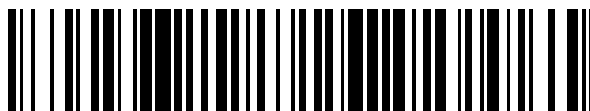


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 015**

51 Int. Cl.:

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2014** **PCT/IL2014/000055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015** **WO15079433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2014** **E 14802208 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019** **EP 3074055**

54 Título: **Almohadilla seca que comprende trombina y pectina**

30 Prioridad:

26.11.2013 IL 22964513

26.11.2013 US 201361908877 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2020

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Bldg. 14, Weizmann Science Park, PO Box 619
Rehovot 7610601, IL

72 Inventor/es:

ILAN, EREZ;
GURMAN, YOTAM;
EAVRI, RONEN y
DEKEL, ELYA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 741 015 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

Almohadilla seca que comprende trombina y pectina

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a una almohadilla de trombina-pectina y a la preparación de la misma.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La pectina es un polisacárido natural extraído de una sustancia vegetal. La pectina consiste principalmente en una cadena lineal de monómeros unidos de ácido D-galacturónico (GalA) unidos en cadenas por el enlace glucosídico alfa-(1-4). Estos monómeros GalA tienen una cadena lateral del grupo carboxilo esterificado (COOCH₃) que puede sustituirse por tres cadenas laterales diferentes: grupo carboxilo (COOH), grupos hidroxilo (OH), y grupos amino (NH₂) produciendo pectinas con características diferentes [Prade RA et al. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions Biotechnol Genet Eng Rev. 1999]. El tipo de cadena lateral está determinado por una reacción química, facilitada por enzimas específicas (basadas en la cadena lateral); y por las condiciones de la solución (por ejemplo, nivel de pH, presencia de sacáridos diferentes, composición de iones, etc.).

Hay dos tipos principales de pectinas: pectina de metoxilo alto (HM) y pectina de metoxilo bajo (LM). La distinción entre estos dos grupos se basa en la proporción entre los monómeros de GalA esterificados y los monómeros de GalA totales (referido como "Grado de esterificación"-DE). Típicamente, los valores de DE para pectinas HM comerciales varían del 60 al 75% y para pectinas LM del 20 al 40%.

La pectina se usa en la industria alimentaria, por ejemplo, como agente espesante y en la industria médica, por ejemplo, como material de recubrimiento de píldoras.

Propiedades de formación de gel de los dos tipos de pectinas:

La adición de agua al polvo de pectina HM bajo las siguientes condiciones da como resultado la formación de gel: un pH de aproximadamente 3, calor (una temperatura de 75-80° C) y la presencia de sólidos solubles, por ejemplo, polisacáridos a una concentración igual o superior al 65%. La adición de polisacáridos reduce la interacción pectina-agua y crea una interacción pectina-sacárido, contribuyendo de este modo a la actividad gelificante. Al contrario que las pectinas HM, las pectinas LM forman un gel en un intervalo de pH más amplio (2,5-6,5), y la formación del gel es independiente del contenido de polisacáridos y del nivel de temperatura. Las pectinas LM requieren la presencia de cationes divalentes (por ejemplo, calcio; aproximadamente 30-40 mg de calcio por 1 g de pectina) para la formación del gel apropiada. El mecanismo para la gelificación de pectina LM implica la formación de enlaces intramoleculares entre los grupos de cadena lateral hidroxilo y carboxilo. Esta estructura es referida como modelo de "caja de huevos", en la que el calcio se atrapa dentro de la estructura y se forma un gel más firme.

El tipo de pectina HM tiene un bajo contenido de grupos de cadena lateral carboxilo y carece de grupos de cadena lateral carboxilo cargados negativamente debido al pH ácido requerido para la formación de gel (el hidrógeno no se libera a pH ácido), por lo tanto, la adición del ion de calcio cargado positivamente no da como resultado la formación de gel ni la formación estérica de la estructura de "caja de huevos".

Varias publicaciones se refieren a composiciones que comprenden pectina con o sin trombina: la US 2012/0282320 se refiere a la composición de un polvo hemostático que puede utilizarse como un apósito para heridas para detener el sangrado. El polvo hemostático comprende una fracción de pectato de plata. De acuerdo con la descripción la pectina utilizada también debería ser modificable para que reaccione con sal de calcio soluble y produzca un pectato de calcio insoluble. Se ejemplifica una composición de un polvo hemostático que comprende un 2,3% de pectato de plata. La publicación indica explícitamente que el uso de un polvo hemostático en lugar de un apósito liofilizado es superior.

La US 7019191 divulga un apósito para heridas hemostático liofilizado que contiene un sustrato de tela y una matriz polimérica soluble en agua o hinchable en agua porosa dispuesta sobre y a través del sustrato y a métodos para elaborar tales apósitos para heridas hemostáticas. Los polisacáridos se enumeran como una posible opción de polímeros solubles en agua o hinchables en agua (entre 17 posibilidades); y la pectina se enumera como un posible polisacárido entre 35 polisacáridos posibles. Se menciona que el apósito puede llevar, por ejemplo, trombina, fibrinógeno y fibrina.

La GB 708148 se refiere a preparaciones hemostáticas y al proceso para su fabricación. Los inventores descubrieron que la adición de derivados de acridina básicos a las preparaciones de trombina aumenta la actividad de la trombina. La patente divulga pectina y derivados de pectina como una posible opción para incluir en una preparación de trombina. Se ejemplifica una preparación hemostática de una solución de pectina-trombina liofilizada. La preparación hemostática comprende un 10% de pectina.

La US 4265233 divulga un material de curación de heridas que tiene un Factor XIII de coagulación sanguínea fijado al mismo. Este material promueve la formación de fibrina estabilizada en un sitio de la herida. De acuerdo con la descripción, preferiblemente la trombina se fija al material junto con el factor XIII. El material está en la forma de un monofilamento, un conjunto fibroso, una película o una esponja. La pectina se menciona como una opción (de una lista enorme) que puede constituir la estructura. La patente se refiere a la unión del Factor XIII y la trombina a varias estructuras, por ejemplo, la estructura de pectina.

La US 4292972 se refiere a un producto de esponja de espuma liofilizada que tiene propiedades hemostáticas y adhesivas médicamente útiles formadas a partir de hidrocoloides, gelatina, pectina y carboximetilcelulosa sódica y que tiene una densidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10 gramos/cc. La gelatina está presente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80% en peso del producto final y la pectina y la carboximetilcelulosa sódica están presentes cada una de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50% en peso del producto final. El producto se prepara formando una dispersión coloidal acuosa de hidrocoloides, aireando o formando espuma, congelando, y liofilizando.

La US 2008/0260810 se refiere a un hemostato que comprende una espuma absorbible, una tela tejida o de punto absorbible, trombina y fibrinógeno. De acuerdo con la descripción, la espuma absorbible puede ser un polímero biocompatible, soluble en agua, o hinchable en agua. Los polímeros solubles en agua o hinchables en agua biocompatibles preferidos usados para fabricar la espuma incluyen polisacáridos. La pectina se menciona como un posible polisacárido entre una vasta lista de posibilidades. La aplicación ejemplifica una espuma que comprende carboximetilcelulosa (como un polímero soluble en agua, o hinchable en agua) y albúmina (como un agente espumante/surfactante) unida a una tela de celulosa regenerada oxidada, y trombina y fibrinógeno incorporados o rociados sobre la espuma.

La US 5688923 se refiere a una composición de fibra de pectina reticulada de catión polivalente compuesta por una pectina de metoxilo bajo (LM) sensible al calcio, útil para hacer apósitos para heridas para aplicaciones tópicas.

La trombina es una serina proteasa que cataliza la conversión de fibrinógeno soluble a fibrina insoluble. En la cirugía, a menudo, la trombina líquida sirve como un producto independiente para detener el sangrado mediante la conversión del fibrinógeno intrínseco en fibrina en un sitio de sangrado activo. Sin embargo, la trombina líquida puede lavarse del lugar del sangrado mediante la exudación de sangre y, por tanto, el uso de la trombina independiente puede ser menos eficaz. Para superar este problema y retener físicamente la trombina en el sitio de sangrado activo, puede usarse ventajosamente una almohadilla, una esponja o un parche que incluya la trombina.

Varias publicaciones describen el uso de una esponja de espuma seca formada a partir de una proteína de origen animal (por ejemplo, colágeno o gelatina) en combinación con trombina para uso hemostático. Sin embargo, la producción de esponjas de origen animal es un procedimiento costoso, mientras que la producción de una esponja a partir de una sustancia vegetal ahorra costos.

Además, las sustancias derivadas de animales pueden conllevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos, como virus.

La presente invención está dirigida a una almohadilla que supera estas y otras deficiencias en las almohadillas de la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

El alcance de la invención está definido 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 de tratamiento.

La invención se refiere a una almohadilla seca que comprende pectina, un catión divalente, por ejemplo, calcio y trombina y a su preparación. La densidad de pectina en la almohadilla seca de la invención varía de igual a o más de 10 mg/cm³ a menos de 70 mg/cm³ (igual o más del 1% a menos del 7% (p/v)). La almohadilla de acuerdo con la invención comprende pectina que tiene un bajo contenido de metoxilo (denominada en la presente como "pectina LM").

Ventajosamente, la almohadilla preparada de acuerdo con la invención es homogénea, tiene una alta capacidad de absorción de líquido/sangre, es maleable ya que puede manipularse fácilmente para adaptarse a la forma de un órgano del cuerpo sin romperse, muestra una adhesión aumentada al tejido objetivo, y puede mantenerse intacta durante la manipulación y el manejo. Debido a la maleabilidad o adaptabilidad de la almohadilla puede aplicarse en una amplia variedad de órganos que tienen diferentes estructuras y formas.

Es de destacar que la almohadilla preparada de acuerdo con la invención tiene propiedades adhesivas mejoradas. Puede usarse para promover la formación de fibrina en un sitio de sangrado y mejorar de este modo la

hemostasis (por ejemplo, por la acción de la trombina presente dentro de la almohadilla sobre el fibrinógeno originado de la sangre del paciente).

5 En una realización de la invención, la densidad de pectina dentro de la almohadilla seca es mayor que el 1% a menos del 7% (p/v).

En otra realización de la invención, la densidad de pectina dentro de la almohadilla seca es de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% (p/v).

10 En una realización adicional, la densidad de pectina dentro de la almohadilla seca es de aproximadamente el 1% a menos del 5% (p/v).

15 En otra realización más de la invención, la densidad de pectina dentro de la almohadilla seca es de aproximadamente el 3% a menos del 5% (p/v).

En otra realización adicional más de la invención, la densidad de pectina dentro de la almohadilla seca es de aproximadamente el 3% (p/v).

20 En una realización de la invención, la almohadilla se prepara mediante los siguientes pasos:

a- proporcionar pectina LM, un catión divalente y trombina;

25 b- mezclar la pectina, el catión divalente y la trombina para llevar la pectina a una concentración de aproximadamente el 1% a menos del 7% (p/v) bajo condiciones que permiten la formación de geles homogéneos; y

c- secar el gel.

30 En una realización de la invención, el paso b se lleva a cabo mezclando primero la trombina con el catión divalente seguido de la adición de la pectina.

En otra realización de la invención, el catión divalente es calcio.

35 La invención también se refiere a un método para atenuar el sangrado de la herida en un paciente que comprende aplicar la almohadilla de acuerdo con la invención a la herida, atenuando de este modo el sangrado de la herida.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

40 En un aspecto, la presente invención proporciona una almohadilla seca mejorada que comprende pectina, un catión divalente y trombina.

45 Se descubrió, de acuerdo con la invención, que una almohadilla seca que comprende un tipo específico de pectina a una concentración específica y en combinación con trombina permite la formación de una almohadilla seca mejorada que permite absorber y mantener dentro de sus intersticios sangre y otros fluidos y detener el sangrado mediante la formación de fibrina en el sitio de la lesión.

50 La almohadilla de acuerdo con la invención comprende pectina de bajo nivel de metoxilo (LM) a densidades que varían de aproximadamente 1 a menos del 7% (p/v), de más del 1% a menos del 7% (p/v), de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% (p/v), de aproximadamente el 1% a menos del 5% (p/v), de más del 1% a menos del 5% (p/v), de aproximadamente el 3% a menos del 5% (p/v) o aproximadamente el 3% (p/v).

55 El término porcentaje de pectina usado a lo largo de la solicitud significa el peso de pectina por volumen (p/v).

Por ejemplo, las almohadillas secas que comprenden pectina a densidades que varían de aproximadamente el 1 a menos del 7% (p/v) significa pectina en un intervalo de densidad de aproximadamente 10 mg/cm³ a menos de 70 mg/cm³.

60 Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 2\%$.

65 El término "almohadilla seca mejorada" se refiere, por ejemplo, a una almohadilla que permite detener efectivamente el sangrado, por ejemplo, sangrado leve, moderado, grave o enérgico; tiene la capacidad de adaptarse fácilmente a la forma de una superficie corporal sin frenado; muestra una adhesión aumentada al tejido objetivo; tiene alta capacidad de absorción de líquidos/sangre. Los términos "dejar de sangrar" y "hemostasis" son

intercambiables.

Por "alta capacidad de absorción de líquido/sangre" se entiende, por ejemplo, que la almohadilla puede absorber y mantener dentro de sus intersticios, muchas veces su peso de sangre y otros fluidos y/o puede absorber sangre y otros fluidos rápidamente, por ejemplo, para absorber 30-veces su propio peso en 30 segundos.

El término "hemostasis" se refiere a la capacidad de un agente para detener el sangrado de un vaso sanguíneo lesionado y/o para contribuir a mantener la sangre contenida dentro del vaso sanguíneo.

Se descubrió que una almohadilla de acuerdo con la invención tiene la capacidad de adaptarse fácilmente a la forma de la superficie corporal a la vez que mantiene su estructura y no se rompe; es pegajosa y muestra una adhesión aumentada al tejido objetivo; tiene una porosidad aumentada que permite una absorción eficiente de líquido/sangre en la almohadilla; y permanece intacta durante la manipulación y el manejo.

Ventajosamente, la almohadilla seca de acuerdo con la invención es homogénea, tiene una alta capacidad de absorción de líquido/sangre, puede manipularse fácilmente y adaptarse a la forma del órgano del cuerpo sin romperse; muestra una adhesión aumentada al tejido objetivo; y puede permanecer intacta durante la manipulación y el manejo. La adaptabilidad de la almohadilla permite su aplicación en una amplia gama de órganos que tienen diferentes estructuras y formas.

El término "homogéneo", en este contexto de una almohadilla, significa que la trombina y la pectina se dispersan sustancialmente de manera uniforme en toda la almohadilla seca. Ventajosamente, diferentes regiones de la almohadilla tienen aproximadamente la misma actividad biológica.

El término "seco" se refiere a una almohadilla que comprende un contenido líquido igual o inferior al 3% en peso en base al peso total de la composición seca (p/p). Ventajosamente, la pectina es un polisacárido derivado de plantas y, por tanto, una almohadilla formada con pectina puede minimizar el riesgo de transmisión de patógenos virales y/o desconocidos.

También, el uso de la pectina, que se extrae de las plantas, en productos farmacéuticos es una ventaja, ya que es una sustancia no inmunogénica y también es un material rentable con un largo historial de seguridad.

En una realización de la invención, el catión divalente en la almohadilla seca es calcio, por ejemplo a un intervalo de densidad de 0,1-100mg/cm³, como a una densidad de 4,5-7,5mg/cm³. En una realización de la invención, la densidad de calcio dentro de la almohadilla es de 4,5 mg/cm³. En otra realización de la invención, la densidad de calcio dentro de la almohadilla es de 7,5 mg/cm³.

La densidad de trombina en la almohadilla puede estar en el intervalo de 10-1000 UI/cm³, por ejemplo, la densidad puede ser de aproximadamente 340 UI/cm³ o 680 UI/cm³.

Típicamente, la almohadilla de la invención puede almacenarse en condiciones de almacenamiento a temperaturas de no congelación (por ejemplo, a una temperatura de 2-8° C y hasta temperatura ambiente o a una temperatura de menos de 37° C) durante un período de tiempo relativamente largo a la vez que retiene su actividad biológica. Se pretende que "temperatura ambiente" incluya una temperatura de aproximadamente 20° C a aproximadamente 28° C, o de 22° C a aproximadamente 26° C.

En una realización de la invención, la almohadilla puede almacenarse durante 2 años a temperatura ambiente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una almohadilla seca de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, el método comprende los siguientes pasos:

- a- proporcionar pectina LM, un catión divalente y trombina;
- b- mezclar la pectina, el catión divalente y la trombina para llevar la pectina a una concentración de aproximadamente igual o más del 1% a menos del 7% (p/v) bajo condiciones que permiten la formación de geles homogéneos; y
- c- secar el gel.

La concentración de pectina puede variar de aproximadamente el 1 a menos del 7% (p/v), de más del 1% a menos del 7% (p/v), de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% (p/v), de aproximadamente el 1% a menos del 5% (p/v), de más del 1% a menos del 5% (p/v), de aproximadamente el 3% a menos del 5% (p/v) o aproximadamente el 3% (p/v). En algunas realizaciones, las almohadillas se prepararon generalmente como se describe a continuación. Como primer paso, se prepararon diferentes soluciones madre de pectina que tenían una

concentración de aproximadamente el 1,5 al 15% (p/v) (15-150 g/l) disolviendo polvo de pectina LM en agua destilada doble (DDW) a 40-70° C mientras se agitaba a 1300 RPM durante 3-6 horas hasta que la solución era homogénea según se determinó mediante una inspección visual. Se obtuvo una solución que tenía un pH de 3,5-5,5. Luego, se añadió NaOH 0,5 M para formar un pH de aproximadamente 7,0. En el paso siguiente, las soluciones madre de pectina se almacenaron a 4° C durante la noche (14-18 horas) para la estabilización de la solución de pectina. En el paso siguiente, se mezclaron entre sí 1,7 ml de trombina (de sellante de fibrina EVICEL®) y 25 µl de cloruro de calcio 10,8M (CaCl₂) y luego la mezcla formada se mezcló con 3,3 ml de cada solución madre de pectina - (1,5, 4,5, 7,5, 10,5 y 15%) - para formar geles de pectina que tenían una concentración final de pectina de aproximadamente 1, 3, 5, 7 y 10% (p/v) (10-100g/l), respectivamente. La mezcla de la trombina con CaCl₂ y luego con la solución madre de pectina se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-25° C). La mezcla de la solución de trombina-CaCl₂ con la solución de pectina se llevó a cabo usando dos jeringuillas (ver la elaboración a continuación), las soluciones se transfirieron entre las dos jeringuillas 10-15 veces. Se obtuvo un volumen final de 5 ml y la mezcla final se vertió en una taza de vidrio de liofilización que tenía las siguientes dimensiones: 25 mm de altura y 25 mm de diámetro. La taza de vidrio de liofilización se colocó en el liofilizador y se liofilizó para formar una almohadilla seca con un contenido de agua de ≤3%. Las diferentes almohadillas secas (después del paso de liofilización) comprendían una densidad de aproximadamente: 1, 3, 5, 7 o 10% (p/v) (10-100 mg/cm³) de pectina, 340 UI/cm³ de trombina y 7,5 mg/cm³ de calcio. La altura de las almohadillas secas estaba en el rango de 10-14 mm y 25 mm de diámetro.

En otra realización, se preparó una almohadilla seca que comprendía una densidad del 3% (p/v) de pectina (30 mg/cm³) de la siguiente manera: se disolvieron 2,25 g de polvo de pectina LM en 48,5 ml de DDW, obteniendo de este modo una solución madre de pectina a una concentración del 4,5% (p/v). La disolución se llevó a cabo a 40° C-70° C con agitación a 1300 RPM durante 3-6 horas (hasta que la solución fue homogénea según se determinó mediante una inspección visual). Se obtuvo una solución que tenía un pH de 3,5-5,5. Después de la disolución, la solución madre de pectina se tituló con NaOH 0,5 M (aproximadamente 2 ml) a un pH de aproximadamente 7,0.

En el siguiente paso, la solución madre de pectina se almacenó a 4° C durante la noche (14-18 horas) para la estabilización de la solución de pectina.

En el paso siguiente, se mezclaron 1,7 ml de trombina, que incluye CaCl₂ 40mM, con 25µl de CaCl₂ 10,8M (obteniendo una concentración final de CaCl₂ de 67,5mM en la solución de trombina). La solución mixta de trombina-calcio (aproximadamente 1,7 ml) se mezcló luego con 3,3 ml de solución madre de pectina (que tenía una concentración de 4,5% p/v) para formar un gel. La mezcla de la trombina con CaCl₂ y luego con la solución madre de pectina se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-25° C).

La mezcla se llevó a cabo usando dos jeringuillas de 5 ml conectadas entre sí mediante una llave de paso de 3 vías- una jeringuilla la solución de trombina-calcio, y la otra con la solución madre de pectina. Las soluciones se transfirieron entre las dos jeringuillas 10-15 veces. Después de la mezcla, las soluciones mezcladas (5 ml en volumen) se vertieron en tazas de liofilización (las mismas dimensiones que antes), las burbujas accesibles formadas sobre la superficie superior del gel se descartaron usando una aguja, y las tazas se transfirieron luego a un liofilizador y se liofilizaron. La densidad final de pectina, trombina y calcio en la almohadilla formada fue del 3% (p/v) (30 mg/cm³), 340 UI/cm³ y 7,5 mg/cm³, respectivamente.

Tras el procedimiento de liofilización, las almohadillas se almacenaron en un compartimiento cerrado con un desecante a temperatura ambiente (20-25° C).

En algunas realizaciones, el volumen de solución de la pectina, trombina y/o calcio se incrementa a aproximadamente 1 a 20 veces para obtener almohadillas más grandes y/o más almohadillas.

Para sustancias líquidas y en gel, una concentración de pectina de aproximadamente el 1% a menos del 7% (p/v) significa pectina en un intervalo de concentración de aproximadamente 10 g/l a menos de 70 g/l.

El término "mezclado" se refiere a la mezcla de o la agitación de los componentes (por ejemplo, pectina, catión divalente y trombina) juntos.

El término "mezclar bajo condiciones que permiten una formación homogénea de gel" se refiere a mezclar o agitar los componentes en condiciones específicas, por ejemplo, de una manera (por ejemplo, una secuencia de mezclado específica de los componentes) y/o en un entorno (por ejemplo, tener un pH específico, tener una temperatura específica y/o evitar la formación de burbujas) que permite la formación de un gel uniforme. En una realización, tales condiciones comprenden primero mezclar la trombina con el catión divalente y después añadir la pectina.

El término "homogéneo", en el contexto de un gel, significa que la trombina y la pectina se dispersan sustancialmente de manera uniforme por toda la sustancia del gel (antes de secar la almohadilla). Por ejemplo, diferentes regiones del gel tienen aproximadamente la misma concentración de trombina y pectina. Puede obtenerse

un gel homogéneo, por ejemplo, mezclando concienzudamente y suavemente la solución de pectina con la solución de trombina que contiene cationes divalentes. En una realización, el mezclado se lleva a cabo usando dos jeringuillas conectadas entre sí, una comprendiendo la solución de pectina y la otra comprendiendo la solución de trombina. Puede obtenerse un gel homogéneo, por ejemplo, eliminando la presencia de un gran número de burbujas y/o de burbujas grandes dentro del gel, por ejemplo, usando una aguja; y/o evitando la presencia de líquido sobre el gel formado como resultado de un mezclado inapropiado. El mezclado también puede llevarse a cabo usando agitadores que mezclan concienzudamente la solución.

El término "gel" se refiere a un material similar a gelatina semirrígido en el que las moléculas de un líquido se dispersan dentro de un sólido y en el que el sólido es la fase continua y el líquido es la fase discontinua. Típicamente, los geles son sistemas reticulados sustancialmente diluidos, que no fluyen. Los geles son en su mayoría líquidos, pero tienen características sólidas debido a la presencia de una red reticulada tridimensional dentro del líquido.

La pectina LM, el catión divalente y la trombina pueden proporcionarse como soluciones.

Los sólidos totales en la solución de trombina pueden ser de aproximadamente 1-45 mg por ml.

En una realización de la invención, el catión divalente se proporciona dentro de la solución de trombina. En otra realización de la invención, el catión divalente se proporciona como una solución separada.

El paso de secado puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica que no degrade ni desnaturalice los ingredientes activos, por ejemplo la trombina, que son sensibles a los procedimientos térmicos, incluyendo pero no limitado a, secado al vacío, liofilización y secado al aire, como el secado a temperatura ambiente.

En una realización, el secado puede llevarse a cabo por liofilización. El término "liofilización" se refiere típicamente al proceso de congelar una mezcla y luego reducir la concentración de agua, por ejemplo, mediante sublimación a niveles que no soportan reacciones biológicas o químicas.

Típicamente, después de la liofilización, se obtiene una "torta sólida". Los términos "torta", "torta sólida", "composición seca" se refieren a una composición similar a una estructura porosa y esponjosa que resulta del proceso de liofilización.

Se demostró que después del proceso de liofilización, la torta formada soportaba su propia estructura, es decir, la estructura y el volumen de la sustancia de gel y de la composición sólida eran sustancialmente iguales. Este parámetro puede evaluarse comprimiendo suavemente la almohadilla y evaluando las fracciones de la almohadilla que quedan en el guante. Las almohadillas deben mantener ventajosamente su estructura y permanecer intactas durante la manipulación y el manejo. Es importante mantener un equilibrio entre una almohadilla que pueda adaptarse fácilmente a la forma del cuerpo pero que pueda mantener su estructura y no romperse.

Como se usa en la presente, los términos "composición seca" y "almohadilla seca" son intercambiables y se refieren a una composición que tiene un contenido de agua igual o inferior a aproximadamente el 3% (p/p).

La pectina usada de acuerdo con la invención puede derivarse (por ejemplo, extraerse o aislarse) de cualquier planta o parte de la misma (por ejemplo, semillas, hojas, tronchos, flores, raíces y/o tallos). La pectina puede tener un nivel variable de pureza y puede comprender también otros componentes extraídos o aislados de la planta o la parte de la misma además de la pectina.

La pectina puede tener un grado de esterificación en el intervalo de aproximadamente el 20% al 75%, y un grado de amidación en el intervalo de aproximadamente el 15% al 30%.

En una realización de la invención, el grado de esterificación está en el intervalo de aproximadamente el 26 al 27%. En otra realización de la invención, el grado de amidación está en el intervalo de aproximadamente el 20 al 22%.

El término "grado de esterificación" se refiere a la proporción entre los monómeros de GalA esterificados y los monómeros de GalA totales.

El término "grado de amidación" se refiere a la proporción entre los monómeros de GalA amidados y los monómeros de GalA totales.

En una realización de la invención, la almohadilla comprende un agente hemostático adicional. El término "agente hemostático", como se usa en la presente, se refiere a la capacidad del agente para controlar, reducir o detener el sangrado capilar, venoso o de arteriola, incluyendo el sangrado leve, moderado, grave o intenso, en un

tiempo eficaz, como se reconocerá por los expertos en la técnica. Los ejemplos de agentes hemostáticos incluyen, pero no están limitados a, protrombina, fibrina, fibronectina, factor X/Xa, factor VII/VIIa, factor IX/IXa, factor XI/XIa, factor XII/XIIa, factor XIII, factor VIII, vitronectina, factor tisular, factor de von Willebrand, inhibidor del activador de plasminógeno, agentes activadores de plaquetas, péptidos sintéticos que tienen actividad hemostática, derivados de los anteriores y cualquier combinación de los mismos.

El término "leve" se refiere a los casos de sangrado en los que tienen lugar pequeños volúmenes y una tasa de sangrado baja. En un sangrado leve, el sangrado puede detenerse por sí solo o con presión, el sangrado puede detenerse o ralentizarse hasta rezumar o gotear después de aproximadamente 10-20 minutos de presión, y/o puede rezumar o gotear hasta durante 40 minutos.

Los ejemplos de sangrado leve incluyen, pero no están limitados a, sangrado debido a daños en un área pequeña en un órgano del cuerpo como la piel donde no se prescribe medicación anticoagulante y no se inflige daño en venas o arterias grandes. Típicamente, en el sangrado leve, la hemostasis se logrará espontáneamente mediante el mecanismo de coagulación de la sangre nativa.

El término "moderado" se refiere a los casos de sangrado en los que se pierden grandes volúmenes de sangre, ya sea a bajas tasas de sangrado durante un período prolongado, o cuando se pierden tasas medias de sangrado durante un corto período de tiempo. Típicamente, en el sangrado moderado, el sangrado disminuye o se detiene con aproximadamente 15 minutos de presión, pero comienza de nuevo cuando se retira la presión, y/o la sangre puede empapar a través de unas pocas vendas, pero no es rápido ni está fuera de control.

Los ejemplos de sangrado moderado incluyen, pero no están limitados a, sangrado debido a daños en un área grande de un órgano del cuerpo como la piel o en casos en que áreas pequeñas se dañan en órganos que reciben un suministro abundante de sangre. Típicamente, en el sangrado moderado, el fracaso en lograr la hemostasis dará como resultado la muerte en minutos u horas. El término "sangrado grave o intenso" se refiere a los casos de sangrado en los que se producen grandes volúmenes y una alta tasa de sangrado. A menudo, en el sangrado grave la sangre bombea de la herida, el sangrado no se detiene ni disminuye con la presión, y/o la sangre empapa rápidamente el vendaje después de vendar.

Los ejemplos de sangrado grave y intenso incluyen, pero no están limitados a, el sangrado debido a una punción arterial, la resección hepática, la resección renal, hemofílicos y pacientes que reciben medicamentos anticoagulantes y similares. Por lo general, en un sangrado grave o intenso, el fallo en lograr la hemostasis dará como resultado la muerte en segundos a minutos.

La efectividad de la almohadilla para detener el sangrado puede evaluarse usando un experimento de modelo animal in vivo. Por ejemplo, un modelo de hemorragia renal de rata (un modelo de sangrado grave) y un modelo de hemorragia de bazo porcino (un modelo de sangrado leve a moderado), como se describe en los ejemplos a continuación.

Se descubrió de acuerdo con la invención, que una almohadilla seca que comprende trombina y una pectina LM igual o más del 1% a menos del 5% (p/v) detuvo eficazmente el sangrado grave, y que una almohadilla seca que comprende trombina y pectina LM igual o más del 1% a menos del 7% (p/v) detuvo eficazmente el sangrado de leve a moderado.

En una realización de la invención, la almohadilla seca comprende trombina y pectina LM a una densidad de aproximadamente el 1% a menos del 5% (p/v) y puede usarse para sangrado leve a grave.

En una realización de la invención, la almohadilla seca es para su uso en sangrado leve a moderado y comprende trombina y pectina LM a una densidad de aproximadamente el 1% a menos del 7% (p/v).

En una realización de la invención, la almohadilla seca es para su uso en sangrado grave y comprende trombina y pectina LM a una densidad de aproximadamente el 1% a menos del 5% (p/v).

También se descubrió de acuerdo con la invención que el rendimiento de una almohadilla de pectina para detener el sangrado puede mejorarse aumentando la densidad de trombina, por ejemplo, el rendimiento de una almohadilla que comprende un 3% (p/v) de pectina y 340IU/cm³ de trombina se mejoró cuando se aumentó la densidad de pectina dentro de la almohadilla a 680 UI/cm³ de trombina.

En una realización de la invención, la densidad de trombina puede aumentarse por lo menos dos veces para aumentar el rendimiento de la almohadilla de pectina.

La almohadilla de la invención puede prepararse y proporcionarse en una variedad de tamaños y formas como cuadrada, poligonal, esférica, cónica, cúbica, oval, rectangular o cilíndrica, dependiendo del uso pretendido. Por ejemplo, la almohadilla de la invención puede prepararse en forma rectangular con tamaños de (anchura x

longitud) 5x10cm, 10x10cm, ambas con una altura de 1 cm. En otro ejemplo, la almohadilla de la invención puede prepararse en una forma circular con diámetros de 2 cm, 4 cm o 6 cm, todas con una altura de 1 cm.

La almohadilla de acuerdo con la invención puede aplicarse al sitio de sangrado tal como está y detener el sangrado mediante la conversión de fibrinógeno intrínseco en fibrina en el sitio de sangrado activo.

La almohadilla puede aplicarse sobre el sitio deseado y mantenerse bajo presión durante un período de tiempo, por ejemplo, en un período de tiempo que varía de 30 segundos a 4 minutos, que es suficiente para que se produzca una coagulación en la interfaz entre la almohadilla y el sitio de aplicación y para que cese sustancialmente el sangrado.

La divulgación de intervalos en la descripción de la invención es fácilmente entendible por el experto. Significa la divulgación de valores y cifras continuos entre los límites de los intervalos, incluyendo las cifras y valores límite. Por ejemplo, si se da un intervalo de aproximadamente el 1% a menos del 7% (p/v), se entiende por lo menos 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 y/o menos del 7% (p/v), con todas las combinaciones de sub-intervalos intermedios, como del 1 al 6,75% (p/v). Por ejemplo, si se da un intervalo de más del 1% a menos del 7% (p/v), se entiende por lo menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 y/o menos del 7% (p/v), con todas las combinaciones de sub-intervalos intermedios, como del 1 al 6,75% (p/v).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para atenuar el sangrado de heridas en un paciente que comprende aplicar la almohadilla de acuerdo con la invención a la herida, atenuando de este modo el sangrado de la herida.

Por "atenuar el sangrado de la herida" se entiende, por ejemplo, que la pérdida de sangre de un tejido y/u órgano lesionado se reduce, disminuye o elimina.

El término "herida" incluye, pero no está limitado a, punción arterial, resección hepática, resección renal, defectos cutáneos, daño de venas y/o arterias, incisiones realizadas durante la cirugía, etc. La divulgación de solicitudes, patentes y publicaciones, citadas anteriormente o a continuación, se incorpora a la presente por referencia.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos pero no limitativos.

EJEMPLOS

MATERIAL Y MÉTODOS.

Trombina En los experimentos a continuación, se usó un componente de trombina como el sellante de fibrina EVICEL® (fabricado por Omrix Biopharmaceuticals Ltd., Israel).

Ingrediente activo: trombina humana (800-1200 UI/ml).

Otros ingredientes: cloruro de calcio 40 mM (CaCl_2), 6 mg/ml de albúmina humana, 20 g/l de D-manitol, acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 130 mM (NaCl), agua para inyección (WFI).

Pectina. En los experimentos a continuación, se usaron pectina baja en metoxilo (LM; dos clases diferentes) y alta en metoxilo (HM) para preparar una almohadilla que comprende trombina:

1. Pectina LM (Cat. N° 104AS, CPKelco, Atlanta, Georgia), grado de esterificación 27%, grado de amidación 20% (referido en la presente como "Tipo 1"). Extraído de cáscara de cítricos.
2. Pectina LM (Cat. N° 104AS FS CPKelco, Atlanta, Georgia), grado de esterificación 26%, grado de amidación 22% (referido en la presente como "Tipo 2"). Extraído de cáscara de cítricos.
3. Pectina HM (Cat N° 76282, Sigma Aldrich, Rehovot, Israel) grado de esterificación 70-75%. Extraído de manzana.

Todos los tipos de pectina fueron suministrados por el proveedor como polvos.

La tabla 1 enumera las propiedades de pectina HM y LM.

Tabla 1: Propiedades de la pectina.

	Grado de esterificación* [%]	Grado de amidación** [%]
Pectinas HM	60-75	Irrelevante
Pectinas LM	20-40	10-30

* Grado de esterificación - la proporción entre los monómeros de GalA esterificados y los monómeros de GalA totales.
 ** Grado de amidación - la proporción entre los monómeros de GalA amidados y los monómeros de GalA totales.

Liofilización La liofilización de la sustancia de gel se llevó a cabo de acuerdo con el ciclo mostrado en la Tabla 2 siguiente usando el liofilizador Christ Epsilon 2-8D. Después de la liofilización, se obtuvo una "torta sólida". Los términos "torta", "torta sólida" y "composición seca" se refieren a una composición similar a una estructura porosa y esponjosa que resulta del proceso de liofilización.

Típicamente, después del proceso de liofilización, la torta soporta su propia estructura, es decir, la estructura y el volumen de la sustancia de gel y de la sustancia sólida obtenida después de la liofilización son sustancialmente iguales.

Tabla 2: Ciclo de liofilización.

Sección	Fase	Tiempo (h: m)	Temperatura. (° C)	Vacío (mBar)	Presión de la cámara (mBar)
1	Valores de inicio	--:--	4	APAGADO	APAGADO
2	Congelación	01:00	-30	APAGADO	APAGADO
3	Congelación	01:00	-50	APAGADO	APAGADO
4	Congelación	05:40	-50	APAGADO	APAGADO
5	Preparación	00:20	-45	APAGADO	APAGADO
6	Sublimación	00:15	-40	0.2	800
7	Sublimación	00:15	-25	0.2	800
8	Sublimación	25:00	-25	0.2	800
9	Sublimación	01:00	-15	0.2	800
10	Sublimación	12:00	-15	0.2	800
11	Sublimación	02:00	20	0.2	800
12	Sublimación	05:00	20	0.2	800
13	Segundo secado	00:30	25	0.012	800
14	Segundo secado	18:00	25	0.012	800

Cuantificación del contenido de agua dentro de la almohadilla seca. La determinación del contenido de agua se llevó a cabo usando el método de titulación Karl Fischer (KFT) volumétrico, que se basa en el ensayo de la farmacopea de los Estados Unidos (USP 27, <921>, P. 2398-2399). Antes de la titulación, el agua se extrajo de la composición liofilizada añadiendo 4 ml de metanol seco en un vial que contenía la composición liofilizada y rodando el vial durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se tomaron 3 ml del sobrenadante para la titulación.

Evaluación de la eficacia hemostática de las almohadillas usando modelos *in vivo*.

Modelo de hemorragia renal de rata - un modelo de sangrado grave o intenso: la eficacia se determinó usando el modelo de hemorragia renal de rata aguda *in vivo*.

En este modelo se usaron ratas Sprague dawley de aproximadamente 3 meses de edad y un peso de aproximadamente 350 gramos. La anestesia se indujo con 50 mg de pentol/kg administrados por inyección IP (intraperitoneal). Durante el procedimiento, se monitorizó el efecto de la anestesia y, si fue necesario, se administró una inyección adicional de pentol.

Para mantener al animal a una temperatura constante de entre 38° C y 40° C (óptimamente 38,4° C), el animal se colocó en un tablero de operación de plástico grueso y se colocaron tanto una lámpara de calentamiento como una almohadilla de calentamiento eléctrica acopladas a una sonda térmica debajo de la placa (termo regulador).

El animal fue afeitado en el costado izquierdo para una laparotomía paralumbar. El sitio afeitado se limpió con alcohol al 70%. Se insertó una termosonda en el recto del animal para monitorizar la temperatura. El animal se giró a una posición dorsolateral derecha. Se inyectó por vía intravenosa un bolo de heparina (RotexMedica Alemania N° ET3L184-10-200 UI/kg) para prevenir la actividad de la trombina endógena presente en la sangre del animal (la concentración de heparina administrada no afectó a la trombina presente en la almohadilla). Usando este modelo, la reproducibilidad se mantiene ya que los animales no pueden activar su mecanismo de coagulación interno a través de la trombina endógena.

Se realizó una incisión paralumbar izquierda de aproximadamente 1-2 cm de tamaño desde la cadera izquierda hasta la duodécima costilla y se expuso el riñón izquierdo. El riñón se separó de la grasa perirrenal. La rata se reposicionó en posición yacente dorsal. Los vasos renales se ocluyeron con una pinza vascular blanda. Se realizó una heminefrectomía sagital, extrayendo la mitad distal completa del riñón perpendicular a los vasos renales. La

superficie del corte del riñón restante se secó. La almohadilla probada se aplicó sobre la superficie de corte del riñón. Se dejaron transcurrir tres minutos para la polimerización antes de liberar la pinza renal. Después de liberar la pinza renal, se observó el riñón para la incidencia del sangrado. Si tuvo lugar sangrado, se permitió que la sangre se absorbiera dentro de las almohadillas durante un período de una hora.

Si el animal vivió durante todo el período de prueba de una hora, se retiró la almohadilla para evaluar el sangrado del riñón restando el peso de la almohadilla después de la aplicación sobre el corte del peso de la almohadilla antes de la aplicación. Inmediatamente después de retirar la almohadilla los animales supervivientes (todavía bajo anestesia) se sacrificaron usando CO₂.

Modelo de hemorragia de bazo porcino: un modelo de sangrado leve a moderado.

El procedimiento se llevó a cabo esencialmente como se describe en Cole DJ et al. "Un estudio piloto que evalúa la eficacia de una formulación de membrana de poli-N-acetil glucosamina completamente acetilada como un agente hemostático tópico". Surgery. 1999 Sep;126(3):510-7 con las siguientes excepciones:

1- la herida se infligió usando una aguja de punción para biopsia de 4 mm y generando un defecto circular dentro del bazo (y no creando una incisión en el bazo como en Cole DJ et al.); y

2- el procedimiento de aplicación de la almohadilla se llevó a cabo como sigue: la herida se dejó sangrar libremente durante 5 segundos antes de extraer la sangre acumulada mediante una presión suave con una esponja quirúrgica. El agente hemostático que se está probando (ya sea almohadilla de pectina-trombina o tratamiento de control: se aplicó la esponja de gelatina absorbible SURGIFOAM® sumergida en solución de trombina; consultar el Ejemplo 4 más abajo para ver las formulaciones exactas) con presión digital directa durante 30 segundos, seguido de observación sin presión durante 60 segundos. Si la herida continuaba sangrando o volvía a sangrar, el agente ya aplicado se dejó en su sitio sin la adición de un agente adicional, y el ciclo de presión descrito anteriormente (30 segundos seguidos de observación durante 60 segundos) se repitió durante una segunda vez. Este ciclo se repitió durante un total de 5 minutos desde la generación de la herida. Si no se lograba la hemostasis en el plazo de 5 minutos, la prueba se declaraba fallida. En este experimento, el tiempo de hemostasis (hasta 5 min) después de la aplicación de la almohadilla/esponja sobre el sitio de sangrado se midió y registró para cada ensayo. Las concentraciones porcentuales de pectina usadas en la aplicación son peso por volumen (p/v).

Para sustancia líquida y en gel, 1% p/v de pectina significa pectina a una concentración de 10 g/l.

Para almohadillas secas, 1% p/v de pectina significa pectina a una densidad de 10 mg/cm³.

Ejemplo 1: Preparación de una almohadilla de trombina-pectina seca usando diferentes concentraciones de pectina LM.

Se prepararon almohadillas que comprendían aproximadamente el 1-10% (p/v) (10-100 mg/cm³) de pectina LM y trombina generalmente como se describe a continuación; la preparación de una almohadilla que comprende un 3% (p/v) (30 mg/cm³) de pectina LM se describe a continuación con más detalle.

Como primer paso, se prepararon diferentes soluciones madre de pectina que tenían una concentración de aproximadamente el 1,5 al 15% (p/v) (15-150 g/l) disolviendo polvo de pectina LM (tipo 1 como se define anteriormente; en la cantidad indicada en la Tabla 3 a continuación) en 48,5ml de DDW a 40-70° C mientras se agitaba a 1300 RPM durante 3-6 horas hasta que la solución fue homogénea como se determinó por una inspección visual. Se obtuvo una solución que tenía un pH de 3.5-5.5. Luego, se añadió NaOH 0,5 M para formar un pH de aproximadamente 7,0 (el volumen de titulación específico se indica en la Tabla 3 a continuación).

El peso del polvo de pectina específico y el volumen de titulación del NaOH usado para preparar las diferentes soluciones madre de pectina se especifican en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Preparación de soluciones de stock de pectina.

Concentración de solución madre de pectina [%] (p/v)	Polvo de Pectina LM (Tipo 1) [g]	NaOH 0,5M usado para la titulación [ml]
1.5	0.75	1.0
4.5	2.25	2.0
7.5	3.75	2.5
10.5	5.25	2.5
15	7.50	2.5

En el siguiente paso, las soluciones de reserva de pectina se almacenaron a 4° C durante la noche (14-18

horas) para la estabilización de la solución de pectina.

En el paso siguiente, se mezclaron 1,7 ml de trombina (de sellante de fibrina EVICEL® como se ha descrito anteriormente) y 25 µl de cloruro de calcio 10,8M (CaCl₂) y luego la mezcla formada se mezcló con 3,3 ml de cada solución madre de pectina -1,5, 4,5, 7,5, 10,5 y 15% - para formar geles de pectina que tenían una concentración final de pectina de aproximadamente el 1, 3, 5, 7 y 10% (p/v) (10-100 g/l), respectivamente. La mezcla de la trombina con CaCl₂ y luego con la solución madre de pectina se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-25° C). La mezcla de la solución de trombina-CaCl₂ con la solución de pectina se llevó a cabo usando dos jeringuillas (ver la elaboración a continuación), las soluciones se transfirieron entre las dos jeringuillas 10-15 veces. Se obtuvo un volumen final de 5 ml y la mezcla final se vertió en una taza de vidrio de liofilización que tenía las siguientes dimensiones: 25 mm de altura y 25 mm de diámetro. La taza de vidrio de liofilización se colocó en el liofilizador y se liofilizó de acuerdo con la Tabla 2 anterior para formar una almohadilla seca que tenía un contenido de agua de ≤ 3%, como se midió por el Método de Titulación de Karl Fischer. Las diferentes almohadillas secas (después del paso de liofilización) comprendían una densidad de aproximadamente: 1, 3, 5, 7 o 10% (p/v) (10-100 mg/cm³) de pectina, 340 UI/cm³ de trombina y 7,5 mg/cm³ de calcio. La altura de las almohadillas secas estaba en el intervalo de 10-14 mm y 25 mm de diámetro.

Elaboración del método de preparación de una almohadilla seca que comprende una densidad del 3% (p/v) de pectina (30 mg/cm³):

se disolvieron 2,25 g de polvo de pectina LM (tipo 1 como se ha definido anteriormente) en 48,5 ml de DDW obteniendo de este modo una solución madre de pectina a una concentración del 4,5% (p/v). La disolución se llevó a cabo a 40° C-70° C con agitación a 1300 RPM durante 3-6 horas (hasta que la solución fue homogénea como se determinó mediante una inspección visual). Se obtuvo una solución que tenía un pH de 3,5-5,5. Después de la disolución, la solución madre de pectina se tituló con NaOH 0,5M (aproximadamente 2 ml) a un pH de aproximadamente 7,0.

En el paso siguiente, la solución madre de pectina se almacenó a 4° C durante la noche (14-18 horas) para la estabilización de la solución de pectina.

En el paso siguiente, se mezclaron 1,7 ml de trombina, que incluye CaCl₂ 40 mM, se mezclaron con 25 µl de CaCl₂ 10,8M (obteniendo una concentración de CaCl₂ final de 67,5mM en la solución de trombina). La solución mezclada de trombina-calcio (aproximadamente 1,7 ml) se mezcló luego con 3,3 ml de solución madre de pectina (que tenía una concentración de 4,5% p/v) para formar un gel. El mezclado de la trombina con CaCl₂ y luego con la solución madre de pectina se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-25° C).

El mezclado se llevó a cabo usando dos jeringuillas de 5 ml conectadas entre sí mediante una llave de paso de tres vías (Cat 1097 Ilif, Haryana, India) - una jeringuilla con la solución de trombina-calcio y la otra con la solución madre de pectina. Las soluciones se transfirieron entre las dos jeringuillas 10-15 veces. Después del mezclado, las soluciones mezcladas (5 ml en volumen) se vertieron en tazas de liofilización (ver dimensiones anteriores), las burbujas accesibles formadas sobre la superficie superior del gel se descartaron usando una aguja, y las tazas se transfirieron luego a un liofilizador y se liofilizaron de acuerdo con a la Tabla 2 anterior.

La densidad final de pectina, trombina y calcio en la almohadilla formada fue del 3% (p/v) (30 mg/cm³), 340 UI/cm³ y 7,5 mg/cm³, respectivamente.

Se preparó una almohadilla que comprendía el 3% (p/v) (30 mg/cm³) de pectina LM tipo 1 y 7,5 mg/cm³ 0 calcio (sin trombina) y sirvió como control para los experimentos/mediciones siguientes. El panel de control se preparó de la misma manera que una almohadilla que comprende el 3% (p/v) de pectina LM, 340IU/cm³ trombina y 7,5 mg/cm³ excepto que en lugar de 1,7 ml de la solución de trombina, sólo se usó el componente de tampón de trombina (1,7 ml de agua para inyección que comprendía 6 mg/ml de albúmina humana, acetato de sodio 20 mM, 20g/l de D-manitol, NaCl 130mM y CaCl₂ 40 mM).

Después del procedimiento de liofilización, las almohadillas se almacenaron en un compartimento cerrado con un desecante a temperatura ambiente (20-25° C) (Sorb-It N° 4243 Süd-Chemie, Munich, Alemania) hasta que se evaluaron para su eficacia hemostática y se inspeccionaron visualmente para los parámetros específicos.

Se realizó una inspección visual de los siguientes parámetros para los geles preparados anteriormente (después de mezclar el contenido de las dos jeringuillas y verter el contenido en las tazas de liofilización y antes de la propia liofilización):

La clasificación de todos los parámetros se realizó en una escala de 1 a 5 (1 siendo bajo a 5 siendo alto); todas las evaluaciones fueron cualitativas y la clasificación se determinó en relación con otras preparaciones de gel; el valor óptimo para cada parámetro se indica entre paréntesis.

- Burbujeo (1) - Cuando se evalúa este parámetro, se consideraron tanto la cantidad como el tamaño de las burbujas dentro del gel formado. La presencia de una gran cantidad de burbujas o de burbujas grandes

dentro de la preparación del gel no es deseable, ya que puede dar como resultado una almohadilla seca que tiene grandes cavidades de aire que no están distribuidas homogéneamente dentro del gel, afectando negativamente a la hemostasis y la firmeza de la almohadilla seca..

- Líquido sobre el gel (1) - Este parámetro se evaluó inclinando la taza que contenía el gel y estimando visualmente el volumen de líquido sobre el gel. La presencia de líquido sobre el gel formado es indeseable ya que es indicativa de una baja homogeneidad del gel y consecuentemente una baja homogeneidad de la almohadilla después de su liofilización.
- Pegajosidad (4-5) - Este parámetro se evaluó tocando el gel con un guante Nitrilo y evaluando cualitativamente la adherencia del gel al guante. Se desea un alto valor de adherencia ya que es indicativo de una alta adherencia de la almohadilla seca, que se obtendrá después del secado, a las superficies.
- Rigidez (3-4) - Este parámetro se evaluó comprimiendo el gel manualmente suavemente. Se desea un valor de 3-4 ya que es indicativo de suficiente rigidez de una almohadilla seca, que se obtendrá después del secado, para mantener su estructura pero no demasiado rígida para que pueda ser manipulada o adaptada para adaptarse a la forma de un órgano corporal.

Los resultados de las inspecciones visuales de los diferentes geles se muestran en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4: Caracterización de los geles preparados.

Concentración de pectina LM [%] (p/v)	Burbujeo (1) *	Líquido sobre el gel (1) *	Pegajosidad (4-5) *	Rigidez (3-4) *
1	4	5 (aproximadamente 2 ml)	2	1
3	3	3 (aproximadamente 1 ml)	2	2
Pectina LM al 3%sin trombina (Almohadilla de Control)	3	3	1	2
5	3	2 (aproximadamente 1 ml)	3	3
7	2	1 sin líquido	4	4.5
10	2	1 sin líquido	4	5

* El valor óptimo para cada parámetro.

También se llevó a cabo una inspección visual de las almohadillas secas (después de la liofilización). Después de la liofilización, se obtuvo una "torta sólida"/"torta". Una "torta sólida" se refiere a una composición similar a una estructura porosa y esponjosa que resulta del proceso de liofilización. Se evaluaron los siguientes parámetros; la clasificación para todos los parámetros se hizo a una escala de 1 (siendo baja) a 5 (siendo alta); todas las evaluaciones fueron cualitativas y la clasificación se determinó en respecto a otras preparaciones de gel; el valor óptimo para cada parámetro se indica entre paréntesis:

- Fragilidad (1) -Este parámetro se evaluó comprimiendo suavemente cada almohadilla y evaluando las fracciones de la almohadilla que quedaron en el guante. Las almohadillas deben mantener ventajosamente su estructura y permanecer intactas durante la manipulación y el manejo.
- Espumosis (3) -Este parámetro se relaciona con la estructura similar a espuma de la almohadilla y se evaluó aplicando suavemente presión sobre la almohadilla y evaluando las cavidades dentro de la almohadilla (en base a la capacidad/resistencia para comprimir la almohadilla). Un valor de 3 indica una almohadilla que tiene una porosidad que puede absorber líquido/sangre sin que la sangre se escape a través de la torta (ver la descripción de "torta" anterior).
- Pegajosidad (4-5) -Evaluada como se ha descrito anteriormente para las preparaciones de gel. Las almohadillas pegajosas se adhieren mejor al tejido objetivo.
- Rigidez/Firmeza (3) - Este parámetro se evaluó comprimiendo manualmente suavemente la almohadilla y evaluando la resistencia a la presión. Un valor de 3 indica un equilibrio entre una almohadilla que puede adaptarse fácilmente a la forma del cuerpo, pero que aún puede mantener su estructura y no romperse.

Además, la densidad de cada almohadilla seca se calculó matemáticamente dividiendo los sólidos totales en la composición de la almohadilla seca por el volumen de la almohadilla (el volumen de la sustancia del gel usado para preparar la almohadilla seca que es sustancialmente igual al volumen de la almohadilla; aproximadamente 5 ml).

Los sólidos totales en la solución del componente de trombina son de aproximadamente 40 mg por ml. Los resultados de las inspecciones visuales y la densidad calculada de las diferentes almohadillas secas se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Caracterización de pastillas secas preparadas con pectina LM.

Densidad de pectina LM [%](p/v)	Fragilidad (1)*	Espumación (3)*	Pegajosidad (4-5 *)	Rigidez (3)*	Densidad [mg/cm ³] **
1	5	4	3	4	23.5
3	3	3	3	3	43.3
Pectina LM al 3% sin trombina (Almohadilla de Control)	2.5	2	3	3	30
5	2	3	3	3	63.1
7	1	1	2	2	82.9
10	1	1	2	2	112.6
* El valor óptimo para cada parámetro.					
** Calculado matemáticamente.					

Los resultados muestran que de acuerdo con las características físicas de los geles (Tabla 4), los geles que tienen una concentración de pectina LM del 7% (p/v) eran superiores en comparación con los otros geles.

Sorprendentemente, las características físicas de las almohadillas secas (Tabla 5) mostraron que las almohadillas de pectina que tenían una densidad de pectina LM del 7 y el 10% (p/v) eran inferiores en comparación con las almohadillas que tenían densidades de pectina más bajas. Los geles/almohadillas que tenían una densidad de pectina del 3 y el 5% (p/v) de pectina LM tenían características óptimas.

En el método de preparación anterior, se formó un gel de trombina-pectina de acuerdo con el siguiente orden en el procedimiento: la trombina se mezcló primero con el CaCl₂ y luego se combinó y se mezcló con la solución de pectina.

Cuando se cambió el orden de mezclado y el CaCl₂ se mezcló primero con la solución de pectina (y luego con la solución de trombina), se produjo una gelificación inmediata. Este inicio de la gelificación temprana, generó gotas de gel y, por lo tanto, falta de homogeneidad dentro del gel de pectina, lo que provocó un mezclado inadecuado con la solución de trombina en el paso siguiente.

Los resultados muestran que, para formar una almohadilla homogénea, es ventajoso mezclar primero el calcio con la solución de trombina, y en un paso siguiente añadir la solución de pectina.

Las almohadillas también se prepararon a partir de pectina LM Tipo 2 (como se ha definido anteriormente) de una manera similar a la pectina LM Tipo 1. Se llevó a cabo una inspección visual de los geles y almohadillas para los parámetros especificados anteriormente. Los resultados obtenidos y las conclusiones fueron similares a las de la pectina LM Tipo 1.

Ejemplo 2: Preparación de una almohadilla de trombina-pectina seca usando diferentes concentraciones de pectina HM.

Se prepararon almohadillas que comprendían 0,66-5,33% (p/v) (6,6-53,3 mg/cm³) de pectina y trombina HM de la siguiente manera:

Como primer paso, se preparó una solución madre de pectina con una concentración del 8% (p/v) (80 g/l) de pectina HM de la siguiente manera: se añadieron 100 ml de tampón bicarbonato de sodio 50 mM (Cat. N° 31437, Sigma Aldrich, Rehovot, Israel) en un recipiente mezclador y se añadieron gradualmente 8 g de pectina HM (como se describe en la sección de Materiales y Métodos anterior) durante la mezcla usando un mezclador (Cat: K5SSWH de 325 vatios KitchenAid, St. Joseph, MI) a una velocidad de 280 RPM durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente (20-25° C) hasta que la pectina se disolvió completamente, inspeccionado visualmente, y se formó una solución similar a una pasta homogénea sin grumos. La solución similar a una pasta tenía un pH de aproximadamente 3,0.

En el paso siguiente, la solución similar a la pasta se usó para formar diferentes concentraciones de pectina: 1, 2, 4, 6 y 7% (p/v) (10-70 g/l) diluyendo la solución madre de pectina al 8% con bicarbonato de sodio 50mM en los volúmenes que se muestran en la Tabla 6 a continuación (el volumen total fue de 30 ml).

Tabla 6: Formación de una solución que tiene diferentes concentraciones de pectina HM.

Concentración de pectina HM (p/v)	solución madre de pectina HM al 8% (ml)	Bicarbonato de sodio 50 mM (ml)	Volumen total (ml)
1% de pectina	3.75	26.25	30
2% de pectina	7.5	22.5	30
4% de pectina	15	15	30
6% de pectina	22	8	30
7% de pectina	25	5	30
8% de pectina	30	0	30

En el paso siguiente, se añadió una solución de trombina (como se describe en la sección de Materiales y Métodos) a las diferentes soluciones de pectina (incluyendo la solución madre de pectina al 8%) a una proporción de 1:2 [15 ml de solución de trombina y 30 ml de solución de pectina]. Como la pectina HM requiere sacáridos para la gelificación (la concentración de manitol en el componente de trombina no era suficiente para formar una sustancia de gel), la solución formada estaba en estado líquido y no en forma de gel. Se observó que la solución formada era viscosa y solo parcialmente homogénea.

Se vertieron 5 ml de la mezcla obtenida en una taza de vidrio de liofilización (que tenía una altura de 25 mm y un diámetro de 25 mm) y se liofilizaron de acuerdo con el ciclo de liofilización descrito en la Tabla 2. La densidad final de pectina en las diferentes almohadillas secas fue: 0,66%, 1,33%, 2,66%, 4%, 4,66%, 5,33% (p/v) (6,6-53,3mg/cm³); la densidad de trombina fue de 333 UI/cm³; y la densidad de calcio fue de 1,48 mg/cm³. La altura de las almohadillas secas estaba en el intervalo de 9-10 mm y 25 mm de diámetro.

Después del procedimiento de liofilización, las almohadillas se almacenaron en un compartimiento cerrado con un desecante a temperatura ambiente (20-25° C) (Sorb-It N° 4243 Süd-Chemie, Munich, Alemania) hasta que se evaluaron para su eficacia hemostática y para las siguientes características: fragilidad, espumabilidad, pegajosidad y rigidez usando la clasificación anterior como en el Ejemplo 1. En estas almohadillas se llevó a cabo una inspección visual solo para las almohadillas secas.

También, se calculó matemáticamente la densidad de cada almohadilla seca como se describe para las almohadillas de pectina LM (el volumen de la sustancia del gel fue de 5 ml).

La densidad y el valor de cada parámetro inspeccionado se muestran en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7: Características de las almohadillas secas preparadas con pectina HM.

Densidad de pectina HM [%] (p/v)	Fragilidad (1)*	Espuma (3)*	Pegajosidad (4-5)*	Rigidez (3)*	Densidad [mg/cm ³]**
0.66	1-2	1-2	1	5	22.8
1.33	1-2	1-2	1	5	29.4
2.66	1-2	1-2	1	5	42.8
4	1-2	1-2	1	5	55.2
4.66	1-2	1-2	1	5	60.5
5.33	1-2	1-2	1	5	69.4
* El valor óptimo para cada parámetro.					
** Calculado matemáticamente.					

Los resultados muestran que la densidad de pectina HM dentro de la almohadilla no tuvo ningún efecto sobre las características probadas anteriormente (todas las almohadillas recibieron la misma clasificación).

También se demostró que estas almohadillas no eran homogéneas y comprendían cristales sólidos (como se observó visualmente).

Estos resultados sugieren que las almohadillas que comprenden pectina HM y que se preparan bajo las condiciones anteriores tendrán una calidad de absorción pobre, no se manipularán fácilmente y no se adaptarán a la forma del órgano del cuerpo, no se adherirán eficazmente al tejido objetivo y, por tanto, no serán eficaces para detener el sangrado.

Ejemplo 3: Eficacia hemostática *in vivo* de las almohadillas de pectina HM y LM-trombina en el modelo de hemorragia renal de rata aguda.

El siguiente ejemplo estaba dirigido a determinar la eficacia hemostática de las almohadillas de trombina-pectina preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2 en un modelo de sangrado grave. La evaluación se llevó a cabo usando el modelo de hemorragia renal de rata aguda *in vivo* descrito anteriormente.

Se probaron almohadillas secas que comprendían las siguientes densidades de pectina LM - 1%, 3%, 5%, 7% y 10% (p/v), y se probaron almohadillas que comprendían las siguientes densidades de pectina HM: 0,66%, 1,33%, 2,66% y 4,66% (p/v).

Las densidades de calcio y trombina en las almohadillas de pectina LM fueron: 7,5 mg/cm³ y 340 UI/cm³, respectivamente.

Las densidades de calcio y trombina en las almohadillas de pectina HM fueron: 1,48 mg/cm³ y 333 UI/cm³, respectivamente.

En este experimento, también se probó el rendimiento de una almohadilla que comprendía un 3% (p/v) de pectina LM y 7,5 mg/cm³ de calcio (sin trombina) preparada como se elaboró en el Ejemplo 1.

Las almohadillas hemostáticamente eficientes se consideraron como almohadillas que lograron una pérdida de sangre de aproximadamente 4 gramos o menos.

Los resultados de la pérdida de sangre y el valor promedio cuando se usan las diferentes almohadillas de pectina se presentan en la Tabla 8 (para almohadillas que comprenden pectina LM) y en la Tabla 9 (para almohadillas que comprenden pectina HM) siguientes.

Tabla 8: Pérdida de sangre media en un modelo renal de rata cuando se usan almohadillas que comprenden diferentes densidades de pectina LM.

Almohadilla probada Densidades de pectina (%) (p/v)	Pérdida de sangre media [gr]***
Pectina al 3% * (almohadilla de control sin trombina)	8.82 (8.321, 8.904, 9.262)
Pectina al 1%*	3.25 (4.368, 4.088, 1.296)
Pectina al 3%*	3.17 (2.832, 4.243, 2.420)
Pectina al 3%**	3.53 (3.030, 4.017)
Pectina al 5%*	7.53 (5.77, 8.614, 8.215)
Pectina al 7%*	5.80 (6.366, 4.645, 6.371)
Pectina al 10%*	6.36 (4.923, 7.243, 6.921)
* Se usó pectina LM tipo 1 (como se ha definido anteriormente).	
** Se usó la pectina LM tipo 2 (como se definió anteriormente).	
*** En paréntesis aparecen los resultados de pérdida de sangre individual para cada tratamiento.	
**** Número de animales probados = 2-3.	

Tabla 9: Pérdida de sangre media en un modelo renal de rata cuando se usan almohadillas que comprenden diferentes densidades de pectina HM.

Almohadilla probada Densidades de pectina (%) (p/v)	Pérdida de sangre media [G] **
Pectina al 0,66%	7.11
Pectina al 1,33%	7.41
Pectina al 2,66%	7.53 (7.099, 7.979)
Pectina al 4,66%	9.57
* Número de animales probados = 1-2.	
** En paréntesis aparecen los resultados de pérdida de sangre individual para cada tratamiento.	

Los resultados muestran que las almohadillas que comprenden un 1% y un 3% (p/v) de pectina LM (tanto de tipo 1 como del 2) tuvieron una pérdida de sangre media aceptable de menos de 4 g (ver la Tabla 8). Los resultados también muestran que las almohadillas que comprenden un 3% (p/v) de pectina LM sin trombina tuvieron una pérdida de sangre elevada no aceptable (ver Tabla 8).

Ninguna de las almohadillas de pectina HM logró un efecto hemostático aceptable, mostrando todas una pérdida de sangre elevada no aceptable (consulte la Tabla 9).

Estos resultados muestran que una almohadilla de pectina debe comprender ventajosamente trombina y pectina LM igual o superior al 1% a menos del 5% (p/v) para obtener una almohadilla capaz de detener eficazmente el sangrado grave.

Ejemplo 4: Eficacia hemostática *in vivo* de almohadillas de pectina LM-trombina en un modelo de hemorragia de bazo de cerdo.

El ejemplo anterior mostró que una almohadilla que comprendía trombina y pectina LM a densidades del 1 y el 3% (p/v) detuvo el sangrado grave. El siguiente ejemplo estaba dirigido a evaluar la eficacia de diferentes almohadillas de trombina-pectina LM para detener el sangrado leve a moderado.

En este ejemplo se usó un modelo de hemorragia del bazo porcino como se ha descrito anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, para cada ensayo se registró el tiempo hasta la hemostasis (hasta 5 min). El criterio aceptable para el éxito es un tiempo de hemostasis de 300 segundos o menos.

Las almohadillas probadas comprendían pectina a densidades en el intervalo del 1-5% (p/v); densidades de trombina de 340 y 680 UI/cm³; y las densidades de calcio de 4,5 y 7,5 mg/cm³.

Las almohadillas se prepararon de la siguiente manera:
Se preparó una solución de pectina al 10% (p/v) disolviendo 5 g de polvo de pectina LM (tipo 1 como se ha definido anteriormente) en 40 ml de DDW. El polvo de pectina se añadió gradualmente al DDW, el paso de disolución se llevó a cabo a una temperatura de 40° C-70° C mientras se agitaba a 1300 RPM durante 3-6 horas. Después de la disolución, el pH de la solución obtenida fue de 5,0, y la titulación se llevó a cabo con aproximadamente 2 ml de NaOH 0,5 M para obtener un pH de aproximadamente 7,0. En el paso siguiente, se añadió DDW a la solución hasta un volumen final de 50 ml. La solución madre de pectina se almacenó a 4° C durante la noche (14-18 horas) para la estabilización.

Luego, la solución de trombina, que contiene CaCl₂ 40mM, se mezcló con 25 µl de CaCl₂ 2,7M (produciendo una concentración final de calcio de 27 mM dentro de la solución de trombina). La solución de trombina-calcio se mezcló luego con DDW (ver la solución de trombina y el volumen de DDW para cada almohadilla en la Tabla 10 siguiente). La solución anterior se mezcló luego con la solución madre de pectina para formar un gel de pectina-trombina (ver el volumen de solución madre de pectina al 10% p/v para cada almohadilla en la Tabla 10 siguiente). La mezcla se llevó a cabo a temperatura ambiente como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 10: Volúmenes usados para la preparación de geles de pectina LM-trombina.

Densidad final de pectina p/v dentro de la almohadilla seca	Solución madre de pectina* al 10% p/v [ml]	Solución de trombina-calcio [ml]	DDW [ml]
1%	0.5	1.7	2.8
3%	1.7	1.7	1.7
3%	1.7	3.4	-
5%	2.5	1.7	0.8

*Se usó pectina tipo 1 LM.

Después de mezclar dentro de las dos jeringuillas, las soluciones (aproximadamente 5 ml) se transfirieron a tazas de liofilización (ver dimensiones anteriores), se colocaron en un liofilizador y se liofilizaron de acuerdo con el ciclo elaborado en la Tabla 2.

Las densidades finales de pectina, trombina y calcio se enumeran en la Tabla 11. Las almohadillas secas tenían las siguientes dimensiones: una altura en el intervalo de 8-12 mm y un diámetro de 25 mm.

Tabla 11: Densidades de pectina, trombina y calcio dentro de la almohadilla seca.

Almohadilla N°	Densidad de pectina dentro de la almohadilla seca (p/v)	Trombina (UI/cm ³)	Calcio (mg/cm ³)
1	1	340	7.5
2	3	340	7.5
3	3	680	4.5
4	5	340	7.5

Como control positivo, se usó la esponja de gelatina absorbible SURGIFOAM® con trombina (preparada como se indica a continuación). La esponja SURGIFOAM® es una esponja absorbible de gelatina porcina, estéril, insoluble en agua, maleable, diseñada para uso hemostático aplicándola a una superficie de sangrado. La esponja es de apariencia blanquecina y porosa. En este experimento, antes de su uso, la SURGIFOAM® (que tenía una altura de 10 mm) se cortó en un tamaño de 20x30 mm, se saturó en 2 ml de solución de trombina (un componente de trombina como en el sellador de fibrina EVICEL® diluido de la siguiente manera: 1 ml de componente de trombina: 4 ml de solución salina). Antes de su aplicación, la esponja saturada se apretó entre los dedos enguantados para expulsar las burbujas de aire, y se aplicó de acuerdo con el procedimiento elaborado en el modelo anterior.

Los tiempos medios hasta la hemostasis logrados cuando se usan las diferentes almohadillas de pectina y el tratamiento de control (SURGIFOAM® con trombina) se presentan en la Tabla 12 siguiente. Como se ha indicado anteriormente, un tiempo aceptable para la hemostasis es de 300 segundos o menos.

Tabla 12: Tiempo medio hasta la hemostasis en un modelo de hemorragia del bazo porcino cuando se usan almohadillas que comprenden diferentes densidades de pectina LM, calcio y de trombina.

Almohadilla N°	Densidad de pectina dentro de la almohadilla seca. (P/v)	Trombina (UI/cm ³)	Tiempo medio hasta hemostasis (segundos)*
1	1	340	240 (180, 300)
2	3	340	300
3	3	680	30
4	5	340	75(120, 30)
Tratamiento de control positivo	-		30 (30, 30, 30)
* Entre paréntesis aparecen los resultados de Tiempo individual hasta la hemostasis para cada tratamiento.			
** Número de animales probados = 1-3.			

Los resultados muestran que todas las almohadillas probadas detuvieron efectivamente el sangrado en este modelo, es decir, tuvieron un tiempo hasta la hemostasis de 300 segundos o menos.

Los resultados también muestran que las almohadillas que comprenden pectina al 3% (p/v) con 680 UI/cm³ de trombina lograron resultados óptimos con un tiempo de hemostasis de 30 segundos, similar al resultado de un tratamiento de control (SURGIFOAM® con trombina) que actualmente es el procedimiento operativo estándar en entornos clínicos.

Estos resultados muestran que el rendimiento de una almohadilla de pectina puede mejorarse aumentando la densidad de trombina; por ejemplo, ver el rendimiento de una almohadilla que comprende el 3% (p/v) de pectina y 340IU/cm³ de trombina frente al rendimiento de una almohadilla que comprende el 3% (p/v) de pectina y 680IU/cm³ de trombina.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una almohadilla seca que comprende pectina a una densidad que varía de igual o más de 10 mg/cm^3 a menos de 70 mg/cm^3 , un catión divalente y trombina, en donde la pectina es pectina de metoxilo bajo (LM).
- 2.** La almohadilla de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la densidad de pectina es de más de 10 mg/cm^3 a menos de 70 mg/cm^3 .
- 10 **3.** La almohadilla de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la densidad de pectina es de 10 mg/cm^3 a 50 mg/cm^3 .
- 4.** La almohadilla de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la densidad de pectina es de 10 mg/cm^3 a menos de 50 mg/cm^3 .
- 15 **5.** La almohadilla de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la densidad de pectina es de 30 mg/cm^3 a menos de 50 mg/cm^3 .
- 6.** La almohadilla de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la densidad de pectina es de 30 mg/cm^3 .
- 20 **7.** La almohadilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el catión divalente es calcio.
- 8.** Un método para preparar una almohadilla seca que comprende pectina con bajo contenido de metoxilo (LM) y trombina, el método comprendiendo los pasos de:
 - 25 a- proporcionar pectina LM, un catión divalente y trombina;
 - b) mezclar la pectina, el catión divalente y la trombina para llevar la pectina a una concentración igual o mayor de 10 mg/cm^3 a menos de 70 mg/cm^3 bajo condiciones que permitan la formación de geles homogéneos; y
 - c- secar el gel.
- 30 **9.** El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el paso b se lleva a cabo mezclando primero la trombina con el catión divalente seguido de la adición de pectina.
- 10.** El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el catión divalente es calcio.
- 35 **11.** Una almohadilla seca como se define en la reivindicación 1 para su uso en un método para atenuar el sangrado de heridas en un paciente, el método comprendiendo aplicar la almohadilla a la herida, atenuando de este modo el sangrado de la herida.
- 40 **12.** Una almohadilla seca para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la almohadilla seca es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.