

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 786**

51 Int. Cl.:

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2006 PCT/FR2006/002747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2007 WO07080276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2006 E 06841950 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 1968626**

54 Título: **Adhesivo biológico libre de trombina y su utilización como medicamento**

30 Prioridad:

16.12.2005 FR 0512817

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2018

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
SOCIÉTÉ ANONYME (100.0%)
3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

CHTOUROU, ABDESSATAR

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 684 786 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

Adhesivo biológico libre de trombina y su utilización como medicamento

- 5 La presente invención se refiere a un adhesivo biológico a base de fibrinógeno, de factor VII activado y una fuente de iones de calcio.

Se entiende por "adhesivo biológico" un componente capaz de reunir unos elementos tisulares (piel, hueso, órganos diversos), y al mismo tiempo asegurar una hemostasia de los tejidos lesionados, pudiendo así reforzar o
10 complementar una reunión de estos tejidos por una o más suturas.

La coagulación sanguínea se realiza según unas etapas en cascada que implican diferentes proenzimas y procofactores presentes en la sangre que se convierten por medio de enzimas proteolíticas, en su forma activada. Esta sucesión de etapas o cascada de la coagulación se efectúa según dos sistemas de la coagulación,
15 denominadas vía extrínseca de la coagulación y vía intrínseca de la coagulación, que conduce a la transformación de la protrombina en trombina.

La vía extrínseca implica la intervención del Factor VII presente en la sangre. Sin embargo, este requiere una activación (factor VIIa) para iniciar esta cascada de coagulación. El factor VIIa presenta una baja actividad
20 enzimática hasta que se compleje a los factores tisulares de naturaleza fosfolipídicas liberadas después de la lesión tisular. El factor VIIa así complejo transforma el factor X (FX) en factor Xa (FXa) en presencia de iones de calcio. El factor Xa a su vez transforma la protrombina en trombina, la cual activa el factor V (Factor Va). La trombina activa también el factor XIII (factor XIIIa). La trombina, en presencia de calcio, de factores tisulares, de factores Va, actúa sobre el fibrinógeno transformándolo en fibrina. La presencia de factor XIIIa permite la formación de un coágulo de
25 fibrina de red de malla sólida y adherente que es progresiva y lentamente reabsorbido con la instalación del tejido cicatricial de consolidación, a la que la red sirve de trama. Esta fibrina reticulada es insoluble y no es atacable por las enzimas fibrinolíticas, al menos durante el tiempo de colocación del tejido cicatricial.

La vía intrínseca de la coagulación implica también el factor VIIa (FIIa). Esta vía comprende una cascada de reacciones que llevan a la activación de la trombina por medio del factor XII (FXII). Este activa el factor XI (Factor
30 XIa – FXIa) que activa el factor IX (factor IXa – FIXa) en presencia de factores tisulares fosfolipídicos (FT). El factor IXa participa en la activación del factor X en factor Xa en presencia de factor VIIIa, unos factores tisulares y de iones de calcio. Esto conduce después a la transformación de la protrombina en trombina. Conviene señalar que la presencia de factor Xa o de trombina permite la activación del factor VII (factor VIIa).

Aparece por lo tanto que el factor VIIa tiene un papel preponderante en los mecanismos de la coagulación intrínseca, que lleva a la formación del coágulo sanguíneo. Se utiliza en el tratamiento de las hemofilias A que tienen un inhibidor circulante, es decir un anticuerpo específico que limita o impide la activación del factor VIII (FVIII). El
40 factor VIIa presenta el interés de poder actuar localmente en presencia de factores tisulares liberados después de la lesión de tejidos que genera unas hemorragias, incluso en ausencia de Factor VIII o IX.

Sin embargo, en el caso de lesiones tisulares hemorrágicas generadas por las llagas, heridas o intervenciones quirúrgicas externas, la reparación tisular por sutura es una necesidad para, en particular, detener la hemorragia por
45 formación del coágulo de fibrina, según los mecanismos explicitados anteriormente. Puede resultar necesario favorecer, en particular en el caso de cirugías pesadas, la hemostasia del tejido lesionado.

Se puede citar, a título de ejemplo, la solicitud de patente WO93/06855 que describe una composición hemoestática, libre de trombina y de factores de la coagulación, que comprende un factor VIIa incorporado en un vehículo compatible en el plano biológico, aplicándose el conjunto sobre una herida hemorrágica para favorecer la
50 hemostasia y la formación de coágulo de fibrina.

Sin embargo, salvo la hemostasia de tejidos lesionados, conviene también acelerar, reforzar, incluso complementar el proceso natural de cicatrización tisular, suturado o no, unido a la reunión de los tejidos para evitar su dehiscencia y acelerar el proceso. Esto es posible en particular por la aplicación local de adhesivo biológico.

Los adhesivos biológicos están constituidos de una mezcla de factores circulantes de la coagulación sanguínea, en particular de proteínas plasmáticas fibrinógena y factor XIII. Requieren además una aportación de trombina exógena, enzima necesaria para transformar el fibrinógeno en fibrina insoluble, reticulable por el factor XIII. Unos
60 componentes adicionales son necesarios para efectuar la coagulación del fibrinógeno, en particular el ion calcio, en forma de CaCl_2 , y eventualmente aprotinina, añadida por sus propiedades anti-fibrinolíticas.

Tales adhesivos biológicos se han descrito en particular en diferentes publicaciones y patentes, tales como EP 0 305 243, FR 2 448 900 y FR 2 448 901, así como sus aplicaciones en diversas situaciones clínicas ("Fibrinkleber", Actes du Congrès de Heidelberg, 1976, Ed. Schattauer).

Los adhesivos biológicos pueden también servir para fijar unos biomateriales de naturaleza diversa (colágeno,

alginate y ácido poliláctico) a unos tejidos biológicos para reforzar sus propiedades mecánicas mientras se espera la consolidación mediante el recrecimiento natural de las células del organismo, por ejemplo piel artificial.

Los adhesivos biológicos disponibles en el comercio se presentan en realidad en forma de kits que comprenden al menos los cuatro componentes citados anteriormente en forma seca en el que las proteínas coagulables por la trombina, el fibrinógeno y el factor XIII, deben aislarse de la trombina, ya que su asociación genera una toma de fibrina en un tiempo muy corto, del orden de algunos segundos después de la reconstitución en un líquido y mezcla. Es la razón por la cual los kits de adhesivo biológico son al menos bi-componentes, es decir que comprenden, por un lado, un lote a base de fibrinógeno y de factor XIII y, por otro lado, un lote a base de trombina. El adhesivo biológico cumple sus funciones indicadas anteriormente por reconstitución y mezcla de dos lotes, por ejemplo con unas jeringas y agujas, después aplicación sobre el tejido a suturar.

Sin embargo, tales reconstituciones y mezclas son relativamente complejas y fuente de errores posibles, en particular en caso de urgencia, dado que a partir de la puesta en contacto del fibrinógeno y de la trombina en forma líquida, en presencia de otros componentes, se forma casi instantáneamente la fibrina. La mezcla fibrinógeno-trombina puede llevarse a cabo por lo tanto solo justo antes de la aplicación sobre la herida o zona de trabajo. Además, cuando un dispositivo único de distribución de adhesivo biológico es utilizado, existe un riesgo real de una toma en fibrina en el dispositivo mismo, lo que puede provocar una obstrucción del sistema de distribución y de aplicación.

La patente EP 0 850 650 B1 describe en particular un adhesivo bi-componente preactivado que contiene fibrinógeno y al menos un factor de la coagulación activado, cuya activación no depende de los iones de calcio, seleccionado entre el Factor XIIa, el Factor XIa, el Factor VIIa y la kalikreína y coagula por simple adición de iones de calcio por formación de fibrina. Este adhesivo se obtiene por fraccionamiento o concentración del plasma sanguíneo activado, que proviene de un único donante, a fin de concentrar el fibrinógeno conservando al mismo tiempo los factores de la coagulación activados necesarios para permitir la coagulación bajo la acción de los iones de calcio. Tal adhesivo presenta los inconvenientes de los adhesivos bi-componentes citados anteriormente y formar el coágulo de fibrina casi instantáneamente a la mezcla.

La solicitud de patente WO 02/055102 A1 describe una composición que comprende FVIIa y fibrinógeno útil para limitar o detener el sangrado provocado por unas hemorragias o heridas internas o externas. Estas composiciones están destinadas a inyectarse por vía intravenosa al paciente y actúan a nivel de la hemorragia o de la herida en la que están presentes todos los factores y los iones de calcio. El inconveniente relacionado con la utilización de tal composición se basa en el hecho de que esta puede interactuar con los FT que se hubieran extendido fuera de la herida o de la hemorragia, por circulación sanguínea por ejemplo, y generar, con los iones de calcio naturalmente presentes en la sangre, una coagulación intempestiva con los diferentes factores presentes en la sangre, provocando unos callos fuera de la zona hemorrágica, con riesgo de trombosis.

La patente US 6,500,427 B1 describe un adhesivo monocompuesto que comprende fibrinógeno, el factor FXIII, un inhibidor de la trombina, unos factores protrombínicos y unos iones de calcio.

Los inconvenientes citados anteriormente plantean por lo tanto unos problemas en particular en el ámbito de intervenciones quirúrgicas y/o situaciones de urgencia, en las que frecuentemente la rapidez del gesto operatorio es una necesidad. Se observa que tales inconvenientes son susceptibles de generar una reunión no homogénea de los tejidos por formación de pilas de fibrina antes de la adhesión tisular, que puede además acentuarse por la retracción del callo, lo que conduce al final a una cicatriz irregular, propicia para una dehiscencia y sangrados secundarios post-operatorios.

Para remediar estos inconvenientes, la solicitante ha buscado desarrollar un adhesivo biológico que responda a un doble objetivo conjunto. El primer objetivo es proporcionar un adhesivo biológico que comprende unos factores plasmáticos de la coagulación, libre de trombina, sin riesgo de una formación de fibrina antes de la aplicación sobre un tejido biológico. El segundo objetivo responde a la necesidad de poner a disposición tal adhesivo que presenta también unas capacidades incrementadas, por un lado, de hemostasia de tejido lesionado y, por otro lado, de reunión de tejidos que conducen a una cicatrización mejorada.

La solicitud describe un adhesivo biológico líquido monocomponente, estable, de uso terapéutico, libre de trombina, a base de fibrinógeno, que comprende un factor VIIa y una fuente de iones de calcio.

La invención se define por las reivindicaciones.

La solicitante ha encontrado que era posible poner a disposición un nuevo medicamento (adhesivo biológico monocompuesto): adyuvante de la hemostasia, apósito, adyuvante de cicatrización u obturante por formación de émbolos, para los tejidos biológicos, las heridas o los biomateriales, que comprenden los dos factores plasmáticos de interés anteriores y una fuente de iones de calcio.

Se entiende por "monocomponente" una utilización conjunta de los tres componentes de interés constitutivos del

adhesivo que forma así un compuesto líquido único, por oposición a los adhesivos bi-componentes de la técnica anterior.

Estos tres componentes son por lo tanto compatibles entre sí en forma líquida, es decir que su combinación, que forma así un sistema monocompuesto, no genera la formación casi instantánea de fibrina. Este adhesivo líquido monocompuesto es estable ya que estos componentes pueden estar en presencia en medio líquido para una utilización funcional de esta, y esto incluso al menos durante 24 horas anterior a esta utilización, sin riesgo de un inicio prematuro del proceso de la coagulación. Esta estabilidad del adhesivo se verifica, en la medida en la que no se observa fibrinoformación durante 24 horas de incubación a 37°C.

El adhesivo biológico descrito aquí cumple su función reparadora de tejidos una vez aplicado a nivel de la herida o del tejido con sangre, ya que la trombina está formada *in situ* por contacto del adhesivo biológico sobre la herida o sobre el tejido con sangre.

En efecto, esta formación de trombina *in situ* está asegurada por el factor VIIa que se pone por lo tanto puesto en contacto con todos los componentes plasmáticos que permiten el inicio y el desarrollo de la vía extrínseca o intrínseca de la coagulación. Como se explicó anteriormente, su actividad biológica depende de la interacción con los factores tisulares de naturaleza fosfolipídica endógenos. El complejo factor VII activado/factores tisulares en presencia de iones de calcio transforma el factor X presente en el plasma en factor X activado, el cual transforma la protrombina en trombina, enzima responsable de la formación del coágulo generando la fibrina en presencia de fibrinógeno.

Se produce entonces una fibrinoformación y, por lo tanto, el poder adhesivo del adhesivo biológico obtenido se encuentra reforzado, ya que la fibrina se forma entonces directamente a nivel de la herida o del tejido a reparar por cirugía, en el que los componentes celulares fosfolipídicos están expuestos.

A pesar de que el fibrinógeno y los iones de calcio estén ya presentes naturalmente en la sangre, su aportación permite reforzar y acelerar aún más el proceso de reunión tisular y de hemostasia por el adhesivo biológico, incluso con respecto a los adhesivos de la técnica anterior. Esto constituye una ventaja decisiva del presente adhesivo.

El adhesivo biológico descrito aquí presenta otras numerosas ventajas. Su puesta a disposición evita los inconvenientes de manipulación y preparación de los adhesivos biológicos de la técnica anterior, en particular en el caso de situaciones de urgencias, lo que mejora sus aptitudes de adhesivo tisular, en términos de dehiscencia y de ausencia de sangrados secundarios a nivel de la cicatriz en formación. Típicamente, el proceso de reunión puede realizarse eficazmente en menos de un minuto, por ejemplo en 30 s.

A título de ejemplo, el adhesivo descrito aquí evita la formación de "paquetes" o pilas de fibrina visible a nivel de una herida que se explicaría por un agarre no homogéneo del adhesivo, probablemente a causa de la fibrina formada antes de la adhesión, presentando la cicatriz formada además una línea limpia, con respecto a un adhesivo de duración igual obtenido utilizando, por ejemplo, un adhesivo biológico bi-componente a base, por un lado, de una mezcla de fibrinógeno y que contiene un factor XIII y, por otro lado, de una mezcla de trombina cálcica, para la cual no se observan los efectos anteriores.

Es simple de preparar y es de una estabilidad incrementada en el tiempo, en la medida en la que no se observa fibrinoformación durante 24 horas de incubación a 37°C. A título de ejemplo, es por lo tanto estable en forma líquida durante al menos 24 horas a temperatura ambiente, en particular 48 horas.

En el ámbito de la invención, cualquier fibrinógeno y FVIIa de la técnica anterior, preferentemente plasmática, convienen para realizar el adhesivo, con la condición no obstante que sean compatibles con los iones de calcio del adhesivo en forma líquida así obtenida, es decir que su puesta en contacto no genere la coagulación del fibrinógeno en fibrina, en particular 24 horas antes de su utilización. En efecto, los dos ingredientes activos, el fibrinógeno y el FVIIa, deben estar desprovistos, además de trombina (FIIa) residual, de factores de la coagulación tales que en presencia de iones de calcio se inicie la cascada de la coagulación intrínseca o extrínseca se. Tales factores de la coagulación representan el factor II (FII) y el FX y, preferentemente, los factores protombínicos (factores II, VII, IX y X).

A título de ejemplo, un contenido máximo aceptable en FII y FX en el fibrinógeno es de aproximadamente 0,1 UI/g de fibrinógeno para cada uno.

Preferentemente, el fibrinógeno y el FVIIa del adhesivo no provienen de un plasma preactivado.

El fibrinógeno, preferentemente asegurado de manera viral, puede prepararse mediante cualquier técnica de fraccionamiento plasmática conocida en la técnica anterior. Puede tratarse del procedimiento descrito en el documento EP 0 305 243 o también el realizado por la solicitante en la solicitud de patente FR 05 06640 según el cual se puede obtener un concentrado de fibrinógeno. Se puede también utilizar un fibrinógeno transgénico.

El factor XIII, preferentemente asegurado de manera viral, puede aislarse a partir del plasma mediante cualquier método desarrollado en la técnica anterior y podrá ventajosamente constituir la proteína que acompaña el fibrinógeno durante el fraccionamiento del plasma. Se prefiere, en este caso, utilizar el procedimiento descrito en la solicitud de patente FR 05 06640. Se puede también utilizar el factor XIII transgénico.

La preparación del factor VIIa, en particular en forma de un concentrado, preferentemente asegurado de manera viral, es también conocida. Se puede citar, a título de ejemplo, la patente EP 346 241. Se puede también utilizar el factor VIIa recombinante (que proviene de la compañía Novo) o transgénico.

Estos ingredientes activos deben, no obstante, responder a ciertos criterios de pureza, enunciados anteriormente, relativos a la presencia en particular de algunos otros factores plasmáticos.

Preferentemente, el adhesivo descrito aquí comprende además un factor XIII. Una aportación exógena de factor XIII favorece la reticulación de la red de fibrina y, en consecuencia, su poder coagulante y cicatrizante.

El factor XIII, en particular en forma de concentrado, preferentemente asegurado de manera viral, puede aislarse a partir del plasma mediante cualquier método desarrollado en la técnica anterior y podrá ventajosamente constituir la proteína acompañante del fibrinógeno durante el fraccionamiento del plasma. Se prefiere, en este caso, utilizar el procedimiento descrito en la solicitud de patente FR 05 06640. Se puede también utilizar el factor XIII transgénico.

El adhesivo descrito aquí puede fabricarse a escala industrial, gracias a la puesta a disposición de los dos ingredientes activos, el fibrinógeno y el FVIIa, y unos iones de calcio.

Preferentemente, El presente adhesivo está constituido de la única mezcla de fibrinógeno, de FVIIa y de iones de calcio.

Tal adhesivo exclusivamente constituido de estos tres componentes presenta la ventaja de necesitar solo dos ingredientes activos en el plano biológico, lo que limita en particular los costes de preparación a escala industrial del adhesivo gracias a la presencia de un número mínimo pero eficaz de componentes activos.

Los componentes constitutivos del adhesivo están presentes en unas cantidades eficaces que permiten al adhesivo responder a los objetivos terapéuticos buscados.

La solicitante ha observado no obstante que los mejores resultados en términos de efectos buscados mencionados anteriormente pueden obtenerse cuando los contenidos de los dos ingredientes activos y en iones de calcio están específicamente seleccionados.

Así, el adhesivo biológico comprende ventajosamente fibrinógeno en una cantidad comprendida entre 60 y 120 mg/ml, de manera más preferida de 80 a 100 mg/ml. Tal contenido en fibrinógeno en el adhesivo asegura un adhesivo al menos tan eficaz, por ejemplo de tejidos lesionados, que se traduce por una resistencia al arranque del adhesivo al menos tan satisfactoria, en particular como los adhesivos de la técnica anterior bi-componente, tal que superior o igual a 125 g/cm².

Comprende en particular de 50 a 500 UI/ml, de manera más preferida de 70 a 300 UI/ml, en particular entre 80 y 120 UI/ml de factor VIIa y entre 4 y 30 μ mol/ml, de manera más preferida, entre 8 y 20 μ mol/ml de la fuente de iones de calcio.

En particular, el factor XIII está presente a razón de 30 UI/ml a 700 UI/ml, preferentemente de 100 UI/ml a 400 UI/ml.

Las concentraciones y actividades son por mililitro de solución líquida final de adhesivo biológico. Tal solución puede obtenerse en particular por reconstitución de los componentes liofilizados. Como se ha indicado anteriormente, estos factores plasmáticos presentes preferentemente a tales concentraciones aseguran las funcionalidades buscadas para el presente adhesivo biológico.

Las fuentes de iones de calcio representan unos componentes hidrosolubles, compatibles con un uso clínico. Preferentemente, estos componentes son unas sales inorgánicas, tales como el cloruro de calcio (CaCl₂) o el gluconato de calcio.

Como se ha indicado anteriormente, el adhesivo biológico descrito aquí está listo para usar y comprende una mezcla homogénea de todos los componentes en forma líquida. Puede también presentarse en forma congelada, lo que la hace apta para un almacenamiento prolongado en esta forma al menos durante 2 años, sin riesgo de una fibrinofórmación, que sería observada, llegado el caso, después de la descongelación. Basta una simple vuelta a temperatura ambiente para que el adhesivo pueda utilizarse.

La solicitud describe también un adhesivo biológico de uso terapéutico, libre de trombina, a base de fibrinógeno, que comprende un factor VIIa y una fuente de iones de calcio, tales como se han definido anteriormente, que se presenta

- en forma liofilizada, apta para un almacenamiento prolongado. Puede obtenerse mediante la realización técnica de liofilización conocidas del adhesivo en forma líquida. La puesta a disposición de tal presentación del adhesivo presenta la ventaja decisiva de necesitar sólo una simple reconstitución del liofilizado que comprende los dos ingredientes activos y la fuente de iones de calcio en un disolvente o medio acuoso biológicamente compatible para obtener el adhesivo líquido estable, efectuándose esta preparación por adelantado en previsión de la utilización. Además, tal adhesivo liofilizado es muy fácilmente almacenable a temperatura ambiente durante al menos 2 años sin riesgo de una fibriniformación, que sería observada, llegado el caso, después de la reconstitución. Es fácilmente transportable hasta un sitio en el que un paciente requiere un uso de este adhesivo.
- La solicitud describe también un kit para la preparación del adhesivo biológico descrito aquí que comprende unos medios de envasado que comprende un lote de factor plasmático fibrinógeno liofilizado, un lote de factor plasmático FVIIa liofilizado, un lote de fuente de iones de calcio en forma de polvo y un disolvente acuoso.
- Tal kit que comprende en particular tres lotes diferentes, individuales, en forma seca, comprendiendo cada uno, en particular, unos componentes constitutivos del adhesivo descrito aquí, constituye en realidad un producto intermedio del cual será fácil después reunir y disolver los lotes en un disolventes o medio acuoso biológicamente compatible, tal como agua purificada para inyección (PPI), para la obtención del adhesivo biológico líquido estable descrito aquí, concentrado si fuese necesario, que puede después congelarse. La ventaja de poner a disposición tal kit es la posibilidad de un almacenamiento prolongado de los tres lotes de componentes diferentes al menos durante 2 años a temperatura ambiente, sin la observación de una fibriniformación después de la reconstitución, y la obtención del adhesivo biológico líquido y estable por simple disolución.
- Los medios de envasado constituyen en realidad unos medios que permiten almacenar en particular los componentes del adhesivo, preparar y distribuir el adhesivo antes de su utilización. Comprenden además ventajosamente, al menos un recipiente para al menos tres de los componentes diferentes del adhesivo, de los cuales, preferentemente, al menos uno para cada componente. Cada recipiente está destinado a recibir uno de los componentes que se disuelve después en el disolvente acuoso. Los recipientes pueden ser unos frascos de diversos materiales de tipo vidrio y polímeros biológicamente compatibles.
- Preferentemente, los medios de envasado pueden ser ventajosamente un recipiente único que contiene al menos los tres componentes. Tal acondicionamiento presenta la ventaja de que una simple disolución del conjunto proporciona directamente el adhesivo líquido listo para el uso.
- Ventajosamente, el kit comprende también un dispositivo de distribución del adhesivo líquido una vez preparado por disolución de los lotes anteriores con el disolvente acuoso. Tal dispositivo representa, por ejemplo, una jeringa de volumen apropiado en función de la dosis de adhesivo a suministrar que comprende una aguja fina, típicamente de diámetro inferior a 2 mm, en particular inferior a 1 mm, o bien un catéter clásico.
- Preferentemente, el kit anterior comprende un lote bicomponente de mezcla de los lotes de dichos factores plasmáticos liofilizados, y el lote de fuente de iones de calcio en forma de polvo. Este kit comprende por lo tanto, por un lado, un lote de mezcla liofilizada de los factores plasmáticos fibrinógenos y FVIIa de la invención y, por otro lado, un lote de la fuente de iones de calcio en forma de polvo, susceptible de estar también en forma de un liofilizado, que bastará simplemente reunir y mezclar con un medio acuoso, tal como agua PPI, antes de la utilización. En una variante el kit puede comprender un lote de mezcla liofilizado factores plasmáticos y, por otro lado, un lote de la fuente de iones de calcio en forma de solución acuosa.
- Preferentemente, el kit descrito aquí se caracteriza por el hecho de que cada lote de factor plasmático fibrinógeno o FVIIa liofilizado, o el lote bi-componente de la mezcla de dichos lotes de los factores plasmáticos liofilizados comprende unos constituyentes de una formulación estabilizante de liofilización farmacéuticamente aceptable. Es igualmente el caso para el adhesivo biológico liofilizado.
- En efecto, los diferentes liofilizados de los factores plasmáticos se obtienen por liofilización de los concentrados o soluciones líquidas de los factores plasmáticos o de cada uno de estos factores, según unas técnicas clásicamente utilizadas, que comprende ventajosamente, para este propósito, una formulación estabilizante de liofilización, tal como se describe en la solicitud de patente FR 04 02001 depositada por la solicitante. En este caso, la formulación estabilizante representa ventajosamente una mezcla de arginina, de al menos un aminoácido hidrófobo y de citrato trisódico y puede además añadirse glicina y/o lisina. Ventajosamente, las concentraciones en cada uno de los aditivos, por litro de concentrado de proteínas, son los siguientes:
- arginina, de 25 a 50 g/l y preferentemente de 35 a 45 g/l (en referencia a la patente US 5 399 670);
 - citrato trisódico, de 0,5 a aproximadamente 12 g/l;
 - leucina, isoleucina o sus mezclas, de 5 a 15 g/l y preferentemente de 9 a 11 g/l; y
 - glicina y/o lisina, cada una de 1 a 5 g/l y preferentemente cada una de 1,5 a 2,5 g/l.

La formulación estabilizante puede también, cuando se necesita, comprender unos adyuvantes estabilizantes conocidos en la técnica.

- 5 En consecuencia, la solicitud describe también la utilización del kit descrito aquí para la preparación de un adhesivo biológico líquido, después eventualmente congelado, por reconstitución de los tres lotes de dicho kit en un disolvente acuoso biológicamente compatible seguido, llegado el caso, de una congelación.

- 10 La solicitud describe también un adhesivo biológico tal como se ha descrito anteriormente, para su utilización como medicamento. En el caso en el que el adhesivo se almacena en forma congelada, bastará, previamente a la utilización, descongelar este. En el caso de un adhesivo liofilizado, la reconstitución en un disolvente acuoso biológicamente compatible permite utilizarlo para los efectos buscados.

- 15 El adhesivo biológico descrito aquí se utiliza por lo tanto para la preparación de un medicamento destinado a la hemostasia y/o la cicatrización de tejidos biológicos lesionados, tales como la piel o cualquier órgano susceptible de intervenciones quirúrgicas (bazo, hígado, pulmones, intestinos, etc.) que, como se ha explicado anteriormente, pueden representar los tejidos con sangre o las heridas hemorrágicas, de las cuales el sangrado puede incluso ser muy bajo en la medida en la que están presentes todos los factores necesarios para la cascada de la coagulación. El adhesivo puede utilizarse, en presencia de plasma, para la preparación de un medicamento destinado a tratar los tejidos lesionados, por ejemplo reunir estos tejidos, seleccionados del grupo constituido por el cartílago, el colágeno, el hueso y el polvo de hueso.

- 20 Además, en presencia de plasma, se utiliza también para la preparación de un medicamento destinado a reunir los biomateriales seleccionados del grupo constituido por los alginatos o el ácido poliláctico. La presencia de plasma es por lo tanto necesaria en algunos casos para la aportación exógena de los factores plasmáticos a fin de iniciar la cascada de la coagulación y, preferentemente, es un plasma compatible u autólogo. Esta aportación podrá efectuarse en particular en el marco de intervenciones quirúrgicas clásicas, en estomatología u odontología.

- 30 El tejido biológico puede también provenir de células cepas puestas en cultivo y diferenciadas.

- A pesar de que el adhesivo descrito aquí sea un medicamento, en particular un apósito para aplicación local, es decir para uso externo sobre una herida u otro como se ha descrito anteriormente, no se excluye que el medicamento pueda también ser una cápsula adaptada, gastroresistente o no, en la que el adhesivo biológico está en forma seca, e ingerida para el tratamiento de un sangrado digestivo.

- 35 La estabilidad de al menos 24 horas del adhesivo descrito aquí le permite quedarse fluido y por lo tanto poder utilizarse para la preparación de un medicamento destinado a embolizar los vasos sanguíneos nutritivos de una diana tumoral. Esto puede efectuarse ventajosamente por vía de inyección utilizando un catéter clásico hasta estas dianas tumorales para así "desechar" el tumor.

- 40 El adhesivo permite aportar una hemostasia a través de un sistema endoscópico utilizado en microcirugía (extracciones, biopsias, escisión de pólipos, etc.).

- 45 La fluidez del presente adhesivo, unida en particular a su estabilidad, hace posible su utilización a través de una aguja fina, típicamente de diámetro inferior a 1 mm, en particular inferior a 0,5 mm, para una aplicación en cirugía bajo microscopio, por ejemplo oftálmico.

El ejemplo siguiente ilustra la invención sin, no obstante, limitar su alcance.

- 50 Ejemplo

- Se preparan 2 ml de una muestra de adhesivo biológico de la invención (muestra A) que comprende fibrinógeno a una concentración de 80 mg/ml, 100 UI/ml de factor VIIa y 5 μ moles/ml de cloruro de calcio que son introducidos en una jeringa única.

- 55 Se prepara también una muestra B estándar de adhesivo biológico de la técnica anterior que comprende, por un lado, una mezcla B1 constituida de fibrinógeno a una concentración de 80 mg/ml y que contiene 100 UI/ml de factor XIII y, por otro lado, una mezcla B2 constituida de trombina cálcica a 500 UI/ml. Las mezclas B1 y B2 respectivas se introducen en dos jeringas distintas cuyos extremos están dispuestos para comprender una aguja única que permite así la reunión de las mezclas B1 y B2.

- 60 Un conejo anestesiado se somete a una laparotomía. El hígado está expuesto y se procede a una primera incisión del órgano a fin de provocar un sangrado sobre este corte. Después del tamponado del exceso de sangre por una compresa, se aplica inmediatamente la muestra B de adhesivo biológico sobre el corte inciso por expulsión simultánea del contenido de las dos jeringas por la aguja única que permite la preparación de una mezcla homogénea de B1 y B2. Los lados de la herida son mantenidos reunidos durante 30 segundos para el agarre del

adhesivo biológico.

5 Después de la cicatrización, se observa que la cicatriz obtenida presenta unas irregularidades y unos “paquetes” de fibrina visible. Estas pilas se deben a un agarre no homogéneo, probablemente debido a la fibrina formada antes de la adhesión.

10 Se efectúa una segunda incisión en otro sitio del hígado que se trata quirúrgicamente de la misma manera que anteriormente. La muestra A de adhesivo biológico según la invención, contenida en una sola jeringa, se aplica sobre el corte inciso y los lados de la herida se mantienen unidos durante 35 segundos para el agarre del adhesivo biológico.

15 Después de la cicatrización, se observa que la cicatriz obtenida presenta una línea clara y resiste bien al intento de dehiscencia. Ninguna traza de fibrina excedentaria es visible, lo que muestra que el exceso de adhesivo no ha coagulado en ausencia de herida operatoria y por lo tanto sin presencia de factores tisulares.

REIVINDICACIONES

1. Adhesivo biológico líquido monocompuesto, estable, es decir que no forma fibrina, durante 24 horas a 37°C, para uso terapéutico por aplicación local, libre de trombina, a base de fibrinógeno, que comprende un factor VIIa y una fuente de iones de calcio.
2. Adhesivo biológico según la reivindicación 1, constituido de la única mezcla de fibrinógeno, de FVIIa y de iones de calcio.
3. Adhesivo biológico según la reivindicación 1 o 2, que comprende una cantidad en fibrinógeno comprendida entre 60 y 120 mg/ml, ventajosamente comprendida entre 80 y 100 mg/ml, de solución líquida final de adhesivo biológico.
4. Adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 50 a 500 UI de factor VII activado por mililitro de solución líquida final de adhesivo biológico (50- 500 UI/ml), ventajosamente de 70 a 300 UI/ml, en particular de 80 a 120 UI/ml.
5. Adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la fuente de iones de calcio está en una concentración comprendida entre 4 y 30 μ moles/ml, ventajosamente entre 8 y 20 μ moles/ml, de solución líquida final de adhesivo biológico.
6. Adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, que comprende además un factor XIII.
7. Adhesivo biológico según la reivindicación 6, en el que el factor XIII está presente a razón de 100 UI a 400 UI por mililitro de solución final líquida de adhesivo biológico (100 UI/ml-400 UI/ml).
8. Adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 a 7, que se presenta en forma congelada, apto para un almacenamiento prolongada.
9. Adhesivo biológico para uso terapéutico por aplicación local, libre de trombina, a base de fibrinógeno, que comprende un factor VIIa y una fuente de iones de calcio, tales como se definen según una de las reivindicaciones 1 a 8, que se presenta en forma liofilizada, apto para un almacenamiento prolongado.
10. Adhesivo biológico según la reivindicación 9, que comprende además una mezcla de arginina, de al menos un aminoácido hidrófobo y de citrato trisódico.
11. Kit para la preparación del adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende unos medios de envasado que comprenden un lote de factor plasmático fibrinógeno liofilizado, un lote de factor plasmático FVIIa liofilizado, un lote de iones de calcio en forma de polvo y un disolvente acuoso.
12. Kit según la reivindicación 11, que comprende un lote bi-componente de mezcla de dichos lotes de los factores plasmáticos liofilizados, y el lote de fuente de iones de calcio en forma de polvo.
13. Kit según la reivindicación 11 o 12, en el que cada lote de factor plasmático fibrinógeno o FVIIa liofilizado, o el lote bi-componente de la mezcla de dichos lotes de los factores plasmáticos liofilizados comprende además una mezcla de arginina, de al menos un aminoácido hidrófobo y de citrato trisódico.
14. Utilización de un kit según una de las reivindicaciones 11 a 13 para la preparación de un adhesivo biológico tal como se define según una de las reivindicaciones 1 a 10 por reconstitución de los tres lotes de dicho kit en un disolvente acuoso biológicamente compatible seguida, llegado el caso, de una congelación.
15. Adhesivo biológico tal como se define según una de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización como medicamento.
16. Utilización del adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de un medicamento destinado a la hemostasia y/o la cicatrización de tejidos biológicos lesionados tales como los tejidos con sangre o las heridas hemorrágicas, por aplicación local.
17. Utilización según la reivindicación 16, en la que los tejidos lesionados son la piel o cualquier órgano susceptible de intervenciones quirúrgicas.
18. Utilización según la reivindicación 16 o 17, en la que dicho medicamento es un apósito para aplicación local o una cápsula en la que dicho adhesivo biológico está en forma seca.
19. Utilización del adhesivo biológico según una de las reivindicaciones 1 a 10, y de plasma, para la preparación de un medicamento para aplicación local destinado a:

- i) tratar los tejidos lesionados seleccionados del grupo constituido por el cartílago, el colágeno, el hueso y el polvo de;
 - ii) reunir los biomateriales seleccionados del grupo constituido por los alginatos o el ácido poliláctico; y/o
- 5 iii) embolizar los vasos sanguíneos nutritivos de una diana tumoral.