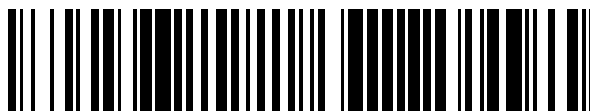


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 657**

51 Int. Cl.:

A61L 24/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2014** **PCT/IL2014/000063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015** **WO15097688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2014** **E 14831093 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 3086818**

54 Título: **Adhesivo de fibrina de un componente que comprende un inhibidor de la polimerización**

30 Prioridad:

24.12.2013 IL 23015113

24.12.2013 US 201361920646 P

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

04.03.2019

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (50.0%)

Bldg.14 Weizmann Science Park, P.O. Box 619

Rehovot 7610601, IL y

ETHICON, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

PILPEL, YAIR;

DEANGLIS, ASHLEY;

ZHERDEV, YURI;

DORON, SIVAN y

NUR, ISRAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 702 657 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).

DESCRIPCION

Adhesivo de fibrina de un componente que comprende un inhibidor de la polimerización

5 CAMPO DE LA INVENCION

En la presente se proporciona una formulación sellante líquida de un solo componente, métodos para su preparación, y tales formulaciones sellantes para su uso, entre otros, en hemostasis, sellado, curación y/o cirugía. En particular, en la presente se divulga una formulación sellante líquida que comprende monómeros de fibrina y un péptido GPRP, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las formulaciones muestran estabilidad y vida útil extendida y son útiles después del bloqueo, neutralización, dilución y/o eliminación del péptido.

ANTECEDENTES

Los sellantes de fibrina, también conocidos como adhesivo de fibrina, han estado en uso clínico durante décadas (ver, por ejemplo Tabélé, et al. J Pharm Pharmaceut Sci 2012, 15:124-140; Dickneite, G et al. Thrombosis Res 2003, 112:73-82). A menudo, los sellantes de fibrina consisten de dos componentes líquidos, un componente que comprende fibrinógeno y un componente que comprende trombina, que se almacenan congelados debido a su inestabilidad inherente. A veces, los productos sellantes de fibrina consisten de dos componentes liofilizados, que requieren reconstitución inmediatamente antes del uso y la administración mediante una jeringuilla conjunta u otro dispositivo de administración de doble barril. Las formulaciones liofilizadas son típicamente estables, pero el componente de fibrinógeno es difícil de reconstituir. Tras la mezcla de soluciones de dos componentes, la trombina escinde el fibrinógeno, permitiendo por tanto que el último genere polímeros de fibrina.

Un coágulo de sellante de fibrina se forma por reacciones enzimáticas que implican fibrinógeno, trombina y factor XIII. El fibrinógeno es la proteína precursora de la matriz de coágulos sanguíneos. Tiene un peso molecular de ~340,000 Daltons y consiste de 3 pares de cadenas polipeptídicas no idénticas, A α , B β y γ , enlazadas entre sí por enlaces disulfuro. El fibrinógeno tiene una estructura trinodular: dos dominios globulares D terminales idénticos y un dominio globular E central conectado por α -hélices superenrolladas. La trombina convierte el fibrinógeno en monómeros de fibrina por acción enzimática a una velocidad determinada por la concentración de trombina.

El factor XIII, una enzima del sistema de coagulación de la sangre, típicamente presente en la formulación del adhesivo, reticula y estabiliza el coágulo de fibrina cuando se activa por la trombina y en presencia de calcio. Este proceso pasa por alto la mayoría de los pasos de la coagulación normal e imita su última fase. Algunos fabricantes añaden agentes antiprotolíticos a la formulación de adhesivo de fibrina (por ejemplo, como se describe en la WO93/05822) o eliminan específicamente el plasminógeno para detener o retrasar la fibrinólisis (por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.792.835 y 7.125.569).

La técnica anterior incluye Laudano y Doolittle (PNAS 75(7):3085-9) y las Patentes de Estados Unidos N° 5.219.328; 5.318.524; 8.367.802; 6.268.483; 6.500.427; 5.723.579; 5.478.810; 5.607.858; 6.908.899 y 8.513.380.

La EP 0592242 A1 se refiere a un sellante de fibrina en el que se usa una composición que comprende monómeros de fibrina como un componente del sellante de fibrina. Un agente caotrópico, como urea o bromuro de sodio, se usa para prevenir la polimerización espontánea de los monómeros de fibrina. La EP 0592242 A1 enseña que la composición se conserva por congelación, liofilización o mantenimiento a 4° C.

SUMARIO DE LA INVENCION

La preparación de un sellante de fibrina antes de su uso requiere mucho tiempo y es engorrosa. Los sellantes comercializados consisten de dos componentes, un componente que comprende fibrinógeno y un componente que comprende trombina, que típicamente se suministran como polvos secos o líquidos congelados separados. El proceso para reconstituir los polvos lleva mucho tiempo debido a la solubilidad limitada del componente de fibrinógeno, y a menudo requiere calentamiento. Una vez reconstituidos o descongelados, los componentes se transfieren a dos jeringuillas separadas para su uso inmediato. Se conocen sellantes de un solo componente que requieren un manejo engorroso y/o tienen una vida útil corta.

En la presente se proporcionan formulaciones de sellantes estables de un solo componente que comprenden monómeros de fibrina y un péptido GPRP, métodos de fabricación y métodos de uso, que superan los inconvenientes de las formulaciones de productos sellantes, métodos de fabricación y/o métodos de uso conocidos.

En la presente se proporciona una formulación de sellante líquido que comprende monómeros de fibrina en una concentración del 1 al 13%, (p/v); y un péptido GPRP, en el que el péptido GPRP está presente en una cantidad que es mayor de 100 veces en exceso molar o mayor de aproximadamente 340 en exceso molar en relación a los monómeros de fibrina; y en el que la formulación líquida es estable durante por lo menos 14 días a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste en 20, 21, 22, 23, 24 y 25° C.

En una realización, la formulación líquida es estable hasta 90 días a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste de 20, 21, 22, 23, 24 y 25° C.

5 En una realización, la formulación líquida es estable durante un período de tiempo en el intervalo de 14 días y hasta 90 días a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste de 20, 21, 22, 23, 24 y 25° C.

10 En una realización, el péptido GPRP está presente en una cantidad mayor de 100 a aproximadamente 460 o mayor de 100 a aproximadamente 340, o de aproximadamente 340 a aproximadamente 460 veces en exceso molar con respecto a los monómeros de fibrina.

15 El término "monómeros de fibrina" como se usa en la presente incluye monómeros de fibrina, dímeros y oligómeros que tienen una serie de unidades de fibrina de tal manera que la fibrina se mantiene en forma soluble en una solución líquida acuosa a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste de 20, 21, 22, 23, 24 y 25° C.

En una realización, un oligómero contiene hasta 10 unidades de fibrina.

20 El término "polímero de fibrina" como se usa en la presente incluye una pluralidad de unidades de fibrina que tienen varias unidades de fibrina que limitan la solubilidad de la fibrina en una solución líquida acuosa a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste de 20, 21, 22, 23, 24, y 25° C.

En una realización, un polímero contiene más de 10 unidades de fibrina.

25 "Una temperatura ambiente" es la temperatura en el ambiente circundante de la formulación de fibrina.

30 En una realización, la formulación es estable durante un período de tiempo más largo cuando se mantiene a una temperatura más baja, por ejemplo, 2-8° C o congelada. Después de la descongelación, la formulación puede transferirse a una localización que tenga una temperatura ambiente de aproximadamente 20-25° C y permanecer estable durante por lo menos 14 días a esa temperatura. La formulación también puede ser estable a temperaturas distintas a las divulgadas específicamente con anterioridad.

35 En varias realizaciones, los monómeros de fibrina están presentes a una concentración del 1 al 4% (p/v) o del 3,5 al 13% (p/v).

En algunas realizaciones, la formulación comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

40 El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier diluyente o un vehículo que sea adecuado para uso humano o en otro animal.

En algunas realizaciones, la formulación está sustancialmente libre de trombina añadida. "Sustancialmente libre" se refiere a menos de aproximadamente una (1) UI de trombina por mililitro (U/ml) de formulación.

45 En algunas realizaciones, el péptido GPRP incluye un péptido, derivado o sal del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos del tetrapéptido Gly-Pro-Arg-Pro.

50 En algunas realizaciones, el péptido GPRP es un tetrapéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un derivado o sal del mismo.

En algunas realizaciones, el péptido GPRP es un tetrapéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un derivado o sal del mismo.

55 En varias realizaciones, el término "péptido GPRP" incluye un péptido seleccionado del grupo de péptidos que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:42 (SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:17; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39; SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:41; y SEQ ID NO:42;) o una sal del mismo.

60 En varias realizaciones, el péptido GPRP se selecciona del grupo de péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 42 o una sal de los mismos.

65

En varias realizaciones, el péptido GPRP se selecciona del grupo de péptidos que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 42 o una sal de los mismos.

En algunas realizaciones, el péptido GPRP es una amida peptídica GPRP.

En algunas realizaciones, la formulación comprende además factor XIII activado por trombina. La formulación puede incluir además un quelante de calcio. El quelante de calcio puede ser un ion de citrato, un ion de oxalato, EDTA, EGTA o una combinación de tales quelantes de calcio. En varias realizaciones, el quelante de calcio es un ion de citrato proporcionado, por ejemplo, como citrato de sodio. El citrato de sodio puede estar presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM. La formulación puede incluir EDTA y/o EGTA, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5 mM de EDTA y/o EGTA.

En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH neutro, por ejemplo, un pH de aproximadamente 6-8, o un pH de aproximadamente 6,5 a 7,5 o un pH de aproximadamente 6,7 a 7,2.

En algunas realizaciones, la formulación contiene un tampón. Típicamente, un tampón es un ingrediente que previene cambios radicales en el pH. En una realización, el tampón se selecciona del grupo que consiste de citrato de sodio, oxalato de sodio, acetato de sodio, glicina, arginina y combinaciones de los mismos.

La formulación puede usarse en hemostasis, curación, sellado y/o en cirugía, por ejemplo en sellado de tejidos, curación de heridas, curación de la duramadre, reemplazo de sutura o anastomosis.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un recipiente que contiene una formulación de sellante líquido como se divulga en la presente. En algunas realizaciones, el recipiente es una ampolla, un vial o una jeringuilla precargada que comprende la formulación. En algunas realizaciones, la formulación o los componentes individuales de la formulación están liofilizados. En la presente se proporciona un recipiente que contiene una formulación liofilizada que, tras reconstituirse, proporciona una formulación de sellante líquido como se divulga en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un kit, que incluye un recipiente que comprende una formulación de sellante líquido como se divulga en la presente, y opcionalmente un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas o dispositivo de eliminación G (y opcionalmente instrucciones de uso).

Un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas puede ser cualquier módulo que contenga una resina pre-equilibrada con una pequeña molécula permisiva para la polimerización de fibrina. Las moléculas pequeñas dentro de la formulación se intercambian por dicha molécula pequeña permisiva de la polimerización.

Típicamente, el intercambio de moléculas pequeñas es el reemplazo de por lo menos una molécula pequeña con por lo menos otra molécula pequeña. La resina en la columna está pre-equilibrada con una o más moléculas pequeñas que se desean en la formulación final y/o moléculas que permiten la polimerización de la fibrina. Las perlas de resina son típicamente porosas, estando los poros en el intervalo de pesos moleculares de los de las moléculas que van a reemplazarse.

En una realización, una formulación líquida que comprende los monómeros de fibrina y el péptido GPRP se pasa a través de una columna que está empaquetada con la resina porosa. Los monómeros de fibrina en la formulación serán demasiado grandes para introducirse en los poros de la resina y pasarán rápidamente a través de la columna. Sin estar limitado por el mecanismo, una molécula pequeña, por ejemplo, el péptido GPRP en la solución, recorrerá una trayectoria más tortuosa, ya que podrán entrar y volver a salir de los poros de la resina, reduciendo por tanto considerablemente su velocidad de migración a través de la resina. Sin desear estar ligados a la teoría, las moléculas pequeñas con las que la resina se ha pre-equilibrado tienen una ventaja importante, y por lo tanto salen de la resina junto con las proteínas (por ejemplo, monómeros de fibrina). Por tanto, el tampón, las sales y otras moléculas pequeñas, se intercambian en este paso.

En una realización antes y/o durante la aplicación de la formulación, el GPRP se diluye con respecto a los monómeros de fibrina y está en una proporción igual o inferior a 100 como en la proporción de 1-60, por ejemplo 3, 4, 11, 11,3, 17, 22,7, 23, 34, 45, 56,7 o 57.

La formulación en el recipiente o en el kit puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, se proporciona una formulación de sellante líquido para usar en la preparación de un sellante en una superficie que comprende:

- a) proporcionar una formulación de sellante líquido como se divulga en la presente; y
- b) aplicar la formulación a la superficie bajo condiciones que facilitan la polimerización de la fibrina en la

superficie.

En algunas realizaciones, la superficie es un órgano/tejido sangrante o no sangrante de un sujeto. Un sujeto incluye animales mamíferos, incluyendo humanos, y puede ser un paciente humano. En algunas realizaciones, el paciente humano es un paciente de cirugía.

Una "superficie" es una posición o localización donde uno desea formar el sellante o adhesivo. La superficie depende del uso del sellante. El sellante puede usarse, por ejemplo, en hemostasis, fijación de tejido, fijación de injertos, curación de heridas y anastomosis. Las formulaciones, los métodos y los kits divulgados en la presente pueden usarse interna y externamente, para la fijación de injertos de tejidos y órganos, para sellar una herida quirúrgica, en cirugía vascular que incluye hemostasis y para anastomosis como anastomosis arterial, gastrointestinal y traqueal.

La superficie puede ser una superficie externa de la piel que puede verse con visión sin ayuda y una superficie de una parte interna del cuerpo que es parte de la anatomía interna de un organismo. Las superficies externas incluyen, pero no están limitadas a, la piel de la cara, garganta, cuero cabelludo, pecho, espalda, orejas, cuello, mano, codo, cadera, rodilla y otros sitios de la piel. Los ejemplos de partes internas del cuerpo incluyen, pero no están limitadas a, cavidad corporal o abertura anatómica que están expuestas al ambiente externo y órganos internos como las fosas nasales; los labios; las oídos; el área genital, incluyendo el útero, la vagina y los ovarios; los pulmones; el ano; el bazo; el hígado; y el músculo cardíaco. La superficie puede ser un sitio de sangrado o no sangrado. La superficie también puede ser una superficie de trabajo.

En algunas realizaciones, las condiciones comprenden eliminar, bloquear, neutralizar y/o diluir el péptido GPRP. El péptido GPRP puede eliminarse o diluirse aplicando la formulación directamente a la superficie. Alternativamente, el péptido GPRP puede eliminarse o diluirse pasando la formulación a través de un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas. Además, puede eliminarse o diluirse pasando la formulación a través de un dispositivo de exclusión por tamaño y/o afinidad antes o durante la aplicación a la superficie. Otras opciones de eliminación o dilución incluyen la adición de fracciones complementarias de GPRP al dispositivo. Las fracciones complementarias en el dispositivo serían esencialmente un método de afinidad.

Alternativa o adicionalmente, el GPRP en la formulación podría neutralizarse y/o bloquearse añadiendo un péptido, por ejemplo, una fracción complementaria de un péptido GPRP o un anticuerpo capaz de desplazar el GPRP unido a la fibrina.

En otro aspecto adicional, se proporciona una formulación de sellante líquido para su uso en un método de curación, sellado y/o reducción de la pérdida de sangre en un sujeto con necesidad de ello, que comprende aplicar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de sellante líquido divulgada en la presente. La formulación se aplica al sujeto bajo condiciones que facilitan la polimerización de fibrina. En algunas realizaciones, las condiciones comprenden eliminar, bloquear, neutralizar y/o diluir el péptido GPRP.

El término "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la dosis requerida para prevenir, mejorar y/o tratar una enfermedad, trastorno o afección. La dosis eficaz puede cambiarse dependiendo de la edad y el peso del sujeto, la enfermedad o afección y su gravedad y otros factores que pueden ser reconocidos por los expertos en la técnica.

En otro aspecto, se proporciona una formulación de sellante líquido como se divulga en la presente para su uso en curación, sellado, reducción de la pérdida de sangre y/o cirugía.

En otro aspecto más, en la presente se proporciona un método para fabricar una formulación de sellante líquido como se divulga en la presente, que comprende:

- a) proporcionar un componente que comprende monómeros de fibrina;
- b) proporcionar un péptido GPRP o una sal del mismo;
- c) mezclar a) y b) para obtener la formulación de sellante líquido que comprende el GPRP en una cantidad que es mayor de 100 o mayor de por lo menos 340 veces en exceso molar con respecto a los monómeros de fibrina y la concentración de monómero de fibrina del 1 al 13% (w/v).

En cierta realización, la proporción es mayor de 100 a aproximadamente 460 o mayor de 100 a aproximadamente 340, o de aproximadamente 340 a aproximadamente 460 veces en exceso molar con respecto a los monómeros de fibrina.

El término "mezclar" significa mezclar los componentes en cualquier orden, cualquier combinación y/o sub-combinación.

Además, se proporciona una formulación de sellante líquido obtenible por el método.

Los monómeros de fibrina pueden obtenerse poniendo en contacto una solución que comprende fibrinógeno acuoso con trombina en condiciones que permiten la escisión del fibrinógeno a fibrina. En tal realización, la preparación de monómeros de fibrina es bajo condiciones en las que se inhibe la polimerización de fibrina, por ejemplo, en presencia de GPRP u otro agente de bloqueo de la polimerización de fibrina reversible. En una realización, la fibrina se obtiene a partir del fibrinógeno en condiciones que inhiben la polimerización (por ejemplo, disminuyendo la temperatura) y péptido GPRP se añade más adelante.

La trombina puede estar libre en solución o inmovilizada en perlas.

Si la trombina se inmoviliza en las perlas, por ejemplo, perlas en forma de lotes o en una columna y el componente de fibrinógeno se pasa a través de/se pone en contacto con las perlas, la formulación/componente resultante puede comprender cantidades residuales de trombina. En algunas realizaciones, la formulación está sustancialmente libre de trombina, por ejemplo, tiene menos de aproximadamente una (1) UI/ml de trombina.

En algunas realizaciones, la formulación/componente incluye Factor XIII activado por trombina.

Alternativamente, los monómeros de fibrina en las formulaciones pueden obtenerse poniendo en contacto una solución que comprende fibrinógeno acuosa con una enzima similar a la trombina en condiciones que permiten la escisión del fibrinógeno a fibrina. Ejemplos de tal enzima son enzimas de veneno de serpiente que escinden el fibrinopéptido A (FpA) como la Batroxobina. En tal realización, la preparación de monómeros de fibrina es en condiciones en las que se inhibe la polimerización de fibrina, por ejemplo, en presencia de GPRP u otro agente de bloqueo de la polimerización de fibrina reversible.

En algunas realizaciones, el componente/formulación de monómero de fibrina incluye además un quelante de calcio.

Además, se proporciona una formulación de sellante fabricada usando el método proporcionado en la presente.

El fibrinógeno puede prepararse a partir de la composición de sangre inicial. La composición de sangre puede ser sangre entera o fracciones de sangre, es decir, un producto de la sangre completa como el plasma. El fibrinógeno puede ser autólogo, humano, incluyendo plasma agrupado, o de fuente no humana. También es posible que el fibrinógeno se prepare por métodos recombinantes o pueda modificarse químicamente.

En una realización de la invención, la solución de fibrinógeno está compuesta de un componente biológicamente activo (BAC) que es una solución de proteínas derivadas de plasma sanguíneo que puede comprender además agentes antifibrinolíticos como ácido tranexámico y/o estabilizantes como arginina, lisina, sus sales farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos. El BAC puede derivarse de crioprecipitado, en particular crioprecipitado concentrado.

El término "crioprecipitado" se refiere a un componente sanguíneo que se obtiene a partir de plasma congelado preparado a partir de sangre total. Un crioprecipitado puede obtenerse cuando el plasma congelado se descongela en frío, típicamente a una temperatura de 0-4° C, lo que da como resultado la formación de un precipitado que contiene fibrinógeno y factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo, mediante centrifugación y disolverse en un tampón adecuado como un tampón que contiene cloruro de sodio 120 mM, cloruro de calcio 1 mM, citrato trisódico 10 mM, glicina 120 mM, clorhidrato de arginina 95 mM. La solución de BAC puede comprender factores adicionales como, por ejemplo, factor VIII, fibronectina, factor de von Willebrand (vWF), vitronectina, etc., por ejemplo, como se describe en la US 6.121.232 y la WO9833533. La composición de BAC puede comprender estabilizantes como ácido tranexámico y clorhidrato de arginina. La cantidad de ácido tranexámico en la solución de BAC puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/ml.

En otra realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC se reduce a igual o menos de 15 µg/ml como por ejemplo 5 µg/ml o menos de plasminógeno, por ejemplo, usando un método como el descrito en la US 7.125.569, la EP 1.390.485 y la WO02095019. En otra realización de la invención, cuando se reduce la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC, la composición no contiene ácido tranexámico o aprotinina.

La solución de fibrinógeno puede ser el componente BAC2 (de EVICEL®) o cualquier otra solución que contenga fibrinógeno, como fibrinógeno recombinante purificado o crioprecipitado producido a partir de plasma humano.

En una realización, la formulación es una solución completamente disuelta, por ejemplo, una solución cuyo soluto y solvente constituyen solo una fase, por ejemplo, una fase líquida.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de péptidos GPRP en el tiempo de polimerización de fibrina a una concentración fija de fibrina.

La Fig. 2A muestra una formulación líquida que comprende péptido GPRP y fibrina.

La Fig. 2B muestra que la polimerización de fibrina tuvo lugar después de la eliminación del péptido GPRP.

En esta realización, se eliminó el péptido GPRP sometiendo la formulación a un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de una formulación sellante estable que incluye monómeros de fibrina y un péptido GPRP a una cierta concentración, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente se proporcionan formulaciones de sellante líquido que comprenden monómeros de fibrina y un péptido GPRP a una cierta proporción molar, que superan las deficiencias de las formulaciones de sellante actualmente disponibles. Además, en la presente se proporcionan métodos de fabricación y métodos de uso de las formulaciones.

En la presente se proporciona una formulación de sellante líquido que comprende a) monómeros de fibrina; y b) un péptido GPRP. Los monómeros de fibrina están presentes a una concentración del 1% al 13% (peso por volumen (p/v)). En una realización, el péptido GPRP tiene la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP; SEQ ID NO:1), o sal del mismo, y está presente en una cantidad que es mayor que 100 veces el exceso molar con respecto a los monómeros de fibrina, mayor o igual a aproximadamente 340 veces el exceso molar o de aproximadamente 340 a aproximadamente 460 veces el exceso molar con respecto a los monómeros de fibrina.

En otra realización, el péptido GPRP comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Arg-Pro (SEQ ID NO:1) o Gly-Pro-Arg-Val (SEQ ID NO:23).

En varias realizaciones, el péptido GPRP se selecciona del grupo de péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO:2 - SEQ ID NO:42.

La estabilidad puede determinarse observando una polimerización espontánea o coagulación mínima o ausencia de ellas en la formulación, por ejemplo, la formulación no muestra o tiene polimerización espontánea o coagulación en presencia de péptido GPRP durante hasta 14 días, y conserva su nivel de actividad de coagulación tras la eliminación, dilución, bloqueo y/o neutralización de GPRP a un exceso molar igual o inferior a 100. El nivel de actividad de coagulación o la capacidad de la formulación para formar un sellante puede determinarse *in vitro* y/o *in vivo* usando métodos de coagulación conocidos en la técnica. La estabilidad también puede determinarse midiendo y observando la presencia de polímeros de fibrina o coágulos mínima o la ausencia de ellos en la formulación líquida lista para su almacenamiento.

En uso, el efecto GPRP puede reducirse, por ejemplo, mediante dilución a una concentración de acuerdo con el uso pretendido. Para la hemostasis será ventajoso obtener tiempos de coagulación que sean menores a un minuto. En una realización, la concentración de GPRP en la formulación se diluye a un exceso molar igual o inferior a 100 veces o a un exceso molar igual o inferior a 34 veces.

Para la fijación de injertos será ventajoso obtener tiempos de coagulación que sean de aproximadamente 15 minutos. En una realización, la concentración de GPRP en la formulación se diluye a un exceso molar igual o inferior a 100 veces o a un exceso molar igual o inferior a 56 veces.

Los términos "estable" y "estabilidad" cuando se refieren a la formulación de sellante líquida, significan una ausencia de polimerización de fibrina/coágulo de fibrina en la formulación antes de su aplicación a una superficie. Las formulaciones divulgadas en la presente son estables a una temperatura ambiente como se ha definido anteriormente durante por lo menos 14 (catorce) días.

La polimerización o coagulación de la fibrina puede medirse, por ejemplo, midiendo la longitud de la migración en una superficie inclinada (o modelo de prueba de caída) o mediante cualquier otro método conocido en la técnica. La polimerización completa puede evaluarse mediante el cese del flujo de la formulación líquida, por ejemplo, tras la inversión. La polimerización rápida se puede medir usando un analizador de coagulación Stat4 de Stago Diagnostics o un coagulómetro similar.

Para el almacenamiento a largo plazo, por ejemplo, 1 año o más a 2-8° C, la formulación, que comprende los monómeros de fibrina y el péptido GPRP, puede dividirse en alícuotas en viales, ampollas u otros recipientes estériles, que luego se sellan. En una realización, se usa un sello que permite la extracción de la formulación con una jeringuilla a través del sello. El contenedor se puede etiquetar de acuerdo con la práctica estándar en el campo de dispositivos farmacéuticos o médicos.

En uso, la formulación de sellante líquida puede aplicarse directamente desde el recipiente, puede pasarse a través de un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas o a través de un dispositivo de eliminación de GPRP (por ejemplo, un dispositivo de afinidad que tenga una fracción complementaria de GPRP); aunque el método de uso será determinado por el usuario (por ejemplo, un practicante médico, como un doctor, una enfermera o un médico), es decir, de acuerdo con las necesidades del paciente individual y la gravedad del sangrado o la afección.

Como se usa en la presente, los artículos indefinidos "un" y "una" significan "por lo menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usan en la presente, los términos "comprende", "incluye", "tiene" y las variantes gramaticales de los mismos deben entenderse que especifican las características, pasos o componentes indicados, pero no excluyen la adición de una o más características, pasos, componentes o grupos de los mismos adicionales.

Cuando un valor numérico está precedido por el término "aproximadamente", el término "aproximadamente" pretende indicar +/- 10%.

Como se usa en la presente, el término "péptido" se usa ampliamente para significar un compuesto aislado de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 aminoácidos consecutivos, o análogos de aminoácidos. Se incluyen dentro de la definición de péptido, por ejemplo, péptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos sintéticos, peptoides, etc.), péptidos con enlaces sustituidos, sales peptídicas, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural (por ejemplo, sintéticas). Por tanto, los péptidos sintéticos, péptidos ramificados, ciclados y similares, se incluyen dentro de la definición.

Por "péptido GPRP" se entiende un péptido de cuatro o más secuencias de aminoácidos consecutivas expuestas en la SEQ ID NO: 1, específicamente la secuencia Gly-Pro-Arg-Pro. Un péptido GPRP puede comprender un tetramero (GPRP, SEQ ID NO: 1), un derivado o análogo del mismo. Un péptido GPRP puede ser de 4 a 12 residuos de aminoácidos de longitud, o de 4 a 8, preferiblemente de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos.

Sin desear estar ligados por la teoría, un péptido GPRP es capaz de unirse a un monómero de fibrina, bloqueando de este modo la asociación y la polimerización de monómeros de fibrina. El péptido GPRP puede comprender, por ejemplo, una amida peptídica GPRP (amida en el extremo C terminal) divulgada en las patentes de Estados Unidos N° 5.478.810 y 5.607.858, que tiene la fórmula GPRP-X-N(R₁R₂) en donde G es el aminoácido glicina, P es el aminoácido L-prolina, R es el aminoácido L-arginina, X es un aminoácido proteinógeno distinto de prolina o es un dipéptido que incluye prolina, N es nitrógeno y R₁ y R₂ son iguales o diferentes y son hidrógeno o una cadena de alquilo inferior que tiene hasta 4 átomos de carbono. Otros péptidos de GPRP incluyen péptidos denominados "péptidos de control de fibrina" divulgados en la Patente de Estados Unidos N° 8.513.380I como un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GPRP (SEQ ID NO: 1), GPRV (SEQ ID NO: 2), o GHRP (SEQ ID NO: 3). El péptido GPRP puede tener la secuencia de aminoácidos GPRPX (SEQ ID NO:32), GPRVX (SEQ ID NO:33), GPRPXX (SEQ ID NO:34), GPRVXX (SEQ ID NO:35), GPRPXXX (SEQ ID NO:36), GPRVXXX (SEQ ID NO:37), GPRPXXXX (SEQ ID NO:38), o GPRVXXXX (SEQ ID NO:39), o GPRXXX (SEQ ID NO:40) donde X es cualquier aminoácido.

El péptido también puede tener un aminoácido C-terminal, como por ejemplo cisteína o lisina, que permite que las reacciones químicas posteriores con otros agentes produzcan conjugados C-terminales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal del péptido es una cisteína. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal del péptido es una lisina. Por ejemplo, el péptido GPRP puede tener la secuencia de aminoácidos GPRPAAC (SEQ ID NO: 25), GPRPFPAC (SEQ ID NO: 26), GPRPPER (SEQ ID NO: 27), GPRVVERC (SEQ ID NO: 28), GPRVVAAC (SEQ ID NO: 29), o GPSPAAC (SEQ ID NO: 30).

Cualquiera de las secuencias de péptidos expuestas en las SEQ ID NO: 1-42 puede ser una amida peptídica, por ejemplo, como se divulga en las patentes mencionadas anteriormente.

Los aminoácidos y las secuencias de péptidos se abrevian comúnmente como se muestra a continuación, en la Tabla A.

Tabla A: Abreviatura, nombres sistemáticos y fórmulas de aminoácidos comunes

Nombre	Símbolos/abreviaturas	Nombre sistemático	Fórmula
	3 ltr	1 ltr	
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropanoico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-5-guanidinopentanoico
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-amino-3-carbamoylpropanoico
Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminobutanodioico
Cisteína	Cys	C	Ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-amino-4-carbamoylbutanoico
Ácido glutámico	Glu	E	Ácido 2-aminopentanodioico
Glicina	Gly	G	Ácido aminoetanoico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-(1H-imidazol-4-il)propanoico
Isoleucina	Ile	I	2-amino-3-metilpentanoico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-amino-4-metilpentanoico
Lisina	Lys	K	Ácido 2,6-diaminohexanoico
Metionina	Met	M	2-amino-4-(metiltio)butanoico
Fenilalanina	Phe	F	Ácido 2-amino-3-fenilpropanoico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidina-2-carboxílico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxiopropanoico
Treonina	Thr	T	Ácido 2-amino-3-hidroxiбутanoico
Triptófano	Trp	W	Ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoico
Tirosina	Tyr	Y	Ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoico
Valina	Val	V	Ácido 2-amino-3-metilbutanoico

En una realización, se usa una secuencia análoga de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido en el péptido aislado está sustituido con un aminoácido análogo o bio-similar (sustitución conservadora), como se conoce en la técnica. Los aminoácidos pueden estar en forma de L o en forma de D.

La secuencia de aminoácidos de un péptido se escribe de acuerdo con la notación convencional, con un grupo amino (NH₂) en el extremo N-terminal apareciendo en el lado izquierdo de la secuencia y el grupo carboxilo (COOH) en el extremo C-terminal apareciendo en el lado derecho de la misma.

Los péptidos divulgados en la presente pueden formar una sal fisiológicamente aceptable por reacción de formación de sales convencional. Tales sales pueden incluir sales con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico; sales con ácidos orgánicos como ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico, ácido oleico y ácido palmítico; sales con hidróxidos y carbonatos de metales alcalinos y metales alcalinotérreos como sodio, potasio, calcio y aluminio; y sales con aminas como trietilamina, bencilamina, dietanolamina, t-butilamina, dicitlohexilamina y arginina.

Pueden formarse enlaces disulfuro tanto inter- como intra-catenarios y las formas peptídicas resultantes de la formación de dichos enlaces disulfuro están abarcadas por la presente invención.

En una realización, los péptidos divulgados en la presente se sintetizan químicamente. En otras realizaciones, los péptidos divulgados en la presente se producen *in vivo* o *ex vivo* mediante expresión de ADN recombinante en células huésped procariotas o eucariotas.

En algunas realizaciones, los péptidos GPRP se unen reversiblemente a la región C-terminal de la cadena de fibrina y fibrinógeno. Debe entenderse que una interacción preferencial no requiere necesariamente una

interacción entre residuos de aminoácidos específicos y/o motivos de cada péptido.

El término "sustancialmente libre de trombina" o "libre de trombina" se refiere a un componente o formulación que no tiene más de aproximadamente 1 (una) unidad de trombina por mililitro (ml) de formulación.

El término "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un componente o formulación divulgada en la presente requerida para formar un sellante, por ejemplo, para cubrir una superficie lesionada, para reducir el sangrado, para aumentar la curación, para mejorar una condición no deseada, etc.

Los portadores, solventes, diluyentes, excipientes y vehículos "farmacéuticamente aceptables" o "farmacológicamente aceptables" se refieren generalmente a cargas sólidas o líquidas no tóxicas inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los ingredientes activos de las composiciones divulgadas en la presente. Los excipientes aceptables incluyen, sin limitación, solución salina; ácido acético o acetato; e iones cloruro de sodio; manitol; albúmina; o combinaciones de los mismos.

Los péptidos divulgados en la presente se sintetizan de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, sintéticos (por ejemplo, sintetizando el péptido químicamente a partir de aminoácidos individuales) y métodos recombinantes (por ejemplo, sintetizando el ADN que codifica el péptido y utilizando el ADN para producir el péptido recombinante).

La síntesis química del péptido: un péptido divulgado en la presente y el ADN que codifica el péptido pueden sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para sintetizar el péptido se describen por Stuart y Young (1984), "Solid Phase Peptide Synthesis," Solid Phase Peptide Synthesis, Methods Enzymol., Segunda edición, Pierce Chemical Company, 289, Academic Press, Inc., NY (1997). Por ejemplo, puede usarse un método de síntesis en fase sólida o un método de síntesis en fase líquida. La síntesis en fase sólida se lleva a cabo habitualmente protegiendo grupos amino con grupos protectores apropiados. Por ejemplo, puede usarse Boc (terc-butoxicarbonilo) o Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo), o una combinación de los mismos. En un ejemplo, un péptido divulgado en la presente se sintetiza siguiendo los pasos: 1) un residuo de aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido a producir se une a un material en fase sólida insoluble a un solvente de reacción a través de un grupo a-COOH del aminoácido o se adquiere dicho material en fase sólida; 2) en la dirección hacia el extremo N-terminal del péptido, un fragmento de aminoácido o péptido correspondiente se une por condensación al aminoácido del paso 1) después de proteger otros grupos funcionales como un grupo a-amino del fragmento de aminoácido o péptido correspondiente distinto de un grupo a-COOH; 3) un grupo protector de un grupo amino que forma un enlace peptídico como un grupo a-amino se elimina del fragmento de aminoácido o péptido unido; 4) los pasos 2) y 3) se repiten para alargar una cadena peptídica para formar una cadena peptídica correspondiente al péptido deseado; 5) se separa la cadena peptídica producida del material en fase sólida y se eliminan los grupos protectores de los grupos funcionales protegidos; y 6) se purifica el péptido, obteniendo de este modo el péptido deseado.

Los materiales en fase sólida, así como los solventes y agentes de condensación, son bien conocidos en la técnica.

Síntesis química y expresión de ADN: el ADN que codifica un péptido divulgado en la presente puede replicarse y usarse para expresar péptidos recombinantes después de la inserción en una amplia variedad de células huésped en una amplia variedad de vectores de clonación y expresión. El huésped puede ser procariota o eucariota. El ADN puede sintetizarse químicamente. Hay disponibles métodos adecuados para sintetizar ADN y vectores de clonación (por ejemplo, para uso en células de mamíferos, insectos o plantas, bacterias, fagos y levaduras). El péptido recombinante, que puede expresarse en la forma de una proteína de fusión, se purifica por métodos conocidos en la técnica.

Aunque los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la invención, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención, sino más bien que contribuyen a una descripción completa de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Efecto de la concentración de péptido GPRP sobre el tiempo de polimerización de fibrina.

Para evaluar el efecto de la presencia de un péptido y su concentración sobre la velocidad de polimerización de los monómeros de fibrina, se incubó una mezcla de péptido GPRP:monómeros de fibrina y se midió el tiempo hasta que se formó un coágulo.

Se preparó una mezcla de péptido GPRP:monómeros de fibrina de la siguiente manera: se añadió péptido GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro; hecho a medida por Sigma; el péptido se suministró en forma liofilizada (250 mg) y se disolvió en dihidrato de citrato trisódico 100 mM; pH=7 creando GPRP 1M) a una solución de

fibrinógeno (solución BAC2 como en el sellante de fibrina EVICEL®). La concentración final de péptido en la solución se enumera en la Tabla 1 siguiente. La concentración final de fibrinógeno usada fue del 1%, 1,5%, 3%, 3,5%. Una solución de BAC2 [componente de fibrinógeno de EVICEL®] que contenía 7% de fibrinógeno coagulable se diluyó en un tampón de acetato de sodio 20 mM (acetato de Na), pH 7,0 para obtener las concentraciones finales enumeradas.

Para formar fibrina, se añadió trombina (como en el Adhesivo de Fibrina EVICEL®) a la solución de fibrinógeno a una concentración final de 10 UI/ml o 100 UI/ml y luego se registró el tiempo de coagulación. La coagulación se evaluó mediante el cese del flujo cuando se invertía el tubo.

La Tabla 1 proporciona un resumen del tiempo de coagulación por concentraciones finales de fibrina y péptido.

Se estimó que la concentración de monómero de fibrina era igual a la concentración de fibrinógeno.

Tabla 1: tiempo de coagulación como una función de concentración de fibrina y péptido.

EXPERIMENTOS A CORTO PLAZO		
Monómeros de fibrina al 1%		
Concentración de GPRP	Tiempo de coagulación	Veces de cambio (GPRP: fibrina)
0.1 mM	Inmediato	3.4
1 mM	<5 minutos	34
5 mM	4 horas	170
10 mM	7-8 días	340
Monómeros de fibrina al 3%		
Concentración de GPRP	Tiempo de coagulación	Veces de cambio (GPRP: fibrina)
0.1 mM	5 segundos	1.1
0.2 mM	7 segundos	2.3
0.5 mM	11 segundos	5.7
1mM	13 segundos	11.3
1.5 mM	22 segundos	17
2mM	28 segundos	22.7
3mM	2.5 minutos	34
4 mM	8 minutos	45
5 mM	15 minutos	56.7
EXPERIMENTOS A LARGO PLAZO		
Monómeros de fibrina al 1.5%		
Concentración de GPRP	Tiempo de coagulación	Veces de cambio (GPRP: fibrina)
20mM	Sin coagulación (> 2 semanas)	453
Monómeros de fibrina al 3,5%		
Concentración de GPRP	Tiempo de coagulación	Veces de cambio (GPRP: fibrina)
40 mM	Sin coagulación (> 2 semanas)	389

Resultados de experimentos a corto plazo:

En general, a medida que se reducía la concentración de péptido GPRP, los monómeros de fibrina polimerizaron progresivamente a una velocidad más rápida. Por ejemplo, a fibrina al 1% y GPRP 0,1 mM (relación molar ~3,4:1 de GPRP:fibrina), se formó un coágulo de fibrina inmediatamente, a fibrina al 1% y GPRP 1 mM (relación molar ~34:1), se formó un coágulo en menos de 5 minutos. A fibrina al 1% y GPRP 5 mM (~170:1), la solución fue estable como un líquido durante 4 horas, y a fibrina al 1% y GPRP10 mM (~340:1), la solución fue estable como un líquido durante aproximadamente 7-8 días, pero se polimerizó para formar un sólido después de eso.

Resultados de experimentos a largo plazo:

A una concentración de fibrina del 1,5% y GPRP20 mM (~453:1), o del 3,5% de fibrina y GPRP 40 mM (~389:1), la solución fue estable y no formó un coágulo incluso después de 2 semanas a temperatura ambiente.

Estos experimentos muestran que una relación molar de 340:1 (GPRP: fibrina) dio como resultado ventajosamente la estabilización de la solución líquida durante aproximadamente 7-8 días.

Se observaron resultados similares con las dos concentraciones de trombina usadas.

Sin desear estar ligados a la teoría, este resultado indica que la trombina escindió la mayor parte o todo el fibrinógeno y que las diferencias en el tiempo de coagulación se relacionaron con las concentraciones de GPRP en relación a la fibrina.

En la Fig. 1 también se muestra la relación entre el tiempo de polimerización y la relación molar de GPRP:fibrina.

En este experimento, se usaron una concentración de fibrina fija (3%) y cantidades crecientes de GPRP (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM) para retrasar la polimerización. Todos estas (que tienen una proporción de como máximo 57:1) están por debajo de la proporción mínima requerida para la estabilización a largo plazo de los monómeros de fibrina. La solución de GPRP:fibrina se preparó como se ha descrito anteriormente (añadiendo un péptido GPRP en una solución de fibrinógeno y añadiendo trombina a la mezcla de GPRP:fibrinógeno). Luego, el tiempo de coagulación se registró como anteriormente.

La Fig. 1 muestra que hay una correlación logarítmica entre la velocidad de polimerización de fibrina y la relación molar de péptido GPRP a fibrina.

Esto indica que la velocidad de formación del coágulo de fibrina se puede controlar ajustando la concentración del péptido GPRP dentro de la solución y que la dilución del péptido GPRP incluso en una pequeña cantidad afectaría la velocidad de polimerización de la fibrina.

Además, la correlación definida permite, en algunas realizaciones, el control de la velocidad de polimerización mediante el control de la concentración del péptido GPRP final después de la aplicación (por ejemplo, a través de un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas).

EJEMPLO 2: Formación de coágulos de fibrina a partir de una solución que comprende fibrina y GPRP usando un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas.

El siguiente ejemplo está dirigido a mostrar que el inicio y/o la aceleración de la formación de coágulos de fibrina puede lograrse usando un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas para diluir o eliminar el péptido GPRP de la solución.

Se preparó una mezcla que contenía una concentración de fibrina de aproximadamente el 3,8% y una concentración de péptido GPRP de péptido GPRP 41 mM (relación molar de ~366:1) como se ha descrito anteriormente (añadiendo un péptido GPRP en una solución de fibrinógeno al 3,8% y añadiendo trombina para escindir el fibrinógeno en fibrina). Se descubrió que esta relación molar era suficiente para mantener la formulación estable.

Se usó un dispositivo de intercambio de moléculas pequeñas comercial (columnas de giro GE PD-10; Código de producto: 17-0851-01, GE Healthcare) según el protocolo de giro estándar proporcionado con el dispositivo, para eliminar/diluir el péptido GPRP de la formulación de GPRP:monómero de fibrina. El dispositivo de intercambio se pre-equilibró con un tampón que incluía acetato de sodio 20 mM, pH 7,0; cloruro de calcio 25 mM. Se sometieron 2,5 ml de solución al procedimiento de intercambio de tampón y se evaluó la formación de coágulos de fibrina invirtiendo el tubo que contenía la mezcla intercambiada de tampón.

La formulación de intercambio de moléculas pequeñas se coaguló rápidamente (Fig. 2B) mientras que la solución que no se sometió al procedimiento de intercambio de tampón, se mantuvo en forma líquida (Fig. 2A).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Omrix Biopharmaceuticals Ltd. and Ethicon Inc.

PILPEL, Yair

ZHERDEV, Yuri

DORON, Sivan

DEANGLIS, Ashley

NUR, Israel

<120> ADHESIVO DE FIBRINA DE UN COMPONENTE QUE COMPRENDE UN INHIBIDOR DE LA POLIMERIZACION

	<130> ETH5784	
	<160> 42	
	<170> PatentIn versión 3.5	
5	<210> 1	
	<211> 4	
	<212> PRT	
10	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 1	
15		Gly Pro Arg Pro 1
	<210> 2	
20	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
25	<223> Péptido sintético	
	<400> 2	
30		Gly Pro Arg Pro Pro 1 5
	<210> 3	
	<211> 5	
	<212> PRT	
35	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
40	<400> 3	
		Gly Pro Arg Pro Ala 1 5
45	<210> 4	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
50	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 4	
55		Gly Pro Arg Pro Ser 1 5
	<210> 5	
60	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
65	<220>	

	<223> Péptido sintético	
	<400> 5	
5		Gly Pro Arg Pro Lys 1 5
10	<210> 6 <211> 5 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
15	<220> <223> Péptido sintético	
	<400> 6	
20		Gly Pro Arg Pro Phe 1 5
25	<210> 7 <211> 5 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
30	<220> <223> Péptido sintético	
	<400> 7	
35		Gly Pro Arg Pro Gly 1 5
40	<210> 8 <211> 5 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
45	<220> <223> Péptido sintético	
	<400> 8	
50		Gly Pro Arg Pro Trp 1 5
55	<210> 9 <211> 5 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
60	<220> <223> Péptido sintético	
	<400> 9	
65		Gly Pro Arg Pro Tyr 1 5
	<210> 10	

	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
5	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 10	
10		Gly Pro Arg Pro Val 1 5
	<210> 11	
15	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
20	<223> Péptido sintético	
	<400> 11	
25		Gly Pro Arg Pro Ile 1 5
	<210> 12	
	<211> 5	
	<212> PRT	
30	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
35	<400> 12	
		Gly Pro Arg Pro Asp 1 5
40	<210> 13	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
45	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 13	
50		Gly Pro Arg Pro Glu 1 5
	<210> 14	
	<211> 5	
55	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
60	<400> 14	
		Gly Pro Arg Pro Gly 1 5
65		

5	<210> 15 <211> 5 <212> PRT <213> ARTIFICIAL <220> <223> Péptido sintético <400> 15	Gly Pro Arg Pro Ser 1 5
15	<210> 16 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL <220> <223> Péptido sintético <400> 16	
25		Gly Pro Arg Pro Pro Pro 1 5
30	<210> 17 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL <220> <223> Péptido sintético <400> 17	
40		Gly Pro Arg Pro Gly Gly 1 5
45	<210> 18 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL <220> <223> Péptido sintético <400> 18	
55		Gly Pro Arg Pro Pro Arg 1 5
60	<210> 19 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL <220> <223> Péptido sintético	
65		

	<400> 19	
5		Gly Pro Arg Pro Arg Pro 1 5
	<210> 20 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
10	<220> <223> Péptido sintético	
	<400> 20	
15		Gly Pro Arg Pro Ala Gly 1 5
20	<210> 21 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
	<220> <223> Péptido sintético	
25	<400> 21	
30		Gly Pro Arg Pro Gly Gly 1 5
	<210> 22 <211> 5 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
35	<220> <223> Péptido sintético	
40	<400> 22	
		Gly Lys Arg Pro Gly 1 5
45	<210> 23 <211> 4 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
50	<220> <223> Péptido sintético	
	<400> 23	
55		Gly Lys Arg Val 1
	<210> 24 <211> 4 <212> PRT <213> ARTIFICIAL	
60	<220> <223> Péptido sintético	
65		

<400> 24

Gly His Arg Pro
1

5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

10

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 25

15

Gly Pro Arg Pro Ala Ala Cys
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

20

<220>
<223> Péptido sintético

25

<400> 26

30

Gly Pro Arg Pro Phe Pro Ala Cys
1 5

35

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

40

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 27

45

Gly Pro Arg Pro Pro Glu Arg Cys
1 5

50

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

55

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 28

60

Gly Pro Arg Val Val Glu Arg Cys
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT

65

	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
5	<400> 29	
10		Gly Pro Arg Val Val Ala Ala Cys 1 5
	<210> 30	
	<211> 7	
	<212> PRT	
15	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
20	<400> 30	
25		Gly Pro Ser Pro Ala Ala Cys 1 5
	<210> 31	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
30	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<400> 31	
35		Gly Pro Arg Pro Ala Ala 1 5
40	<210> 32	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
45	<223> Péptido sintético	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (5)..(5)	
50	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural	
	<400> 32	
55		Gly Pro Arg Pro Xaa 1 5
	<210> 33	
	<211> 5	
	<212> PRT	
60	<213> ARTIFICIAL	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<220>	
65	<221> característica miscelánea	

	<222> (5)..(5)
	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
5	<400> 33
	Gly Pro Arg Val Xaa 1 5
10	<210> 34 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL
15	<220> <223> Péptido sintético
20	<220> <221> característica miscelánea <222> (5)..(6) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
	<400> 34
25	Gly Pro Arg Pro Xaa Xaa 1 5
30	<210> 35 <211> 6 <212> PRT <213> ARTIFICIAL
35	<220> <223> Péptido sintético
40	<220> <221> característica miscelánea <222> (5)..(6) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
	<400> 35
45	Gly Pro Arg Val Xaa Xaa 1 5
50	<210> 36 <211> 7 <212> PRT <213> ARTIFICIAL
55	<220> <223> Péptido sintético
60	<220> <221> característica miscelánea <222> (5)..(7) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
	<400> 36
65	Gly Pro Arg Pro Xaa Xaa Xaa 1 5
	<210> 37 <211> 7

<212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 5 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (5)..(7)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 37

 15 Gly Pro Arg Val Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> Péptido sintético

 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (5)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 30 <400> 38

 Gly Pro Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

 35 <210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 40 <220>
 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> característica miscelánea
 45 <222> (5)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 39

 50 Gly Pro Arg Val Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 40
 55 <211> 6
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 60 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(6)
 65 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 40	
5	Gly Pro Arg Xaa Xaa Xaa 1 5
<210> 41	
<211> 7	
<212> PRT	
10	<213> ARTIFICIAL
<220>	
<223> Péptido sintético	
15	<220>
<221> característica miscelánea	
<222> (6)..(7)	
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural	
20	<400> 41
Gly Pro Arg Pro Phe Xaa Xaa 1 5	
25	<210> 42
<211> 7	
<212> PRT	
<213> ARTIFICIAL	
30	<220>
<223> Péptido sintético	
<220>	
<221> característica miscelánea	
35	<222> (6)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural	
<400> 42	
40	Gly Pro Arg Val Phe Xaa Xaa 1 5
45	
50	
55	
60	
65	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de sellante líquida que comprende monómeros de fibrina a una concentración del 1 al 13% (p/v) y un péptido GPRP; en la que el péptido GPRP está presente en la formulación en una cantidad que es mayor que 100 veces el exceso molar en relación a los monómeros de fibrina; y en la que la formulación líquida es estable durante por lo menos 14 días a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste de 20, 21, 22, 23, 24 y 25° C.
- 10 2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el péptido GPRP está presente en una cantidad mayor que 340 veces el exceso molar en relación a los monómeros de fibrina, opcionalmente en la que el péptido GPRP está presente en una cantidad de 340 a 460 veces en exceso molar en relación a los monómeros de fibrina.
- 15 3. La formulación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la formulación está libre de trombina añadida.
- 20 4. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además el factor XIII activado por trombina.
- 25 5. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un quelante de calcio, opcionalmente en la que el quelante de calcio es un ion de citrato, opcionalmente en la que el ion de citrato se proporciona por citrato de sodio.
- 30 6. La formulación de la reivindicación 5, que comprende de 1 mM a 50 mM de citrato de sodio.
- 35 7. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la formulación tiene un pH neutro.
- 40 8. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método de cirugía.
- 45 9. Un recipiente que comprende la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 50 10. Un kit que comprende el recipiente de la reivindicación 9 y, opcionalmente, instrucciones de uso.
- 55 11. Un método para fabricar una formulación de sellante líquida que comprende monómeros de fibrina a una concentración del 1 al 13% (p/v) y un péptido GPRP; en la que el péptido GPRP está presente en la formulación en una cantidad que es mayor que 100 veces el exceso molar en relación a los monómeros de fibrina; y en la que la formulación líquida es estable durante por lo menos 14 días a una temperatura ambiente seleccionada del grupo que consiste de 20, 21, 22, 23, 24 y 25° C, que comprende los pasos de:
 - a) proporcionar un componente que comprende monómeros de fibrina;
 - b) proporcionar un péptido GPRP, o una sal del mismo; y
 - c) mezclar a) y b) para obtener la formulación de sellante líquida.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en la que los monómeros de fibrina proporcionados se obtienen poniendo en contacto una solución de fibrinógeno acuosa con trombina o una enzima similar a trombina bajo condiciones que permiten la escisión del fibrinógeno.
- 65 13. El método de la reivindicación 11 o 12, en la que el componente de monómero de fibrina comprende Factor XIII activado por trombina.
- 70 14. El método de la reivindicación 11 o 12, en la que el componente de monómero de fibrina comprende un quelante de calcio.
- 75 15. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método de curación, sellado y/o reducción de la pérdida de sangre en un sujeto con necesidad de ello, el método comprendiendo aplicar al sujeto una cantidad eficaz de la formulación.

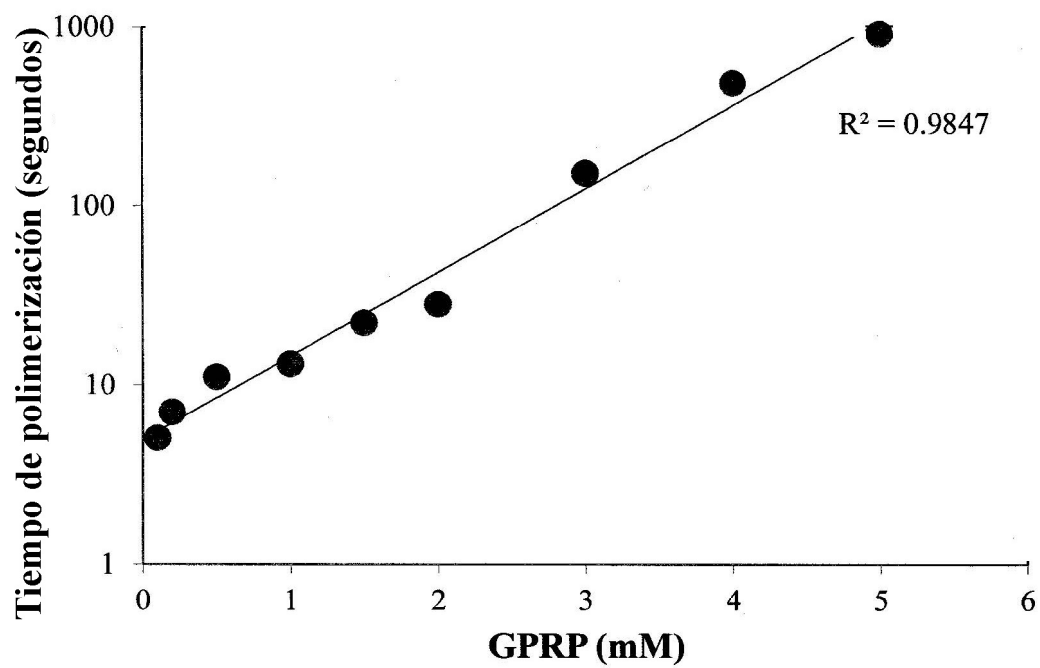


FIGURA 1

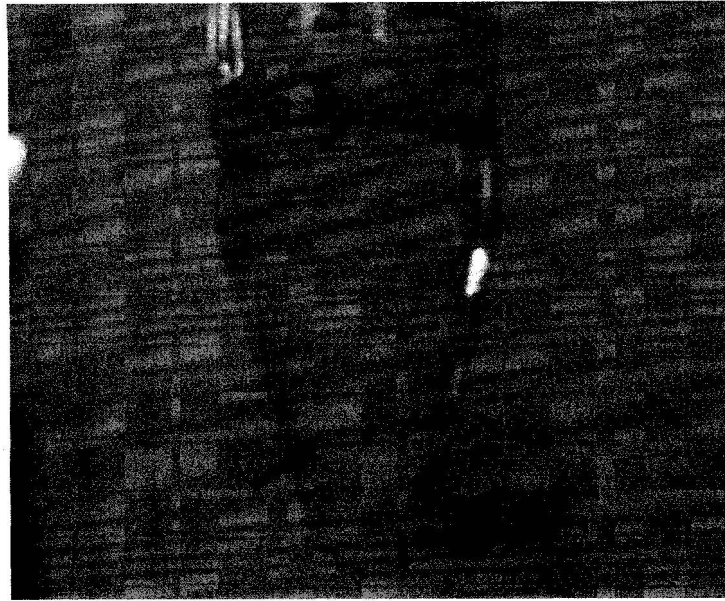


FIGURA 2A



FIGURA 2B