

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 656**

51 Int. Cl.:

**A61L 33/12** (2006.01)

**A61K 38/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2013 PCT/KR2013/000143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14092239**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 13862143 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2932989**

54 Título: **Adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina, y método para preparar el mismo**

30 Prioridad:

**11.12.2012 KR 20120143519**

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

**03.02.2020**

73 Titular/es:

**SEWONCELLONTEC CO., LTD. (100.0%)  
(Yeouido-dong) Hanguk HP building 83,  
Uisadang-daero, Yeongdeungpo-gu  
Seoul 150-724, KR**

72 Inventor/es:

**YOO, JI CHUL;  
YEO, SE KEN;  
KIM, JANG HOON;  
LEE, JUN KEUN;  
SUH, DONG SAM y  
CHANG, CHEONG HO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 739 656 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 tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina, y método para preparar el mismo

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición en la que se mezclan colágeno y fibrina, para su uso como adhesivo tisular, y a un método para preparar el mismo, y más específicamente, la presente invención es para complementar la resistencia y la degradabilidad, las cuales son indicativas de debilidades de un adhesivo de fibrina en el mercado. Es decir, la presente invención se refiere a un adhesivo tisular el cual, aunque tiene afinidad con las células, activa plaquetas contenidas en la sangre para inducir la regeneración tisular, y por tanto, puede mejorarse de manera significativa la calidad y la fiabilidad de los productos para satisfacer diversas necesidades de los consumidores que son usuarios.

### 15 **Antecedentes de la técnica**

Tal como se conoce generalmente, los adhesivos médicos se han aplicado a diversos campos que varían desde adherencia y unión quirúrgicas hasta hemostasis, y tienen una larga historia. Dado que un material adhesivo médico se aplica directamente a tejidos humanos, necesita utilizarse un material biocompatible. Dado que el material adhesivo médico puede fluir sustancialmente hacia el líquido corporal o la sangre, el material adhesivo médico necesita ser estrictamente biocompatible y biodegradable, puede estar esterilizado, y no debe mostrar toxicidad ni perjuicio. Además, es importante seleccionar un material adhesivo que tenga una afinidad alta con tejidos biológicos incluso después de aplicarse a los tejidos y por tanto no interfiera con la regeneración en tejidos originales.

Actualmente, se aplican cianoacrilato, poliuretano, gelatina, fibrina, o similares, como material adhesivo médico, a productos. Los adhesivos médicos se han utilizado generalmente en varios campos, tales como piel, vasos sanguíneos, órganos digestivos, nervios cerebrales, cirugía plástica, ortopedia, y similares. Dichos adhesivos requieren tener una resistencia adhesiva rápida en un ambiente de humedad, ser esterilizables y no tóxicos, y no interferir con propiedades mecánicas suficientes, biodegradabilidad, hemostasis eficaz, y curación del cuerpo en vista de la herida.

El cianoacrilato se utiliza principalmente para fines industriales, y se utiliza en no más del 5% para fines médicos. Sin embargo, dado que el cianoacrilato tiene la posibilidad de sustituir una sutura, están llevándose a cabo de manera activa estudios del mismo en, especialmente, países desarrollados. Sin embargo, el cianoacrilato es vulnerable al impacto, tiene deterioros en resistencia al calor y resistencia al agua después de aplicarse, y conserva la toxicidad y la vulnerabilidad para algunos tejidos, y por tanto, el cianoacrilato se utiliza actualmente de manera restrictiva.

El poliuretano es un material que mantiene la flexibilidad de una región de unión, y tiene ventajas en que el poliuretano se endurece rápidamente debido a la buena reactividad con agua, y el material endurecido mantiene su elasticidad. Por otro lado, el poliuretano tiene una desventaja en que el diisocianato aromático, el cual es un material de partida sintético, es biológicamente tóxico.

Un pegamento que utiliza gelatina es un adhesivo derivado biológicamente, y ejemplos del mismo son un producto en el cual la gelatina y el resorcinol se reticulan mediante formalina, y un producto que utiliza gelatina, ácido poliglutámico y carbodiimida. Estos productos pueden mostrar toxicidad al utilizar un agente de reticulación químico de formalina y carbodiimida. Los productos que emplean formalina como un agente de reticulación se han utilizado en algunos países, pero la licencia de los mismos está en curso y la efectividad de los mismos se está sometiendo a prueba en Japón y similares.

El pegamento de fibrina es un producto que se obtiene al aplicar el principio de formación de fibrina utilizando fibrinógeno, trombina, cloruro de calcio, y similares como materiales. El pegamento de fibrina tiene una adherencia rápida, no requiere calor o presión, no se ve afectado significativamente por el medioambiente de una región pegada, y conserva las ventajas biológicas de ser biocompatible y biodegradable. Sin embargo, el pegamento de fibrina tiene desventajas en que carece de propiedades físicas y tiene una tasa de biodegradación relativamente mayor cuando se compara con un adhesivo que utiliza un material sintético. Para superar dichas desventajas, están llevándose a cabo investigaciones en la inhibición en enzimas fibrinolíticas a través de la adición de aptotina para reducir la tasa de degradación de un polímero de fibrina y conservar una forma. El uso de colágeno como aditivo para complementar dichas desventajas hará una contribución significativa para complementar la formulación del pegamento de fibrina.

La fibrina utilizada para el pegamento de fibrina se aplica y comercializa como un adhesivo o hemostato natural, y tiene biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se conoce que la fibrina se absorbe generalmente en el procedimiento de cicatrización en el plazo de varias semanas y que no tiene efectos secundarios, tales como inflamación, respuestas inmunitarias, necrosis tisular o hipertrofia fibrilar. Además, la fibrina es un soporte natural para fibroblastos, y desempeña un papel importante en la cicatrización. El concepto de un producto de fibrina se estableció en la década de 1970. El primer producto se comercializó en Europa en 1982, y se ha utilizado hasta

ahora. Recientemente, se ha verificado la fibrina como un soporte para el diseño por ingeniería genética de tejidos biológicos en muchos estudios, y se ha aplicado en diversos campos, tales como ortopedia, odontología y neurocirugía.

5 El colágeno que puede utilizarse como aditivo para complementar las desventajas del pegamento de fibrina es un componente de proteína estructural. El colágeno constituye tejidos blandos, tales como dermis, tendón/ligamento, y vaso sanguíneo, y tejidos duros, tales como hueso y cartilago, y representa aproximadamente 1/3 del contenido de proteína de todo el cuerpo en mamíferos. Se conocen más de veinte tipos de colágeno, y el colágeno de tipo I que  
10 constituye la piel, el tendón/ligamento, el hueso, y similares representa aproximadamente el 90% del colágeno en el cuerpo. El colágeno es la proteína que está formada por tres hebras y tiene un peso molecular de 300.000 daltons (aproximadamente 100.000 daltons por cada hebra). En el colágeno, la glicina, que es la unidad de aminoácido más pequeña (que tiene el menor peso molecular), se conecta de manera repetida (-G X Y-; la glicina se repite de manera continua, y X e Y varían). Por tanto, la glicina representa aproximadamente 1/3 de los aminoácidos que constituyen el colágeno. El colágeno se ha utilizado actualmente con fines médicos en campos de hemostato, un  
15 agente de cobertura de heridas, vasos sanguíneos artificiales, mejora de las arrugas, y similares. En casos de hemostato, Aviten, que es un producto en polvo de colágeno extraído de la piel de becerro, se desarrolló por primera vez en 1974, y se ha utilizado hasta ahora.

20 Sobre todo, la característica más importante del colágeno utilizado en el campo de la regeneración médica es que el colágeno es un material que es biológicamente compatible en el tejido humano para mostrar una afinidad con células, y por tanto es importante en la adherencia y el crecimiento de las células y el mantenimiento de la viabilidad. Además, el colágeno estimula las plaquetas contenidas en la sangre para inducir factores de crecimiento contenidos en las plaquetas, regenerando así los tejidos dañados. Además, el colágeno tiene una estructura de triple hélice y su degradabilidad puede mantenerse relativamente en comparación con una estructura única de la proteína, y por tanto  
25 el colágeno puede servir como un almacén en el cuerpo.

Dicha unión de material puede conservar fundamentalmente las características biodegradables que el adhesivo tisular necesite tener y mantener las características de no interferir con regeneración. Además, dicho material de unión puede complementar las propiedades físicas de las que carece el pegamento de fibrina, y ralentizar la tasa de degradación, proporcionando así huesos de regeneración degradables. Por tanto, el adhesivo tisular promoverá la  
30 generación tisular y acelerará el procedimiento de regeneración para acortar el proceso de terapia, además de un papel como adhesivo simple. Además, para utilizar el adhesivo tisular de forma rápida, el adhesivo tisular puede ser una formulación que esté montada en un tipo precargado y almacenada congelada.

35 El adhesivo tisular es un producto que reduce la carga de un paciente en el procedimiento quirúrgico y maximiza la satisfacción en casos donde se sutura y se recubre una herida, tales como tener un riesgo de dolor e infección menor en comparación con los métodos convencionales y acortar el tiempo de operación. Por tanto, el adhesivo tisular estará altamente favorecido en este campo, y la escala de mercado se expandirá de manera gradual. Además, dicho producto ayuda a la generación de tejidos, y se utiliza como un sistema de administración de fármacos y un almacén para la regeneración, y contribuye así al campo médico regenerativo.  
40

El documento US 2012/0207736 A1 da a conocer una composición para la reparación de tejido cartilaginoso producida al disolver fibrinógeno liofilizado en una disolución de aprotinina, disolver trombina liofilizada en una disolución estabilizante, mezclar una disolución de colágeno enriquecida con trombina y la disolución estabilizante e  
45 instalar la disolución de fibrinógeno a un lado de un kit dual y la disolución que contiene el colágeno al otro lado, mezclando después las dos composiciones e inyectando en el tejido cartilaginoso dañado.

El documento US 2005/0118156 A1 da a conocer una composición de adhesivo de fibrina disponible instantáneamente y lista para utilizar preparada a partir de un componente de disolución de fibrinógeno acuoso en  
50 almacenamiento estable y un componente de trombina o similar activado.

El documento EP 099311 A2 da a conocer una composición hemostática que comprende trombina y colágeno microfibrilar en un medio acuoso.

## 55 Descripción detallada de la invención

### Problema técnico

60 (Documento de patente 1) Se ha archivado la publicación de patente coreana n.º 2012-0125465 (solicitud de patente n.º 2012-7018109, título: dry powder fibrin sealant).

Por tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas mencionados anteriormente, y la presente invención proporciona un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina, y un método para preparar el mismo, en la que un primer fin de la presente invención es incluir las etapas de: mezclar un primer material utilizando  
65 fibrinógeno y aprotinina; mezclar un segundo material utilizando trombina, cloruro de calcio y colágeno; y mezclar el primer material y el segundo material entre sí para preparar un tercer material; según un segundo fin de la presente

invención, se verificó que, como resultado de la comparación de resistencia física, un adhesivo que contiene colágeno mostró alta resistencia; según un tercer fin de la presente invención, se verificó que, como resultado de pruebas de degradabilidad a largo y corto plazo, un adhesivo que contiene colágeno mostró baja degradabilidad; según un cuarto fin de la presente invención, se verificó que, mediante observación por microscopía electrónica, se combinan colágeno y fibrinógeno para mostrar una estructura estable; según un quinto fin de la presente invención, se verificó que, como resultado de la comparación de crecimiento y viabilidad utilizando condrocitos, osteoblastos y células derivadas del tejido adiposo, una estructura que contiene colágeno mostró una buena tasa de crecimiento y un alta viabilidad; según un sexto fin de la presente invención, se verificó que la inclusión de colágeno mantiene una alta resistencia y una estructura estable y proporciona un material que tiene afinidades con células/sangre, ayudando mucho así a la regeneración de regiones delecionadas/dañadas; un séptimo fin de la presente invención es activar las plaquetas incluidas en la sangre para inducir la regeneración tisular; y un octavo fin de la presente invención es mejorar de manera significativa la calidad y la fiabilidad de los productos, satisfaciendo así diversas necesidades de consumidores que son usuarios, dando por tanto una buena impresión.

15 Solución técnica

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un adhesivo tisular tal como se define en la reivindicación 2.

20 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un adhesivo tisular tal como se define en la reivindicación 1.

Una realización preferida de la presente invención se refleja en la reivindicación 3.

25 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los productos de la presente invención para su uso en un método para tratamiento.

Efectos ventajosos

30 Tal como se estableció anteriormente, la presente invención incluye las etapas de: mezclar un primer material utilizando fibrinógeno y aprotinina; mezclar un segundo material utilizando trombina, cloruro de calcio y colágeno; y mezclar el primer material y el segundo material entre sí para preparar un tercer material.

35 Según la presente invención que tiene la característica técnica anterior, se verificó que, como resultado de la comparación de resistencia física, un adhesivo que contiene colágeno mostró alta resistencia.

Además, según la presente invención, se verificó que, como resultado de pruebas de degradabilidad a largo y corto plazo, un adhesivo que contiene colágeno mostró una baja degradabilidad.

40 Además, según la presente invención, se verificó que, mediante observación por microscopía electrónica, se combinan colágeno y fibrinógeno para mostrar una estructura estable.

45 Además, según la presente invención, se verificó que, como resultado de la comparación de crecimiento y de viabilidad utilizando condrocitos, osteoblastos y células derivadas del tejido adiposo, una estructura que contiene colágeno mostró una buena tasa de crecimiento y una alta viabilidad.

50 Además, según la presente invención, se verificó que la inclusión de colágeno mantiene una alta resistencia y una estructura estable y proporciona un material que tiene afinidades con células/sangre, ayudando mucho así a la regeneración de regiones delecionadas/dañadas.

Además, la presente invención es para activar las plaquetas incluidas en la sangre para inducir la regeneración tisular.

55 La presente invención puede mejorar de manera significativa la calidad y la fiabilidad de los productos a través de los efectos anteriores, satisfaciendo así diversas necesidades de consumidores como usuarios de los mismos, dando por tanto una buena impresión, y por tanto la presente invención es muy útil.

A continuación en el presente documento, se describirán en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención para alcanzar los efectos anteriormente mencionados con referencia a los dibujos adjuntos.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una imagen micrográfica electrónica de un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina según la presente invención (20.000 X, secado de punto crítico).

65 La figura 2 es un diagrama conceptual que muestra la unión de colágeno y una célula.

La figura 3 es un diagrama conceptual que muestra la activación de plaquetas en colágeno.

5 La figura 4 es una gráfica de comparación que muestra las tasas de degradación de adhesivos tisulares en los que se mezclan colágeno y fibrina.

La figura 5 es una gráfica que muestra las tasas de proliferación de condrocitos en adhesivos tisulares en los que se mezclan colágeno y fibrina.

10 La figura 6 ilustra imágenes que confirman la proliferación y la viabilidad de condrocitos en adhesivos tisulares en los que se mezclan colágeno y fibrina según la presente invención.

La figura 7 es una gráfica que muestra las tasas de proliferación de osteoblastos en adhesivos tisulares en los que se mezclan colágeno y fibrina.

15 La figura 8 ilustra imágenes que confirman la proliferación y la viabilidad de osteoblastos en adhesivos tisulares en los que se mezclan colágeno y fibrina según la presente invención.

20 La figura 9 ilustra imágenes que confirman la proliferación y la viabilidad de células derivadas del tejido adiposo en adhesivos tisulares en los que se mezclan colágeno y fibrina según la presente invención.

La figura 10 es un diagrama de un estado en el que un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina según la presente invención se carga en una jeringa de dos vías.

25 Modo para llevar a cabo la invención

Un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina y un método para preparar el mismo según la presente invención son tal como se muestran en las figuras de 1 a 10.

30 En las siguientes descripciones, cuando se determina que las descripciones detalladas de funciones o constituciones conocidas asociadas con la presente invención oscurecen la esencia de la presente invención, se omitirán las descripciones detalladas de las mismas.

35 Además, los términos que van a describirse después se definen en consideración de funciones en la presente invención, y por tanto, de las definiciones de los términos que van a interpretarse a lo largo de la presente memoria descriptiva, dado que los términos pueden interpretarse por la intención del productor o costumbre.

40 En primer lugar, la presente invención incluye una etapa de mezclar un primer material utilizando fibrinógeno y aprotinina.

Además, la presente invención incluye una etapa de mezclar un segundo material utilizando trombina, cloruro de calcio y colágeno.

45 Además, la presente invención incluye una etapa de mezclar el primer material y el segundo material entre sí para preparar un tercer material, y por tanto se prepara un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrinógeno.

Según la presente invención, el fibrinógeno tiene una concentración de 65-130 mg/ml y la aprotinina tiene una concentración de 1.000-3.000 kUI/ml.

50 La trombina tiene una concentración de 40-600 U/ml, el cloruro de calcio tiene una concentración de 4-140 mmol/l.

Menos de 65 mg/ml de fibrinógeno debilita la resistencia física, y más de 130 mg/ml de fibrinógeno conduce a la densificación de la estructura física, dando como resultado la reducción de los tamaños de poro, inhibiendo así la actividad celular, y por tanto la concentración de fibrinógeno es de 65-130 mg/ml.

55 Además, la concentración de la aprotinina es de 1.000-3.000 kUI/ml. Menos de 1.000 kUI/ml de aprotinina acelera la degradación de una composición, y más de 3.000 kUI/ml de aprotinina aumenta el riesgo de provocar anafilaxis, y por tanto la concentración de aprotinina es de 1.000-3.000 kUI/ml.

60 Además, la concentración de la trombina es de 40-600 U/ml. Menos de 40 U/ml de trombina debilita la resistencia física de una composición, y más de 60 U/ml de trombina conduce a la densificación de la estructura de la composición, la cual por tanto no tiene afinidad con células y aumenta rápidamente la tasa de gelificación, no sirviendo como adhesivo en una región aplicada, y por tanto, la concentración de la trombina es de 40-60 U/ml.

65 Además, la concentración de cloruro de calcio es de 4-140 mmol/l. Menos de 4 mmol/l de cloruro de calcio ralentiza demasiado la tasa de gelificación, y más de 140 mmol/l de cloruro de calcio puede tener una mala influencia en las

células debido a la alta presión osmótica, y por tanto la concentración de cloruro de calcio es de 4-140 mmol/l.

La concentración de colágeno es de 10-30 mg/ml.

5 Es decir, menos de 10 mg/ml de colágeno debilita la resistencia física, y más de 30 mg/ml tiene una mala influencia en la degradabilidad y una estructura estable, y no tiene afinidad con células y sangre, y por tanto la concentración de colágeno es de 10-30 mg/ml.

10 Mientras tanto, el método para preparar un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina según la presente invención se describirá específicamente tal como sigue.

En primer lugar, se lleva a cabo una etapa de preparar un primer material que incluye fibrinógeno y aprotinina.

15 Después de esto, se lleva a cabo una etapa de preparar un segundo material que incluye trombina, cloruro de calcio y colágeno.

20 Luego, se lleva a cabo una etapa de poner el primer material en un lado de una jeringa de dos vías y el segundo material en el otro lado de la jeringa de dos vías y luego mezclar el primer y el segundo material entre sí, y por tanto, se prepara un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina.

Según la presente invención, las disoluciones de aprotinina y de calcio se inyectan al fibrinógeno y a la trombina, respectivamente, y la trombina se mezcla con una disolución de colágeno, y luego las disoluciones resultantes se cargan en la jeringa de dos vías, preparando así un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina.

25 Según la presente invención, puede prepararse un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina, pasando por las respectivas etapas para preparar un adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina.

El adhesivo tisular en el que se mezclan colágeno y fibrina y el método para preparar el mismo según la presente invención se describirán dando ejemplos.

30 (Ejemplo 1)

Comparación de propiedades físicas entre la presente invención y la técnica anterior

35 Para verificar las propiedades físicas de la presente invención, se verificaron el estrés máximo, la resistencia del gel y la resistencia a la tracción utilizando un medidor de propiedad física.

1. Preparación de la muestra

40 1) En la técnica anterior, se utilizó el producto Greenplast (ejemplo comparativo).

45 2) Para los componentes de la presente invención, se disolvieron fibrinógeno y trombina secos de Greenplast en una disolución de aprotinina y se añadió una disolución de calcio a la misma, respectivamente. Aquí, se mezcló la disolución de trombina con una disolución de colágeno al 3%. Se cargaron las disoluciones resultantes en una jeringa de dos vías.

3) Para la medición de las propiedades físicas, se colocó cada muestra en un molde con forma cilíndrica ( $\Phi 12 \times 15$  mm) para fabricar una forma.

50 2. Medición de las propiedades físicas

1) Medidor de propiedad física: Reómetro (CR-500DX, reómetro de Sun scientific)

55 2) Elementos de prueba: estrés máximo (N), resistencia del gel (g-cm), resistencia a la tracción (g/cm<sup>2</sup>)

3) Condiciones de la prueba: distancia de entrada (7,5 mm), velocidad de la mesa (50 mm/min), estrés máximo (10 kg), adaptador (nº. 1  $\Phi 20$ mm)

3. Resultados de la prueba

60 [Tabla 1]

Clasificación	Estrés máximo N	Resistencia del gel g-cm	Resistencia a la tracción g/cm <sup>2</sup>
Presente invención	19,3	1212,9	2493,7

## ES 2 739 656 T3

Técnica anterior	13,4	831,7	1692,2
------------------	------	-------	--------

(Ejemplo 2)

5 Comparación de degradabilidad entre la presente invención y el producto de la técnica anterior (corto plazo/largo plazo)

Para verificar la degradabilidad de la composición de la presente invención, se comprobó la degradabilidad del producto de pegamento de fibrina y del material para un periodo predeterminado.

10 1. Degradabilidad (corto plazo)

1) Preparación de la muestra

- 15 • En la técnica anterior, se utilizó el producto de Greenplast (ejemplo comparativo).
- Para los componentes de la presente invención, se disolvieron fibrinógeno y trombina secos de Greenplast en una disolución de aprotinina y se añadió una disolución de calcio a la misma, respectivamente. Aquí, se mezcló la disolución de trombina con una disolución de colágeno al 3%. Se cargaron las disoluciones resultantes en una jeringa de dos vías.
- 20 • Para la medición de las propiedades físicas, se colocó cada muestra en un molde con forma cilíndrica ( $\Phi 8 \times 5$  mm) para fabricar una forma.

25 2) Condiciones de tratamiento para la verificación de degradabilidad

- Se confirmaron dos condiciones para el disolvente. Se confirmaron una condición de utilizar solo un medio DEME y una condición de utilizar un medio DMEM que contenía Liberase TM (la concentración de Liberase TM se fijó en 10 ug/ml).
- 30 • Se colocó la muestra en una placa de 12 pocillos, y se comprobó el aspecto de la degradación como un peso de residuo de la composición en la unidad de 2 horas durante 12 horas.

3) Resultados de la prueba

- 35 • Se verificó que, en la condición de degradación mediante el tratamiento con enzimas, se degradó más del 90% de la formulación de la técnica anterior en un plazo de 12 horas, y se mantuvo aproximadamente el 80% de la composición de la presente invención durante 12 horas. En la condición de DMED, no se comprobó la degradación durante 12 horas.

40 2. Degradabilidad (largo plazo)

1) Preparación de la muestra

- 45 • En la técnica anterior, se utilizó el producto de Greenplast (ejemplo comparativo).
- Para los componentes de la presente invención, se disolvieron fibrinógeno y trombina secos de Greenplast en una disolución de aprotinina y se añadió una disolución de calcio a la misma, respectivamente. Aquí, se mezcló la disolución de trombina con una disolución de colágeno al 3%. Se cargaron las disoluciones resultantes en una jeringa de dos vías.
- 50 • Para la medición de las propiedades físicas, se colocó cada muestra en un molde con forma cilíndrica ( $\Phi 12 \times 15$  mm) para fabricar una forma.

55 2) Condiciones de tratamiento para la verificación de degradabilidad

- Se utilizó DMEM para el disolvente, y se realizó la observación a simple vista a 37°C durante un mes.

3) Resultados de la prueba

- 60 • Se observó la composición de la presente invención durante un mes o más, pero la formulación de la técnica anterior se degradó en un plazo de tres semanas. Se verificó que el periodo de degradación de la composición de la presente invención fue más largo que el de la formulación de la técnica anterior.

(Ejemplo 3)

Análisis micrográfico electrónico de la presente invención

5 Se observó la estructura de la composición de la presente invención mediante un microscopio electrónico.

1. Preparación de la muestra

- 10
- Para la preparación de la composición, se prepararon una disolución de fibrinógeno de Greenplast y una disolución de trombina/disolución de calcio que contenía colágeno. La concentración de la disolución de colágeno fue del 3% (p/v).
  - Se aplicó cada disolución preparada a una jeringa de dos vías que va a dispensarse en cubetas para la observación por microscopio electrónico, y luego se gelificaron.
- 15

2. Métodos

- 20
- Se secó la composición de la presente invención al punto crítico, y luego se observó mediante un microscopio electrónico.
  - Se realizó el secado de punto crítico de la composición mediante tratamiento con alcohol en un secador de punto crítico (Hitachi, HCP-2).
  - Se cortó y se recubrió con oro la muestra para la observación por microscopía electrónica, y luego se observó mediante SEM (Hitachi, S3500).
  - Se realizó el análisis por microscopía electrónica con un aumento de 20.000.
- 25

3. Resultados de la prueba

30 Como resultado de observar en el microscopio electrónico con un aumento de 20.000, se verificó que el colágeno y la fibrina se reticulaban entre sí. También se observó la estructura fibrosa del colágeno. Puede anticiparse que dicho material de reticulación mejora las propiedades físicas.

35 (Ejemplo 4)

Prueba sobre la compatibilidad y el crecimiento celular de la presente invención (condrocitos)

40 Para verificar la proliferación y la viabilidad de condrocitos en la composición de la presente invención, se utilizaron el ensayo CCK-8 y la tinción con calceína-AM y EtD-1.

1. Células y composición

- 45
- Se utilizaron condrocitos de animales excluyendo los seres humanos. El número de células fue de 12.000.000 en el líquido de mezcla de la composición.
  - Para la composición, se mezcló Greenplast, el cual es el producto de pegamento de fibrina, con el 3% (según la invención) y el 6% (ejemplo comparativo) de colágeno, respectivamente.
- 50
- Se preparó la composición disolviendo fibrinógeno seco de Greenplast en 1 ml de una disolución que contenía condrocitos y mezclando la disolución de trombina/calcio con 1 ml de una disolución de colágeno con cada concentración.
  - Se utilizaron la disolución de fibrinógeno que contenía condrocitos y la disolución de trombina que contenía colágeno para preparar un total de 2 ml de disolución de colágeno-fibrina.
- 55
- Para el cultivo, se dispensó el componente de colágeno-fibrina preparado en una placa de 24 pocillos a 0,2 ml por cada pocillo, y se realizó la observación durante 20 días mientras se cambiaba el medio DMEM cada 2-3 días.
- 60

2. Ensayo CCK-8

- Se retiró el medio de cada pocillo (placa de 24 pocillos) que contenía un material cultivado.

- Se colocó 1 ml de un nuevo medio en cada pocillo.
- Se añadió un reactivo CCK-8 (Dojindo, CK04-11) en 100 ul para cada pocillo, que corresponde al 10% del volumen del medio, seguido por una reacción en un incubador con el 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas.
- Después de completarse la reacción, se leyó la absorbancia (450 nm) del líquido de reacción utilizando un lector de microplacas.
- Se verificó la proliferación celular para cada periodo de cultivo utilizando el valor de DO medido.

### 3. Tinción con calceína-AM y EtD-1

- Se preparó una disolución de trabajo al mezclar una disolución tampón con 2 µM y 4 µM de calceína AM y EtD-1 del kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD (Invitrogen, L3224), respectivamente.
- Se transfirió el material cultivado a una nueva placa de 24 pocillos, y luego se colocó en el mismo 1 ml de la disolución de trabajo, seguido por una reacción en la condición donde se bloquea la luz durante 20 minutos. Después de esto, se observaron las células vivas y las células muertas utilizando un microscopio de fluorescencia. Se observaron las células vivas en verde y se observaron las células muertas en rojo.

### 4. Resultados de la prueba

A. Ensayo CCK-8 (figura 5 en la que la fibrina y la fibrina-colágeno al 6% son ejemplos comparativos y la fibrina-colágeno al 3% es un ejemplo según la presente invención)

B. Tinción con calceína-AM y EtD-1 (figura 6)

(Ejemplo 5)

### Prueba sobre la biocompatibilidad celular de la presente invención (osteoblastos)

Para verificar la proliferación y la viabilidad de osteoblastos en la composición de la presente invención, se utilizaron el ensayo CCK-8 y la tinción con calceína-AM y EtD-1.

#### 1. Células y composición

- Se utilizaron osteoblastos de animales excluyendo los seres humanos. El número de células fue de 12.000.000 en el líquido de mezcla de la composición.
- Se configuró la composición mezclando Greenplast, el cual es el producto de pegamento de fibrina, con el 3% (según la invención) y el 6% (ejemplo comparativo) de colágeno, respectivamente.
- Se preparó la composición disolviendo fibrinógeno seco de Greenplast en 1 ml de una disolución que contenía condrocitos y mezclando la disolución de trombina/calcio con 1 ml de una disolución de colágeno con cada concentración.
- Se utilizaron la disolución de fibrinógeno que contenía osteoblastos y la disolución de trombina que contenía colágeno para preparar un total de 2 ml de disolución de colágeno-fibrina.
- Para el cultivo, se dispensó el componente de colágeno-fibrina preparado en una placa de 24 pocillos a 0,2 ml por cada pocillo, y se realizó la observación durante 20 días mientras se cambiaba el medio de  $\alpha$ -DMEM cada 2-3 días.

#### 2. Ensayo CCK-8

- Se retiró el medio que contenía el material cultivado de cada pocillo (placa de 24 pocillos).
- Se colocó 1 ml de un nuevo medio en cada pocillo.
- Se añadió un reactivo CCK-8 (Dojindo, CK04-11) en 100 ul para cada pocillo, que corresponde al 10% del volumen del medio, seguido por una reacción en un incubador con el 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas.
- Después de completarse la reacción, se leyó la absorbancia (450 nm) del líquido de reacción utilizando un

lector de microplacas.

- Se verificó la proliferación celular para cada periodo de cultivo utilizando el valor de DO medido.

5 3. Tinción con calceína-AM y EtD-1

- Se preparó una disolución de trabajo al mezclar una disolución tampón con 2  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{M}$  de calceína AM y EtD-1 del kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD (Invitrogen, L3224), respectivamente.

- 10
- Se transfirió el material cultivado a una nueva placa de 24 pocillos, y luego se colocó en el mismo 1 ml de la disolución de trabajo, seguido por una reacción en la condición donde se bloquea la luz durante 20 minutos. Después de esto, se observaron las células vivas y las células muertas utilizando un microscopio de fluorescencia.

15 4. Resultados de la prueba

A. Ensayo CCK-8 (figura 7 en la que la fibrina y la fibrina-colágeno al 6% son ejemplos comparativos y la fibrina-colágeno al 3% es un ejemplo según la presente invención)

20 B. Tinción con calceína-AM y EtD-1 (figura 8)

(Ejemplo 6)

Prueba sobre la biocompatibilidad celular de la presente invención (células derivadas del tejido adiposo)

25 Para verificar la proliferación y la viabilidad de células derivadas del tejido adiposo en la composición de la presente invención, se utilizaron el ensayo CCK-8 y la tinción con calceína-AM y EtD-1.

30 1. Células y composición

- Se utilizaron células derivadas del tejido adiposo. El número de células fue de 12.000.000 en el líquido de mezcla de la composición.
- Se configuró la composición mezclando Greenplast, el cual es el producto de pegamento de fibrina, con el 3% de colágeno, respectivamente.
- Se preparó la composición disolviendo fibrinógeno seco de Greenplast en 1 ml de una disolución que contenía células derivadas del tejido adiposo y mezclando la disolución de trombina/calcio con 1 ml de una disolución de colágeno con cada concentración.
- Se utilizaron la disolución de fibrinógeno que contenía células derivadas del tejido adiposo y la disolución de trombina que contenía colágeno para preparar un total de 2 ml de disolución de colágeno-fibrina.
- Para el cultivo, se dispensó el componente de colágeno-fibrina preparado en una placa de 24 pocillos a 0,2 ml por cada pocillo, y se realizó la observación durante 20 días mientras se cambiaba el medio DMEM cada 2-3 días.

35 2. Tinción con calceína-AM y EtD-1

- Se preparó una disolución de trabajo al mezclar una disolución tampón con 2  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{M}$  de calceína AM y EtD-1 del kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD Invitrogen, L3224), respectivamente.
- Se transfirió el material cultivado a una nueva placa de 24 pocillos, y luego se colocó en el mismo 1 ml de la disolución de trabajo, seguido por una reacción en la condición donde se bloquea la luz durante 20 minutos. Después de esto, se observaron las células vivas y las células muertas utilizando un microscopio de fluorescencia.

40 3. Resultados de la prueba

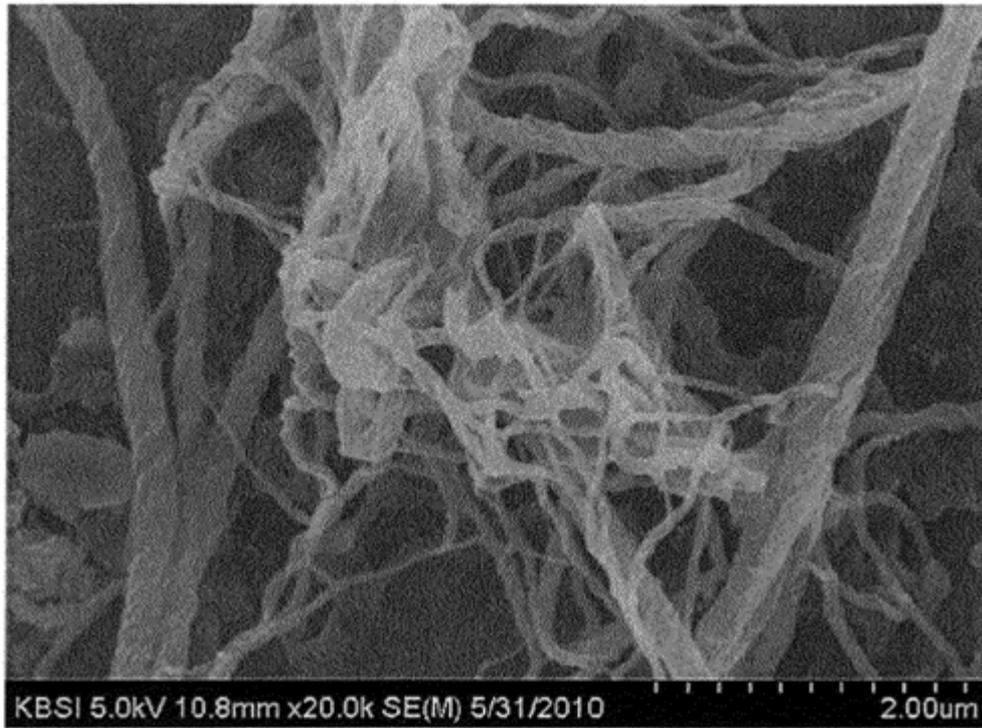
- Tinción con calceína-AM y EtD-1 (figura 9)

60

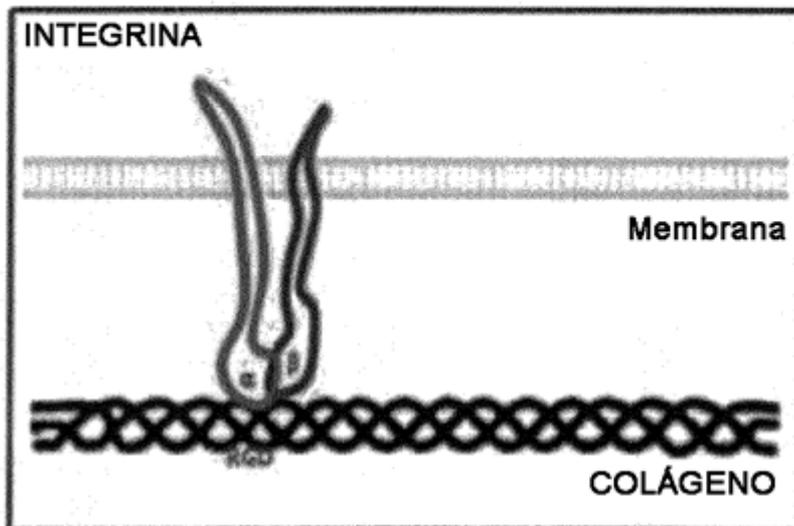
**REIVINDICACIONES**

1. Composición, en la que se mezclan colágeno y fibrina, para su uso como adhesivo tisular, en la que la composición se prepara
- 5 mezclando fibrinógeno y aprotinina para preparar un primer material;
- mezclando trombina, cloruro de calcio y colágeno para preparar un segundo material; y
- 10 mezclando el primer material y el segundo material entre sí para preparar un tercer material, y
- en la que el fibrinógeno tiene una concentración de 65-130 mg/ml, la aprotinina tiene una concentración de 1.000-3.000 kUI/ml, la trombina tiene una concentración de 40-600 U/ml,
- 15 el cloruro de calcio tiene una concentración de 4-140 mmol/l,
- y el colágeno tiene una concentración de 10-30 mg/ml.
2. Método para preparar una composición para su uso como adhesivo tisular, en la que se mezclan colágeno y fibrina, en el que el método comprende:
- 20 preparar un primer material que incluye fibrinógeno y aprotinina;
- preparar un segundo material que incluye trombina, cloruro de calcio y colágeno; y
- 25 poner el primer material en un lado de una jeringa de dos vías y el segundo material en el otro lado de la jeringa de dos vías, y luego mezclar el primer y el segundo material entre sí, y
- 30 en el que el fibrinógeno tiene una concentración de 65-130 mg/ml, la aprotinina tiene una concentración de 1.000-3.000 kUI/ml, la trombina tiene una concentración de 40-600 U/ml, el cloruro de calcio tiene una concentración de 4-140 mmol/l, y el colágeno tiene una concentración de 10-30 mg/ml.
3. Método según la reivindicación 2, en el que las disoluciones de aprotinina y de calcio se inyectan en el fibrinógeno y la trombina, respectivamente, y la trombina se mezcla con una disolución de colágeno, y las disoluciones resultantes luego se cargaron en la jeringa de dos vías.
- 35

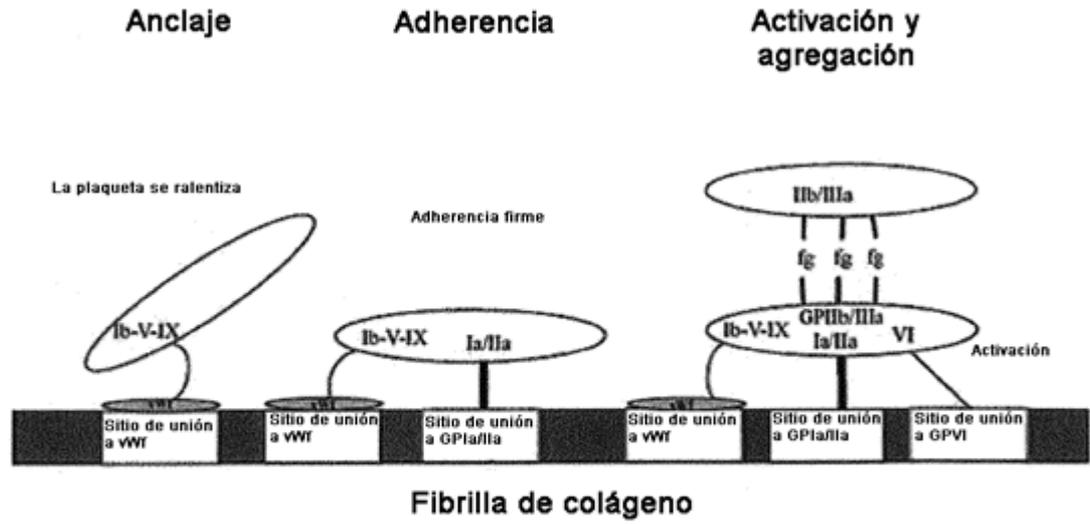
[Fig. 1]



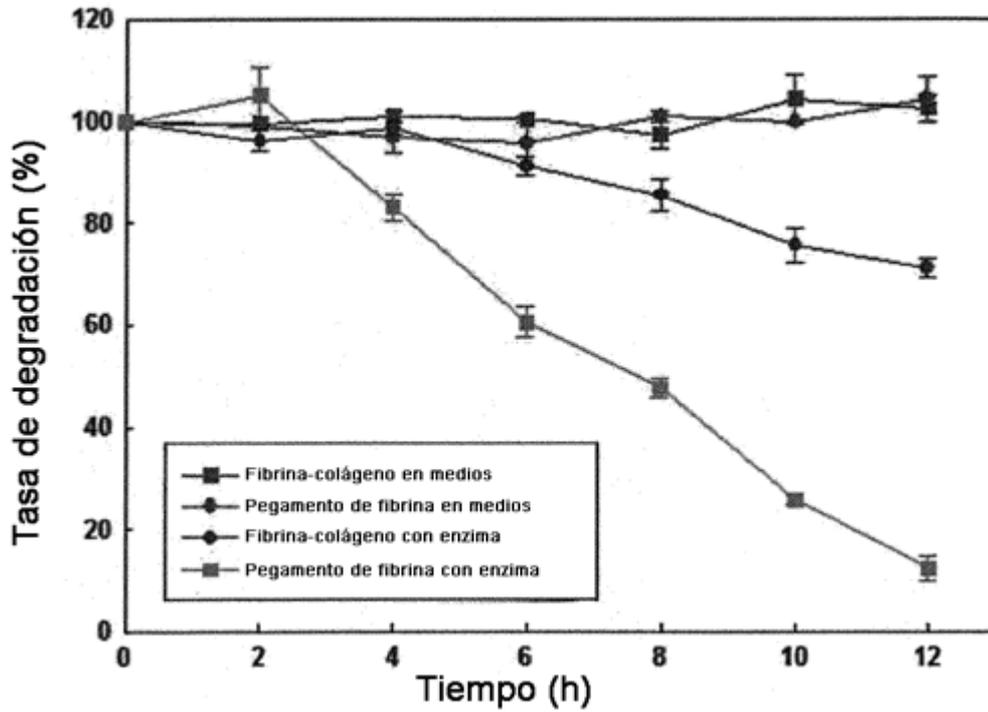
[Fig. 2]



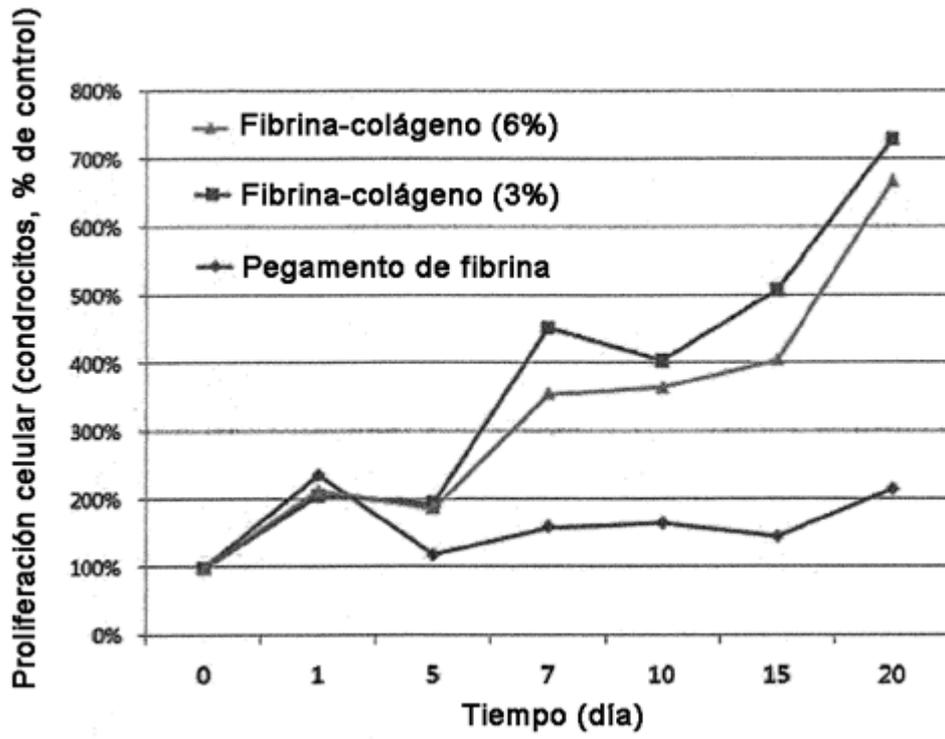
[Fig. 3]



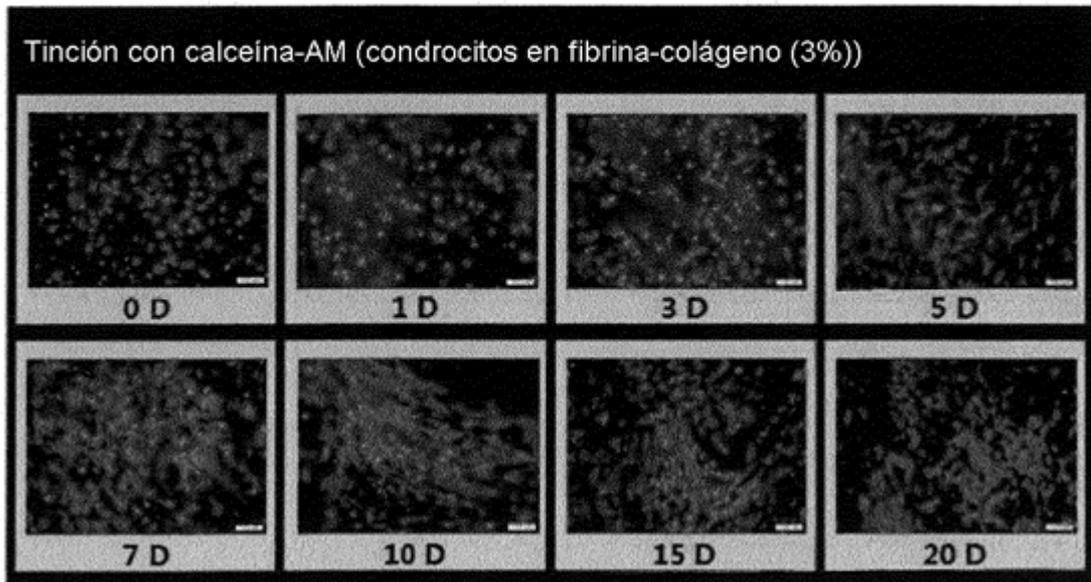
[Fig. 4]



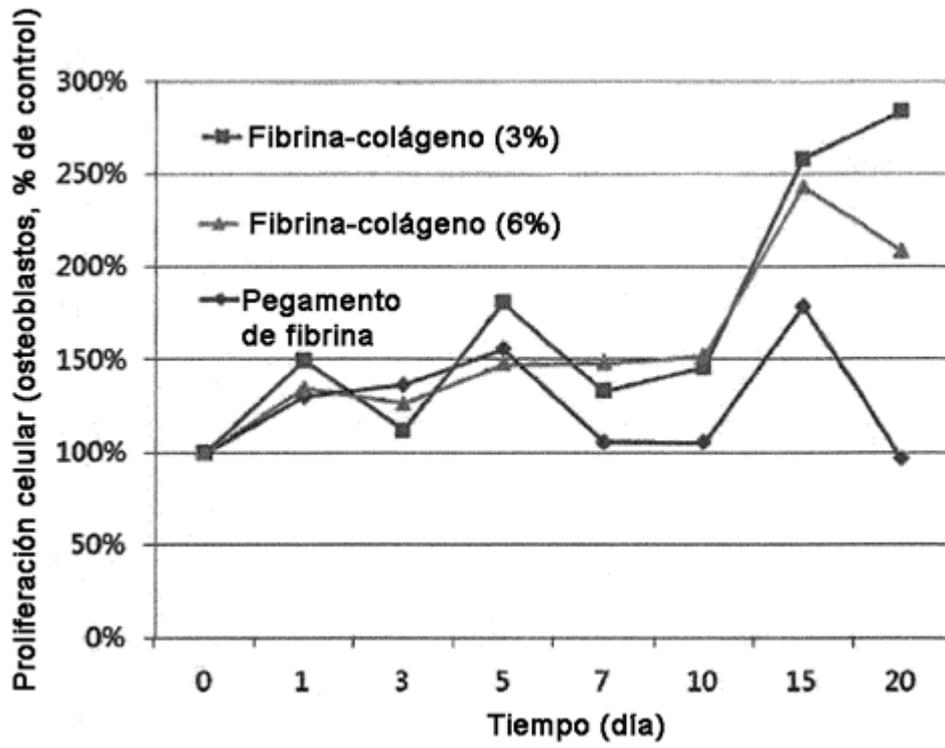
[Fig. 5]



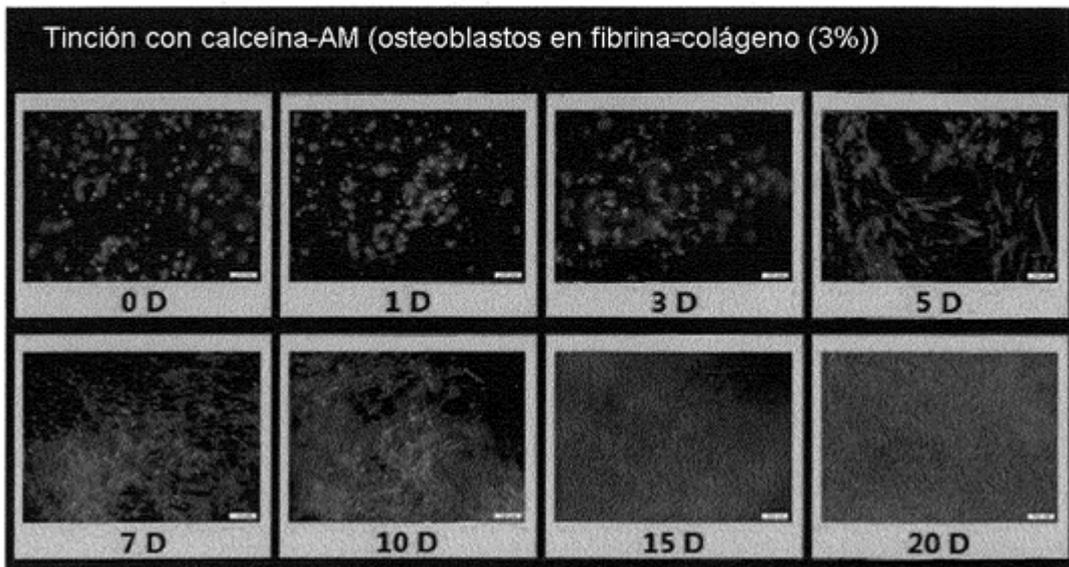
[Fig. 6]



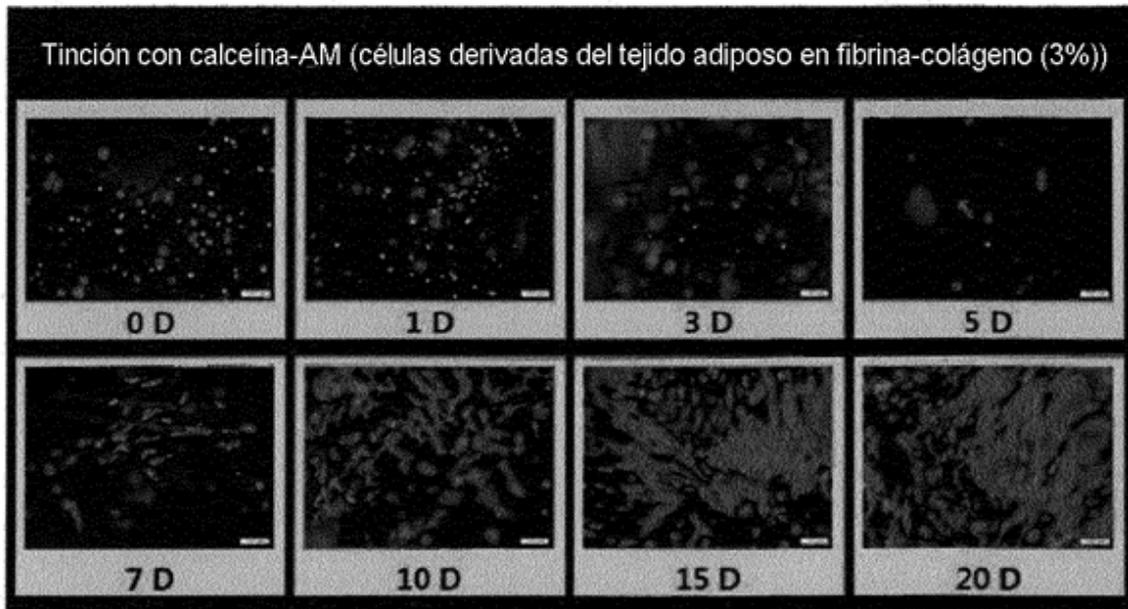
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

