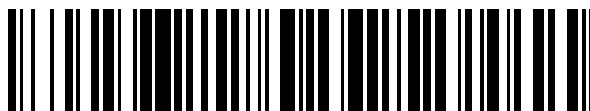


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 424**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2017** **E 17208850 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 3501552**

54 Título: **Una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**13.11.2020**

73 Titular/es:

**MAGLE CHEMOSWED HOLDING AB (50.0%)**  
**Box 839**  
**201 80 Malmö, SE y**  
**UNIVERSITÄT HEIDELBERG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JOHANSSON, HENRIK;**  
**SCHUISKY, PETER;**  
**PAUSCH, THOMAS y**  
**HACKERT, THILO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 793 424 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

Una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de detección de escape de líquido corporal y a su uso en la detección de un escape de líquido pancreático en combinación con cirugía de páncreas, por ejemplo, pancreatectomía parcial.

10 **Antecedentes**

El cáncer de páncreas es la cuarta causa principal de muerte relacionada con el cáncer en el mundo, siendo la resección pancreática la única cura potencial. Se realizan anualmente decenas de miles de estos procedimientos en todo el mundo. Una complicación frecuente, grave y costosa es la fístula pancreática posoperatoria provocada por el escape de líquido pancreático, el problema no resuelto más importante de la cirugía pancreática. El escape de líquido pancreático no solo supone un riesgo de infecciones bacterianas, sino también de que los órganos próximos, como el intestino o los vasos sanguíneos, se digieran por una acción de autodigestión del líquido pancreático, lo que puede provocar una hemorragia grave e incluso la muerte.

Por lo tanto, el escape de líquido pancreático es uno de los problemas de morbilidad más importantes en las pancreatectomías. Aunque se han estudiado diversas técnicas de pancreatectomía de disección y cierre pancreáticos, así como técnicas de tratamiento posoperatorio, todavía se produce el escape de líquido pancreático con una frecuencia de un 30 % a un 50 %. Debido a que cada caso de fístula pancreática posoperatoria es potencialmente mortal, la detección precoz es vital. La dificultad con el escape de líquido pancreático es que el escape es macroscópicamente imperceptible y actualmente los cirujanos no pueden ver si y dónde el resto pancreático se escapa durante las operaciones pancreáticas. Los enfoques intraoperatorios existentes para prevenir o cerrar el escape de líquido pancreático, por lo tanto, son imprecisos debido a que ningún procedimiento fiable y viable que permita la visualización del escape de líquido pancreático se encuentra en uso clínico.

Durante la pancreatectomía parcial es difícil prevenir completamente el escape de líquido pancreático, ya que las aberturas del sistema ductal pancreático en la superficie de corte del tejido pancreático son pequeñas y apenas visibles, por tanto, es difícil de realizar el cierre dirigido. Además, el tejido pancreático es muy blando, por lo que el cierre quirúrgico del escape debe ser muy suave para evitar rupturas.

Se usa actualmente la medición de la concentración de amilasa, que es una enzima glucolítica, en el líquido de drenaje intraperitoneal como un procedimiento indirecto de detección de un escape de líquido pancreático después de pancreatectomías parciales. Sin embargo, esta técnica adolece de ser indirecta y de no permitir la detección y localización directas de un escape de líquido pancreático durante la cirugía pancreática. Por tanto, sería deseable proporcionar una técnica que pudiera visualizar y localizar un escape de líquido pancreático incoloro y transparente durante el transcurso de la operación.

El documento EP 2 857 830, y la publicación relacionada de Mori *et al* en Gastroenterology (véase 2015; 149: p. de 1334 a 1336), divulga una sonda fluorescente que se indica que rápidamente puede detectar y formar imágenes de la presencia de un escape de líquido pancreático durante o después de la cirugía. Aunque se indica que puede proporcionar la rápida detección y formación de imágenes con alta sensibilidad, la sonda todavía adolece de requerir una iluminación con luz UV y el uso de lentes bloqueantes de luz para formar imágenes de un escape. Además, las reacciones químicas que finalmente dan como resultado la visualización de un escape, tardan minutos antes de que se visualice el escape, perturbando así notablemente el "flujo de avance quirúrgico". Además, como en general se sabe, las sondas fluorescentes tienden a tener efectos secundarios potencialmente tóxicos y la radiación UV puede dar lugar a daños en el ADN. Por tanto, el enfoque de visualización proporcionado es bastante complejo, ineficiente e inseguro para implementarse en los hospitales. Además, la forma farmacéutica usada adolece de ser un poco imprecisa, es decir, puede ser difícil de localizar el punto exacto de escape.

Los documentos CN105334209 y CN105203541 divulgan un revelador de jugo pancreático. El revelador de jugo pancreático comprende un compuesto de indicación ácido-base, por ejemplo, azul de timol y azul de bromotimol. El revelador de jugo pancreático se proporciona en diversas formas farmacéuticas seleccionadas del grupo que consiste en loción, pulverizador, papel indicador, gasa con indicador, algodón y un bastoncillo de algodón. De forma similar a la sonda fluorescente del documento EP 2 857 830, estos reveladores de jugo pancreático adolecen de ser imprecisos, es decir, puede ser difícil de identificar el punto exacto de escape, y de requerir la retirada de la forma farmacéutica una vez usada.

Dada la dificultad en llevar a cabo un tratamiento dirigido en el tejido pancreático, sería altamente deseable la localización rápida y precisa del punto exacto de escape. Además, sería deseable proporcionar un medio de visualización degradable que posibilite la aplicación repetida para volver a comprobar un cierre suficiente y que no se necesite retirar al final de la operación. Además, también sería deseable proporcionar medios de visualización

para detectar un escape de líquido pancreático en una cirugía laparoscópica.

## Sumario

5 En consecuencia, la presente invención busca mitigar, aliviar, eliminar u obviar una o más de las carencias identificadas anteriormente en la técnica y desventajas individualmente o en cualquier combinación proporcionando, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal, comprendiendo la composición un agente gelificante, que incrementa la viscosidad de la composición, y especies tamponantes, estando, de este modo, la composición tamponada. La composición comprende además un  
10 indicador de pH. El pH de la composición es al menos 0,1 unidades de pH menor o mayor que un pKa del indicador de pH. El agente gelificante es microesferas de almidón reticulado.

La composición puede comprender de un 5 a un 25 % en peso de microesferas de almidón reticulado, preferentemente de un 10 a un 20 % en peso de microesferas de almidón reticulado, más preferentemente de un 13  
15 a un 17 % en peso de microesferas de almidón reticulado. El grado de reticulación, expresado como la proporción en peso reticulante:almidón, puede estar en el intervalo de un 12 a un 20 % en peso, tal como en el intervalo de un 13,5 a un 18,5 % en peso o de un 15,0 a un 17,0 % en peso.

Un pKa del indicador de pH puede estar en el intervalo de 5 a 9; preferentemente en el intervalo de 6 a 8; más preferentemente en el intervalo de 6,5 a 7,5. Por tanto, el indicador de pH puede ser azul de bromotimol y la  
20 composición puede comprender de un 0,001 a un 0,5 % en peso, tal como de un 0,005 a un 0,25 % en peso o de un 0,01 a un 0,1 % en peso de azul de bromotimol. Además, el pH de la composición puede estar entre 4 y 7; preferentemente entre 5 y 6. Las especies tamponantes presentes en la composición para proporcionar una composición tamponada pueden estar presentes en una cantidad de 0,1 a 30 mM, preferentemente de 0,5 a 10 mM,  
25 más preferentemente de 1,0 a 5 mM.

De acuerdo con el aspecto preferente de la invención, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal es una composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático. El pH de dicha composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático está en el intervalo de 4 a 6 y un pKa del indicador de pH  
30 está en el intervalo de 6 a 8; preferentemente en el intervalo de 6,5 a 7,5.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona dicha composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático para su uso en la detección de un escape de líquido pancreático en combinación con cirugía pancreática, por ejemplo pancreatectomía parcial.  
35

Otros rasgos característicos ventajosos de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes. Además, los rasgos característicos ventajosos de la invención se explican en los modos de realización divulgados en el presente documento.

## 40 Descripción detallada

Para proporcionar un medio de detección de un escape de líquido pancreático que aborde las necesidades en la técnica se consideraron diversos conceptos. Se descubrió que los medios basados en polvo, por ejemplo, microesferas de almidón reticulado impregnadas de indicador, adolecían de ser difíciles de manipular y aplicar.  
45 Además, el polvo aplicado se eliminaba fácilmente por el jugo del páncreas, proporcionando así una detección imprecisa, en caso de que la hubiera. Además, ninguno de los intentos para superar las deficiencias de los polvos secos proporcionándolos en una cinta o reemplazándolos por toallitas de papel o gasas impregnadas con indicador tuvo éxito y no pudo proporcionar una detección precisa.

Para superar estas deficiencias y proporcionar un medio de detección de un escape de líquido pancreático que aborde las necesidades en la técnica, se consideró entonces un medio de detección de escape de líquido pancreático líquido, en lugar de seco, sólido o inmovilizado. Por tanto, se proporcionó una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal que comprendía un indicador de un escape.  
50

Se reconoció que emplear un indicador de pH como indicador de un escape proporciona una respuesta rápida al cambio en el pH provocado por el escape de líquido pancreático, siempre que el pH de la composición difiera del de un pKa del indicador de pH, de modo que un cambio en el pH dé como resultado que el indicador de pH cambie el color. El pH del líquido pancreático es mayor (aproximadamente de 8,3 a 8,5) que el pH del líquido intersticial normal (pH de aproximadamente 7,4). Con el uso de un indicador de pH adecuado, por ejemplo, azul de bromotimol, se  
55 puede detectar un escape de líquido pancreático. Además, no solo debe diferir el pH de la composición de un pKa del indicador de pH. También se observó que la composición debe comprender especies tamponantes para proporcionar una composición tamponada. El tampón permitirá un contraste mejorado entre la detección positiva y negativa.

Además, para proporcionar a la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal una precisión mejorada, se necesita incrementar la viscosidad de la composición acuosa. Como ejemplo, la aplicación de un  
65

indicador de pH disuelto en agua, por ejemplo, por pulverización, no proporcionó ninguna detección precisa. Sin embargo, se descubrió que añadir un agente gelificante incrementaba la viscosidad de una manera deseable para proporcionar un límite nítido entre la detección positiva y negativa. El incremento de la viscosidad de la composición disminuirá la difusión dentro de la composición, que está presente como un gel o una masa semisólida. La difusión disminuida dentro de la composición implica que un cambio de pH debido al líquido pancreático de escape que provoca una variación en el color de la composición (el azul de bromotimol varía de amarillo a azul en el intervalo de pH de 6,0 a 7,6) estará más localizado y de ahí que la precisión mejore. Por tanto, la precisión de una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal se puede mejorar añadiendo un agente gelificante que incrementa la viscosidad de la composición.

De acuerdo con un modo de realización, por tanto, se proporciona una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal que comprende un agente gelificante. La composición comprende además un indicador de pH. Además, el agente gelificante es microesferas de almidón reticulado. Para proporcionar un cambio de color visible en respuesta a un cambio en el pH, el pH de la composición es al menos 0,1 unidades de pH menor o mayor que un pKa del indicador de pH.

Como ejemplo, para el azul de bromotimol, que tiene un pKa de 7,0, el pH de la composición debe ser de 6,9 o menor, o 7,1 o mayor. Para proporcionar un cambio de color más claro, el pH de la composición puede ser al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidades de pH menor o mayor que un pKa del indicador de pH. De acuerdo con un modo de realización, el pH de la composición es al menos 1,0 unidades de pH menor o mayor que un pKa del indicador de pH.

Para la detección de un escape de líquido pancreático, el pH de la composición es preferentemente menor que un pKa del indicador de pH, ya que el pH del líquido intersticial es menor que el pH del líquido pancreático. Por tanto, el pH de la composición puede ser al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidades de pH menor que un pKa del indicador de pH. De acuerdo con un modo de realización, el pH de la composición es al menos 1,0 unidades de pH menor que un pKa del indicador de pH.

Además, se descubrió que era necesario que la composición comprendiera especies tamponantes, es decir, la composición debe estar tamponada. De acuerdo con un modo de realización, la composición está, por tanto, tamponada. Las especies tamponantes pueden estar presentes en una cantidad global de 0,1 a 30 mM, tal como de 0,5 a 10 mM o de 1,0 a 5 mM. Tener una concentración demasiado alta de especies tamponantes puede dar como resultado ningún cambio de color o uno retrasado. El cambio de color retrasado no solo adolecerá de una indicación retrasada, sino también de una precisión disminuida. Además, una concentración demasiado baja de especies tamponantes puede dar como resultado una detección de un escape imprecisa e incluso potencialmente falsos positivos.

El tamponamiento de la composición proporciona una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal más sólida. Además, no solo difieren el líquido intersticial y el líquido pancreático en el pH, sino también en la fuerza de tamponamiento. Aunque el líquido intersticial no cambiará significativamente el pH de una composición tamponada, el líquido pancreático, que tiene una mayor fuerza de tamponamiento debido a las altas concentraciones de bicarbonato en el líquido pancreático, también podrá incrementar el pH de una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal tamponada y conseguir, de ese modo, que la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal cambie de color. El líquido pancreático comprende altas concentraciones de bicarbonato para poder neutralizar el ácido gástrico ácido. Por tanto, el tamponamiento de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal puede ser ventajoso para mejorar además la precisión de la composición.

Como se reconoce por el experto en la técnica, se pueden usar diversos sistemas tamponantes para proporcionar una composición tamponada. Como ya se expuso, la composición tamponada puede tener un pH de 4 a 7, tal como de 5 a 7, de 5 a 6 o de 6 a 7. La composición puede comprender, por tanto, solución salina tamponada con fosfato (PBS). De acuerdo con un modo de realización, la composición está tamponada con fosfato y/o citrato. La composición puede comprender fosfato de 0,1 a 30 mM, tal como fosfato de 0,5 a 10 mM o de 1,0 a 5 mM. En este contexto, la concentración de fosfato se refiere a la concentración global de diversas especies de fosfato (por ejemplo,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ).

Además, las especies tamponantes se pueden basar en un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, PIPES (ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etanosulfónico)), MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico) o una mezcla de uno o varios de estos compuestos. Sin embargo, es preferente que las especies tamponantes se basen en compuesto(s) endógeno(s), por ejemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido láctico.

Dependiendo del indicador de pH, se puede usar la presente composición para detectar un escape de diversas clases de líquidos corporales, por ejemplo, bilis, similares al líquido pancreático, que es débilmente alcalino, o el jugo gástrico, que es ácido. La bilis se secreta por la vesícula biliar. Por tanto, también se puede usar la presente composición acuosa de detección de escape de líquido corporal en la detección de un escape de bilis, por ejemplo, después de un traumatismo o en combinación con cirugía de vesícula biliar. Aunque no se limita a esto, un pKa del

indicador de pH puede estar en el intervalo de 5 a 9; preferentemente en el intervalo de 6 a 8; más preferentemente en el intervalo de 6,5 a 7,5. Para la detección de un escape de líquido pancreático, se descubrió que un pKa en el intervalo de 6 a 8, preferentemente en el intervalo de 6,5 a 7,5, era adecuado. Este intervalo también es preferente para la detección de un escape de bilis. De acuerdo con un modo de realización, el indicador de pH es azul de bromotimol. El azul de bromotimol no solo tiene un pKa apropiado, sino que también el azul de bromotimol presenta un contraste nítido de colores entre un pH bajo (amarillo) y alto (azul oscuro). Además, también el contraste entre la indicación (azul oscuro) y el tejido y la sangre es nítido. Además, el indicador de pH puede ser rojo fenol (clorhidrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) o rojo neutro (también conocido como fenolsulfonftaleína o 1,1-dióxido de 3,3-bis(*p*-hidroxifenil)-2,1-3H-benzoxatíol).

Para la detección de un escape de jugo gástrico, un pKa del indicador de pH puede estar en el intervalo de 4 a 6. Como se reconoce por el experto en la técnica, es conocida una serie de indicadores de pH que tienen un pKa en este intervalo, y de ahí un cambio de color correspondiente. Como ejemplo, se pueden mencionar los indicadores de pH verde de bromocresol (2,6-dibromo-4-[7-(3,5-dibromo-4-hidroxil-2-metil-fenil)-9,9-dioxo-8-oxa-9λ6-tiabicio]4.3.0]nona-1,3,5-trien-7-il]-3-metil-fenol), rojo de metilo (ácido 2-[[4-(dimetilamino)fenil]diacenil]benzoico) y violeta de metilo (número de registro de CAS: 1340-02-9).

Como ya se mencionó, el pH de la composición debe diferir del pKa del indicador de pH. El pH de la composición puede estar entre 4 y 7, preferentemente entre 5 y 6. Se descubrió que un pH ligeramente ácido era beneficioso en la detección de un escape de líquido pancreático.

Como ya se analizó, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal comprende un agente gelificante para incrementar la viscosidad de la composición. Una composición con viscosidad incrementada ha mejorado la precisión, es decir, el cambio de color solo aparece cerca del escape cuando se aplica, por ejemplo, al resto pancreático después de la pancreatometomía. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que aunque el incremento de la viscosidad de la composición mejora la precisión, también puede ralentizar el cambio de color. Aunque una composición más viscosa puede proporcionar una localización de un escape más precisa, una composición demasiado viscosa puede adolecer de cambiar el color lentamente en respuesta a un escape. Además, una composición demasiado fluida o demasiado viscosa puede ser más difícil de aplicar.

Es preferente si la composición marcadamente está fluidificada por corte y/o es un (pseudo)plástico de Bingham. Una composición que está fluidificada por corte y/o es un (pseudo)plástico de Bingham permanecerá en posición una vez aplicada y no se extenderá. Todavía, la composición se puede aplicar fácilmente, por ejemplo, por medio de una jeringuilla, dadas sus propiedades de fluidificación por corte (véase el "efecto ketchup").

De acuerdo con un modo de realización, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal comprende de un 5 a un 25 % en peso, tal como de un 10 a un 20 % en peso, de un 13 a un 17 % en peso o de un 14 a un 16 % en peso del agente gelificante. Como se expone a continuación, las microesferas de almidón reticulado representan un agente gelificante preferente.

No solo la concentración del agente gelificante, sino también la concentración de sal, es decir, la fuerza iónica, afecta a la viscosidad de la composición. Un incremento de la fuerza en la solución tiene un efecto decreciente sobre la viscosidad. Las concentraciones mayores que 1 M tienen un efecto significativo sobre la viscosidad. La disminución está provocada por un emparejamiento iónico entre los iones cargados y las macromoléculas en la matriz. La introducción de iones a concentraciones menores da lugar a una interacción de atracción disminuida entre las macromoléculas (biopolímeros) debido al efecto de salado.

De acuerdo con un modo de realización, la fuerza iónica en la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal es de 50 a 500 mM, tal como de 100 a 250 mM o de 125 a 175 mM. Una fuerza iónica en el intervalo de 100 a 250 mM, tal como de 125 a 175 mM, puede ser especialmente preferente si el agente gelificante es microesferas de almidón reticulado.

Se descubrió que el agente gelificante es preferentemente microesferas de almidón reticulado. Las microesferas de almidón reticulado proporcionan una composición que está fluidificada por corte y/o es un (pseudo)plástico de Bingham. Como ya se expuso, una composición que está fluidificada por corte y/o es un (pseudo)plástico de Bingham permanecerá en posición una vez aplicada y no se extenderá. Todavía, la composición se puede aplicar fácilmente, por ejemplo, por medio de una jeringuilla, dadas sus propiedades de fluidificación por corte (véase el "efecto ketchup").

Además, con el uso de microesferas de almidón reticulado como agente gelificante, se descubrió que era más fácil establecer una composición de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal para obtener una viscosidad adecuada para la detección de un escape de líquido corporal. Las microesferas hinchadas mejoran la fricción interna de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal. Esto proporciona que la consistencia de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal sea tal que se vuelva mucho más fácil de manipular y aplicar. Además, también promueve la acción del indicador en el sentido de que la indicación de color se vuelve más precisa en la localización. Además, el almidón y las microesferas de almidón reticulado son

biodegradables. Esto implica que no se necesita retirar una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal que comprende almidón o microesferas de almidón reticulado o un agente gelificante relacionado, como gelificante, sino que se degradará *in situ*.

De acuerdo con un modo de realización, el agente gelificante es microesferas de almidón reticulado. Las microesferas de almidón reticulado consisten en almidón de origen vegetal (por ejemplo, de patatas) que se reticula para proporcionar microesferas. Como se reconoce por el experto en la técnica, el almidón es un polímero natural, que se construye por una mezcla de dos cadenas poliméricas, un polímero de glucosa ramificada (cadenas de  $\alpha$ -4-glucosa con ramificaciones en  $\alpha$ 6). Es un material natural encontrado en plantas y animales donde funciona como un depósito de energía. El polímero consiste en amilosa (de cadena larga y de baja ramificación) y amilopectina (altamente ramificada y de cadena corta). La proporción entre estos dos polímeros es diferente dependiendo de la fuente. Como es conocido en la técnica, las microesferas de almidón reticulado degradables (DSM) se forman por un procedimiento de emulsificación en el que las cadenas poliméricas se reticulan en la forma esférica. Se han mostrado micropartículas de almidón o almidón modificado en la técnica anterior (por ejemplo, D.R. Lu *et al.* "Starch-based completely biodegradable polymer materials", *eXPRESS Polymer Letters*, vol. 3, n.º 6 (2009) p. 366-375; P.B. Malafaya *et al.* "Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers", *J. Mater. Sci: Mater Med* (2006), 17:371-377). En la técnica, las microesferas de almidón reticulado son bien conocidas por formar parte de sistemas de administración de fármacos degradables. El almidón en las microesferas de almidón reticulado puede ser almidón hidrolizado. Se puede usar el grado de hidrolización para adaptar las propiedades de las microesferas de almidón reticulado resultantes.

En el almidón de reticulación para proporcionar microesferas de almidón reticulado se usa un reticulante, por ejemplo, epíclorhidrina. De acuerdo con un modo de realización, el agente gelificante es microesferas de almidón reticulado que se han reticulado con el uso de epíclorhidrina.

Como los niveles de amilasa en el líquido pancreático son sustancialmente mayores que los niveles normales en el cuerpo, el tiempo de degradación de las microesferas basadas en almidón también se acortará respectivamente.

El grado de reticulación afecta a la resistencia a la degradación por amilasa. Un mayor grado de reticulación proporciona una mayor resistencia a la degradación. El grado de reticulación debe ser preferentemente tal que las microesferas de almidón reticulado estén intactas durante al menos 5 minutos cuando se expongan al líquido corporal que se va a detectar para permitir la detección de cualquier escape con suficiente precisión. Sin embargo, un grado demasiado alto de reticulación afectará negativamente a las propiedades, por ejemplo, viscosidad y tiempo de detección, de la composición.

De acuerdo con un modo de realización, el grado de reticulación, expresado como la proporción en peso de reticulante:almidón, debe estar en el intervalo de un 12 a un 20 % en peso, tal como de un 13,5 a un 18,5 % en peso o de un 15,0 a un 17,0 % en peso. Para la detección de líquido pancreático, se estimó que un grado de reticulación de aproximadamente un 25 % en peso era preferente.

Las microesferas de almidón reticulado se degradan *in vivo* por la amilasa plasmática en oligosacáridos, maltosa y finalmente en glucosa, que se introduce en el metabolismo normal.

Como la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal se va a usar en la cavidad abdominal, cuando se usa como una composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático, el agente gelificante debe ser preferentemente biodegradable. El uso de un agente gelificante biodegradable implica que el agente gelificante no necesariamente se debe retirar completamente antes de cerrar la cavidad abdominal. Especialmente cuando se va a usar en cirugía laparoscópica, es ventajoso, o incluso prácticamente necesario, que el agente gelificante sea biodegradable. Las microesferas de almidón reticulado representan un ejemplo preferente de un agente gelificante que es biodegradable.

Las microesferas de almidón reticulado se pueden proporcionar en diversos tamaños y pueden tener una distribución de diversos tamaños. Las figuras proporcionadas a continuación se refieren a microesferas de almidón reticulado en estado hinchado como están presentes dentro de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal. Se descubrió que las microesferas de almidón reticulado no debían ser demasiado pequeñas para presentar marcadamente propiedades de fluidificación por corte y/o de (pseudo)plástico de Bingham. De acuerdo con un modo de realización, el diámetro medio basado en volumen ( $D[4,3]$ ), como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009 usando difracción láser, es, por tanto, de 100 a 1000  $\mu\text{m}$ , tal como de 250 a 750  $\mu\text{m}$ . Además, el diámetro medio basado en volumen  $D[v, 0,5]$ , como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009, típicamente será ligeramente menor que el diámetro medio basado en volumen. Todavía, también el diámetro medio en volumen  $D[v, 0,5]$ , como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009, puede estar en el intervalo de 100 a 1000  $\mu\text{m}$ , tal como en el intervalo de 250 a 750  $\mu\text{m}$ , aunque es menor que el diámetro medio basado en volumen. Además, la distribución de tamaños puede ser tal que un 90 % de las partículas, como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009, tengan un diámetro basado en volumen ( $D[v, 0,9]$ ) de menos de 300 a 2000  $\mu\text{m}$ , tal como menos de 500 a 1500  $\mu\text{m}$ . Además, la distribución de tamaños puede ser tal que un 10 % de las partículas, como se determina de

acuerdo con ISO 13 320:2009, tengan un diámetro basado en volumen ( $D[v, 0,1]$ ) de menos de 50 a 600  $\mu\text{m}$ , tal como de menos de 100 a 500  $\mu\text{m}$ , es decir, un 90 % de las partículas que tienen un diámetro de al menos 50 a 600  $\mu\text{m}$ , tal como al menos de 100 a 500  $\mu\text{m}$ .

5 De acuerdo con un modo de realización, la distribución de tamaños de las microesferas de almidón reticulado, como están presentes dentro de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal, es tal que:

- el diámetro medio basado en volumen  $D[4,3]$ , como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009 usando difracción láser, es de 100 a 1000  $\mu\text{m}$ , como de 250 a 750  $\mu\text{m}$ ; y/o

- el diámetro basado en volumen  $D[v, 0,9]$ , como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009 usando difracción láser, es de 300 a 2000  $\mu\text{m}$ , tal como de 500 a 1500  $\mu\text{m}$ ; y/o

- el diámetro basado en volumen  $D[v, 0,1]$ , como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009 usando difracción láser, es de 50 a 600  $\mu\text{m}$ , tal como de 100 a 500  $\mu\text{m}$ .

El tipo y la cantidad de agente gelificante en la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal afectará a la viscosidad de la composición. De acuerdo con un modo de realización, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal comprende:

- de un 5 a un 25 % en peso, tal como de un 10 a un 20 % en peso, de un 13 a un 17 % en peso o de un 14 a un 16 % en peso del agente gelificante, por ejemplo, microesferas de almidón reticulado;

- de un 0,001 a un 0,5 % en peso, tal como de un 0,005 a un 0,25 % en peso o de un 0,01 a un 0,1 % en peso del indicador de pH, por ejemplo, azul de bromotimol; y

- al menos un 75 % en peso, tal como al menos un 80 % en peso, de agua.

Preferentemente, las microesferas de almidón reticulado en dicho modo de realización tienen un grado de reticulación de un 12 a un 20 % en peso, tal como de un 13,5 a un 18,5 % en peso o de un 15,0 a un 17,0 % en peso. Además, la concentración del tampón puede ser de 0,1 a 30 mM, tal como de 0,5 a 10 mM o de 1,0 a 5 mM. El tampón puede ser un tampón fosfato. Además, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal se puede basar en solución salina. Preferentemente, la composición acuosa comprende solución salina tamponada con fosfato para proporcionar una composición isotónica tamponada. De acuerdo con este modo de realización, la fuerza iónica de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal puede ser de 100 a 200 mM, preferentemente de 125 a 175 mM.

El indicador de pH debe estar presente en una cantidad suficiente para proporcionar una composición coloreada, al menos por encima o por debajo de su  $pK_a$ . Por tanto, la concentración del indicador de pH puede ser al menos de un 0,001 % en peso, tal como al menos de un 0,005 % en peso o un 0,01 % en peso. Además, visto desde una perspectiva de seguridad, la concentración del indicador de pH no debe ser demasiado alta. Por tanto, la concentración del indicador de pH puede ser de un 0,5 % en peso o menor, tal como de un 0,25 % en peso o de un 0,1 % en peso o menor.

Para mejorar el periodo de validez de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal, puede comprender además un conservante. Son conocidos ejemplos de conservantes por los expertos en la técnica e incluyen ácido láctico y ácido benzoico, entre otros. Dado que la composición típicamente es ligeramente ácida, incluso se puede prescindir de la adición de conservante.

Además, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal puede comprender cloruro de sodio (NaCl) para ajustar la tonicidad y proporcionar una composición isotónica. Para proporcionar una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal isotónica tamponada, se puede usar solución salina tamponada con fosfato (PBS) para disolver el agente gelificante.

De acuerdo con un modo de realización preferente, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal es una composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático. El pH de dicha composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático está en el intervalo de 4 a 6. Además, un  $pK_a$  del indicador de pH está en el intervalo de 6 a 8, tal como en el intervalo de 6,5 a 7,5. El indicador de pH en la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático se puede seleccionar del grupo que consiste en azul de bromotimol, rojo fenol y rojo neutro; y preferentemente el indicador de pH es azul de bromotimol.

Se puede usar dicha composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático en la detección de un escape de líquido pancreático en combinación con cirugía pancreática, por ejemplo, pancreatectomía parcial. Por tanto, un modo de realización se refiere a la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático para su uso en la detección de un escape de líquido pancreático en combinación con cirugía pancreática, por

ejemplo pancreatectomía parcial. En dicho uso, la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático se aplica al páncreas durante la cirugía pancreática. En base a sus propiedades, la composición mantendrá su color inicial (amarillo si se usa azul de bromotimol) a menos que haya un escape de líquido pancreático. Un escape de líquido pancreático aumentará localmente el pH en la composición y dará como resultado un cambio de color local (de azul a azul verdoso si se usa azul de bromotimol), que no solo es indicativo de la cantidad de, sino que también localiza el punto exacto de escape. Por tanto, se informa al cirujano de que el cierre o anastomosis del resto pancreático es insuficiente y de que se necesita un tratamiento adicional antes de que se vaya a cerrar la cavidad abdominal o de que se tiene que cambiar el tratamiento perioperatorio, por ejemplo, disposición del drenaje, medicación o tratamiento en la unidad de cuidados intensivos. Además, también se proporciona orientación al cirujano con respecto a la localización exacta del escape en la superficie del tejido. Esta última es una orientación importante para dirigir el tratamiento de cierre; por ejemplo, una ligadura adicional.

Otro modo de realización de la invención se refiere a un procedimiento de detección de un escape de líquido pancreático en combinación con cirugía pancreática. En dicho procedimiento, la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático se aplica al páncreas durante la cirugía pancreática, por ejemplo, después del cierre convencional del resto pancreático en la pancreatectomía distal con tratamiento de ligadura, tal como suturas de puntos simples no absorbibles transversales o uso de grapadora. Como ya se explicó, el escape de líquido pancreático se detectará y localizará en la superficie del tejido por un cambio en el color de la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático aplicada a la superficie. El procedimiento puede comprender otra etapa de detección de un escape detectado, tal como por un tratamiento de ligadura dirigido, por ejemplo, suturas de puntos simples/en x no absorbibles o aplicación de grapas. Como la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático se aplica a la superficie del tejido por inyección intrabdominal, se puede usar tanto en cirugía abierta como en laparoscópica o asistida por robot.

De acuerdo con otro modo de realización, la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal es una composición acuosa de detección de escape de líquido biliar. El pH de dicha composición acuosa de detección de escape de bilis está en el intervalo de 4 a 6. Además, un pKa del indicador de pH está en el intervalo de 6 a 8, tal como en el intervalo de 6,5 a 7,5. El indicador de pH en la composición acuosa de detección de escape de bilis se puede seleccionar del grupo que consiste en azul de bromotimol, rojo fenol y rojo neutro; y preferentemente es el indicador de pH azul de bromotimol.

Se puede usar dicha composición acuosa de detección de escape de bilis en la detección de un escape de bilis en combinación con cirugía abdominal, por ejemplo, después de resección hepática parcial en enfermedades benignas o malignas, traumatismo hepático o trasplante de hígado. Por tanto, un modo de realización se refiere a la composición acuosa de detección de escape de bilis para su uso en la detección de un escape de bilis en combinación con transección de la superficie hepática, daño hepático traumático o anastomosis biliodigestiva. En dicho uso, la composición acuosa de detección de escape biliar se aplica a la superficie del tejido, lo que quiere decir cápsula hepática, superficie parenquimatosa de corte o anastomosis biliodigestiva. En base a sus propiedades, la composición mantendrá su color inicial (amarillo si se usa azul de bromotimol) a menos que haya un escape de bilis. Un escape de bilis aumentará localmente el pH en la composición y dará como resultado un cambio de color local (de azul a azul verdoso si se usa azul de bromotimol), que no solo es indicativo de, sino que también localiza el punto exacto de escape biliar. Por tanto, se informa al cirujano del cierre insuficiente del resto hepático o anastomosis biliodigestiva y de que se necesita un tratamiento adicional antes de que se vaya a cerrar la cavidad abdominal o de que se tiene que cambiar el tratamiento perioperatorio, por ejemplo, disposición del drenaje, medicación o tratamiento en la unidad de cuidados intensivos. Además, también se proporciona orientación al cirujano con respecto a la cantidad y la localización exacta de un escape biliar. Esta última es una orientación importante para el cierre dirigido de la superficie del tejido hepático con escape o anastomosis biliodigestiva, tal como ligadura, tratamiento con grapas o aplicación de parches de cierre biológicos o artificiales. Como la composición acuosa de detección de escape de líquido biliar se aplica a la superficie del tejido por inyección intrabdominal, se puede usar tanto en cirugía abierta como en laparoscópica o asistida por robot. Sin explicación adicional, se cree que, usando la descripción precedente, un experto en la técnica puede utilizar la presente invención en su extensión más completa. Por lo tanto, los modos de realización específicos preferentes precedentes se deben interpretar como meramente ilustrativos y no limitantes de la divulgación en modo alguno.

Aunque se ha descrito anteriormente la presente invención con referencia a modos de realización específicos, no se pretende que esté limitada a la forma específica expuesta en el presente documento. En su lugar, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas y otros modos de realización distintos de la específica anterior son igualmente posibles dentro del alcance de estas reivindicaciones adjuntas, por ejemplo, diferentes de los descritos anteriormente.

En las reivindicaciones, el término "comprende/que comprende" no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Adicionalmente, aunque se pueden incluir rasgos característicos individuales en diferentes reivindicaciones o diferentes modos de realización, estos posiblemente se pueden combinar ventajosamente, y la inclusión en diferentes reivindicaciones o modos de realización no implica que una combinación de rasgos característicos no sea viable y/o ventajosa.

Además, las referencias al singular no excluyen a una pluralidad. Los términos "un", "una", "primero", "segundo", etc. no excluyen a una pluralidad.

### Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, rasgos característicos y ventajas que puede abordar la invención serán evidentes y se aclararán a partir de la siguiente descripción de los modos de realización ejemplares de la presente invención, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La **fig. 1** es una secuencia de fotografías tomadas durante una cirugía pancreática (pancreatectomía distal). La **fig. 1a** representa la parte cerrada del páncreas que se conserva después de la pancreatectomía distal. A simple vista no hay ningún escape evidente. Sin embargo, como se puede observar en la **fig. 1b**, todavía se visualizó un escape (véanse las flechas) por medio de la presente composición acuosa de detección de escape de líquido corporal. La **fig. 1c** representa el páncreas después del cierre dirigido del escape localizado. Finalmente, como se puede observar en la **fig. 1d**, la reaplicación de la presente composición acuosa de detección de escape de líquido corporal confirmó que el cierre dirigido del escape localizado (véase la fig. 1b) tuvo éxito.

### Experimental

Los siguientes ejemplos son meros ejemplos y de ninguna manera se deben interpretar como que limitan el alcance de la invención. En su lugar, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

#### Material

De las tres clases diferentes (tamaño y grado de reticulación) de microesferas de almidón reticulado usadas, dos se produjeron internamente en Magle AB (Kristianstad, Suecia) como se describe a continuación y la tercera (Arista®) se obtuvo de Davol Inc. Todos los demás productos químicos y reactivos se usaron en la preparación de las microesferas de almidón reticulado y en las preparaciones posteriores de los hidrogeles de calidad analítica y se obtuvieron de VWR International AB a menos que se indique de otro modo. El almidón de patata natural se obtuvo de Lyckeby Starch (Kristianstad, Suecia).

#### General

En resumen, las microesferas de almidón reticulado de los dos primeros tipos se proporcionaron:

- hidrolizando almidón natural para proporcionar cadenas poliméricas más cortas;
- reduciendo los grupos aldehído terminales para evitar reducir la decoloración;
- formando una emulsión que comprendía gotículas de almidón esféricas;
- reticulando el almidón en las gotículas para proporcionar microesferas de almidón reticulado; y microesferas de almidón reticulado; y
- lavando las microesferas de almidón reticulado.

Las propiedades de las microesferas de almidón reticulado resultantes, como se reconoce en la técnica, dependen de una serie de factores que incluyen:

- el grado de hidrólisis, es decir, la longitud de las cadenas poliméricas (afectadas por el pH, el tiempo de reacción y la temperatura);
- el tamaño de las microesferas (afectadas por el tipo de emulsionante, la longitud de las cadenas poliméricas y la velocidad de agitación); y
- el grado de reticulación (afectado por la proporción en peso epíclorhidrina:almidón).

#### Preparación de la solución de almidón hidrolizado (HST)

En un primer reactor se carga agua purificada con agitación a temperatura ambiente. A continuación, en el primer reactor se carga ácido clorhídrico concentrado. En el ácido diluido se carga ahora almidón de patata natural en porciones con agitación. Se aumenta la temperatura de la camisa. La mezcla se agita a temperatura elevada hasta que se logra el grado deseado de hidrólisis. Después de que se complete el tiempo de reacción, la temperatura de la camisa se reduce a temperatura ambiente. La mezcla de reacción ácida se desactiva por una adición controlada de hidróxido de sodio. La temperatura interior no debe superar la temperatura de la reacción durante la carga de la

base. En la mezcla, se carga borohidruro de sodio con agitación y condiciones controladas a temperatura ambiente. Una vez que el borohidruro se disuelve completamente, la mezcla se agita para que se produzca una reacción completa.

## 5 Preparación de microesferas

En el segundo reactor, se cargan tolueno y Rhodafac PA17 (emulsionante) en condiciones controladas y se agita a temperatura elevada hasta que Rhodafac se disuelva completamente. En el segundo reactor se carga ahora el contenido del primer reactor, se hidroliza y reduce el almidón natural, a una velocidad de agitación alta hasta que se obtenga una suspensión estable. La velocidad de agitación y, de este modo, la composición de la suspensión, se ajusta dependiendo de qué intervalo de microesferas se va a producir. En la suspensión, se carga epiclorhidrina en condiciones controladas. La cantidad de reticulante cargado depende del intervalo de microesferas que se va a producir. La reacción se mantiene durante la noche a temperatura elevada. Se carga etanol y la temperatura de la camisa se reduce hasta la temperatura ambiente, y el producto bruto sedimenta. La fase superior clara se elimina por sifón.

### Tratamiento

Se carga etanol en el producto bruto con agitación. Una vez homogénea, a continuación, se dejó que la mezcla sedimentara. La fase superior se elimina por sifón. Esta secuencia se repite tres veces.

En la mezcla de producto se carga agua purificada con agitación. En la suspensión se carga ahora ácido acético con agitación para obtener un pH de 4-5. Se carga etanol. Una vez homogénea, se deja que la mezcla sedimente y, a continuación, la fase superior se elimina por sifón.

En el reactor se carga una solución acuosa preparada previamente de etanol (20 % en peso), la mezcla se agita. Una vez homogénea, se deja que la mezcla sedimente y, a continuación, la fase superior se elimina por sifón. Esta secuencia se repite cuatro veces.

Se repite el procedimiento anterior sin sedimentación, pero la mezcla se recoge de la válvula inferior y se filtra.

El producto se enjuaga con etanol absoluto y se filtra. El procedimiento de enjuague se repite durante cinco veces.

El producto se seca a vacío en una bandeja de acero inoxidable a 60 °C y se tamiza a través de un tamiz de 400 micrómetros (primer tipo) para proporcionar microesferas en el intervalo de tamaños (estado húmedo; dispersado en agua purificada) de 32 a 900 µm, o a través de un tamiz de 600 micrómetros (segundo tipo) para proporcionar microesferas en el intervalo de tamaños (estado húmedo; dispersado en agua purificada) de 50 a 1200 µm.

### Tipos de microesferas

Con el uso de este procedimiento, se produjeron dos tipos de microesferas de almidón reticulado. El primer tipo tenía un diámetro medio basado en volumen (D[4,3]) de aproximadamente 450 µm (estado húmedo; dispersado en agua purificada) y un grado de reticulación de aproximadamente un 14 %. Se produjo el segundo tipo que tenía un diámetro medio basado en volumen (D[4,3]) de aproximadamente 620 µm (estado húmedo; dispersado en agua purificada) y un grado de reticulación de aproximadamente un 15 %.

Como ya se indicó, el tercer tipo de microesferas fueron Arista® proporcionadas por Davol Inc. Estas microesferas tienen un diámetro medio basado en volumen (D[4,3]) de aproximadamente 138 µm (estado húmedo; dispersado en agua purificada) y un grado de reticulación de aproximadamente un 11 %.

### Provisión de una composición de detección de escape de líquido pancreático

Para proporcionar una composición de detección de escape de líquido pancreático, se cargó almidón de patata natural (véase el ejemplo 21 y 22), microesferas (15 g) del primer, segundo o tercer tipo en una solución de etanol de 25 ml que contenía azul de bromotimol (0,2 % p/p). La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo que la mezcla se secó a vacío a 60 °C durante la noche.

El producto seco, la mezcla base (15 g), se disolvió en 100 ml de agua purificada, o solución preparada previamente que contenía solución salina y un tampón fosfato, y se acidificó opcionalmente por adición de ácido clorhídrico. La mezcla se agitó hasta que se obtuvo una solución homogénea a temperatura ambiente, a continuación, se cargó el gel base homogéneo en jeringuillas.

Usando este protocolo, se obtuvieron 25 composiciones de detección de escape de líquido pancreático. A continuación se indican las modificaciones a este protocolo, así como el tipo de microesferas para proporcionar cada ejemplo.

Ejemplo 1 La mezcla base que comprende microesferas del tercer tipo se carga en agua purificada, 100 ml, y se acidifica con ácido clorhídrico (0,1 M). A continuación, se cargó el gel homogéneo en jeringuillas.

5 Ejemplo 2: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en agua purificada, 100 ml, sin ninguna acidificación. A continuación, se cargó el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 3: La mezcla base que comprende microesferas del tercer tipo se carga en agua purificada, 100 ml, y se acidifica con 5 ml de ácido clorhídrico (0,1 M). A continuación, se cargó el gel homogéneo en jeringuillas.

10 Ejemplo 4: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 83 ml, y un tampón fosfato a pH 6,4, 1 ml. El pH del gel resultante se ajustó a 4,5 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agitó hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. A continuación, se cargó el gel homogéneo en jeringuillas.

15 Ejemplo 5: La mezcla base (20,5 g) que comprendía microesferas del segundo tipo se cargó en una solución preparada previamente que contenía solución salina, 100 ml. La solución se acidifica con el uso de ácido clorhídrico, 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

20 Ejemplo 6: La mezcla base (29,5 g) que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 150 ml. La solución se ajusta a 4,5 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

25 Ejemplo 7: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 1,13 ml. La solución se ajusta a 4,6 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

30 Ejemplo 8: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 1,13 ml. La solución se ajusta a 5,0 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

35 Ejemplo 9: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 1,13 ml. La solución se ajusta a 4,3 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

40 Ejemplo 10: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,565 ml. La solución se ajusta a 4,5 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

45 Ejemplo 11: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,565 ml. La solución se ajusta a 4,8 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

50 Ejemplo 12: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 2,26 ml. La solución se ajusta a 4,1 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

55 Ejemplo 13: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 85 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 2,26 ml. La solución se ajusta a 4,7 con el uso de ácido clorhídrico, 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

60 Ejemplo 14: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 83 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,1 ml. El pH del gel se ajusta a 5,8 usando ácido clorhídrico 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas y se esteriliza en una autoclave.

65 Ejemplo 15: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 83 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,457 ml. El pH

del gel se ajusta a 4,7 usando ácido clorhídrico 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas y se esteriliza en una autoclave.

Ejemplo 16: La mezcla base que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 83 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,125 ml. El pH del gel se ajusta a 4,5 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas y se esteriliza con vapor en una autoclave.

Ejemplo 17: La mezcla base, 48 g, que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 230 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,345 ml. El pH del gel se ajusta a 4,6 usando ácido clorhídrico 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 18: La mezcla base, 48 g, que comprende microesferas del segundo tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 230 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,345 ml. El pH del gel se ajusta a 4,6 usando ácido clorhídrico 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas y se esteriliza con vapor en una autoclave.

Ejemplo 19: La mezcla base, 31 g, que comprende microesferas del segundo tipo, excepto el intervalo de tamaños (estado húmedo; dispersado en agua purificada) de las microesferas que sea de 150 a 2000 µm, se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 140 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,21 ml. El pH del gel se ajusta a 4,6 usando ácido clorhídrico 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 20: La mezcla base, 28 g, que comprende microesferas del segundo tipo, excepto el intervalo de tamaños (estado húmedo; dispersado en agua purificada) de las microesferas que sea de 150 a 1600 µm, se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 130 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,195 ml. El pH del gel se ajusta a 4,5 usando ácido clorhídrico 1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 21: La mezcla base, 10 g, que comprende almidón de patata natural se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 120 ml, glicerol, 4,4 g, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,075 ml. La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó durante 30 minutos. El pH del gel se ajusta a 4,5 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 22: La mezcla base, 10 g, que comprende almidón de patata natural se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 120 ml, glicerol, 4,4 g, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,05 ml. La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó durante 30 minutos. El pH del gel se ajusta a 4,5 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 23: La mezcla base que comprende microesferas del primer tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 87 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,124 ml. La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó durante 30 minutos. El pH del gel se ajusta a 4,4 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 24: La mezcla base que comprende microesferas del primer tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 87 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,124 ml. La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó durante 30 minutos. El pH del gel se ajusta a 4,4 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

Ejemplo 25: La mezcla base que comprende microesferas del primer tipo se carga en una solución preparada previamente que contiene solución salina, 83 ml, y un tampón fosfato 1 M a pH 5,8, 0,124 ml. La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó durante 30 minutos. El pH del gel se ajusta a 4,6 usando ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se agita hasta que se obtiene una suspensión homogénea. A continuación, se carga el gel homogéneo en jeringuillas.

#### Evaluación *in vitro*

Las composiciones acuosas de detección de escape de líquido corporal obtenidas (es decir, los ejemplos de 1 a 25) se evaluaron *in vitro* usando papel de filtro humedecido con saliva, tejido pancreático porcino recién obtenido y

líquido pancreático humano recién obtenido. El tejido pancreático porcino se donó por el matadero regional (Fleischversorgungszentrum de Mannheim) y se almacenó a una temperatura de 2 °C hasta su uso experimental dentro de las 12 horas *post mortem*. El líquido pancreático humano se aspiró de una muestra quirúrgica recién obtenida de pacientes después de su consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki (aprobado por el comité de ética de la Universidad de Heidelberg; votos 301/2001, 159/2002). Los procedimientos *in vitro* proporcionaron pruebas altamente controladas con complejidad limitada. Por tanto, las muestras se pudieron evaluar rápidamente en cuanto a a) practicidad de uso, b) tiempo de reacción, c) claridad y d) precisión de la indicación y la inmediata retroalimentación a los desarrolladores posibilitó una rápida optimización del indicador.

En las pruebas *in vitro*, se pudieron sacar algunas conclusiones:

- Se descubrió que un grado de reticulación de alrededor de un 12,5 % en peso (véase el ejemplo 3) era un poco bajo para proporcionar propiedades óptimas, ya que la composición aparentemente se degradaba muy rápidamente. El incremento del grado de reticulación a aproximadamente un 16 % en peso (véanse los ejemplos 2, 11, 14, 16 y 17) proporcionó a la composición una resistencia apropiada a la degradación por amilasa por el jugo pancreático (es decir, que es estable durante al menos 5 minutos);

- La cantidad de microesferas en la composición afecta a la viscosidad de la composición. Se concluyó que menos de un 10 % en peso de microesferas (véanse los ejemplos 21 y 22) proporcionó composiciones demasiado líquidas para proporcionar propiedades óptimas, mientras que un 20 % en peso de microesferas o más (véase el ejemplo 5) proporcionó una composición demasiado espesa para proporcionar propiedades óptimas. Una concentración de un 13 a un 18 % en peso de microesferas (véanse los ejemplos 1, 2, 6-20, 23 y 24) proporcionó una composición que era fácil de manipular y proporcionaba una detección de un escape rápida, es decir, en 5 minutos, y precisa;

- Es preferente mantener la concentración del indicador de pH lo más baja posible. Sin embargo, debe ser lo suficientemente alta como para proporcionar la detección de un escape claramente visible. Una concentración de BTB menor que un 0,04 % en peso (véanse los ejemplos 1 y 2) proporcionó colores un tanto débiles, aunque todavía visibles; y

- las composiciones que no estaban tamponadas proporcionaron la detección de un escape menos precisa. Además, la composición con alta fuerza de tamponamiento (véanse los ejemplos 5-9, 12 y 13) proporcionó una detección un tanto lenta, mientras que una fuerza de tamponamiento de 1 a 10 mM (véanse los ejemplos 10, 11 y 14 a 24) proporcionó una rápida y precisa detección de un escape.

#### Verificación *in vivo*

En base a la evaluación *in vitro*, también se evaluaron composiciones acuosas de detección de escape de líquido corporal seleccionadas (es decir, los ejemplos 1-25) en un modelo animal. El proyecto de ensayo en animales se aprobó por la autoridad administrativa regional (Regierungspräsidium de Karlsruhe de acuerdo con el párrafo 1 del artículo 8 de la Deutsches TierSchG (ley sobre animales alemana), número de referencia 35-9835.81/G-184/16) para el desarrollo de indicadores y pruebas en cerdos domésticos (*sus scrofa domestica*) que se someten a cirugía pancreática. Se realizó la cirugía bajo anestesia general como se usa en seres humanos.

En un primer experimento de prueba de concepto (n=10 animales), se sometieron a prueba composiciones acuosas preliminares de detección de escape de líquido corporal (ejemplo 1-5) en cuanto a su aplicabilidad técnica y rendimiento en operaciones pancreáticas finales (pancreatectomía distal, PD, véase a continuación). De forma paralela a los experimentos *in vitro*, se evaluaron las características a) practicidad de uso, b) tiempo de reacción, c) claridad y d) precisión de la indicación seguido de la evaluación del daño tisular inicial provocado por el indicador usando análisis histológico posoperatorio del muñón pancreático.

El segundo experimento (n=8 animales) consistió en una pancreatectomía distal inicial (véase a continuación) seguido de 48 horas de observación de la citotoxicidad local y los efectos secundarios sistémicos de las composiciones acuosas de detección de escape de líquido corporal (ejemplo 5-25) y reoperación terminal con evaluación de patologías intrabdominales y recuperación de muestras de tejido para su análisis histológico. Tras un diseño del estudio de tres brazos, los animales se dividieron en un grupo negativo para indicador sin ningún escape detectado y, si el indicador detectaba un escape, se subdividieron aleatoriamente en un grupo positivo para indicador sin ningún cierre adicional y un grupo positivo para indicador con cierre adicional dirigido. Por tanto, se pudo estudiar la sensibilidad y especificidad, así como el impacto del cierre refinado de la fístula pancreática posoperatoria. Durante la observación, se observó el impacto a corto plazo del uso de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal en organismos biológicos por evaluación clínica complementada por análisis de laboratorio de muestras de sangre y líquido peritoneal. Los parámetros clínicos incluyeron signos de infección o fístula pancreática posoperatoria, el análisis de sangre incluyó marcadores de inflamación, anemia o pancreatitis en la sangre, así como escape pancreático en el líquido peritoneal.

El experimento número tres (n=16 animales) se realizó de forma análoga al segundo experimento, pero el tiempo de observación se extendió a 8 días para hacer posible la evaluación del impacto de medio a largo plazo del uso de la composición acuosa de detección de escape de líquido corporal en organismos biológicos. En base al conocimiento clínico, se sabe que dentro de este tiempo casi todas las fístulas pancreáticas posoperatorias se vuelven clínicamente evidentes. Por el contrario, si no se produce ninguna complicación una semana después de la operación, se puede considerar como un punto de tiempo de alta hospitalaria promedio que establece el marco de tiempo principal para el tratamiento clínico.

#### Pancreatectomía distal (PD)

La cavidad abdominal se abrió por laparotomía media y la transcavidad de los epiplones se abrió para exponer el páncreas. Una vez expuesto, se liberaron quirúrgicamente los últimos de 2 a 3 cm del páncreas (lóbulo esplénico porcino) del tejido peritoneal circundante y se resecaron los 2 cm distales del páncreas con bisturí. La hemorragia se detuvo con suturas de puntos simples/en x no absorbibles (máx. 3 por animal). El cierre del resto pancreático se realizó con suturas de puntos simples no absorbibles transversales (superficie de 1x/cm). Después de esto, el muñón pancreático cerrado se enjuagó y se limpió con solución salina.

Una vez enjuagado, se aplicó una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con lo anterior a toda la superficie del muñón pancreático. La composición aparece amarilla cuando se aplica, pero localmente se volverá verde azulada si el jugo pancreático se escapa debido al cierre insuficiente en alguna localización. Esta reacción indicadora ocurre de inmediato, es decir, en segundos. Dada la viscosidad de la composición, el cambio de color solo aparece en la proximidad cercana al escape.

En caso de un escape de jugo pancreático, se puede aplicar un cierre fino del muñón usando suturas de puntos simples/en x no absorbibles en los escapes visualizados. Después de esto, el cierre se puede controlar por la repetición ilimitada de la aplicación de la composición. Finalmente, se retiró la composición en gel con gasa y enjuague con solución salina. Se dispuso un drenaje abdominal de silicona junto al muñón pancreático para la evacuación posoperatoria y el análisis del líquido; y se cerró la pared abdominal.

#### Conclusiones

Se desarrolló una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal *in vitro* novedosa. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal se evaluó y adaptó *in vivo* para que finalmente fuera fácilmente aplicable sobre el resto pancreático o tejido anastomótico como una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de reacción rápida. La prueba de concepto mostró que la composición muestra el escape pancreático con precisión y rapidez sobre el margen de resección en un modelo porcino de pancreatectomía distal.

La sensibilidad y especificidad de la composición hacia un escape pancreático fueron ambas de un 100 %. La resolución visual fue más pequeña que una gotícula (< 500 µm de diámetro). Por tanto, fue posible el cierre de un escape dirigido refinado seguido de un control de estanqueidad a través de la reaplicación de indicador ilimitada.

En estudios porcinos de observación de medio a largo plazo, la composición no dañó significativamente al organismo. Es importante destacar que no se produjeron efectos secundarios sistémicos. En el páncreas, la composición no dio lugar a una significativa pancreatitis, hemorragia o citotoxicidad como se confirmó mediante histología. El escape pancreático detectado visualizado por una reacción indicadora positiva dio lugar específicamente a una fístula pancreática posoperatoria en todos los casos, que no solo se confirmó por las concentraciones incrementadas de enzimas pancreáticas en los líquidos peritoneales en los primeros días después de la operación, sino que también se acompañó de afecciones médicas específicas como vaciado gástrico retrasado o abscesos intrabdominales. Por el contrario, el cierre de un escape dirigido dio lugar a una tasa de fístula pancreática posoperatoria reducida significativamente como se observa por la enorme reducción de los niveles de enzimas pancreáticas en el líquido peritoneal seguido de la recuperación rápida de los animales.

Esta composición acuosa de detección de escape de líquido corporal visualiza escapes pancreáticos en operaciones pancreáticas experimentales fácil y rápidamente sin efectos secundarios o toxicidad pertinentes, y permite la cuantificación y localización precisa de un escape pancreático directamente durante el transcurso de la operación. La visualización posibilita un tratamiento perioperatorio adaptado, así como el cierre dirigido de un escape, lo que reduce significativamente la aparición de una fístula pancreática posoperatoria.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa de detección de escape de líquido corporal, comprendiendo la composición un agente gelificante, que incrementa la viscosidad de la composición, y especies tamponantes, estando, de este modo, la composición tamponada, en la que la composición comprende además un indicador de pH, en la que el pH de la composición es al menos 0,1 unidades de pH menor o mayor que un pKa del indicador de pH, y en la que el agente gelificante es microesferas de almidón reticulado.

2. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende de un 5 a un 25 % en peso de microesferas de almidón reticulado, preferentemente de un 10 a un 20 % en peso de microesferas de almidón reticulado, más preferentemente de un 13 a un 17 % en peso de microesferas de almidón reticulado.

3. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el grado de reticulación, expresado como la proporción en peso reticulante:almidón, está en el intervalo de un 12 a un 20 % en peso, tal como en el intervalo de un 13,5 a un 18,5 % en peso o de un 15,0 a un 17,0 % en peso; preferentemente las microesferas de almidón reticulado están reticuladas con epíclorhidrina.

4. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el diámetro medio basado en volumen (D[4,3]), como se determina de acuerdo con ISO 13 320:2009 usando difracción láser, de las microesferas de almidón reticulado, como están presentes en la composición, es de 100 a 1000 µm, tal como de 250 a 750 µm.

5. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el pH de la composición es al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidades de pH menor o mayor que un pKa del indicador de pH; preferentemente, el pH de la composición es al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidades de pH menor que un pKa del indicador de pH.

6. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que un pKa del indicador de pH está en el intervalo de 5 a 9; preferentemente en el intervalo de 6 a 8; más preferentemente en el intervalo de 6,5 a 7,5.

7. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el indicador de pH es azul de bromotímol, comprendiendo preferentemente la composición de un 0,001 a un 0,5 % en peso, tal como de un 0,005 a un 0,25 % en peso o de un 0,01 a un 0,1 % en peso de azul de bromotímol.

8. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el pH de la composición está entre 4 y 7; preferentemente entre 5 y 6.

9. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las especies tamponantes están presentes en una cantidad de 0,1 a 30 mM, preferentemente de 0,5 a 10 mM, más preferentemente de 1,0 a 5 mM.

10. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición está tamponada con fosfato.

11. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición comprende:

- de un 10 a un 20 % en peso, tal como de un 13 a un 17 % en peso o de un 14 a un 16 % en peso del agente gelificante, siendo el agente gelificante microesferas de almidón reticulado;

- de un 0,001 a 0,5 % en peso, tal como de un 0,005 a un 0,25 % en peso o de un 0,01 a un 0,1 % en peso del indicador de pH, siendo preferentemente el indicador de pH azul de bromotímol;

- al menos un 75 % en peso de agua; y

- opcionalmente solución salina tamponada con fosfato; en la que:

- las microesferas de almidón reticulado tienen un grado de reticulación de un 12 a un 20 % en peso, tal como de un 13,5 a un 18,5 % en peso o de un 15,0 a un 17,0 % en peso; y

- la concentración de tampón es de 0,1 a 30 mM, tal como de 0,5 a 10 mM o de 1,0 a 5 mM.

12. La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición acuosa comprende además:

- un conservante y/o

5           - solución salina.

10       **13.** La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con la reivindicación 1 a 12, en la que la composición es una composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático y el pH de la composición está en el intervalo de 4 a 6; y en la que un pKa del indicador de pH está en el intervalo de 6 a 8; preferentemente en el intervalo de 6,5 a 7,5.

15       **14.** La composición acuosa de detección de escape de líquido corporal de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en azul de bromotimol, rojo fenol, antocianinas y rojo neutro.

20       **15.** La composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la que la composición acuosa de detección de escape de líquido pancreático es para su uso en la detección de un escape de líquido pancreático en combinación con cirugía pancreática, por ejemplo, pancreatometría parcial.

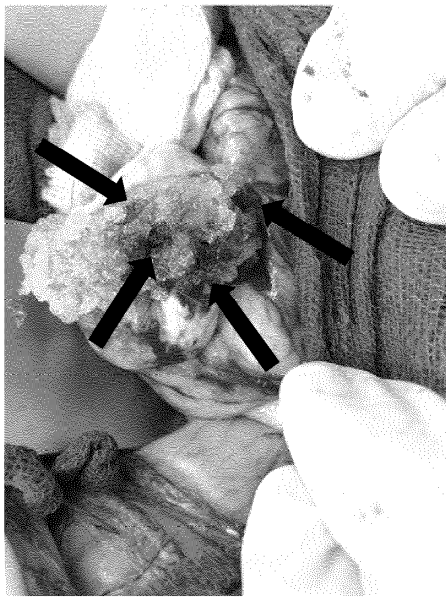


Fig. 1b



Fig. 1d



Fig. 1a



Fig. 1c