTGGTGCACACAAGCGTAGAG; FGF inverso: ATGATGTGCAGAGCATCAACTG; IGF directo: ATTGTGGATGAGTGTGCTTCC; IGF inverso: GTACATCTCCAGCCTCCTCAGA; GAPDH directo: GTTACCAGGGCTGCCTTCTC; GAPDH inverso: GGGTTTCCGTTGATGACC. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un total de 5 μ l con los siguientes componentes: 2,5 μ l de 2X mezcla maestra Power Sybr Green (Applied Biosystems), 1,0 μ l de 0,2 μ M de cebador (directo e inverso), 1,0 μ l de ADN (10 ng para el primer ensayo, dilución 1:10 para el segundo ensayo), y 0,5 μ l de dH₂O. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en 60 ciclos secuenciales de 95 °C durante 10 minutos, 95 °C durante 15 segundos, y 60 °C durante reacciones de 1 minuto sobre un instrumento 7900HT (Applied Biosystems). Los productos de PCR se analizaron digitalmente en tiempo real para determinar la intensidad de fluorescencia mediante el cálculo del valor de Ct para cada curva y se cuantificaron usando el método de cálculo de Delta-Delta Ct.

Análisis tensiométrico

El ensayo mecánico de las tiras fasciales de la pared abdominal se realizó en un periodo de 4 h de necropsia. El análisis de resistencia a la rotura de la interfase fascia-fascia se realizó usando un tensiómetro Instron (modelo MicroTester®; Instron Corporation, Canton, MA) ajustado a una velocidad de cruceta de 10 mm/min. La resistencia a la rotura se definió como la fuerza en Newtons requerida para romper la incisión miofascial curada para cada tira fascial. Las tiras fasciales se montaron en el marco de carga por medio de sujetadores neumáticos, precargados a 0,1 Newtons con la longitud de calibre medida entre las sujeciones. El marco de carga aplicó cargas de ensayo a las

tiras fasciales hasta que se produjo la rotura tisular mecánica. Los datos de la fuerza y deformación del tejido se capturaron simultáneamente a través de un análisis por ordenador y de los datos realizado usando software de Bluehill® (Instron Corporation).

5 Análisis estadístico

Se usó el ensayo t de Student para determinar las diferencias en las mediciones mecánicas tensiométricas. Se usó el ensayo exacto de Fisher para determinar las diferencias en la incidencia de hernias incisionales. Los valores se notificaron como la media $\pm$ desviación estándar. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

10 **RESULTADOS**

Prevención de hernias incisionales

15 El tratamiento con micropartículas de plata redujo significativamente la formación de hernias incisionales en ratas. Las hernias clínicas se desarrollaron después de 28 días en el 100 % de los controles tratados con solución salina y en el 65 % de los controles tratados con pegamento de fibrina en comparación con el 41 % y 11 % de las ratas tratadas con dosis bajas y dosis altas de micropartículas de plata, respectivamente ($p < 0,05$; FIG. 1A). Del mismo modo, las dosis bajas y altas de micropartículas de plata redujeron significativamente el tamaño de hernias anatómicas en ratas después de 28 días en un 57 % y 88 %, respectivamente ($p < 0,05$; FIG. 1B). El pegamento de fibrina solo redujo la incidencia de hernias clínicas en un 35 % y el tamaño de la hernia anatómica en un 16 %. La histología de las incisiones miofasciales tratadas con plata en sección transversal demostró de manera fiable tres zonas concéntricas distintas de tejido. En el centro de la incisión de curación eran micropartículas (indicado por la flecha) dentro de un infiltrado inflamatorio no granulomatoso, adyacente a una zona de colágeno recién sintetizado, junto al músculo (esquelético) recto abdominal (FIG. 2). No hubo diferencia significativa en el colágeno 1 o 3, citoquina o expresión génica del factor de crecimiento en la interfase de incisión músculo-hernia/curación entre los diferentes grupos experimentales en un intervalo temporal de 28 días (datos no mostrados). El tratamiento de las incisiones miofasciales con micropartículas metálicas de plata después del cierre de la sutura aumentó la cicatrización y de este modo disminuyó la velocidad de formación de la hernia incisional.

Cicatrización normal miofascial

Las micropartículas de plata no tuvieron efecto significativo alguno sobre la cicatrización normal miofascial en las ratas después de 28 días. El análisis tensiométrico de las tiras fasciales de la pared abdominal de todos los grupos experimentales no reveló diferencia significativa alguna en la fuerza tensil relativa (solución salina: $16,4 \pm 6,8$ N, solo pegamento de fibrina: $12,7 \pm 5,3$ N, dosis baja: $15,6 \pm 5,3$ N, dosis alta: $13,0 \pm 4,6$ N; $p > 0,4$). Del mismo modo, no hubo diferencia significativa en la histología o expresión génica entre los grupos experimentales (datos no mostrados).

40 **DISCUSIÓN**

La aplicación tópica de micropartículas de plata en pegamento de fibrina en laparotomías en la línea media redujo significativamente el desarrollo de hernias incisionales en una forma dependiente de la dosis. La dosis baja (25 mg/ml) y la dosis alta (250 mg/ml) de plata disminuyeron la incidencia de hernias en aproximadamente un 59 % y 89 %, respectivamente. Además, las dos dosificaciones de micropartículas de plata redujeron el tamaño medio de los defectos herniarios que se desarrollaron en un grado similar. La histología de las laparotomías curativas reveló la formación de tres zonas distintas de tejido dispuestas concéntricamente alrededor de la herida. Localizadas en la zona central se encontraban las micropartículas de plata que parecían embebidas dentro de una reacción a cuerpos extraños no granulomatosos, (infiltrado inflamatorio) que contiene células gigantes multinucleadas. Adyacente a la zona central se encontraba un área de fibrosis temprana compuesta por fibroblastos y fibras de colágeno maduras. La tercera zona y la zona más exterior consistían en un músculo recto abdominal. La histología de las heridas reveló que las micropartículas se concentraron en el medio de la incisión curativa en las que aparecieron para inducir una reacción a cuerpos extraños, incluyendo colágeno y fibrosis temprana, que unen la distancia que separa los bordes mediales de los músculos rectos. El tratamiento con micropartículas de plata disminuyó la formación de hernia incisional. No obstante, el tratamiento con micropartículas de plata no se asoció con un aumento dependiente de la dosis en la actividad génica de colágeno, citoquina o factor de crecimiento en el intervalo temporal de 28 días. Dado que se espera que estos genes sean normalmente quiescentes durante cuatro semanas después de las heridas, el tratamiento con micropartículas de plata no dio lugar a un cambio prolongado en la expresión génica. La aplicación tópica del pegamento de fibrina sin micropartículas de plata en las laparotomías en la línea media redujo el desarrollo de las hernias incisionales clínicas y anatómicas en un 16-35 %. El análisis de histología en este grupo mostró que el pegamento de fibrina solo indujo una reacción a cuerpos extraños, no obstante en un menor grado del que la reacción a cuerpos extraños inducida por las micropartículas de plata. Aunque menos importante que la reacción a cuerpos extraños inducida por las micropartículas de plata, estos datos indicaron una correlación directa mecánica entre la inducción de una reacción a cuerpos extraños y la prevención de las hernias incisionales.

Las micropartículas de plata no tuvieron efecto medido alguno en la histología, expresión génica o fuerza tensil de normalmente la curación de incisiones abdominales. En general, se podría predecir que las micropartículas de plata solo aumentarían la respuesta de curación fibrótica en todas las circunstancias, y que únicamente el tratamiento con plata no sólo reduciría la formación de una hernia incisional, sino que también aumentaría la fuerza de una cicatrización normal. Inesperadamente, como se muestra en los experimentos discutidos anteriormente, las micropartículas de plata mejoraron la cicatrización miofascial en condiciones en un modelo deficiente de cicatrización mientras que no tenga efectos adversos significativos (tales como cicatrización excesiva) en un modelo de cicatrización normal. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, en ciertas realizaciones, el mecanismo por el que la plata mejora la cicatrización miofascial puede asociarse con el desarrollo de una reacción a cuerpos extraños con respecto a las partículas metálicas de plata.

Como se muestra en los experimentos discutidos anteriormente, el tratamiento con solo partículas de plata no tuvo efecto medido alguno como se ha descrito anteriormente. El tratamiento con solo pegamento de fibrina redujo la incidencia de hernias clínicas en un 35 % y el tamaño de la hernia anatómica en un 16 %. No obstante, el pegamento de fibrina con partículas de plata redujo la incidencia de hernias clínicas en un 59 % y 89 % en ratas tratadas con dosis bajas y altas de micropartículas de plata, respectivamente, y redujo el tamaño de hernias anatómicas en un 57 % y 88 % en ratas tratadas con dosis altas y bajas de micropartículas de plata, respectivamente. De este modo, el tratamiento con pegamento de fibrina con micropartículas de plata mostró un efecto que no era más que aditivo en la reducción de la incidencia de hernias clínicas y el tamaño de las hernias anatómicas en comparación con la administración de solo partículas de plata o solo pegamento de fibrina.

Los experimentos discutidos anteriormente que incluían el tratamiento con partículas de oro dispersadas en pegamento de fibrina no mostraron efecto medido en la reducción de la incidencia de la hernia clínica. Además, los experimentos discutidos anteriormente que incluyeron el tratamiento con partículas de plata dispersadas en una matriz proteica natural (Matrigel™) tampoco mostraron efecto medido alguno en la reducción de la incidencia de la hernia clínica. De este modo, el tratamiento con pegamento de fibrina con micropartículas de plata redujo tanto la incidencia de hernias clínicas como el tamaño de las hernias anatómicas en comparación con la administración de partículas de oro en pegamento de fibrina o partículas de plata en una matriz proteica natural (Matrigel™).

EJEMPLO 2

Los experimentos se realizaron usando un modelo de cicatrización de ratón diabético para ensayar la eficacia de las composiciones de la presente divulgación en comparación con un control negativo.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de San Francisco, Universidad de California. Se obtuvieron genéticamente ratones C57BL/KSJ-db/db diabéticos en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y tenían un periodo de vida de entre 8-10 semanas en el momento del ensayo. Los animales se aclimataron a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 2 días antes de someterse a la cirugía y a todos se les proporcionó acceso al agua y alimento equilibrado comercial convencional para ratas *ad libitum*.

Los ratones se colocaron bajo anestesia con isoflurano y el dorso se afeitó con una maquinilla eléctrica. 0,1 ml de 1/30 dilución de 0,3 mg/ml de buprenorfina se inyectaron por vía subcutánea, a continuación, el dorso se preparó con una solución antiséptica de betadine. Un círculo de diámetro de 2,0 cm se trazó en el área preparada. 0,5 ml de bupivacaína (0,25 %) se inyectaron en torno al perímetro del seguimiento para la analgesia local. El área circular marcada se extirpó a continuación, incluyendo la capa de panículo carnoso. Cada animal tenía su herida marcada sobre láminas de plástico transparente individuales para seguimientos semanales, y luego los animales fueron asignados al azar en un grupo de control (n = 19) o un grupo experimental (n = 33). Se aplicaron aproximadamente 0,2 a 0,3 ml de solución salina a las heridas abiertas en los ratones de control, y la Composición A se aplicó por vía tópica a las heridas en los ratones experimentales. La Composición A incluía micropartículas de plata dispersadas en pegamento de fibrina (250 µm de diámetro medio en una concentración de 250 mg/ml en pegamento de fibrina con 0,1 ml aplicados por cm² de la herida abierta). Los ratones se devuelven a jaulas individuales y se les permitió despertar y reanudar la actividad normal. Los ratones fueron examinados a intervalos semanales y la cicatrización fue seguida en las láminas de plástico transparente cada semana hasta la escara se cayó, lo que indica que la herida subyacente había sanado. Después de que las heridas hubieran epitelizado, los ratones se eutanasiaron por sobredosis de anestésicos y toracotomía bilateral, y el tejido curado se extirpó para el análisis histoquímico. Las áreas de seguimiento de la herida se midieron usando un programa de formación de imágenes, Image J.

Se realizó un análisis estadístico del tamaño de la herida (p. ej., área de la herida) en comparación con los valores medios de los grupos de control y experimentales usando una calculadora para el ensayo t de Student (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la FIG. 3.

Tabla 1

Tiempo (semanas)	Tamaño de la herida,% (grupo de control)	Tamaño de la herida,% (grupo experimental)	Desviación estándar (grupo de control)	Desviación estándar (grupo experimental)
0	100,0	100,0	-	-
1	103,0	86,7	17,0	12,0
2	80,6	52,8	19,9	16,2
3	22,7	0,9	14,9	3,4
4	2,1	0,0	5,4	-
5	0,0	0,0	-	-

Los resultados mostrados en la Tabla 1 y en la FIG. 3 indican que los ratones tratados con la Composición A tenían un tiempo de cicatrización promedio que era de aproximadamente 1 semana menos que el de los ratones de control.

5

Lo anterior ilustra meramente los principios de la divulgación. La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un sitio de una incisión abdominal en un sujeto, comprendiendo la composición farmacéutica un primer agente de material precursor que comprende fibrinógeno, un segundo agente de material precursor, que comprende trombina, y partículas de plata.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer agente de material precursor, el segundo agente de material precursor y las partículas de plata están adaptados para combinarse *in situ*.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer agente de material precursor se aplica antes de la aplicación del segundo agente de material precursor.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el segundo agente de material precursor se aplica antes de la aplicación del primer agente de material precursor.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las partículas de plata son micropartículas de plata.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que las partículas de plata son esféricas.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 5 µm o más.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las micropartículas de plata tienen un diámetro medio de 200 µm o más.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende 25 mg/ml de partículas de plata.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende 250 mg/ml de partículas de plata.
11. Un dispositivo para aplicar una composición farmacéutica para tratar una herida en un sujeto, comprendiendo el dispositivo:
 - un recipiente estéril que contiene un primer agente de material precursor que comprende fibrinógeno, un segundo agente de material precursor, que comprende trombina, y partículas de plata en una cantidad eficaz para tratar un sitio de una incisión abdominal.
12. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que el recipiente estéril comprende una primera cámara que contiene el primer agente de material precursor, una segunda cámara que contiene el segundo agente de material precursor y una tercera cámara que contiene las partículas de plata.
13. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que el recipiente estéril comprende una jeringa.
14. Un kit que comprende:
 - un recipiente estéril que contiene un primer agente de material precursor que comprende fibrinógeno, un segundo agente de material precursor, que comprende trombina, y partículas de plata en una cantidad eficaz para tratar un sitio de una incisión abdominal; y
 - un envase sellado configurado para mantener la esterilidad del recipiente estéril.

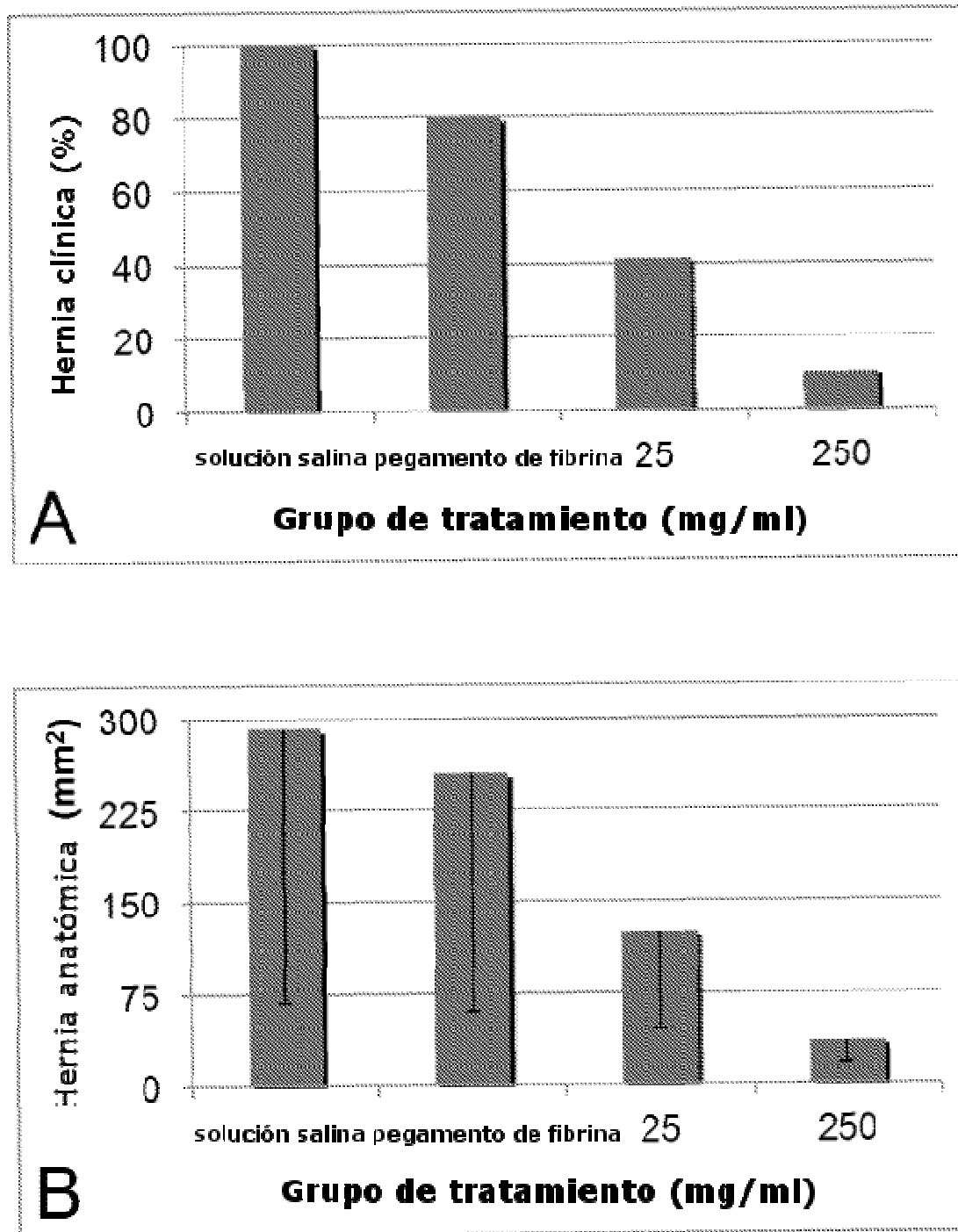


FIG. 1

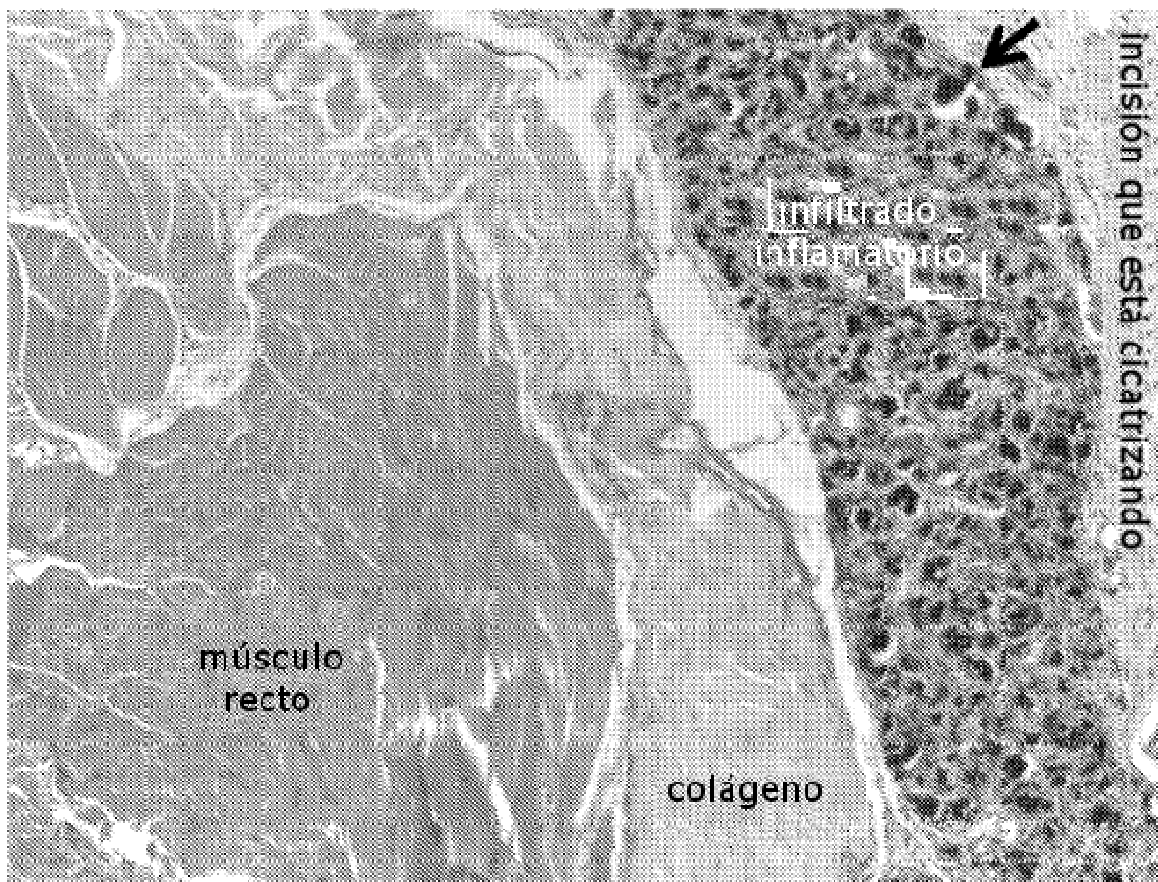


FIG. 2

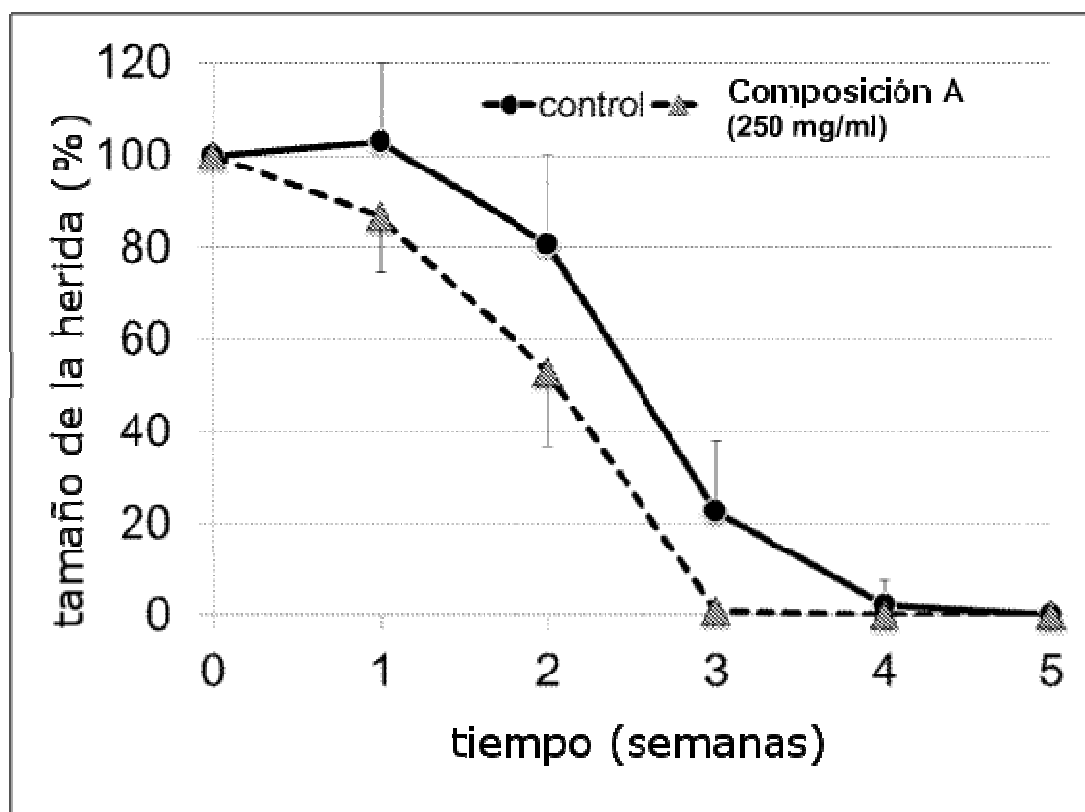


FIG. 3