

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 313**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/US2012/042346**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13003045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12732896 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2726115**

54 Título: **Péptidos, procoagulantes y sus derivados y usos para ellos**

30 Prioridad:

**30.06.2011 US 201113173013**

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

**20.12.2017**

73 Titular/es:

**ETHICON, INC. (100.0%)  
P.O. Box 151, U.S. Route 22  
Somerville, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**WANG, YI-LAN y  
ZHANG, GUANGHUI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 647 313 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).

**Péptidos, procoagulantes y sus derivados y usos para ellos****Descripción**

5 La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado en formato ASCII a través de EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el 28 de junio de 2011, se llama ETH5623.txt y tiene un tamaño de 4,912 bytes.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a los agentes y dispositivos para la promoción de la hemostasis y materiales de sellado de tejidos y, más particularmente, a péptidos sintéticos que tienen fuertes propiedades hemostáticas y las propiedades de sellado de tejidos en combinación con andamios, tales como andamios hemostáticos a base de gelatina.

**Fondo**

15 La sangre es un tejido líquido que incluye glóbulos rojos, glóbulos blancos, glóbulos y plaquetas dispersas en una fase líquida. La fase líquida es plasma, que incluye ácidos, lípidos, electrolitos disueltos y proteínas. Una proteína particular suspendida en la fase líquida es fibrinógeno. Cuando ocurre el sangrado, el fibrinógeno reacciona con agua y trombina (una enzima) para formar fibrina, que es insoluble en la sangre y se polimeriza para formar coágulos.

20 En una amplia variedad de circunstancias, animales, incluidos los seres humanos, pueden sufrir de sangrado debido a heridas o durante los procedimientos quirúrgicos. En algunas circunstancias, el sangrado es relativamente menor, y las funciones normales de coagulación sanguínea, además de la aplicación de primeros auxilios simples, son todo lo que se requiere. En otras circunstancias, puede ocurrir un sangrado considerable. Estas situaciones generalmente requieren equipos y materiales especializados, así como personal capacitado para administrar la ayuda adecuada.

25 En un esfuerzo para abordar los problemas descritos anteriormente, los materiales se han desarrollado para controlar el sangrado excesivo.

30 Los materiales previamente conocidos, tales como gelatina, colágeno, celulosa oxidada, la trombina, el fibrinógeno, y otros materiales se han utilizado, pero cada uno de estos materiales tiene sus limitaciones. Por ejemplo, un tipo de materiales de coagulación sanguínea de la técnica anterior son proteínas o enzimas derivadas de sangre, que incluyen fibrinógeno y/o trombina, que son costosas, necesitan condiciones de almacenamiento especializadas y requieren una purificación extensa para eliminar el potencial de transmisión de sangre. Infecciones transmitidas.

35 Los dispositivos hemostáticos que contienen trombina líquida tienen requisitos especiales de manipulación con el fin de mantener la actividad biológica de la trombina. Por ejemplo, la trombina líquida requiere refrigeración para mantener la estabilidad de la vida útil. La seguridad también es una preocupación cuando se usa trombina derivada de animales o humanos, ya que existen algunos riesgos de contaminación o inmunogenicidad. Además, la trombina y el fibrinógeno purificados a partir de plasma humano o animal son muy caros. Por lo tanto, es ventajoso desarrollar hemostatos novedosos con mayor estabilidad de vida útil, menor riesgo de contaminantes virales, etc. y menor inmunogenicidad, bajo costo, y que pueden funcionar en sangre heparinizada.

40 Proteína humana trombospondina-1 (TSP-1) y péptidos relacionados se describen en la literatura por estar implicados en la angiogénesis y la agregación plaquetaria. TSP-1 es una glicoproteína homotrimérica (MW ~ 450K) y se descubrió primero en las plaquetas como una proteína sensible a trombina.

45 Un artículo "The evolving role of thrombospondin-1(TSP1) in hemostasis and vascular biology" por Bonnefoy et al., Cell. Mol. Life Sci. 65 (2008) 713 - 727, describe TSP1 como implicados en la angiogénesis, inflamación, cicatrización de heridas y hemostasis y referencias adicionales a la estructura y dominios de la TSP1, así como la unión del péptido de aminoácido (SEQ ID NO: 1) de CD47.

50 Un artículo "agregación plaquetaria inducida por el péptido C-terminal de la trombospondina-1 requiere la proteína de acoplamiento LAT pero es en gran medida independiente de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3", por Trumel et al, Journal of Trombosis and Haemostasis, 2003 Feb;. 1 (2): 320-9, enseña que la trombospondina-1 (TSP1) se secreta abundantemente durante la activación plaquetaria y juega un papel en la agregación plaquetaria irreversible. Un péptido derivado del dominio C-terminal de TSP1, SEQ ID NO: 1 puede activar plaquetas humanas al menos en parte a través de su unión a proteína asociada a integrina.

55 Un artículo "Thrombospondin Acts via Integrin-associated Proteína to Activate the Platelet Integrin (IIb $\beta$ 3", por Chung et al, J Biol Chem., 1997; 272 No. 23, Edición del 6 de junio, páginas 14740-14746, enseña que un péptido

del CBD, SEQ ID NO: 2 (4N1K) se ha identificado como un agonista de IAP. TS1, el CBD, y un péptido agonista de IAP (4N1K) de la CBD de TS1 activan la plaqueta integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, resultando en difusión de plaquetas sobre el fibrinógeno inmovilizado, la estimulación de la agregación plaquetaria, y el aumento de la fosforilación de tirosina de la quinasa de adhesión focal.

Un artículo "Thrombospondin promotes platelet aggregation" por Tuszynski et al, Blood, 72, 109-115 (1988), enseña que mientras que el papel de TSP en la hemostasis no se entiende bien, se ha postulado que la TSP reticula plaquetas agregadas de fibrinógeno, estabiliza la formación de coágulos de fibrina y modula la fibrinólisis y que un estudio ha sugerido que TSP puede desempeñar un papel regulador en la hemostasia al inhibir la adhesión plaquetaria y proporcionar una superficie no trombogénica.

Un artículo "Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-mediated platelet activation", por Chung et al., Blood. 1999 Jul 15; 94 (2): 642-8 describe péptido agonista de CD47, 4N1K (SEQ ID NO: 2), derivado del CBD, sinergiza con el colágeno soluble en la agregación de plasma rico en plaquetas. El 4N1K y el TS1 intacto también inducen la agregación de plaquetas lavadas y sin agitación sobre el colágeno inmovilizado con un aumento rápido en la fosforilación de la tirosina.

Un artículo "Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor", por Dorahy et al, J. Biol Chem., 1997; 272: 1323-1330, enseña que un péptido del término carboxilo de la trombospondina, SEQ ID N°: 1, directa e específicamente induce la activación y agregación de plaquetas humanas lavadas de diferentes donantes a concentraciones de 5-25 mM. A concentraciones más bajas, el péptido se sinergiza con concentraciones subóptimas de ADP para inducir la agregación. La cromatografía de afinidad de péptidos y la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal se usaron para identificar el receptor para el péptido carboxilo terminal como la proteína asociada a integrina. La proteína asociada a integrina permaneció unida a la columna de péptido que contiene la SEQ ID N°: 1 cuando se lavó con un péptido codificado en presencia de 5 mM de EDTA, indicando una asociación divalente independiente de catión. Se sugiere que la proteína asociada a la integrina es el receptor primario de la trombospondina en la superficie de las plaquetas en reposo y está implicada en la potenciación de la respuesta de agregación plaquetaria.

Un artículo "proteína integrina asociada trombospondina unida (CD47) física y funcionalmente modifica  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrina por su dominio extracelular", por Fujimoto et al, J Biol Chem., 2003; 278: 26655-26665, enseña que un péptido del dominio de unión celular C-terminal, SEQ ID NO: 2 (4N1K) se une a IAP y estimula las funciones celulares dependientes de integrina, incluida la agregación plaquetaria. La agregación plaquetaria inducida por 4N1K no se inhibió completamente por la depleción de energía con azida sódica y 2-desoxi-D-glucosa, aunque la respuesta plaquetaria inducida por ADP o colágeno se inhibió por completo.

Un artículo "péptido C-terminal de la trombospondina-1 induce la agregación plaquetaria a través de la vía de señalización asociada a cadena receptora Fc y por aglutinación" por Tulasne et al, Blood 2001.; 98: 3346-3352, enseña que un péptido del dominio C-terminal de trombospondina-1 (Arg-Phe-Tyr-Val-Val-Met-Trp-Lys (SEQ ID NO: 1); conocido como 4N1-1) se ha informado que induce la agregación plaquetaria y se une a la proteína asociada a la integrina (IAP), que también se conoce como CD47. Se descubrió que 4N1-1 o su péptido derivado, 4N1K, induce la fosforilación rápida de la cadena del receptor Fc (FcR)  $\gamma$ , Syk, SLP-76 y fosfolipasa C  $\gamma$ 2 en plaquetas humanas. La referencia enseña que el péptido C-terminal de trombospondina induce la agregación plaquetaria a través de la ruta de señalización de la cadena  $\gamma$  de FcR y a través de la aglutinación.

Un artículo "El péptido C-terminal de la trombospondina-1 estimula vías de señalización distintas pero induce una aglutinación independiente de las plaquetas y otras células," por Voit et al, FEBS Letters., 2003; 544: 240-245 enseña que se ha propuesto un péptido del dominio C-terminal de la trombospondina-1 (4N1-1) para estimular la agregación plaquetaria mediante un nuevo mecanismo que implica tanto una aglutinación independiente de la activación como una dependiente de la activación, la agregación mediada por glicoproteína (GP) IIb/IIIa que implica la señalización de GPVI pero no implica CD47. El estudio demuestra que 4N1-1 estimuló un patrón diferente de vías de transducción de señales que el agonista de GPVI convulxina. Además, la agregación de plaquetas inducida por 4N1-1 era independiente de la activación y no dependía de GPVI o GPIIb/IIIa. 4N1-1 también estimuló la aglutinación independiente de la activación de diferentes células megacariocíticas y no megacariocíticas. La aglutinación celular inducida por 4N1-1 pero no la señalización de plaquetas fue inhibida por anticuerpos anti-CD47.

Un artículo "Un modelo de la agregación plaquetaria implica múltiples interacciones de trombospondina-1, fibrinógeno, y el receptor de GPIIb/IIIa" por Bonnefoy et al, J Biol Chem., 2001; 276: 5605-5612, enseña que trombospondina-1 (TSP) puede, después de la secreción de gránulos  $\alpha$  de plaquetas, participar en la agregación de plaquetas, pero su modo de acción es poco conocido. El estudio evaluó la capacidad de TSP para formar puentes cruzados de inter-plaquetas a través de su interacción con el fibrinógeno (Fg), usando perlas recubiertas con Fg o unidas por Fg a la integrina GPIIb/IIIa activada (GPIIb/IIIa \*) inmovilizada en perlas o en plaquetas fijadas activadas (AFP), es decir, en un sistema sin mecanismos de señalización y secreción de plaquetas.

La patente de EE.UU. N° 5,399,667 "Thrombospondin receptor binding peptides" de Frazier et al., enseña nuevos péptidos cortos que se unen al receptor de trombospondina 1, que tiene preferiblemente cinco residuos de aminoácidos que comparten el tetrapéptido Arg-Val-Ala-Val (SEQ ID NO: 20) y tienen las secuencias específicas. La patente enseña además un péptido que contiene VVM que se une al receptor de trombospondina 1 seleccionado del grupo que consiste en RFYVVMWKQVTQS (SEQ ID NO: 8) (SEQ ID N°1 en '667) y fragmentos de los mismos que contienen al menos la secuencia SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4 y fragmentos de los mismos que contienen al menos la secuencia SEQ ID NO: 5.

La patente de EE.UU. n° 5.190.920 "Method for using synthetic analogs of thrombospondin for inhibiting metastasis activity" a Jacob et al. se refiere en general a fragmentos de péptidos y análogos sintéticos de trombospondina (TSP) que retienen la actividad de tipo trombospondina. Se proporcionan compuestos y composiciones que comprenden fragmentos y métodos para usar análogos sintéticos de trombospondina para promover o inhibir la actividad de tipo trombospondina.

La publicación PCT WO 1996/040033 a Thaddeus et al. describe un parche hemostático compuesto por una matriz biodegradable, ácidos aminocaproicos de épsilon (EACA) y péptidos activadores del receptor de trombina (TRAP). La invención describe muchas realizaciones representativas que contienen gelatina, alginatos, celulosa regenerada oxidada o colágeno como matriz, y EACA, TRAP, calcio, péptido RGD y calcio como componentes activos. Las secuencias descritas incluyen SFLLRNPNDKYEPF (SEQ ID NO: 9), SFLLRNPNDKYEP (SEQ ID NO: 10), SFLLRNPNDKYE (SEQ ID NO: 11), SFLLRNPNDKY (SEQ ID NO: 12), SFLLRNPNDK (SEQ ID NO: 13), SFLLRNPND (SEQ ID NO: 14), SFLLRNPN (SEQ ID NO: 15), SFLLRNP (SEQ ID NO: 16), SFLLRN (SEQ ID NO: 17), SFLLR (SEQ ID NO: 18), SFLL (SEQ ID NO: 19), SFL y sus derivados.

La patente de EE.UU. n° 7.285.580, "Methods of using primer molecules for enhancing the mechanical performance of tissue adhesives and sealants" a Stedronsky enseña que, además de las proteínas naturales diferentes proteínas producidas recombinantemente también pueden encontrar uso en adhesivos de tejidos y selladores. No solo las proteínas naturales descritas anteriormente pueden producirse de forma recombinante, sino que también se usarán varias proteínas recombinantes no naturales reticulables. Las proteínas producidas recombinantemente no naturales incluyen proteínas que comprenden unidades repetitivas de bloques de secuencias de aminoácidos de origen natural a partir de proteínas estructurales naturales tales como fibroína, elastina, colágeno, queratina y similares. Las proteínas de unidades repetitivas preferidas para su uso incluyen SELP8K, SELP0K-CS1 y SELP0K.

La publicación PCT WO 2009/040034 "USE OF A PEPTIDE AS A THERAPEUTIC AGENT" para Bevec et al. se dirige al uso del compuesto peptídico Arg-Phe-Tyr-Val-Val-Met-Trp-Lys-OH (SEQ ID NO: 1) como agente terapéutico para la profilaxis y/o el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades fibróticas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades infecciosas, enfermedades pulmonares, enfermedades cardíacas y vasculares y enfermedades metabólicas y además se refiere a composiciones farmacéuticas preferiblemente en forma de una solución de tampón liofilizada o líquida o formulación de leche materna artificial o sustituto de leche materna que contiene el péptido Arg-Phe-Tyr-Val-Val-Met-Trp-Lys-OH (SEQ ID NO: 1) opcionalmente junto con al menos un vehículo, crioprotector, lioprotector, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

WO 2007/044026 se refiere a métodos de modificación de colágeno que implican la puesta en contacto colágeno con un péptido mimético de colágeno, en las condiciones que proporcionan una interacción física entre el colágeno y el péptido mimético de colágeno. En una realización, el péptido mimético de colágeno contiene una unidad de repetición Z-[XY-Gly], donde Z es cualquier aminoácido, X es prolina o prolina modificada, Y es prolina o prolina modificada, y n es un número entero entre 1 y 20, inclusive. En particular, el péptido mimético de colágeno puede contener las secuencias de aminoácidos Gly<sub>n</sub>-(ProHypGly)<sub>n</sub>'(ProHypGly)<sub>n</sub>-Tyr<sub>n</sub>, o Cys<sub>n</sub>-(Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub>' en la que n es un número entero entre 1 y 5, y n' es cualquier número entero entre 1 y 15, en donde el péptido comprende además un modificador seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico, una molécula de adhesión celular, un agente de contraste, una etiqueta detectable, un factor de crecimiento, un anti-inflamatorio, un componente de la matriz extracelular, un polímero, PEG y una molécula pequeña.

#### Resumen de la invención

La presente invención se dirige a un material de sellado hemostático o de tejido que tiene (a) un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de análogo de aminoácido de los mismos, y (b) un andamio hemostático para dicho ácido péptido o secuencia de amino análoga, en la que dicho armazón hemostático es gelatina reticulada en forma de partículas con un vehículo líquido. El andamio es hemostático.

La gelatina se reticula y en forma de partículas con un vehículo líquido. El vehículo líquido puede ser una solución salina normal, en donde la gelatina y el (los) péptido(s) se mezcla(n) de manera sustancialmente homogénea en combinación con la solución salina normal como una fase líquida. La concentración del péptido en dicho material hemostático (polvo, esponja, pasta o gel) es de aproximadamente 0,0025 mM a aproximadamente 1,25 mM. Se pueden incorporar uno o más aditivos o compuestos en la mezcla hemostática que se selecciona del

grupo que consiste en agentes antimicrobianos, tensioactivos, antioxidantes, humectantes, agentes humectantes, lubricantes, espesantes, diluyentes y estabilizadores de irradiación. Además, se puede añadir una cantidad de glicerol potenciador de la extrusión.

5 En una realización, el péptido se conjuga con un polímero biocompatible. El polímero biocompatible puede ser un polímero hidrófilo, como polietilenglicol, un derivado del polietilenglicol, polipropilenglicol, polisacárido, polisacárido modificado, proteína, proteína modificada, péptido, polilactida glicolida, caprolactona, carbonato de trimetileno, almidón, almidón modificado, gelatina, colágeno o combinaciones de los mismos.

10 En una realización alternativa, el polímero hidrófilo es un polietilenglicol que tiene un peso molecular que ha sido seleccionado para proporcionar una hemostasia rápida o para un sellado de tejidos rápido. La molécula de polietilenglicol puede ser una molécula lineal, una molécula ramificada, una molécula en forma de estrella o combinaciones de los mismos. El peso molecular puede ser en promedio de aproximadamente 1000 Daltons a aproximadamente 8000 Daltons, preferiblemente dicho peso molecular es en promedio 2000 o 5000 Daltons.

15 En una realización alternativa, el material de sellado hemostático o tejido contiene una secuencia de análogo de aminoácido que se obtiene de la secuencia de SEQ ID NO: 1 en que al menos uno de los aminoácidos está sustituido con aminoácidos analógicos correspondientes. La secuencia análoga de aminoácido puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y combinaciones de los mismos.

20 La presente invención también se refiere a un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de análogo de aminoácido del mismo para uso en un método para proporcionar un tratamiento hemostático o sellar tejido a un sitio de la herida, que comprende las etapas de: (a) formar el material de sellado hemostático o tisular como se describió anteriormente, y (b) aplicar el material de sellado hemostático o tisular al sitio de la herida.

25 La presente invención también se refiere a un método de fabricación de un material de sellado hemostático o de tejido que comprende las etapas de: (a) proporcionar un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de análogo de aminoácido de los mismos, dicho péptido opcionalmente conjugado a un polietilenglicol; (b) proporcionar un armazón absorbible, en el que dicho armazón absorbible es gelatina reticulada en forma de partículas; y (c) mezclar dicho péptido y dicho armazón absorbible de forma sustancialmente homogénea formando el material de sellado hemostático o tisular.

30 En una realización, el material y los métodos hemostático de material o tejido de sellado descritos anteriormente son para su uso en un paciente que tiene sangre heparinizada o de otra manera que contiene anti-coagulación o agentes anti-coagulantes.

#### Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 muestra datos sobre el tiempo de hemostasia para varios sistemas probados.  
 La Figura 2 muestra datos sobre el tiempo de hemostasia para varios sistemas probados.  
 La Figura 3 muestra datos sobre el tiempo de hemostasia para varios sistemas probados.  
 La Figura 4 muestra datos sobre el tiempo de hemostasia para varios sistemas probados.  
 45 La Figura 5 muestra datos sobre el tiempo de hemostasia para varios sistemas probados.  
 La Figura 6 muestra datos sobre el tiempo de hemostasia para varios sistemas probados.  
 La Figura 7 muestra datos sobre el tiempo hasta la hemostasia para varios sistemas probados en sangre heparinizada.  
 La Figura 8 muestra datos sobre el tiempo hasta la hemostasia para dos sistemas probados en un modelo  
 50 inactivado de plaquetas.

#### Descripción detallada de la invención

**Amino ácidos y péptidos se abrevian habitualmente como se muestra a continuación:**

Nombre trivial	Símbolos	Nombre sistemático	Fórmula
Alanine	Ala A	Ácido 2-aminopropanoico	CH <sub>3</sub> CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Arginina	Arg R	Ácido 2-amino-5-guanidinopentanoico	H <sub>2</sub> NC(=NH)-NH-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Asparagina	Asn N	Ácido 2-amino-3-carbamoilpropanoico	H <sub>2</sub> N-CO-CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Ácido aspártico	Asp D	Ácido 2-Aminobutanodioico	HOOC-CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Cisteína	Cys C	Ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico	HS-CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Glutamina	Gln Q	Ácido 2-Amino-4-carbamoilbutanoico	H <sub>2</sub> N-CO-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Ácido glutámico	Glu E	Ácido 2-aminopentanodioico	HOOC-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Glicina	Gly G	Ácido aminoetanoico	CH <sub>2</sub> (NH <sub>2</sub> )-COOH
Histidina	His H	Ácido 2-Amino-3-(1H-imidazol-4-ilo)propanoico	
Isoleucina	Ile I	Ácido 2-Amino-3-metilpentanoico	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Leucina	Leu L	Ácido 2-Amino-4-metilpentanoico	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Lisina	Lys K	Ácido 2,6-Diaminohexanoico	H <sub>2</sub> N-[CH <sub>2</sub> ] <sub>4</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Metionina	Met M	Ácido 2-Amino-4-(metiltio)butanoico	CH <sub>3</sub> -S-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Fenilalanina	Phe F	Ácido 2-Amino-3-fenilpropanoico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Prolina	Pro P	Ácido pirrolidina-2-carboxílico	
Serina	Ser S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanoico	HO-CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Treonina	Thr T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-butanoico	CH <sub>3</sub> -CH(OH)-CH(NH <sub>2</sub> )-COOH
Triptofan	Trp W	Ácido 2-Amino-3-(1H-indol-3-ilo)propanoico	
Tirosina	Tyr Y	Ácido 2-Amino-3-(4-hidroxifenilo)propanoico	
Valina	Val V	Ácido 2-Amino-3-metilbutanoico	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH(NH <sub>2</sub> )-COOH

De acuerdo con una realización de la presente invención, un péptido de 8 aminoácidos que tiene una secuencia de RFYVVMWK (Arg-Phe-Tyr-Val-Val-Met-Trp-Lys (SEQ ID NO: 1)), también denominado aquí RK-8, (opcionalmente conjugado con PEG o pegilado) que puede derivarse de la proteína humana TSP-1, se encontró que tiene propiedades hemostáticas fuertes y/o propiedades de sellado tisular cuando se usa en combinación con un armazón hemostático en el que dicho armazón hemostático es gelatina reticulada en forma de partículas con un vehículo líquido. En una realización, el polímero absorbible natural es SURGI-FLO™ disponible en Ethicon, Inc, que es una gelatina reticulada en forma de partículas que se combina con un vehículo líquido y un componente de gas en un dispositivo de suministro, tal como una jeringa.

En una realización, una secuencia de análogo de aminoácido se utiliza por lo cual al menos un aminoácido en la secuencia SEQ ID NO: 1 ha sido sustituido con amino-ácidos análogos o bio-similares. A continuación, se proporciona una tabla de aminoácidos análogos o bio-similares:

Nombre trivial	Símbolos	Aminoácidos Análogos o BioSimilares
Arginina	Arg R	His (H), Lys (K)
Lisina	Lys K	Arg (R), His (H)
Metionina	Met M	Ala (A), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Trp (W), Tyr (Y), Val (V), Cys (C), Ser (S)
Triptófano	Trp W	(H) (A), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Met (M), Tyr (Y), Val (V), His (H)
Tirosina	Tyr Y	Ala (A), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Met (M), Trp (W), Val (V), His (H)
Valina	Val V	Ala (A), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Met (M), Trp (W), Val (V)
Fenilalanina	Phe F	Trp (W), Tyr (Y), His (H), Ile (I), Leu (L)

Los aminoácidos pueden estar en forma L, D, o sus derivados [por ejemplo, pseudoaminoácido, aminoácido funcionalizado (por ejemplo, aminoácido fluorado... etc.), aminoácido beta, aminoácido gamma... etc.]. Los ejemplos de los péptidos análogos particularmente preferidos para la secuencia peptídica SEQ ID NO: 1 son:

KRFYVVMWKK

(Lys-Arg-Phe-Tyr-Val-Val-Met-Trp-Lys-Lys (SEQ ID N°: 2))  
 RFYVVM (Arg-Phe-Tyr-Val-Val-Met (SEQ ID N°: 3))  
 FIRVVMYEGKK  
 (Phe-Ile-Arg-Val-Val-Met-Tyr-Glu-Gly-Lys-Lys (SEQ ID NO: 4))  
 IRVVM (Ile-Arg-Val-Val-Met (SEQ ID NO: 5))

De acuerdo con una realización de la presente invención, el péptido está opcionalmente conjugado con un polímero biocompatible, más preferiblemente a un polímero hidrófilo. El polímero hidrófilo puede ser polietilenglicol, derivados del polietilenglicol, polipropilenglicol, polisacárido, polisacárido modificado, proteína, proteína modificada, polipéptido, polilactida glicolida, caprolactona o carbonato de trimetileno, y/o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con una realización de la presente invención, los péptidos aminoácidos que contienen la secuencia SEQ ID NO: 1 para la hemostasia que se combinan con un andamio hemostático, en el que el andamio hemostático es gelatina reticulada en forma de partículas con un vehículo líquido, prever la ventajas siguientes: Los péptidos con pesos moleculares bajos, tales como la SEQ ID NO: 1, son más estables que los agentes hemostáticos proteicos grandes, tales como la trombina y pueden almacenarse sin refrigeración. La fabricación a gran escala de los péptidos puede realizarse mediante tecnología de ADN recombinante o síntesis química de péptidos, siendo ambos métodos más rentables que la purificación de biología (por ejemplo, trombina). El amino péptido SEQ ID NO: 1 y los péptidos análogos que están conjugados con PEG tienen ventajosamente una solubilidad mejorada del péptido. Además, se descubrió que los péptidos pegilados son más eficaces a concentraciones más bajas para la hemostasia y funcionan bien en sangre heparinizada.

La presente invención se refiere además a un método para proporcionar un tratamiento hemostático a un sitio de hemorragia, formado por etapas de formar una preparación hemostática descrita anteriormente, y aplicar la preparación hemostática al sitio de sangrado.

La presente invención se refiere además a un método de fabricación de una preparación hemostática semi-líquida que comprende las etapas de mezclar la matriz hemostática con el agente de hemostasis promotora que contiene la SEQ ID NO: aminoácido péptido 1 y/o una secuencia de análogo de aminoácido, y aplicar el material resultante a un sitio de la herida.

Descripción de los portadores de gelatina. La gelatina, que es una forma desnaturalizada del colágeno proteico, se ha usado en una variedad de apósitos para heridas. Dado que los geles de gelatina tienen un punto de fusión relativamente bajo, no son muy estables a la temperatura corporal. Por lo tanto, es imperativo estabilizar estos geles mediante el establecimiento de enlaces cruzados entre las cadenas de proteínas. En la práctica, esto generalmente se obtiene tratando la gelatina con glutaraldehído o formaldehído o calor. Por lo tanto, la gelatina reticulada se puede fabricar en esponjas secas que se trituran en forma de partículas.

El término "gel" se utiliza aquí para denotar una red de polímero hinchado, hidratado, que es esencialmente continuo en todo su volumen. Un gel de proteína se compone de una red esencialmente continua de moléculas de proteínas unidas y un solvente líquido (típicamente acuoso), que llena el espacio dentro de la matriz proteica. La matriz proteica ejerce un fuerte arrastre viscoso sobre las moléculas de disolvente, lo que evita que fluyan libremente. Las moléculas componentes que componen la red de gel pueden estar unidas por enlaces iónicos, hidrófobos, metálicos o covalentes. El enlace covalente es el más estable térmicamente de estos enlaces.

En una realización, las composiciones esterilizadas de la presente invención pueden contener partículas sólidas, porosas o no porosas de un polímero biocompatible adecuado para su uso en hemostasia, un líquido biocompatible y el extracto hemostático como se describe anteriormente como sus tres componentes primarios. Las partículas, el líquido y el extracto hemostático se combinan y se mezclan en condiciones eficaces para proporcionar una composición hemostática sustancialmente homogénea que comprende una fase líquida continua que comprende el extracto hemostático y que tiene las partículas sólidas de polímero dispersadas de manera homogénea a su través. La cantidad y el diámetro promedio de las partículas contenidas en la composición y las cantidades relativas del extracto sólido, líquido y hemostático es eficaz para proporcionar a la composición propiedades hemostáticas y físicas, como se describe a continuación en la presente.

Como se usa en el presente documento, "continuo" y "discontinuo" se usan en el sentido corriente de esas palabras en el contexto de la nomenclatura estándar usada para definir y describir dispersiones.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente homogéneo" denota que el estado físico de las composiciones o pastas donde las partículas sólidas se dispersan uniformemente en toda la fase líquida continua tal que la relación de sólido: líquido y la densidad de cualquier porción o sección transversal de la composición o pasta son sustancialmente iguales.

Como se usa en este documento, "estéril" significa sustancialmente libre de gérmenes que viven y/o microorganismos y reconocido adicionalmente y descrito por las normas gubernamentales relativas a composiciones y dispositivos médicos descritos y reivindicados en el presente documento.

Como se usa en este documento, "hemostático", o "propiedades hemostáticas", significa la capacidad de detener o minimizar el sangrado, como un experto en el arte de la hemostasis entendería esos términos, como se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos de la especificación.

5 El polímero biocompatible utilizado para preparar las partículas es una gelatina reticulada. Un polvo de gelatina preferido es un polvo de gelatina parcialmente reticulado preparado moliendo esponja de gelatina en partículas que tienen un diámetro promedio de aproximadamente 40 micrómetros a aproximadamente 1200 micrómetros, más preferiblemente de aproximadamente 100 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros, como se determina mediante difracción láser.

10 Las composiciones estériles de la presente invención comprenden preferiblemente una fase líquida continua en la que se dispersan el extracto hemostático y partículas a base de gelatina sólidas. Dependiendo del dispositivo médico particular y su uso, el líquido puede ser acuoso o no acuoso. Preferiblemente, la fase líquida es acuosa. Los líquidos acuosos pueden incluir, sin limitación, soluciones acuosas biocompatibles, tales como cloruro de calcio y solución salina. Más preferiblemente, la fase líquida comprende solución salina. La fase líquida y la fase en partículas sólidas están presentes en cantidades relativas efectivas para proporcionar una composición, por ejemplo, una pasta o suspensión, adecuada para uso en la provisión de hemostasia. En ciertas realizaciones, la relación en peso de partículas sólidas a líquido generalmente es de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1:12, o de aproximadamente 1: 3 a aproximadamente 1: 8 o incluso aproximadamente 1: 5.

20 Las composiciones hemostáticas pueden comprender además cantidades eficaces de uno o más aditivos o compuestos, incluyendo, pero no limitado a, agentes antimicrobianos, agentes tensioactivos, antioxidantes, humectantes, agentes humectantes, lubricantes, espesantes, diluyentes, estabilizadores de irradiación, por ejemplo, eliminadores de radicales, plastificantes y estabilizadores. Por ejemplo, se puede añadir glicerol para mejorar la capacidad de extrusión o la capacidad de inyección de la composición. Cuando se utiliza el glicerol puede estar presente en las composiciones de aproximadamente 0% a aproximadamente 20% en peso, basado en el peso de la fase líquida. Preferiblemente, la composición puede comprender de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en peso de glicerol, en base al peso de la fase líquida. Más preferiblemente, las composiciones pueden comprender de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso de glicerol, en base al peso de la fase líquida.

30 En adición, aminas cuaternarias se pueden utilizar para proporcionar propiedades mejoradas a las composiciones. Por ejemplo, se pueden usar cloruro de benzalconio, polibreno u onámero M a niveles de hasta aproximadamente 1 por ciento en peso, basado en el peso de la fase líquida. Preferiblemente, el cloruro de benzalconio se usa en niveles de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,01% en peso, basado en el peso de la fase líquida. Más preferiblemente, las composiciones pueden comprender de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,006% en peso de cloruro de benzalconio, en base al peso de la fase líquida. Se cree que las aminas cuaternarias pueden cumplir múltiples funciones, actuando como un agente antimicrobiano, un agente espumante, un eliminador de radicales y como neutralizador de heparina.

40 La preparación hemostática puede contener además cantidades eficaces de uno o más aditivos o compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes antimicrobianos, agentes tensioactivos, antioxidantes, humectantes, agentes humectantes, lubricantes, espesantes, diluyentes, estabilizadores de irradiación, por ejemplo, eliminadores de radicales, plastificantes y estabilizantes, más particularmente incluyendo una cantidad de glicerol potenciadora de la extrusión, y preferiblemente donde el glicerol está presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 20% en peso, basado en el peso de la fase líquida de la preparación hemostática general.

50 Tales composiciones hemostáticas pueden comprender además neutralizadores de heparina, procoagulantes adicionales o agentes hemostáticos, tales como el fibrinógeno, fibrina, Factor Xa, o Factor VIIa. Por "cantidad efectiva", se entiende la cantidad necesaria para proporcionar las composiciones de esas propiedades para las que se está añadiendo el aditivo. La cantidad eficaz también es limitada por la cantidad máxima que puede añadirse sin causar efectos biológicos perjudiciales.

60 Los métodos para la incorporación de péptidos sobre soportes de gelatina. En una realización para la fabricación de composiciones de la invención, una pasta sustancialmente homogénea se prepara mezclando las partículas con el líquido para formar una pasta uniforme. El líquido incluye el material hemostático péptido y puede incluir cantidades eficaces de otros aditivos disueltos en la misma como se describió anteriormente. La mezcla puede llevarse a cabo mediante extrusión o mediante la mezcla en un espacio cerrado en condiciones eficaces para proporcionar una dispersión uniforme de las partículas sólidas en la fase líquida. Alternativamente, un mezclador, por ejemplo un mezclador planetario doble, se puede utilizar en la fabricación de composiciones de la presente invención. Se añade el líquido que contiene el material peptídico hemostático a la mezcladora. El líquido puede incluir cantidades efectivas de aditivos disueltos en él antes de la adición de las partículas a la solución. Por ejemplo, una solución salina que contiene material peptídico, glicerol y cloruro de benzalconio hemostático se puede preparar y después se añadió a la mezcladora. Las partículas sólidas se añaden a la mezcladora en el tiempo con mezcla continua hasta que se han añadido todos los ingredientes. La mezcla se continúa hasta que se forma una composición sustancialmente homogénea que contiene las partículas sólidas dispersadas uniformemente en toda la fase líquida continua.

Las composiciones hemostáticas preparadas como anteriormente se pueden esterilizar proporcionar composiciones estériles que comprenden el péptido hemostático. En algunas realizaciones, las composiciones se transfieren a un dispositivo médico como se describió anteriormente y el dispositivo que contiene la composición hemostática se esteriliza, preferiblemente por la radiación ionizante. Más preferiblemente, la esterilización es por irradiación gamma como se ejemplifica en el presente documento.

Las composiciones de la presente invención incluyen composiciones descritas en la presente memoria que son estériles, en los que han sido irradiados con un nivel de, por ejemplo, irradiación ionizante. Dicha irradiación puede incluir haz de electrones o irradiación gamma. El nivel de irradiación y las condiciones de esterilización, incluyendo el tiempo que las composiciones se irradian, son los que proporcionan composiciones estériles, como se define aquí. Una vez que tengan el beneficio de esta descripción, un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente el nivel de irradiación necesario para proporcionar composiciones estériles.

Los dispositivos médicos en los que pueden utilizarse las composiciones hemostáticas de la presente invención incluyen cualquier dispositivo que actualmente se utiliza para aplicar una pasta hemostática fluida o inyectable o suspensión a un sitio, o herida, requiere hemostasia. Una esponja puede ser aplicada por la mano o por otros medios de manera convencional. La hemostasis que requiere sitio puede ser el resultado de una lesión o un procedimiento quirúrgico. Los ejemplos de dispositivos o aplicadores incluyen jeringas tales como Becton Dickinson o jeringas luer Monoject. Otros dispositivos se describen en detalle en la patente de los Estados Unidos N° 6.045.570, los contenidos de la cual se incorporan por referencia en su totalidad.

Los péptidos sintéticos de secuencias variables se sintetizaron con la tesis mediada por síntesis de péptido soportado por sólido mediado por Fmoc. Péptidos conjugados con PEG, PEG2000-RK-8 o PEG5000-RK-8, designado como P2K-RK-8 o P5K-RK-8, respectivamente, se sintetizaron mediante la conjugación de metoxipolietilenglicol-N-hidroxisuccinimida (mPEG-NHS) en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 purificado a través de la síntesis en solución. Los péptidos se purificaron por C18 RP-HPLC para dar >95% de pureza. Sus identidades se analizaron mediante MALDI-TOF MS o ESI-MS.

Las mezclas con Surgiflo™, que es una matriz hemostática a base de gelatina se prepararon del siguiente modo. Los artículos de ensayo incluyen mezclas de Surgiflo™ basadas en gelatina con 2 ml de solución salina normal o 2 ml de solución salina normal que contienen componente activo o como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 1 pegilado, o su análogo; o solución de 2 mL de EVITHROM™ que contiene trombina principalmente humana (composición completa de Evithrom® contiene trombina humana (800-1200 UI/mL), cloruro de calcio, albúmina humana, manitol, acetato de sodio, y agua para inyección).

Para la preparación del artículo de prueba, Surgiflo™ se mezcló a fondo con el material hemostático por los siguientes pasos: 1. Extraer 2 ml de solución de material hemostático tal como solución salina o solución salina con el péptido en una jeringa vacía; 2. Mezclar los 2 componentes mediante la fijación de un conector luer a una jeringa precargada y adjuntar la jeringa que contiene solución de material hemostático al otro extremo del adaptador luer, y luego inyectar la solución de material hemostático en una jeringa precargada; 3. Continuar para mezclar los componentes empujando el material combinado de ida y vuelta hasta que la consistencia está equilibrado, y aplicarse a la herida.

Todas las concentraciones en los ejemplos y tablas se refieren a la concentración en 2 ml de solución salina antes de la mezcla con 6 ml de Surgiflo™. Al mezclar la concentración del ingrediente activo o excipiente en el artículo de prueba corresponderá a 1/4 de la concentración en la solución salina; Por ejemplo la concentración de 5 mM a que se refiere en los ejemplos corresponde a la concentración final de  $0,25 \times 5 \text{ mM} = 1,25 \text{ mM}$  en el material hemostático.

En las figuras, el SF es sinónimo de Surgiflo™ Hemostatic Matrix; y TH significa EVITHROM™, disponible de Ethicon, Inc., que contiene trombina tópica (humana), 800 ~ 1.200 UI/mL.

Mientras que los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la invención, no han de interpretarse como limitantes del alcance de la invención, sino más bien como contribuyentes a una descripción completa de la invención.

#### EJEMPLO 1

Con referencia ahora a la Figura 1, los datos sobre el momento de la hemostasia en minutos se presenta para varios sistemas ensayados, todos incluyendo Surgiflo™, (designado en la tabla como SF), y diferentes tipos de aditivos para mejorar la hemostasia, incluyendo trombina humana (designada como TH en el gráfico) y el péptido sintético SEQ ID NO: 1 que tiene una concentración que varía de 0,01 mM a 5 mM. Las mezclas de Surgiflo™ con trombina se designan en la tabla como SF/TH; las mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 se designan en la tabla como SF/RK-8.

Los datos se recogieron usando modelo punzón de biopsia de hígado porcino [8 mm de ancho x 7 mm de

profundidad], con el tiempo de taponamiento inicial: 30s; tiempo de observación: 30s; N es el número de experimentos para cada punto de datos; N = 3. Las barras de error en las tablas corresponden a las desviaciones estándar.

5 Un estudio de actividad hemostática in vivo se realizó usando el modelo de punzón de biopsia de hígado porcino, con la herida perforada de apertura de 8 mM x 7 mM de ancho profundo hecho en el hígado y el artículo de prueba se aplica a un sitio de la herida recién creado seguido de una presión digital oclusiva (taponamiento). Se aplicó presión inicialmente durante 30 segundos y se midió usando un temporizador electrónico. Tras el taponamiento durante 30 segundos, se interrumpió la presión digital; se eliminó inmediatamente la almohadilla de gasa sobre el artículo. Se realizó una evaluación de la hemostasia durante un período de 30 segundos. Si el sangrado de flujo libre no se observó dentro de los 30 segundos, se observó el tiempo para la hemostasis, en un formato de minutos y segundos, y las pruebas se llegó a la conclusión de ese artículo. Si se observó sangrado de flujo libre, la presión y la gasa se vuelven a aplicar durante un taponamiento adicional de 30 segundos y períodos de observación hasta que se logró la hemostasia o hasta que el período de prueba llegó a diez minutos. La hemostasia se determinó por el cese de la hemorragia de flujo libre en menos de diez minutos. La almohadilla de gasa se utilizó como control negativo.

20 Como puede verse en la Figura 1, la mezcla Surgiflo™ con la concentración más alta de la SEQ ID NO: 1 (5 mM) tiene una eficacia similar a la mezcla de Surgiflo™/trombina (SF/TH), lo que indica un fuerte efecto hemostático del péptido SEQ ID NO: 1.

#### EJEMPLO 2

25 Con referencia ahora a la Figura 2, los datos sobre el momento de la hemostasia en minutos se presenta para varios sistemas ensayados, todos incluyendo Surgiflo™, (designado en la tabla como SF), y diferentes tipos de aditivos para mejorar la hemostasia, incluyendo trombina humana (designada como TH en el gráfico) y péptido sintético PEG-conjugado (o pegilado) de la SEQ ID NO: 1. Para PEG-conjugación, PEG2000 o polietilenglicol con el peso molecular medio de 2000 Da se utilizó, designado en el gráfico como P2K. La mezcla de SEQ ID NO: 1 pegilado y Surgiflo™ se designa en el gráfico como SF/P2K-RK-8. Esta mezcla se puso a prueba con la concentración de la SEQ ID NO: 1 que varía de 0,05 mM a 5 mM.

Los datos se recogieron usando modelo punzón de biopsia de bazo porcino in vivo en sacabocados [6 mm de ancho x 3 mM de profundidad], tiempo inicial de taponamiento en: 30s; tiempo de observación: 30s; N = 3.

35 El estudio de actividad hemostática in vivo se realizó usando el modelo de punzón de biopsia de bazo porcino, con la abertura de herida perforada 6 mM de ancho x 3 mM de profundidad hecha en el bazo y el artículo de prueba se aplica a un sitio de la herida recién creado seguido de una presión oclusiva digital (taponamiento). Se aplicó presión inicialmente durante 30 segundos y fue programado usando un temporizador electrónico. Tras el taponamiento durante 30 segundos, se interrumpió la presión digital; la almohadilla de gasa sobre el artículo se eliminó inmediatamente. Se realizó una evaluación de la hemostasia durante un período de 30 segundos. Si el sangrado de flujo libre no se observó dentro de los 30 segundos, se observó el tiempo para la hemostasis, en un formato de minutos y segundos, y se concluyeron las pruebas de ese artículo. Si se observó sangrado de flujo libre, la presión y la gasa se vuelven a aplicar para un taponamiento de 30 segundos adicionales y períodos de observación hasta que se logró la hemostasia o hasta que el período de prueba llegó a diez minutos. Hemostasis se determinó por el cese de libre flujo de sangrado en menos de diez minutos. La almohadilla de gasa se utilizó como control negativo.

50 Como puede verse en la Figura 2, en mezclas con Surgiflo™, SEQ ID NO: 1 pegilado es comparable a la trombina en un amplio intervalo de concentraciones que varían de 0,05 mM a 5 mM, mostrando prácticamente al mismo tiempo la hemostasia como trombina y posiblemente el mejor momento para hemostasis de trombina a una concentración de 0,1 mM de SEQ ID NO: 1 pegilado.

#### EJEMPLO 3

55 Con referencia ahora a la Figura 3, los datos sobre el momento de la hemostasia en minutos se presentan para varios sistemas ensayados, todos incluyendo Surgiflo™, (designado en la tabla como SF), y diferentes tipos de controles o aditivos para mejorar la hemostasia, incluyendo: humana trombina (designada como SF/TH); péptido SEQ ID NO: 1 (designado como SF/RK-8), que tiene una concentración de 5 mM; SEQ ID NO: 1 conjugada con PEG 2000 (designado en la tabla como SF/PEG2000-RK8) que tiene una concentración de 5 mM; PEG2000 (designado en la tabla como SF/PEG2000) que tiene una concentración de 5 mM; y solución salina normal (designada en el gráfico como SF/solución salina).

Los datos se recogieron usando modelo punzón de biopsia de bazo porcino [6 mm de ancho x 3 mm de profundidad], tiempo de taponamiento inicial: 30s; tiempo de observación: 30s; N = 3.

65 Como puede verse en la Figura 3, la comparación directa de mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 y con

SEQ ID NO: 1 pegilado a mezclas con trombina y con los controles que representan mezclas con excipientes que no inducen hemostasis, representadas por PEG2000 y solución salina normal, indica que las mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 pegilado (5 mM) y con la SEQ ID NO: 1 (5 mM) mostraron eficacia hemostática similar a mezclas con trombina. Las mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 pegilado o con la SEQ ID NO: 1 demostraron tiempo mucho más rápido a las mezclas hemostasis vs. de Surgiflo™ con solución salina y con PEG2000 (5 mM).

#### EJEMPLO 4

Con referencia ahora a la Figura 4, los datos sobre el momento de la hemostasia en minutos se presenta para varios sistemas ensayados, todos incluyendo Surgiflo™, (designado en la tabla como SF), y diferentes tipos de controles o aditivos en concentraciones variables para mejorar la hemostasia, incluso:

- SEQ ID NO: 1 conjugada con PEG 2000 (designado en la tabla como SF/PEG2000-RK8) que tiene concentraciones de 0,05 - 5 mM;
- SEQ ID NO: 1 péptido (designado como SF/RK-8), que tienen concentraciones de 0,05 - 5 mM
- Control: Surgiflo™ con trombina humana (designado como SF/TH);
- Control: Surgiflo™ con solución salina normal (designado en la tabla como SF/solución salina).

Los datos se recogieron usando modelo punzón de biopsia de bazo de porcino [6 mM de ancho x 3 mM de ancho], tiempo de taponamiento inicial: 30s; tiempo de observación: 30s; N = 3.

Como puede verse en la Figura 4, la comparación directa de mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 1 pegilado a mezclas con trombina y con solución salina normal, indica que las mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 pegilado mostraron eficacia hemostática mejor o similar vs. mezclas de Surgiflo™ con trombina en todas las concentraciones, con el tiempo particularmente rápido para la hemostasia en 0,05 mM de SEQ ID NO: 1 pegilado. Además, las mezclas de Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 mostró una eficacia hemostática comparable a mezclas de Surgiflo™ con trombina. En todos los casos, la eficacia hemostática era mejor frente a mezclas de Surgiflo™ con solución salina. Un análisis más detallado indica que SEQ ID NO: 1 pegilado mostró una mejor eficacia hemostática de SEQ ID NO: 1 y la trombina en mezclas con Surgiflo™.

#### EJEMPLO 5

Con referencia ahora a la Figura 5, los datos sobre el momento de la hemostasia en minutos se presentan para varios sistemas ensayados, basados en dos andamios diferentes hemostáticos, incluyendo Surgiflo™, (designados en el gráfico como SF), y andamio de celulosa oxidada regenerada, o polvo de ORC (designado en la tabla como ORC), (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención).

Celulosa regenerada oxidada (ORC) es una pinza hemostática conocida y ampliamente utilizada, disponible de Ethicon, Inc. como SURGICEL Original, SURGICEL Nu-Knit, SURGICEL Fibrilar, y SURGICEL SNoW. Polvo de ORC se preparó moliendo tela de CRO y luego entremezclando el polvo resultante con solución salina normal y/o con el péptido correspondiente.

Los inventores han ensayado las siguientes composiciones a base de ORC:

- mezclas de ORC con SEQ ID NO: 1 pegilado a una concentración de 5 mM (designado en la tabla como ORC/PEG2000-RK-8)
- mezclas de ORC con SEQ ID NO: 1 a una concentración de 5 mM (designado en la tabla como ORC/RK-8)
- mezclas de ORC con solución salina normal

Los datos se recogieron usando modelo punzón de biopsia de bazo de porcino [6 mM de ancho x 3 mM de ancho], tiempo de taponamiento inicial: 30s; tiempo de observación: 30s; N = 4.

La comparación con los controles indica que todas las composiciones basadas en ORC realizado como pinzas hemostáticas comparables con Surgiflo™ con solución salina normal (designada en la tabla como SF/solución salina) y tenía un tiempo más largo a hemostasia vs. Surgiflo™ con trombina humana (designado como SF/TH). El andamio hemostático basado en ORC no es adecuado para su uso con la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 1 pegilado.

La Figura 5 ilustra además los datos obtenidos usando mezclas Surgiflo™ con SEQ ID NO: 1 pegilado y SEQ ID NO: 1 pegilado como 8 péptidos de aminoácidos con secuencias variables en concentraciones de 5 mM. Haciendo referencia ahora a la Tabla 1, las secuencias de SEQ ID NO: 1 y tres SEQ ID NO: 1 como 8 péptidos de

aminoácidos se presentan, junto con la designación abreviada en el gráfico. Todos los péptidos que incluyen la SEQ ID NO. 1 se pegilaron.

Tabla 1. Secuencias de péptidos

Designación en el gráfico	Conjugación y Secuencia
PEG2000-RK-8	PEG2000-SEQ ID NO: 1
PEG2000- RK-8 aleatorio	PEG2000-KVYRWFMV (SEQ ID NO: 21)
PEG2000-RL4L5K8	PEG2000-SEQ ID NO: 6
PEG2000-KR-8	PEG2000-SEQ ID NO: 7

8 péptidos de aminoácidos de PEG2000-KVYRWFMV (SEQ ID NO: 21) o PEG2000- RK-8 aleatorio tiene una secuencia aleatoria KVYRWFMV (SEQ ID NO: 21);

8 péptidos de aminoácidos de PEG2000-RL4L5K8 o PEG2000-SEQ ID NO: 6 tiene una secuencia RFYLLMWK ((Arg-Phe-Tyr-Leu-Leu-Met-Trp-Lys) SEQ ID NO: 6)) análogo a RK-8 pero con VVM sustituido por LLM, por lo que V y L son aminoácidos análogos.

8 péptidos de aminoácidos PEG2000-KR-8 o PEG2000-SEQ ID NO: 7 tienen una secuencia KYFLLQFR ((Lys-Tyr-Phe-Leu-Leu-Gln-Phe-Arg) SEQ ID NO: 7)), donde cada aminoácido individual de RK-8 se sustituye con un aminoácido análogo pero con diferente cadena lateral.

El análisis de los datos indica que el 8 péptido pegilado de aminoácidos que tiene la secuencia de RK-8 como, en particular SEQ ID NO: 6, mostró una eficacia hemostática similar en comparación con SEQ ID NO: 1 pegilado y a la trombina.

El 8 péptido pegilado de aminoácidos SEQ ID NO: 7 mostró tiempo algo más largo para la hemostasia, comparable a SEQ ID NO: 1 no pegilado.

La secuencia aleatoria pegilada de 8 péptido de aminoácidos KVYRWFMV (SEQ ID NO: 21) mostraron más tiempo para la hemostasia, comparable a la mezcla SF/solución salina.

Con referencia ahora a la Figura 6, los datos sobre el momento de la hemostasia en segundos se presenta para varios sistemas ensayados, basados en dos andamios hemostáticos diferentes, incluyendo Surgiflo™, (designado en la tabla como Surgiflo), y andamio hecho de ácido plurónico F127 (designado en la tabla como ácido plurónico F127), (ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención).

Ácido plurónico F127 es copolímero de bloque (PPO)x-(PEO)y, que tiene un peso molecular medio de 12.600 Da. Fue comprado de BASF y se preparó del siguiente modo: 0,58 g de ácido plurónico F127 se mezcló con 2 ml de solución salina o solución salina que contiene 5 mM pegilado PR-8.

Los datos se recogieron usando modelo punzón de biopsia de bazo porcino [6 mm de ancho x 3 mm de profundidad], tiempo de taponamiento inicial: 30s; tiempo de observación: 30s.

El análisis de los datos indica que las mezclas de ácido plurónico con pegilado RK-8 y con solución salina normal han fallado en la prueba hemostática. Así, composiciones basadas en ácido plurónico se realizaron mal como pinzas hemostáticas basadas y no son adecuadas para su uso con RK-8 pegilado.

La Figura 6 también presenta datos obtenidos con mezclas Surgiflo™ con solución salina (designado Surgiflo/solución salina) y con Evithrom™ (trombina humana, trombina tópica (humano), 800 ~ 1200 UI/mL) (designado como Surgiflo/Evithrom) como controles, así como mezclas de Surgiflo™ con:

- 3-Péptidos de aminoácidos cortos que tienen secuencias de VVM, LLM, VMV, que tienen una concentración de 5 mM (designada en la tabla como Surgiflo/VVM; Surgiflo/LLM; Surgiflo/VMV)
- SEQ ID NO: 1 péptido (designado como Surgiflo/RK-8), que tiene una concentración de 5 mM
- SEQ ID NO: 1 conjugado con PEG 2000 (designado en la tabla como Surgiflo/PEG2000-RK8) que tiene una concentración de 5 mM
- Mezcla de tres aminoácidos individuales V, V, M; (designada en la tabla como Surgiflo/ individual V, V, M) que tiene concentración de 5 mM cada uno)
- Mezcla de tres aminoácidos individuales L, L, M; (designada en la tabla como Surgiflo/L individual, L, M) que tiene concentración de 5 mM cada uno)

Los 3-péptidos de aminoácidos, VVM, LLM, y VMV, fueron sintetizados por GenScript EE.UU. Inc.

El análisis de los datos presentados en la Figura 6 indica que las mezclas de Surgiflo™ con aminoácidos individuales y 3-péptidos aminoácidos cortos no fueron eficaces como agentes hemostáticos, con la excepción de péptido VMV que era algo eficaz.

5 El análisis adicional de los datos muestra que la SEQ ID NO: 1 y PEG-SEQ ID NO: 1 se realizaron tan bien como la trombina.

#### EJEMPLO 7

10 Con referencia ahora a la Figura 7, los datos en tiempo para la hemostasia en minutos se presenta para varios sistemas y controles probados, utilizando sangre heparinizada.

15 El modelo era modelo de punzón de biopsia de bazo porcino heparinizado: 6 mM de ancho x 3 mM de profundidad, el tiempo de taponamiento: 30s; tiempo de observación: 30s; tiempo de coagulación activado (ACT) se mantuvo por encima de 300 segundos mediante la infusión de solución de heparina adicional 2000 UI si es necesario. 9975 UI de solución de heparina se aplicó inicialmente a un porcino de 39,1 Kg.

Como se puede observar a partir de los datos presentados:

- 20 - Gasa (como control negativo), se utilizó sin ningún material activo hemostático adicional) ha fallado como hemostato en sangre heparinizada;
- Surgiflo™ con mezcla de trombina (designado como SF/TH) ha fallado como hemostato en sangre heparinizada;
- 25 - Surgiflo™ con mezcla salina normal (designado como SF/solución salina) ha fallado como hemostato en sangre heparinizada;
- Surgiflo™ con 2 ml de 5 mM de SEQ ID NO: 1 en solución salina (designado como SF/RK-8) ha fallado como hemostato en sangre heparinizada;
- 30 - Surgiflo™ con 2 ml de 5 mM de PEG2000-SEQ ID NO: 1 en solución salina (designado como SF/P2K-RK-8) ha proporcionado algún efecto hemostático pero con un tiempo a hemostasis que es demasiado largo para ser práctico, 6,8 min;
- Surgiflo™ con 2 ml de 5 mM de PEG5000-SEQ ID NO: 1 en solución salina (designado como SF/P5K-RK-8) ha proporcionado eficacia hemostática significativa.

35 Por lo tanto SEQ ID NO: 1 pegilado, específicamente PEG-5000 conjugado con SEQ ID NO: 1, mostró una eficacia superior hemostática vs. trombina, no SEQ ID NO: 1 pegilado, y otros controles en la sangre heparinizada.

#### EJEMPLO

(ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

40 En un experimento de parte superior del banco, una almohadilla porosa sintética se trató con SEQ ID NO: 1 pegilado en solución salina o con solución de control de solución salina para evaluar la interacción con la sangre. Las muestras se prepararon mediante la adición de 100 µL de SEQ ID NO: 1 pegilado en solución salina normal (0,5 mM) o 200 µl de solución salina normal a 0,025 g de almohadilla de Monocriolo (poliglicaprona 25). Las almohadillas de Monocriolo\* impregnado (poliglicaprona 25) fueron entonces secadas al aire durante 2 horas siguientes por un proceso de secado de vacío de 1 h.

45 Después se añadió 150 µL de sangre porcina fresca a cada almohadilla por separado, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Las almohadillas se transfirieron después a una placa de Petri que contiene 20 ml de solución salina, observando la difusión de sangre no coagulada hacia fuera de las almohadillas. Se observó una cantidad significativa de sangre coagulada atrapada en un SEQ ID NO: 1 pegilado de la almohadilla de Monocriolo tratado, mientras que también se observó una fuerte difusión de la sangre no coagulada de la almohadilla de control. Así, el SEQ ID NO: 1 pegilado se muestra como la promoción de la rápida coagulación de la sangre.

#### EJEMPLO

(ejemplo comparativo, que no forma parte de la invención)

60 En un experimento de parte superior de banco, SEQ ID NO: 1 pegilado en solución salina normal, SEQ ID NO: 1 no pegilado en solución salina normal, y la solución de control de solución salina normal se ensayaron para evaluar la interacción con la sangre. Las muestras se prepararon mediante la adición de 100 mL de SEQ ID NO: 1 pegilado en solución salina normal (0,5 mM), SEQ ID NO: 1 en solución salina normal (0,5 mM), y solución salina normal para separar viales de vidrio que contienen 100 µL de citrato de porcino que contiene sangre de sodio (0,105M). Opacidad de la sangre se observó al instante cuando la solución pegilada de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 1 se añadió a la sangre, mientras que no se observó enturbiamiento en el vial con la solución de control de solución

salina normal. Se observó una precipitación completa de la sangre después de 2 horas en viales que contienen SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 1 pegilado, mientras que no se observó la precipitación completa de la sangre en el vial con la solución de control de solución salina normal. Así, el SEQ ID NO: 1 pegilado y SEQ ID NO: 1 no pegilado se muestra como la promoción de la rápida coagulación de la sangre.

5 EJEMPLO 10

10 Con referencia ahora a la Figura 8, los datos sobre el momento de la hemostasia en minutos se presenta para dos sistemas ensayados, todos incluyendo Surgiflo™, y diferentes tipos de controles o aditivos para mejorar la hemostasia, incluyendo:

- 0,5 mM de la SEQ ID NO: 1 péptido conjugado con PEG 2000 en solución salina (designado en la tabla como Surgiflo/0,5 mM PEG2000-RK8 en solución salina);
- Control: Surgiflo™ con trombina humana (designada como Surgiflo/TH).

15 Los datos se recogieron usando un modelo de punzón de biopsia de bazo porcino tratado con clopidogrel y ácido acetilsalicílico (x 6 mm de ancho 3 mm de profundidad, el tiempo de taponamiento: 30 seg; tiempo de observación: 30 seg; las siguientes dosis orales se aplicaron a un porcino hembra de 4 meses de edad (peso: 66,1Kg):

- 20 2 días antes del laboratorio: 300 mg de Plavix y 325 mg de aspirina.
- 1 día antes del laboratorio: 75 mg de Plavix y 325 mg de aspirina.
- 25 El día para el laboratorio: 75 mg de clopidogrel y 325 mg de aspirina antes de la cirugía.

30 Los datos presentados en la Figura 8 demuestran que péptido Surgiflo/SEQ ID NO: 1 pegilado funciona tan bien como Surgiflo/Trombina en un modelo inactivado plaquetario y muestra una eficacia hemostática similar. Así, no sólo el péptido SEQ ID NO: 1 demuestra eficacia hemostática en la sangre no comprometida, en la sangre heparinizada, sino también en la sangre inactivada de plaquetas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> WANG, YI-LAN ZHANG, GUANGHUI
- <120> PÉPTIDOS PROCOAGULANTES Y SUS DERIVADOS Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> ETH5623
- 40 <140>
- <141>
- <160> 21
- 45 <170> Versión patentIn 3,5
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 55 <400> 1

60 Arg Phe Tyr Val Val Met Trp Lys  
1 5

- 65 <210> 2
- <211> 10
- <212> PRT

# ES 2 647 313 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

5

<400> 2

10

Lys Arg Phe Tyr Val Val Met Trp Lys Lys  
1 5 10

15

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 3

25

Arg Phe Tyr Val Val Met  
1 5

30

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 4

40

Phe Ile Arg Val Val Met Tyr Glu Gly Lys Lys  
1 5 10

45

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 5

55

Ile Arg Val Val Met  
1 5

60

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

ES 2 647 313 T3

<400> 6

5 Arg Phe Tyr Leu Leu Met Trp Lys  
1 5

10 <210> 7  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 7

20 Lys Tyr Phe Leu Leu Gln Phe Arg  
1 5

25 <210> 8  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 8

35 Arg Phe Tyr Val Val Met Trp Lys Gln Val Thr Gln Ser  
1 5 10

40 <210> 9  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 9

50 Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe  
1 5 10

55 <210> 10  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 10

65 Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro  
1 5 10



ES 2 647 313 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

5 <400> 15

10 Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn  
1 5

<210> 16  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

20 <400> 16

25 Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro  
1 5

30 <210> 17  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

40 <400> 17

45 Ser Phe Leu Leu Arg Asn  
1 5

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

55 <400> 18

60 Ser Phe Leu Leu Arg  
1 5

<210> 19  
<211> 4  
<212> PRT

65

ES 2 647 313 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

5

<400> 19

10

Ser Phe Leu Leu  
1

15

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 20

25

Arg Val Ala Val  
1

30

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 21

40

Lys Val Tyr Arg Trp Phe Met Val  
1 5

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Un material de sellado hemostático o de tejido que comprende:

- 5 (a) un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de análogo de aminoácido de los mismos, y  
 (b) un andamio hemostático

en el que dicho andamio hemostático es gelatina reticulada en forma de partículas con un vehículo líquido.

10 2. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 1 en el que el vehículo líquido es una solución salina normal, en el que la gelatina y el péptido se mezclan sustancialmente homogéneamente en combinación con la solución salina normal como una fase líquida.

15 3. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la concentración de dicho péptido en dicho material hemostático es de aproximadamente 0,0025 mM a aproximadamente 1,25 mM.

20 4. El material hemostático o de sellado de tejido de cualquier reivindicación precedente que comprende además cantidades eficaces de uno o más aditivos o compuestos seleccionados del grupo que consiste en agentes antimicrobianos, agentes tensioactivos, antioxidantes, humectantes, agentes humectantes, lubricantes, espesantes, diluyentes, estabilizadores de irradiación, y combinaciones de los mismos.

25 5. El material hemostático o de sellado de tejido de cualquier reivindicación precedente que comprende además una cantidad potenciadora de extrusión de glicerol.

30 6. El material de sellado hemostático o tejido de cualquier reivindicación precedente en el que dicho péptido está conjugado con un polímero biocompatible, preferiblemente en el que dicho polímero biocompatible es un polímero hidrófilo.

35 7. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 6 en el que dicho polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, derivado del polietilenglicol, polipropilenglicol, polisacárido, polisacárido modificado, proteína, proteína modificada, péptido, glicólido de poliláctido, caprolactona, trimetileno carbonato, almidón, almidón modificado, gelatina, colágeno, y combinaciones de los mismos.

40 8. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 7 en el que el polímero hidrófilo es polietilenglicol que tiene un peso molecular seleccionado para proporcionar una hemostasia rápida o para un sellado de tejidos rápido.

45 9. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 8 en el que dicha molécula de polietilenglicol es una molécula lineal, una molécula ramificada, una molécula en forma de estrella, o combinaciones de los mismos.

50 10. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 8 o 9 en el que dicho peso molecular es, en promedio de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 8.000 Daltons, preferiblemente en el que dicho peso molecular es, en promedio de 2000 Daltons o 5000 Daltons.

55 11. El material hemostático o de sellado de tejido de la reivindicación 10 en el que la concentración de dicho péptido en dicho material hemostático es de aproximadamente 0,0025 mM a aproximadamente 1,25 mM, y en el que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.

60 12. El material hemostático o de sellado de tejido de cualquier reivindicación precedente en el que dicha secuencia de análogo de aminoácido se obtiene a partir de dicha secuencia de SEQ ID NO: 1 con al menos uno de los aminoácidos sustituidos con aminoácidos analógicos correspondientes, preferiblemente en los que se selecciona dicha secuencia de análogo de aminoácido del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y combinaciones de los mismos.

65 13. Un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de análogo de aminoácido del mismo para uso en un método para proporcionar un tratamiento hemostático o de sellado de tejido a un sitio de la herida, que comprende las etapas de:

- (a) formar el material hemostático o de sellado de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y  
 (b) aplicar el material hemostático o de sellado de tejido al sitio de la herida.

14. Un péptido para el uso según la reivindicación 13, en el que el material hemostático o material de sellado de tejidos se utiliza en un paciente que tiene sangre heparinizada o de otra manera que contiene anti-coagulación o

agentes anti-coagulantes.

**15.** Un método de fabricación de un material de sellado hemostático o de tejido que comprende las etapas de:

- 5
- (a) proporcionar un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de análogo de aminoácido de los mismos, conjugándose dicho péptido opcionalmente con un polietilenglicol;
  - (b) proporcionar un andamio absorbible, en el que dicho andamiaje absorbible es gelatina reticulada en forma de partículas; y
  - (c) mezclar dicho péptido, dicho andamio absorbible y un líquido biocompatible sustancialmente homogéneo
- 10 que forma el material hemostático o de sellado de tejido.

**16.** El método de la reivindicación 15 en el que dicho péptido está conjugado con un polietilenglicol y la concentración de dicho péptido en dicho material hemostático es de aproximadamente 0,0025 mM a aproximadamente 1,25 mM, y en el que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

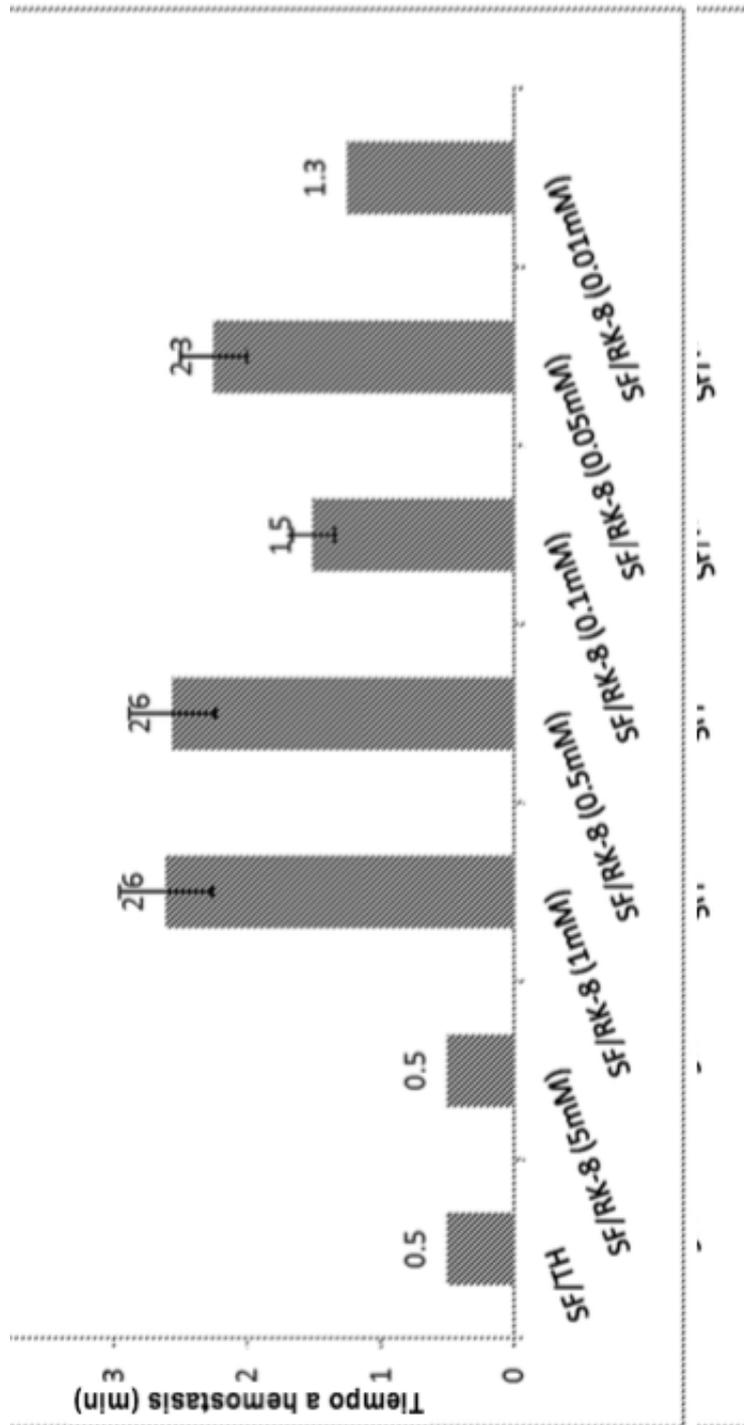


Figura 2

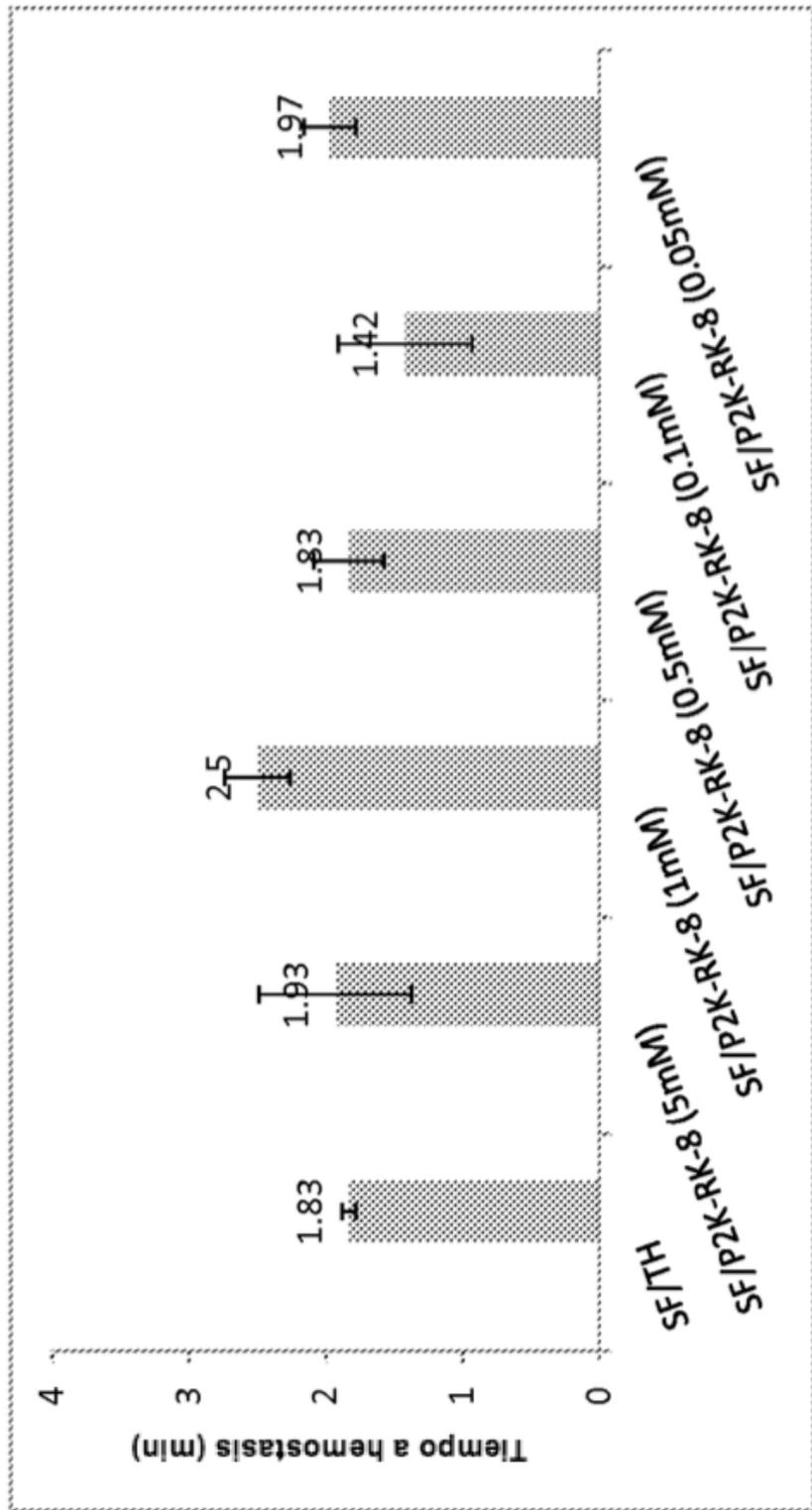


Figura 3

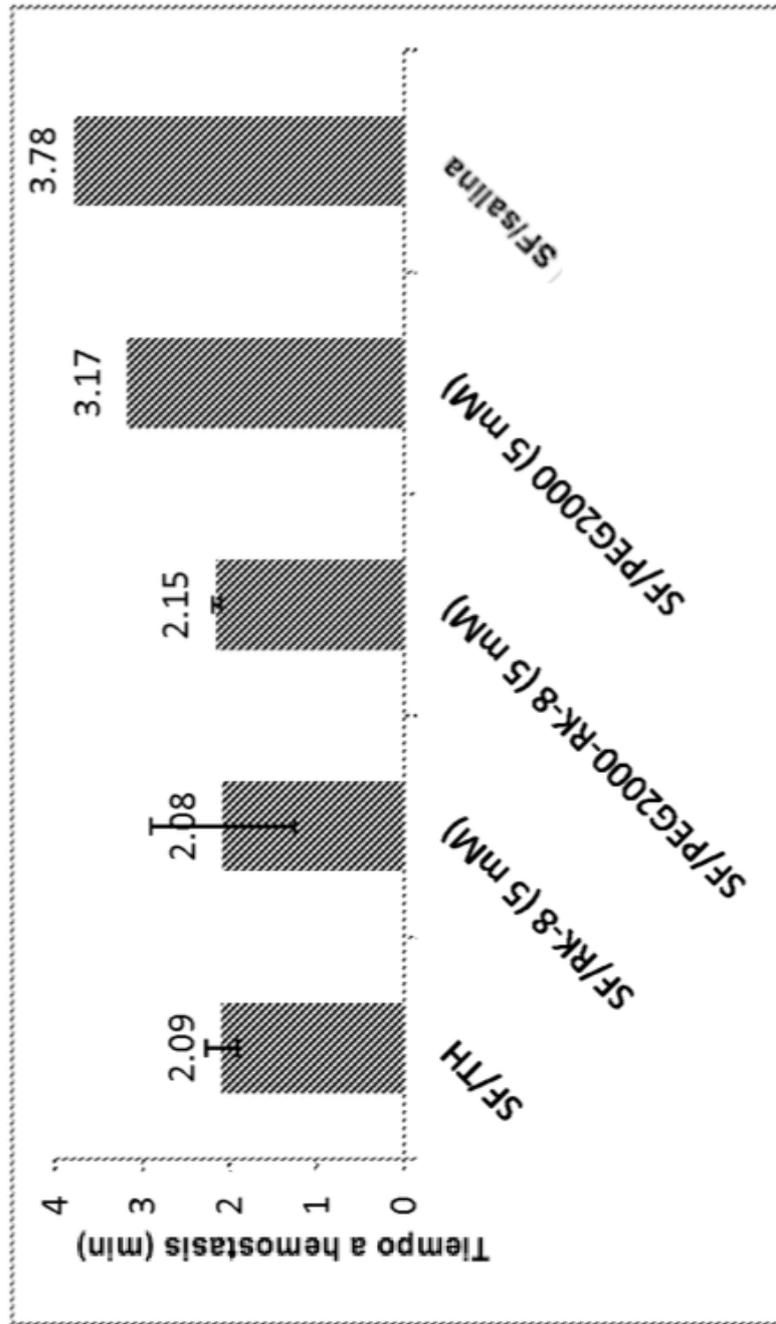


Figura 4

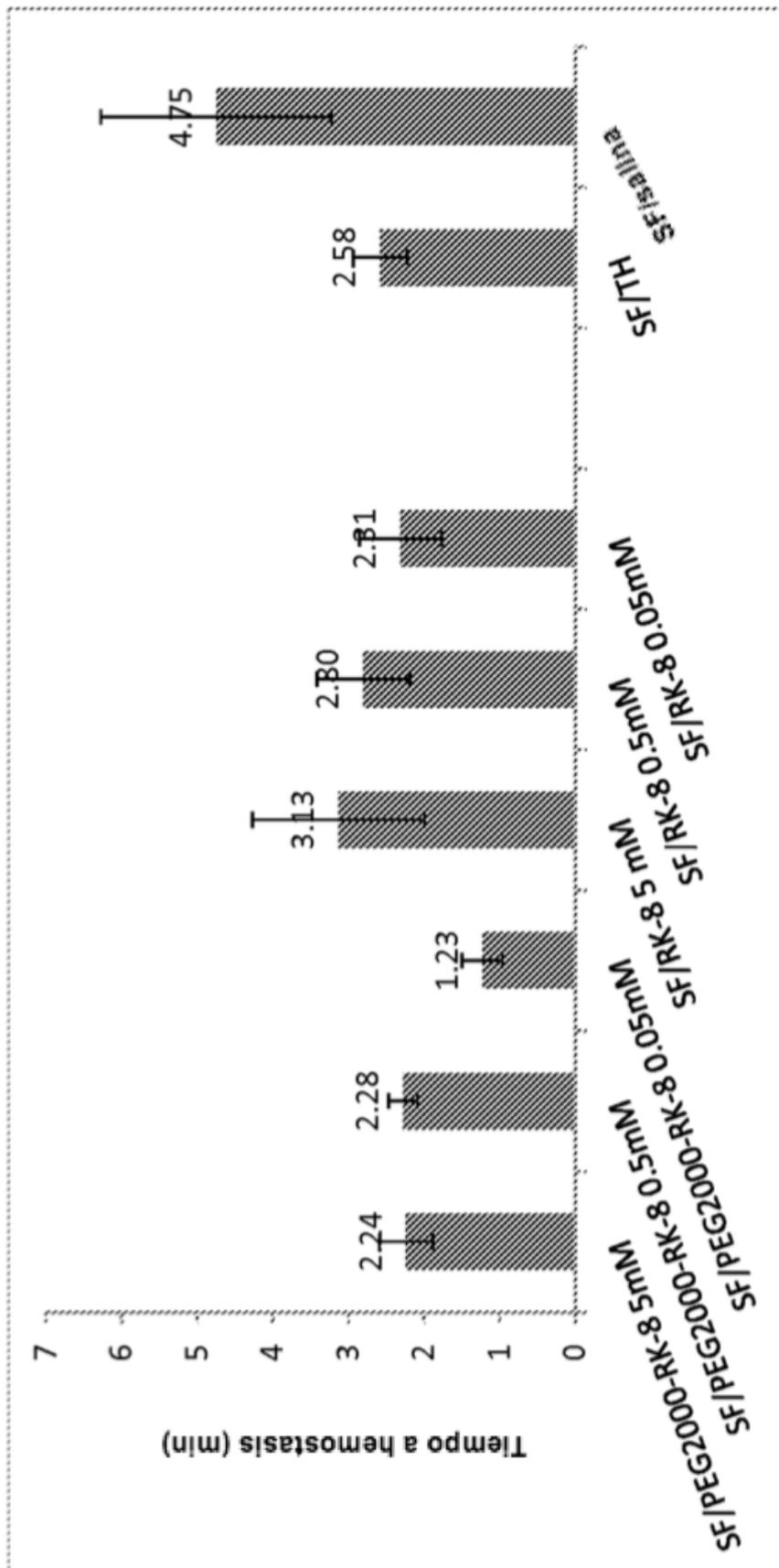


Figura 5

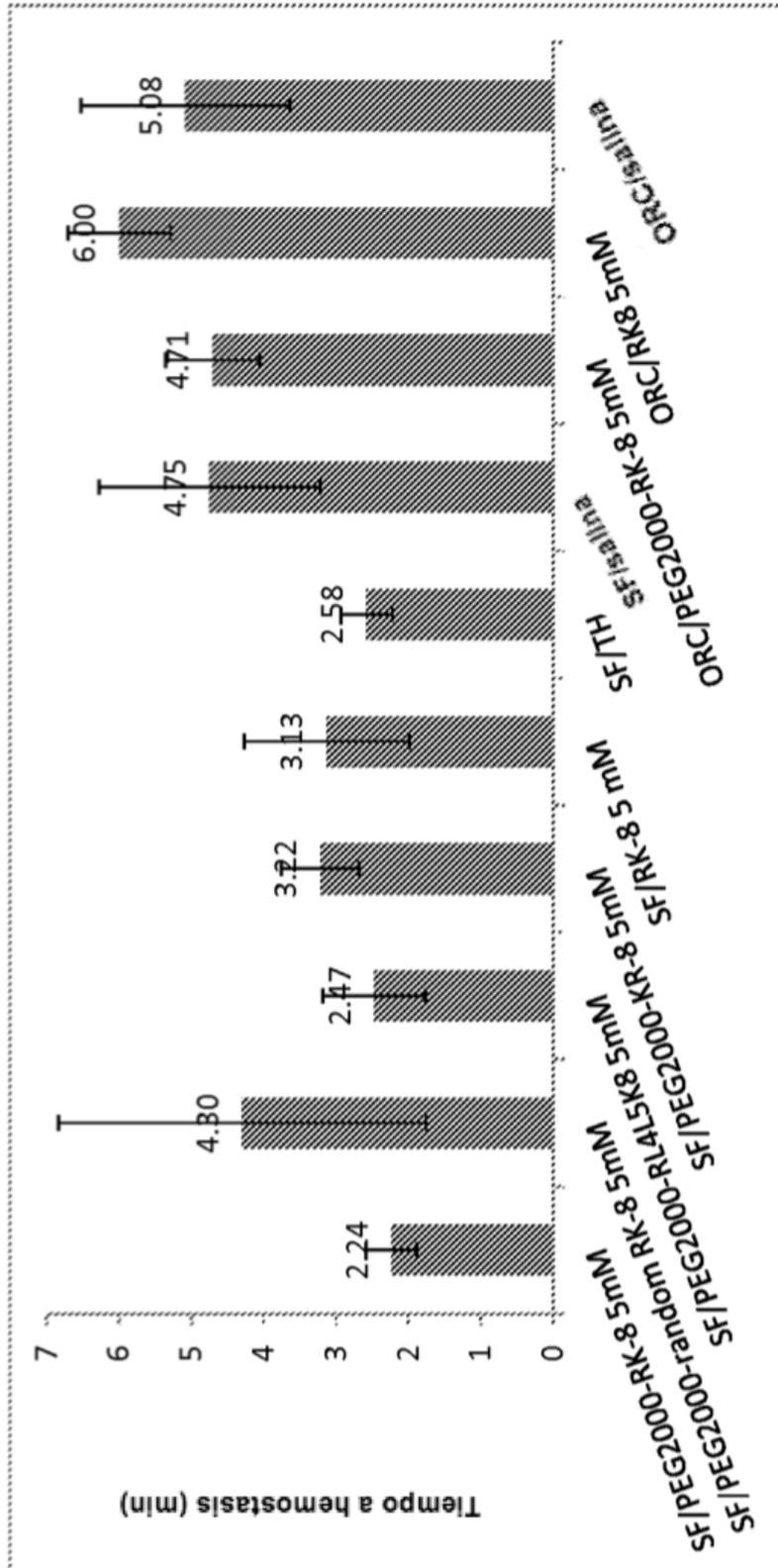


Figura 6

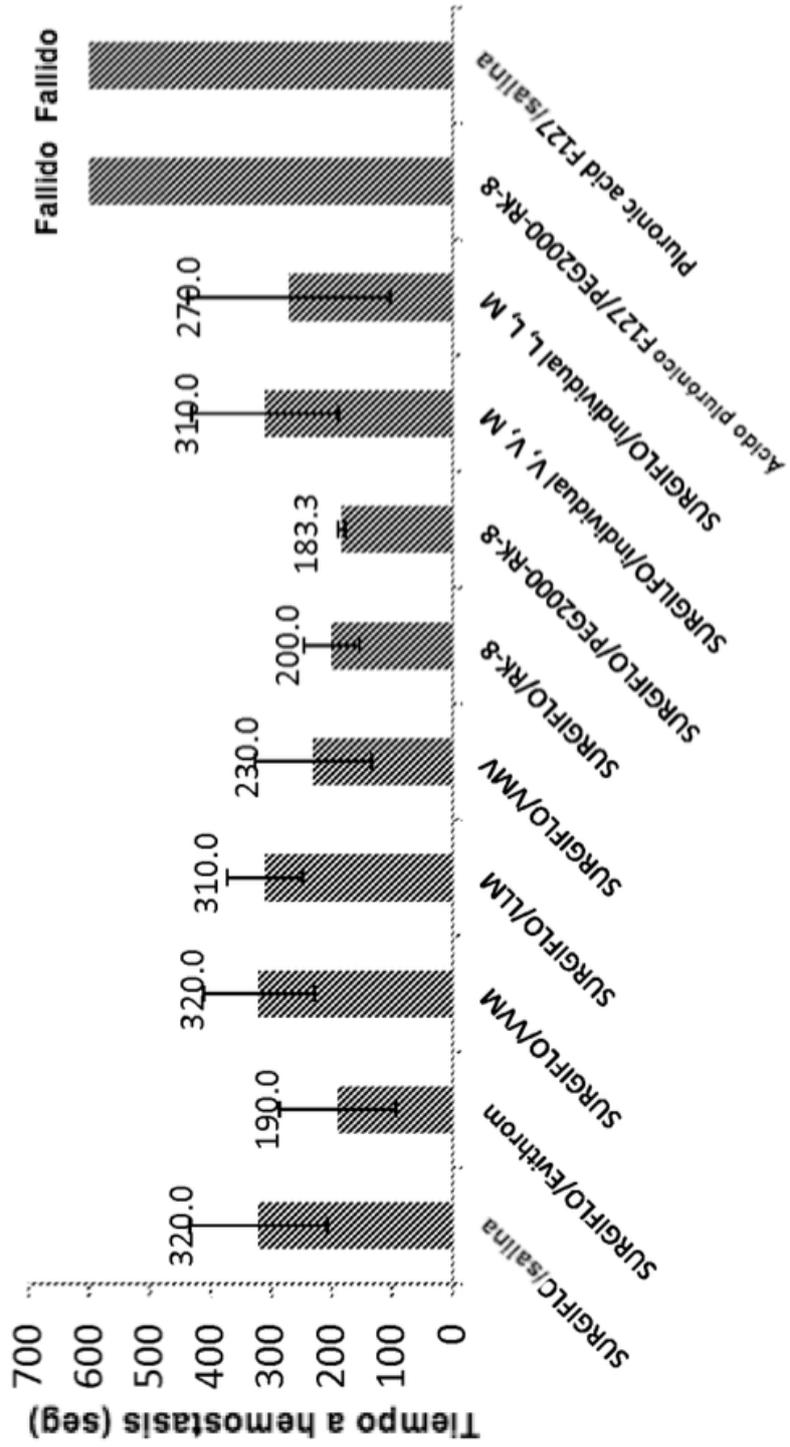


Figura 7

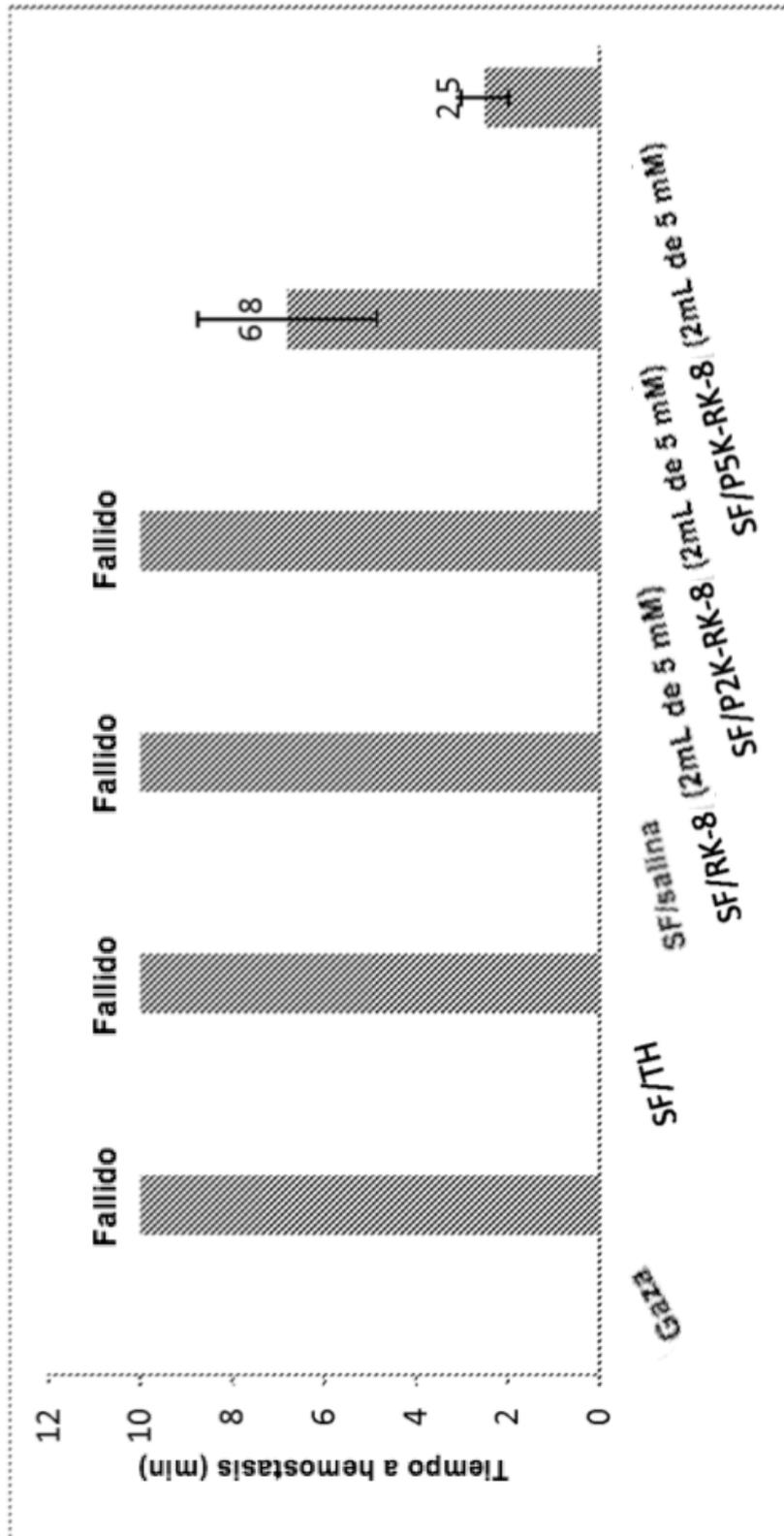


Figura 8

