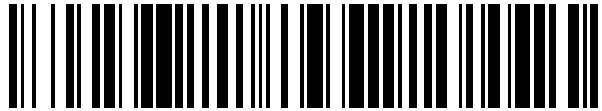


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 958**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2019 PCT/EP2019/058822**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2019 WO19193202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2019 E 19717461 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022 EP 3773765**

54 Título: **Eficacia hemostática de un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado**

30 Prioridad:

06.04.2018 ES 201830346

06.09.2018 ES 201830872

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2023

73 Titular/es:

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD (50.0%)

Avda. Américo Vespucio, nº 15, Edificio S2.

Parque Científico y Tecnológico Cartuja

41092 Sevilla, ES y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)

72 Inventor/es:

CAMPOS CUERVA, RAFAEL;

FERNANDEZ MUÑOZ, BEATRIZ;

GÓMEZ BRAVO, MIGUEL ANGEL;

CEPEDA FRANCO, CARMEN y

MUNTANE RELAT, JORDI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 933 958 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

Eficacia hemostática de un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a la aplicación como componente sellador adhesivo y agente hemostático de hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII (NFAH). Tales hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII (NFAH), pueden usarse para detener el sangrado o sellar tejidos *in vivo* con y sin compresión. Esta invención se refiere particularmente a la necesidad de incorporar un sellador de fibrina en un producto similar a un gel viscoso que pueda resistir el flujo de sangre en una herida para sellar el tejido y controlar la hemorragia vascular, epidérmica, ósea o interna.

15 **Antecedentes de la invención**

La hemorragia no controlada continúa siendo una preocupación importante en las intervenciones quirúrgicas y es responsable de mayores tasas de mortalidad, morbilidad y estancias hospitalarias más prolongadas (Brustia, Granger & Scatton, 2016). La lesión de los vasos sanguíneos desencadena diferentes mecanismos con el fin de establecer un proceso complejo denominado hemostasia. La hemostasia es una interrupción del escape de sangre por medios o bien naturales o bien artificiales.

La resección hepática generalmente requiere una transfusión perioperatoria debido a la pérdida de sangre intraoperatoria en los pacientes. Existen varias técnicas quirúrgicas usadas para reducir el sangrado (Berrevoet & De Hemptinne, 2007). Sin embargo, estos métodos tienen un efecto transitorio o incompleto. Esto, a su vez, requiere un agente hemostático tópico para prevenir la pérdida de sangre posoperatoria (Moggia *et al.*, 2016) (Eeson & Karanicolas, 2016).

Diferentes agentes hemostáticos aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) se usan en múltiples disciplinas quirúrgicas para lograr la hemostasia. Entre estos, el sellador de fibrina derivado de plasma humano se ha convertido en un agente hemostático próspero debido a su capacidad para imitar y promover la etapa final de la cascada de coagulación para ayudar a la hemostasia (MOSESSON, SIEBENLIST & MEH, 2006) (Mankad & Codispoti, n.d.). También reduce el posible rechazo y los efectos indeseables, y es el único material clínico aprobado por la FDA como hemostáticos, selladores y adhesivos (Spotnitz, 2014). A pesar de las ventajas en el campo, el tiempo hasta la hemostasia, la aplicabilidad y la transfusión posoperatoria pueden mejorarse adicionalmente.

Se desarrolló un reciente hidrogel de fibrina y agarosa de tipo VII nanoestructurado (NFAH) como biomaterial para usar en múltiples modelos biocompatibles (Carriel *et al.*, 2017). Este sustituto similar a un tejido se compone principalmente de plasma humano y muestra propiedades altamente flexibles y elásticas, así como resistencia mecánica (MOSESSON *et al.*, 2006; Scionti *et al.*, 2014). El documento WO 20011/123346 A1 divulga un sellador quirúrgico y un agente hemostático diseñados para usarse en casos de hemorragia no compresible para sangrado de moderado a grave. Incorpora monómero de fibrina en disolución listo para polimerizar al cambio de pH, que se incrusta en un andamiaje de hidrogel.

Esta invención se centra en la eficacia hemostática de los hidrogeles de agarosa, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII (NFAH), e ilustra dicha eficacia en un modelo *in vivo*. Con este propósito, se comparó NFAH con dos productos hemostáticos disponibles comercialmente usados en múltiples disciplinas quirúrgicas: Hemopatch, una almohadilla de colágeno recubierta de polietilenglicol, y Tachosil, una almohadilla de colágeno recubierta de fibrinógeno y trombina.

Sumario de la invención

La presente invención se encuentra dentro del dominio de los selladores y hemostáticos de tejidos biológicos, que son biodegradables y no tóxicos, destinados a uso terapéutico, por ejemplo, como adyuvante a la hemostasia en laparotomía o cirugía laparoscópica, en cirugía ortopédica, traumatismo (laceración del bazo o cirugía hepática) y heridas de gran tamaño de encamado.

En un aspecto, la presente invención se refiere a hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados adhesivos biocompatibles, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII (NFAH), que son biorreabsorbibles y no tóxicos, para uso quirúrgico o terapéutico. También se refiere a una aplicación de una sola parte que contiene un hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado, preferiblemente un hidrogel de agarosa de tipo VII (NFAH), que puede liberarse en un sitio determinado para producir un coágulo de fibrina estable.

Los estudios *in vivo* muestran en el presente documento que los hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII (NFAH), son un excelente candidato a agente hemostático general

para su uso como tratamiento adyuvante y primario en sangrado moderado. El agente es duradero, fácil de almacenar, presenta un riesgo mínimo, requiere poca capacitación para su uso y es altamente efectivo contra el sangrado.

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización de fibroblastos de rata aislados mediante una técnica basada en colagenasa: (A) fibroblastos de rata en cultivo después del aislamiento; (B) la expresión de vimentina se determinó mediante análisis de inmunotinción en fibroblastos de rata cultivados; HaCat, una línea celular de queratinocitos inmortalizados, se usó como control negativo; (C) análisis de cariotipo de cultivo disociado de células individuales.

Figura 2. Tiempo hasta la hemostasia después de la aplicación del tratamiento. NFAH tuvo una eficacia hemostática superior en relación con Hemopatch y Tachosil. (A): Efecto hemostático en resección hepática de 0,5 cm. (B): Efecto hemostático en resección hepática de 1,5 cm.

Figura 3. Comparación de hemostasia en tratamientos con Hemopatch y c-NFAH. Se obtuvieron resultados similares en cuanto a tiempo hasta la hemostasia para diferentes longitudes de resección hepática.

Figura 4. Aplicación secuencial de NFAH en resección hepática. NFAH tuvo la aplicabilidad más fácil de los grupos de tratamiento. 1-3) Resección hepática y exposición de la herida. 4-6) Aplicación de NFAH y posicionamiento final.

Figura 5. Gráfico de barras que muestra la incidencia de hematoma. Los resultados no mostraron presencia de hematoma en ningún NFAH celularizado o acelularizado. A) Porcentaje de animales en resección hepática de 0,5 cm. B) Porcentaje de animales en resección hepática de 1,5 cm.

Figura 6. Porcentaje de grado de adhesión. NFAH mostró menor adhesión que otros tratamientos en la resección hepática 24 horas después de la aplicación. El grado de adhesión se determinó mediante la siguiente clasificación: sin adhesión (estructuras anatómicas separadas); adhesiones delgadas (adhesión separable por gravedad); adhesiones gruesas (adhesión no separable por gravedad).

Figura 7. NFAH no mostró presencia de hematoma y mostró menor adhesión que otros tratamientos en la resección hepática 24 horas después de la aplicación. (A): Hemopatch provoca alto grado de adhesión. (B): NFAH no muestra adhesión. (C): Presencia de hematoma en tratamiento con Hemopatch. (D): Sin presencia de hematoma en tratamientos con NFAH.

Figura 8. NFAH no mostró resangrado ni migración en las resecciones hepáticas 24 horas después de la aplicación.

Figura 9. Factores inflamatorios en animales con resección hepática de 0,5 cm después de 24 horas. No hubo diferencias significativas de proteína C reactiva e IL-1 β entre los tratamientos con NFAH celularizado y Hemopatch.

Figura 10. Factores inflamatorios en animales con resección hepática de 1,5 cm después de 24 horas. (A) El tratamiento con a-NFAH no mostró diferencias significativas en los niveles del factor inflamatorio CRP en comparación con los tratamientos con Hemopatch y Tachosil. (B) El tratamiento con Hemopatch provocó niveles más altos de factores inflamatorios de IL-1 β que los tratamientos con a-NFAH. (C) a-NFAH no mostró diferencias significativas en el nivel inflamatorio de TNF- α con respecto a Hemopatch o Tachosil.

Figura 11. Ejemplos de clasificación de hemorragia, inflamación y necrosis.

Figura 12. Gráficos de barras que muestran el porcentaje de hemorragia, inflamación y necrosis en resecciones hepáticas de 0,5 y 1,5 cm después del tratamiento con agentes hemostáticos. Cada muestra se clasificó en ausente, leve, moderada o intensa (véanse los métodos de clasificación). (A-C): Análisis histológico de resección hepática de 0,5 cm; (D-F): Análisis histológico de resección hepática de 1,5 cm.

Figura 13. Generación de hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado (NFAH).

Descripción detallada

En la presente invención, se investigó el éxito hemostático de un NFAH celularizado (c-NFAH) en hepatectomía parcial en ratas. Los hallazgos mostraron que c-NFAH tiene un mayor éxito hemostático que el agente hemostático comercialmente disponible Hemopatch. Tales resultados prometedores impulsaron a extender los experimentos aumentando la longitud de la sección hepática e incluyendo otros agentes hemostáticos. Para ello se incorporó al estudio TachoSil por su composición similar respecto al NFAH investigado. También se incluyó un NFAH acelularizado (a-NFAH) para comprobar si el menor tiempo hasta la hemostasia se debía principalmente a la composición de NFAH más que a la presencia de células. Una vez más, los resultados mostraron que NFAH tiene menos tiempo hasta la hemostasia que Hemopatch. Además, esta eficacia de NFAH para alcanzar la hemostasia también fue significativamente superior a la de Tachosil. En este estudio, también se encontró que Hemopatch tuvo

un mayor éxito que Tachosil para lograr una hemostasia inmediata en el modelo quirúrgico hepático.

Además, aunque tal como se muestra en los ejemplos, las almohadillas hemostáticas necesitan mucho tiempo de compresión local con el fin de alcanzar la hemostasia, la colocación de NFAH sobre el hígado seccionado fue suficiente para actuar como agente hemostático. Este diferente procedimiento de aplicación confiere una gran ventaja a NFAH evitando compresiones mecánicas que provocan hematomas.

Además, los grupos de tratamiento con NFAH, a diferencia de Hemopatch y Tachosil, no mostraron incidencias de hematoma en ningún tamaño de resección hepática. Estos resultados probablemente se deban al menor tiempo hasta la hemostasia de los tratamientos con NFAH y su más fácil aplicabilidad evitando la formación de hematomas.

También es destacable el bajo grado de adhesión que producen las almohadillas de NFAH en comparación con los agentes hemostáticos Hemopatch y Tachosil. Este atributo puede ser una ventaja importante para su uso en cualquier aplicación quirúrgica.

Además, se encontraron nuevos resangrados posoperatorios en cualquier grupo de tratamiento tal como se esperaba y la única almohadilla migrada que se encontró en el grupo de tratamiento con Tachosil probablemente se debió a un cambio de posición involuntario durante la sutura.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de CRP e IL-1 β entre c-NFAH y Hemopatch en resecciones hepáticas de 0,5 cm. Sin embargo, estos resultados no fueron reproducibles en resecciones de 1,5 cm. En las resecciones hepáticas de 1,5 cm no hubo un único tratamiento con los niveles más bajos en todos los factores inflamatorios analizados. En primer lugar, el nivel más bajo de CRP se obtuvo con el tratamiento con Tachosil, pero el a-NFAH no mostró diferencias significativas con Hemopatch; en segundo lugar, Tachosil produjo el nivel más bajo de IL-1 β sin diferencias significativas con los tratamientos con NFAH; y finalmente, el grupo Hemopatch tuvo los niveles más bajos de TNF- α sin diferencias significativas con a-NFAH.

Aunque los resultados mostraron un mayor nivel de CRP en c-NFAH con respecto a a-NFAH, probablemente debido a la presencia de células que provoca una mayor respuesta inmunitaria, los niveles de IL-1 β y TNF- α no fueron significativamente diferentes.

En conclusión, el tratamiento con a-NFAH no tuvo al menos niveles inflamatorios más altos con respecto a los agentes hemostáticos disponibles comercialmente incluidos en este estudio. Estos hallazgos indican que a-NFAH es un producto seguro sin una respuesta inflamatoria más alta. En general, los tratamientos con NFAH mostraron mejores resultados histológicos que los agentes hemostáticos comerciales en estudio. En resecciones hepáticas de 1,5 cm, los mejores resultados de hemorragia, inflamación y necrosis se obtuvieron con un tratamiento con NFAH. Sólo c-NFAH tuvo mayor presencia de granulocitos neutrófilos y necrosis en la resección hepática de 0,5 cm.

Basándose en los resultados anteriores, NFAH (a-NFAH así como c-NFAH) se describe en la presente invención, por primera vez, como agente hemostático y sellador de tejidos, para su uso como adyuvante a la hemostasia o tratamiento primario en procedimientos quirúrgicos y en el tratamiento de heridas traumáticas. Tales resultados pueden extrapolarse a los hidrogeles de agarosa en general para su uso como adyuvante a la hemostasia o tratamiento primario en procedimientos quirúrgicos y en el tratamiento de heridas traumáticas. Se observa que la agarosa es termorreversible y puede modificarse para fundirse y gelificarse a una variedad de temperaturas. Esto permite que el gel se use en innumerables aplicaciones en campos tan diversos como la industria alimentaria, la biología molecular, la biología celular y la ingeniería de tejidos. Los hidrogeles de agarosa se entienden preferiblemente en el contexto de la presente invención como hidrogeles termosensibles que tienen una temperatura de fusión de aproximadamente 40°C y una temperatura de gelificación de aproximadamente 32°C, lo que hace que este hidrogel sea adecuado para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Debido a estas propiedades de gelificación térmica, la agarosa tiene la ventaja adicional de no requerir una etapa de reticulación adicional.

Se observa que NFAH puede prepararse tal como se describe en cualquiera de los protocolos informados en la técnica anterior (Alaminos, M., Sanchez-Quevedo, M.C., Muñoz-Avila, J.I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., Campos, A., 2006. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47, 3311-3317; Carriel V, Alaminos M, Garzon *et al.* 2014a; Tissue Engineering of the peripheral nervous system. Expert Rev Neurother 14: 301- 318; Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes Pet *al.* 2013; Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. J Neural Eng 10: 026022; Carriel V, Garzon I, Jimenez JM *et al.* 2012; Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. Cells Tissues Organs 196:1-12; Garzon I, Martin-Piedra MA, Alfonso-Rodriguez C *et al.* 2014; Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 55: 4073-4083; Scionti G, Morales M, Toledano M *et al.* 2013; Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. J Biomed Mater Res A102 (8): 2573- 2582) o tal como se describe en los ejemplos ilustrados en la presente invención.

En particular, y tal como se muestra en la figura 13, para la fabricación de NFAH celularizado, los fibroblastos

humanos se descongelan previamente y se mantienen momentáneamente en medios de cultivo en un número específico de células. En primer lugar, se prepara un tubo 1 mediante la adición de plasma humano, ácido tranexámico y medio de cultivo con o sin células (para la fabricación de NFAH acelularizado (a-NFAH), el volumen de medio de cultivo añadido a la mezcla será el mismo pero no contiene células). Una vez listo el tubo 1, este se mantiene a 37°C. Por separado, se prepara un tubo 2 mediante la adición de cloruro de calcio (CaCl₂) y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de esto, se calienta una disolución de agarosa al 2,2% a 39-41°C y se añade a un tubo 2 y se mezcla. Inmediatamente, la disolución del tubo 1 se añade al tubo 2, se mezcla y se vierte en un pocillo. Después de 2 horas a temperatura ambiente, se mantiene el hidrogel de fibrina-agarosa (FAH) obtenido con medio de cultivo en la incubadora durante al menos 24 horas. La nanoestructuración es la última etapa para obtener un hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado (NFAH). Este proceso consiste en una compresión y deshidratación de FAH. Para ello, se coloca FAH entre filtros de red de nailon. A continuación, se colocan papeles de filtro secantes sobre filtros de nailon y se realiza la nanoestructuración mediante la aplicación de un vidrio plano con un peso y una superficie específicos.

15 Otros tipos de hidrogeles de agarosa diferentes de los que usan agarosa de tipo VII podrían prepararse de manera similar a la explicada anteriormente.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición para su uso en el control del sangrado con o sin compresión que comprende hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurado, preferiblemente un hidrogel de agarosa de tipo VII, (NFAH), o un hidrogel de fibrina y agarosa no nanoestructurado o prenanoestructurado, preferiblemente un hidrogel de agarosa de tipo VII, (FAH). Preferiblemente, esta composición está destinada para su uso como selladores y hemostáticos de tejidos biológicos, que son, más preferiblemente, biodegradables y no tóxicos. Más preferiblemente, esta composición está destinada a uso terapéutico, por ejemplo, como adyuvante a la hemostasia en laparotomía o cirugía laparoscópica, en cirugía ortopédica, traumatismo (laceración del bazo o cirugía hepática) y heridas de gran tamaño de encamado. Todavía más preferiblemente, esta composición está destinada para su uso como agente hemostático general candidato para su uso como tratamiento adyuvante y/o primario en sangrado moderado. La composición es duradera, fácil de almacenar, presenta un riesgo mínimo, requiere poca capacitación para su uso y es altamente eficaz contra el sangrado.

30 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición para su uso son preferiblemente hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados celularizados, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII, (c-NFAH), o hidrogeles de fibrina y agarosa no nanoestructurados o prenanoestructurados, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII, (c-FAH).

35 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición para su uso son preferiblemente hidrogeles de fibrina y agarosa nanoestructurados acelularizados (sin células), preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII, (a-NFAH), o hidrogeles de fibrina y agarosa no nanoestructurados o prenanoestructurados, preferiblemente hidrogeles de agarosa de tipo VII, (a-FAH).

40 La composición para su uso según el primer aspecto de la invención, en la que para la fabricación de NFAH celularizado, los fibroblastos humanos preferiblemente se descongelan previamente y se mantienen en medio de cultivo en un número específico de células. Luego, se prepara un tubo 1 mediante la adición de fibrina, preferiblemente plasma humano y ácido tranexámico, y medio de cultivo con o sin células. Una vez listo el tubo 1, este se mantiene preferiblemente a 37°C. Por separado, se prepara un tubo 2 mediante la adición de un agente gelificante tal como cloruro de calcio (CaCl₂) y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de esto, se calienta una disolución de agarosa al 2,2% a 39-41°C y se añade a un tubo 2 y se mezcla. Preferiblemente, se añade inmediatamente la disolución del tubo 1 al tubo 2, se mezcla y se vierte en un pocillo. Después de aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente, se mantiene el hidrogel de fibrina-agarosa (FAH) obtenido con medio de cultivo en la incubadora durante al menos 24 horas. La nanoestructuración es la última etapa para obtener un hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado (NFAH). Este proceso consiste en una compresión y deshidratación de FAH. Para ello, preferiblemente se coloca FAH entre filtros de red de nailon. A continuación, se colocan papeles de filtro secantes sobre filtros de nailon y se realiza la nanoestructuración mediante la aplicación de un vidrio plano con un peso y una superficie específicos.

55 La composición para su uso según el primer aspecto de la invención, en la que para la fabricación de NFAH acelularizado (a-NFAH), el volumen de medio de cultivo añadido a la mezcla será el mismo que el añadido para el NFAH celularizado pero sin células.

60 La composición para su uso según el primer aspecto de la invención, en la que para la fabricación de FAH acelularizado o FAH celularizado, la información se deriva claramente de los párrafos anteriores.

Ejemplos

Materiales y métodos

65

Agentes hemostáticos

En este estudio se usaron cuatro agentes hemostáticos diferentes: dos disponibles comercialmente, Hemopatch® y Tachosil®, y dos NFAH caseros, un NFAH celular (c-NFAH) y un NFAH acelular (a-NFAH).

5 Hemopatch (Baxter AG, Viena, Austria) es una almohadilla de colágeno derivada de la dermis bovina con un lado activo recubierto con una proteína reactiva, pentaeritritol polietilenglicol éter tetrasuccinimidil glutarato (TACHOSIL, 2010).

10 Tachosil (Takeda Austria GmbH) es una esponja de colágeno equino con un lado activo recubierto con fibrinógeno (5,5 mg/cm²) y trombina (2,0 UI/cm²) de origen humano.

NFAH es un hidrogel de fibrina y agarosa de tipo VII de alta densidad con aproximadamente el 80% de hidratación y 50-60 µm de grosor.

15 Cultivo de células

Los fibroblastos usados en este estudio se aislaron de tejido de rata. Las biopsias de piel de rata se lavaron minuciosamente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X con una disolución de cóctel antibiótico-antimicótico (penicilina G 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, gentamicina 20 µg/ml y vancomicina 50 µg/ml) y se fragmentaron en trozos de aproximadamente 1×1 mm. Se transfirieron aproximadamente veinte trozos a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml que contenía 5 ml de disolución de colagenasa precalentada (colagenasa 2 mg/ml, SERVA Electrophoresis GmbH) preparada en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Las muestras se incubaron 16 horas a 37°C.

25 La digestión se neutralizó mediante la adición de 25 ml de medio de cultivo (DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácido no esencial 0,1 mM, Glutamax 2 mM, penicilina G 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Finalmente, la suspensión de células se centrifugó, se contó, se sembró en una placa de 6 pocillos y se cultivó en una incubadora humidificada con el 5% de CO₂ y a 37°C.

30 Los medios se cambiaron cada 2-3 días hasta que el cultivo alcanzó una confluencia del 70-90%. En este punto, las células se recogieron y expandieron posteriormente. Finalmente, las células se crioconservaron y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta la generación de hidrogel.

35 Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio (VWR) en placas de 24 pocillos (Nunc) y se incubaron en una incubadora humidificada con el 5% de CO₂ y a 37°C. Una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% (Sigma) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma) al 0,05% durante 15 min a temperatura ambiente y se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1% durante 30 minutos a 37°C. Luego, se incubaron las células por separado durante 30 minutos a 37°C con la dilución indicada de los anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS que contenía BSA al 0,1%. Una vez incubados los anticuerpos primarios, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con el anticuerpo secundario. Los núcleos se tiñeron con una disolución 1 µg/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Life technologies). Luego, los cubreobjetos se montaron con las células teñidas con reactivo de montaje Prolong (Life technologies). La microscopía de fluorescencia se realizó en un microscopio TiS (Nikon).

50 Cariotipado

El cariotipado de banda G de la línea de fibroblastos se realizó por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional Permanente de Nomenclatura Citogenética Humana (2013).

55 Generación de almohadilla de NFAH

El protocolo es una adaptación de los métodos informados en informes anteriores (Alaminos *et al.*, 2006; Carriel *et al.*, 2012, 2013; Scionti *et al.*, 2013; Garzon *et al.*, 2014; Carriel *et al.*, 2015). Con el fin de obtener el volumen de hidrogel de fibrina y agarosa (FAH) para una placa de 6 pocillos, se preparó una mezcla de 30 ml de la siguiente manera: se colocaron 25 ml de plasma humano, 0,5 ml de ácido tranexámico y 2 ml de medio de cultivo con o sin fibroblastos humanos en un tubo Falcon (la disolución celularizada se preparó con 150.000 células descongeladas por ml de volumen final). Posteriormente, se añadió una disolución que contenía 1,8 ml de cloruro de calcio al 10%, 1,2 ml de PBS y agarosa tipo de VII fundida al 2,2%. Después de mezclar, se colocaron 5 ml de disolución en cada pocillo y se mantuvieron a 37°C durante 2 horas. Una vez que se completó la gelificación, se cubrió FAH con medio de cultivo y se mantuvo a 37°C durante 24 horas hasta la nanoestructuración. Si FAH contenía células, las placas permanecían en la incubadora durante 7 días.

5 La nanoestructuración es un proceso de compresión y deshidratación. Para ello, se colocó FAH entre un par de filtros de red de nailon de 10 µm (Merck-Millipore) y se comprimió con papel de filtro de inmunotransferencia de tipo Western extragruoso (Thermo Scientific) bajo una superficie plana de vidrio de 500 g durante 1 minuto y 40 segundos. Se obtiene un NFAH final de alta densidad y aproximadamente el 80% de hidratación.

Análisis de viabilidad celular

10 Se usó el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD® para células de mamífero (Molecular Probe, Invitrogen) para determinar la viabilidad celular en NFAH. El protocolo del fabricante se adaptó a este fin. Brevemente, se cortaron trozos de 2x2 cm y se transfirieron a una placa de Petri. Las muestras se lavaron tres veces con PBS. Después de la incubación con la disolución T durante 30 min a temperatura ambiente, las muestras se lavaron tres veces y se mantuvieron en PBS.

15 El número de células vivas (verdes) y muertas (rojas) se determinó mediante un microscopio de fluorescencia. Se contaron un mínimo de cuatro campos para cada sección de NFAH, con al menos 100 células visualizadas.

Protocolo animal y resección hepática

20 Para el estudio se usaron ratas Wistar macho con un peso aproximado de 250 g. La inyección subcutánea de ketamina 80 mg/kg y xilazina 10 mg/kg indujo anestesia que se mantuvo con inhalación de isoflurano. Los animales se sometieron a un corte longitudinal desde 1 cm por debajo de la apófisis xifoides en dirección craneocaudal y se procedió a la exposición del lóbulo medio.

25 Se realizaron resecciones hepáticas en animales con una longitud de 0,5 ó 1,5 cm.

30 A todos los agentes hemostáticos aplicados se les dio una forma redonda de 24 mm de diámetro y se aplicaron sobre la superficie de la herida mediante compresión local. El tiempo hasta la hemostasia se definió como la detención de la fuga de sangre libre después de la aplicación del agente hemostático.

35 Los animales se sacrificaron un día después de la cirugía para evaluar la hemorragia posoperatoria, la presencia de hematoma, la migración del agente hemostático y la adhesión intraabdominal adyacente a la herida. El grado de adhesión se determinó mediante una puntuación de 3 valores (0: sin adhesión; 1: adhesiones delgadas separables por gravedad; 2: adhesiones gruesas no separables por gravedad).

40 El hígado se extirpó completamente para el cálculo de las razones de sección de hígado/peso total del hígado. Secciones de tejido hepático adheridas al agente hemostático se fijaron en paraformaldehído al 4% para su posterior análisis histológico.

45 El estudio lo aprobó el Comité Ético de Investigación (REC) del Hospital Universitario Virgen Macarena y Virgen del Rocío.

ELISA

50 Las muestras de sangre se recogieron con anticoagulante EDTA, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se mantuvieron a -20°C o -80°C en pequeños volúmenes para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

55 Para medir la cantidad de factores inflamatorios se usaron kits para ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante: proteína C reactiva (CRP) (kit para ELISA con CRP de rata, RayBio®), interleucina 1 beta (kit para ELISA con IL-1β de rata, Elabscience®) y (kit para ELISA con TNF-α de rata, CUSABIO®).

Análisis microscópico

60 Después de la fijación con paraformaldehído al 4%, se cortaron bloques de tejido hepático incrustados en parafina con un grosor de 4 micrómetros y las secciones se sometieron a tinción tricrómica de Masson y hematoxilina-eosina (disolución de hematoxilina, Sigma Aldrich GHS316-500ML; disolución de eosina Y alcohólica, Sigma Aldrich HT110116-500ML; kit de tinción tricrómica (Masson), Sigma Aldrich HT15-1KT; y disolución de hematoxilina férrica de Weigert, HT1079-1set). Las muestras de hígado seccionadas se analizaron por triplicado en diferentes días.

65 Las variables histológicas se estudiaron mediante análisis microscópico y se clasificaron de la siguiente manera (figura 11):

- Hemorragia: ausente (grupos de eritrocitos que se juntan sin formar una zona libre de hemorragia); leve (área de hemorragia < 1 mm de diámetro); moderada (área de hemorragia de 1-2,5 mm de diámetro y

menor de $\times 40$ campos de alta potencia (hpf) de profundidad); e intensa (área de hemorragia $>2,5$ mm de diámetro o más de $\times 40$ campos de alta potencia de profundidad).

- 5 • Inflamación: ausente, leve, moderada e intensa. La clasificación se realizó basándose en la presencia de granulocitos neutrófilos por $\times 40$ campos de alta potencia.
- Necrosis: ausente, leve (0,1-0,4 hpf), moderada (0,5-1,2 hpf) e intensa ($>1,2$ hpf).

Estadística

10 Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0.

Resultados

15 Fabricación de c-NFAH y a-NFAH

Se aislaron fibroblastos de rata a partir de biopsias de piel mediante una técnica basada en colagenasa. Las células aisladas mostraron expresión de vimentina y un cariotipo normal (figura 1) tal como se esperaba para los fibroblastos proliferantes sanos.

20 Se usaron fibroblastos de rata para la producción de c-NFAH (véanse los procedimientos experimentales para más detalles).

25 NFAH mostró un mayor efecto hemostático en un modelo de resección hepática

Este estudio inicialmente comenzó comparando el efecto hemostático de NFAH celularizado (c-NFAH) frente a Hemopatch en un modelo de resección hepática de 0,5 cm. c-NFAH mostró una mayor eficacia de hemostasia que Hemopatch en resección de 0,5 cm ($p < 0,05$) con un tiempo medio hasta la hemostasia igual a 2 segundos (N=10, EEM=2, intervalo=0-20) y 8,4 segundos (N=10, EEM=2,6, intervalo=5-20) respectivamente (figura 2A).

30 Posteriormente, el experimento se amplió a una resección hepática de 1,5 cm que incluía otros dos agentes hemostáticos, NFAH acelularizado (a-NFAH) y Tachosil. En el caso de resección hepática de 1,5 cm, a-NFAH tuvo el menor tiempo hasta la hemostasia del grupo con 2,4 segundos (N=10, EEM=0,58, intervalo=1-5), próximo a c-NFAH con 2,9 segundos (N=10, EEM=1,72, intervalo=1-7), ambos con un éxito hemostático significativamente mayor en comparación con Hemopatch (9,8 segundos (N=15, EEM=1,02, intervalo=3-30)) y Tachosil (11,2 segundos (N=10, EEM=0,49, intervalo=3-17)) (figura 2B).

Los resultados mostraron un tiempo similar hasta la hemostasia entre la resección hepática de 0,5 cm y 1,5 cm para los tratamientos con c-NFAH y Hemopatch (figura 3).

40 NFAH mostró una aplicabilidad más fácil

Hemopatch y Tachosil se aplicaron por compresión manual según lo indicado por los fabricantes. Por el contrario, se colocaron NFAH sobre la herida sin aplicar ninguna compresión. Este procedimiento de aplicación fue suficiente para alcanzar la hemostasia con el tratamiento con NFAH (figura 4).

45 NFAH mostró menor adhesión y hematomas y ningún resangrado ni migración posquirúrgicos

No se encontró presencia de hematoma en animales tratados con c-NFAH en resecciones hepáticas de 0,5 cm. Por el contrario, Hemopatch mostró un 40% (figura 5 A).

En la resección hepática de 1,5 cm, c-NFAH y a-NFAH no mostraron incidencias de hematoma mientras que Hemopatch y Tachosil tuvieron un 73,3% y un 40% respectivamente (figura 5 B y 7C-D).

55 La adhesión no deseada a los tejidos se estimó sobre el sacrificio. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos. c-NFAH y a-NFAH tuvieron resultados similares y la mayoría de los animales mostraron una adhesión delgada. Sin embargo, Hemopatch y Tachosil mostraron una adhesión más evidente a los órganos adyacentes (tabla 1 y figuras 6 y 7A-B).

TABLA 1. Eficacia de los hidrogeles de fibrina-agarosa en la prevención de adhesiones peritoneales en ratas				
	a-NFAH	c-NFAH	Hemopatch®	Tachosil®
Puntuación 2	0	1	11	5

Puntuación 1	8	8	4	5
Sin adhesión	2	1	0	0
N	10	10	15	10

Tabla 1: Número de ratas por grupo de tratamiento y grado de adhesión. a-NFAH y c-NFAH mostraron una adhesión más baja similar en relación con Hemopatch y Tachosil. El grado de adhesión se determinó mediante una puntuación de 3 valores (sin adhesión: estructuras anatómicas separadas; puntuación 1: adhesiones delgadas separables por gravedad; puntuación 2: adhesiones gruesas no separables por gravedad).

5 Después de 24 horas de lograr la hemostasia, no se encontró presencia de resangrado en ningún grupo tratado (figura 8) y sólo una almohadilla de Tachosil pareció migrar en una rata (probablemente se movió durante la sutura).

10 NFAH no mostró una respuesta inflamatoria más alta que Hemopatch y Tachosil

Los niveles de factores inflamatorios para resecciones hepáticas de 0,5 cm y 1,5 cm se muestran en las figuras 9 y 10 respectivamente. Se consideró un mínimo de seis animales en cada grupo tratado.

15 Los tratamientos con NFAH tuvieron mejores resultados en el análisis histológico para resecciones hepáticas más largas

20 Las variables del análisis microscópico se categorizaron tal como se indicó anteriormente en materiales y métodos (la figura 11 muestra ejemplos de clasificación). El análisis histológico de resecciones hepáticas de 0,5 cm mostró menor presencia de hemorragia en el tratamiento con c-NFAH. Sin embargo, la respuesta inflamatoria y la necrosis fue mayor que en el tratamiento con Hemopatch (figura 12 A-C). Estos resultados difieren con las resecciones hepáticas de 1,5 cm que mostraron menor respuesta inflamatoria y necrosis en los tratamientos con NFAH. Además, el tratamiento con c-NFAH tuvo la menor presencia de hemorragia (figura 12 D-F).

25

REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en el control del sangrado con o sin compresión, en la que la composición comprende:
- 5 hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurados, preferiblemente hidrogel de agarosa de tipo VII, (NFAH);
- 10 o hidrogel de fibrina y agarosa no nanoestructurados o prenanoestructurados, preferiblemente hidrogel de agarosa de tipo VII, (FAH).
2. Composición para su uso en el control del sangrado según la reivindicación 1, en la que la composición es para su uso como selladores y/o hemostáticos de tejidos biológicos.
- 15 3. Composición para su uso en el control del sangrado según la reivindicación 1, en la que la composición es para su uso como adyuvante a la hemostasia en laparotomía o cirugía laparoscópica, en cirugía ortopédica, traumatismo (laceración del bazo o cirugía hepática) o heridas de gran tamaño de encamado.
- 20 4. Composición para su uso en el control del sangrado según la reivindicación 1, en la que la composición es para su uso como tratamiento adyuvante y/o primario en el sangrado moderado.
- 25 5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición son hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurados celularizados, preferiblemente hidrogel de agarosa de tipo VII, (c-NFAH).
- 30 6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición son hidrogel de fibrina y agarosa no nanoestructurados o prenanoestructurados celularizados, preferiblemente hidrogel de agarosa de tipo VII, (c-FAH).
- 35 7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición son hidrogel de fibrina y agarosa nanoestructurados acelularizados (sin células), preferiblemente hidrogel de agarosa de tipo VII, (a-NFAH).
8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición son hidrogel de fibrina y agarosa no nanoestructurados o prenanoestructurados acelularizados (sin células), preferiblemente hidrogel de agarosa de tipo VII, (a-FAH).

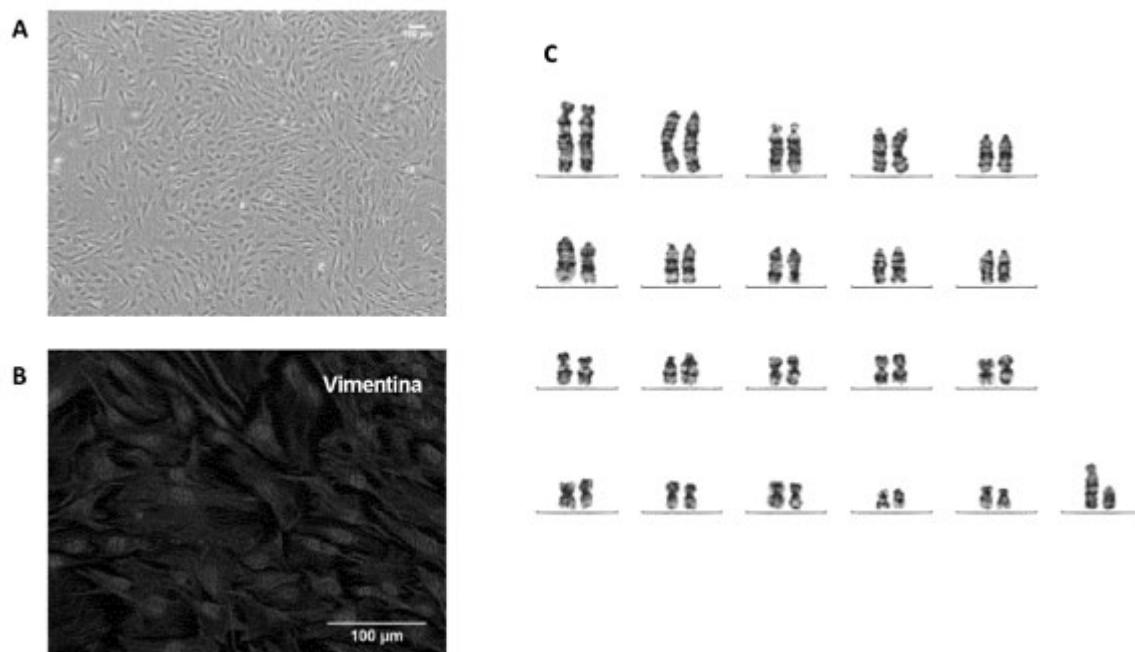


Fig. 1

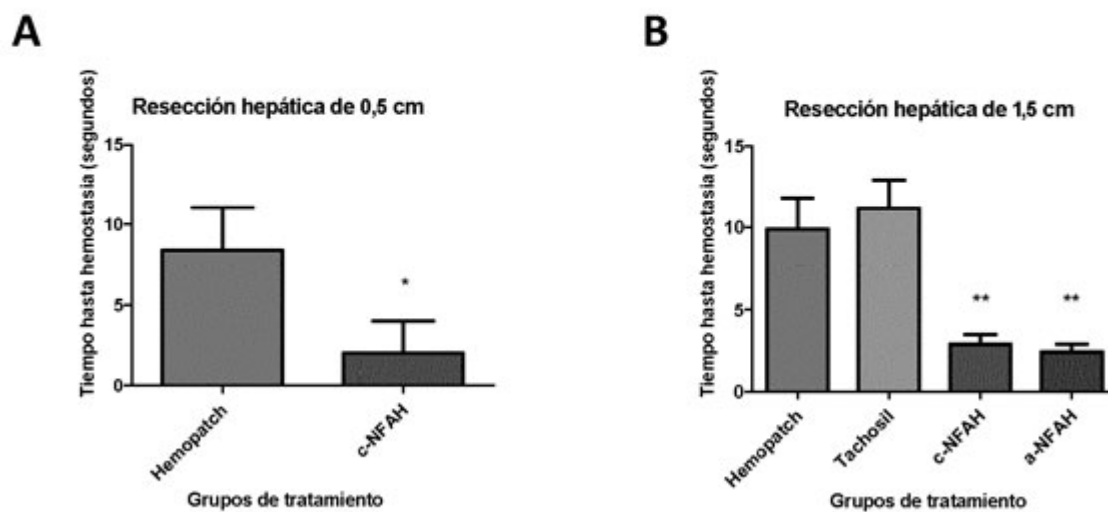


Fig. 2

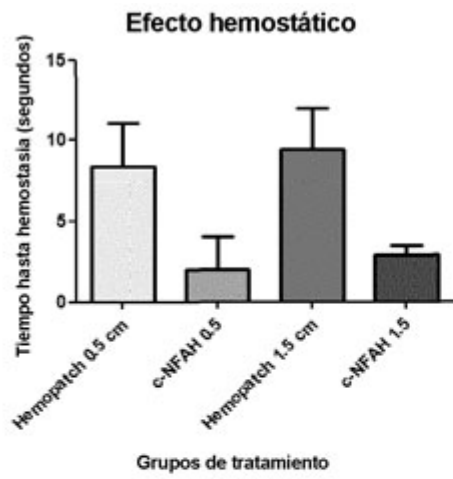


Fig. 3

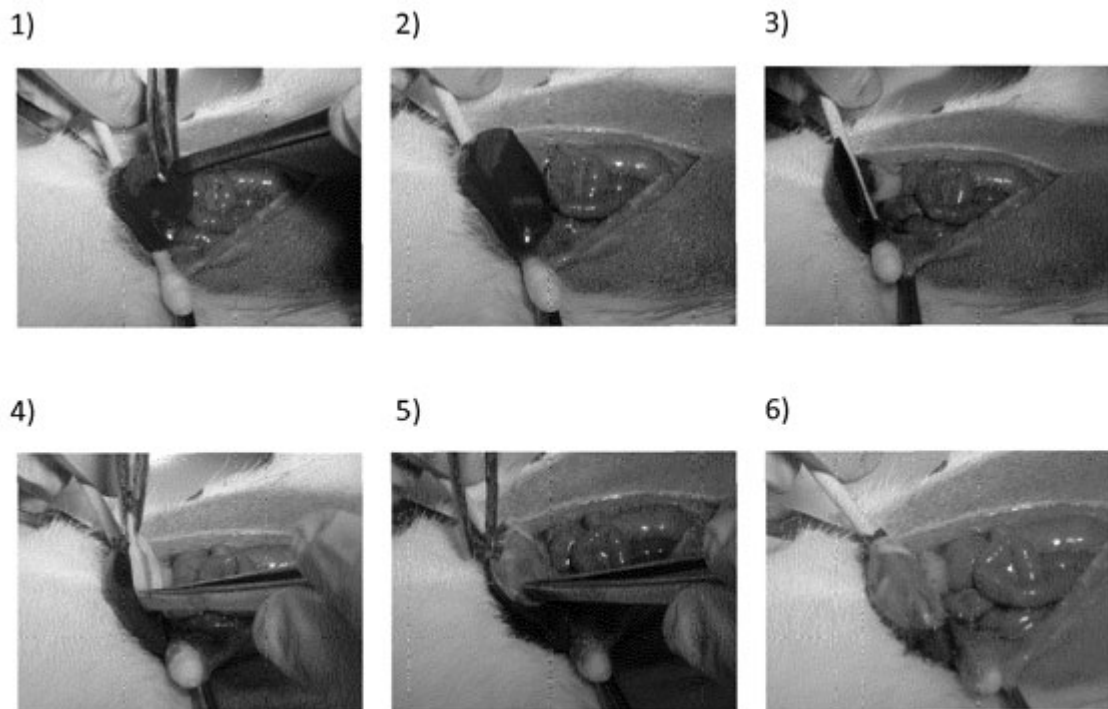


Fig. 4

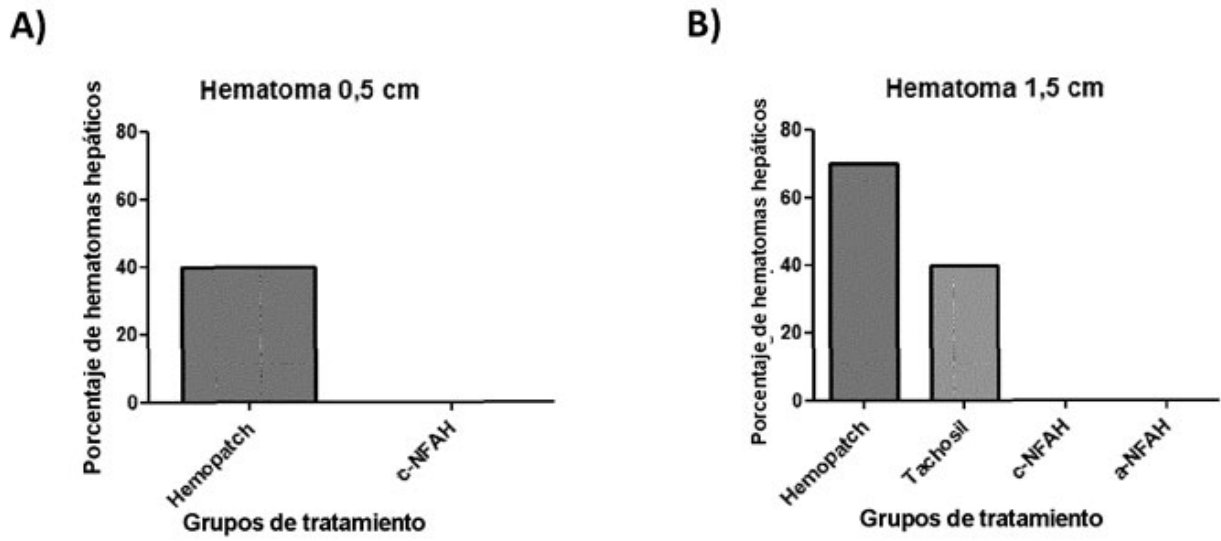


Fig. 5

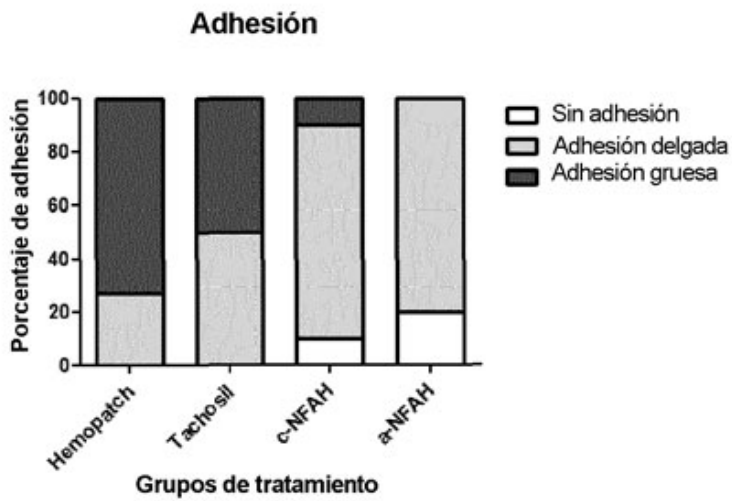
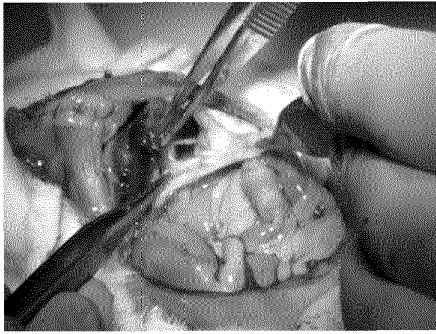
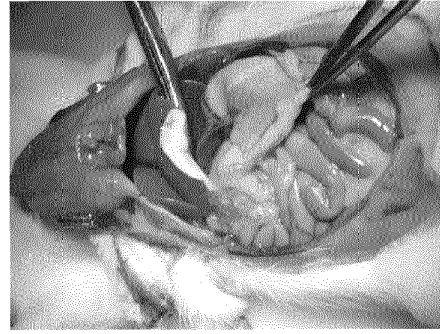


Fig. 6

A



B



C



D

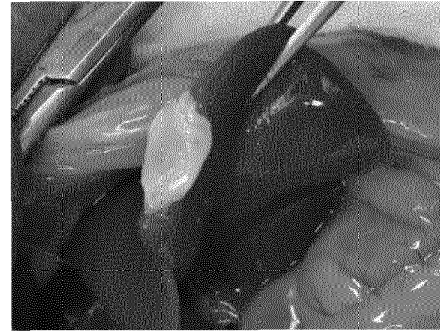


Fig. 7

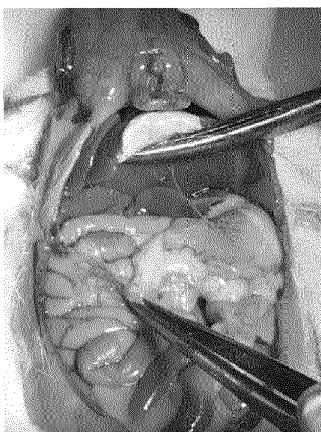


Fig. 8

Factores de inflamación en resección hepática de 0,5 cm

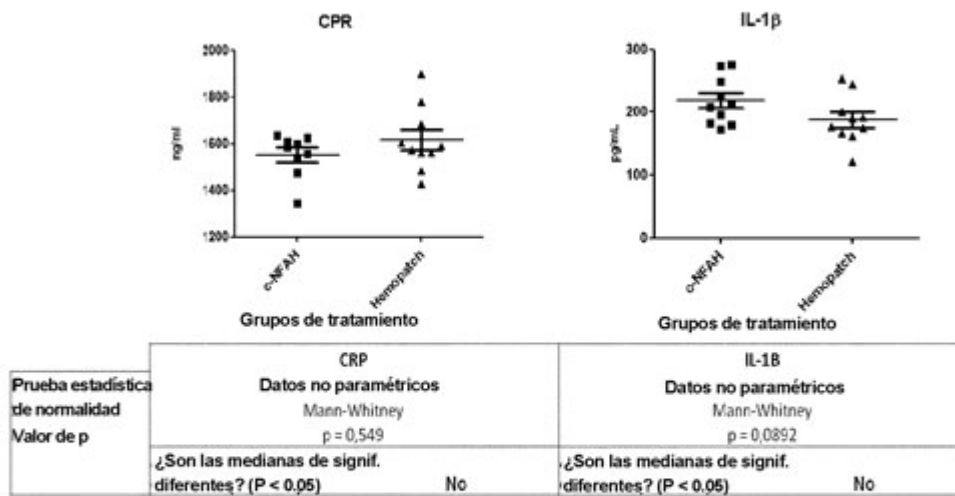


Fig. 9

Factores de inflamación en resección hepática de 1,5 cm

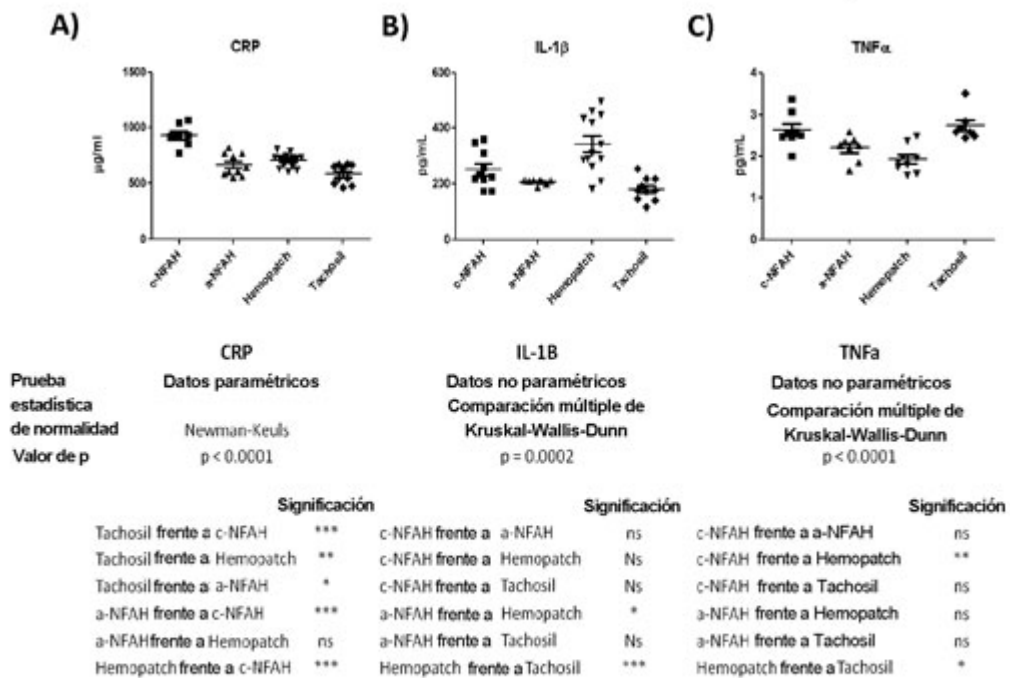


Fig. 10

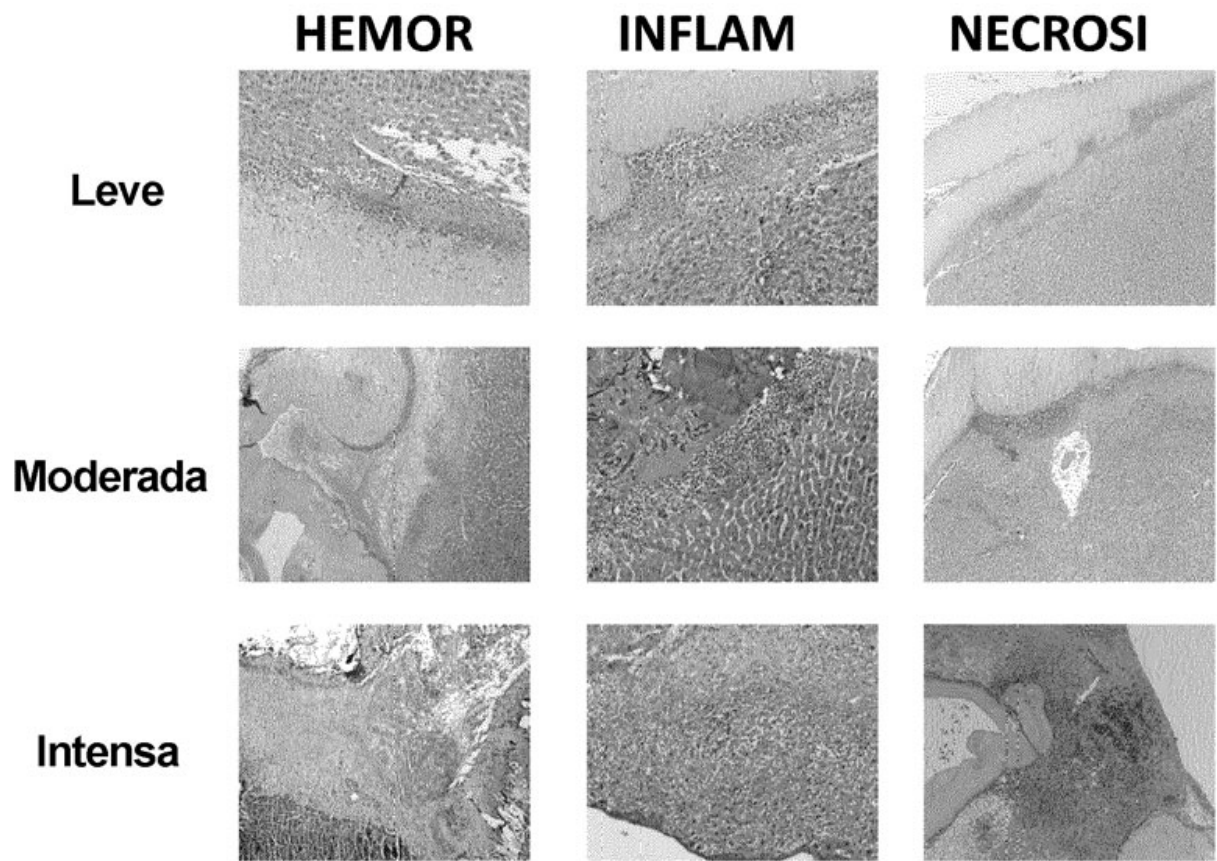
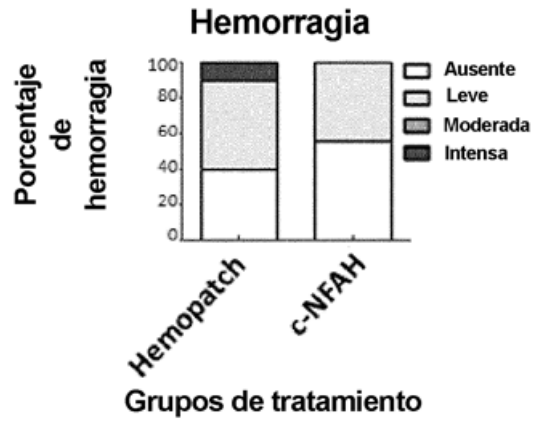


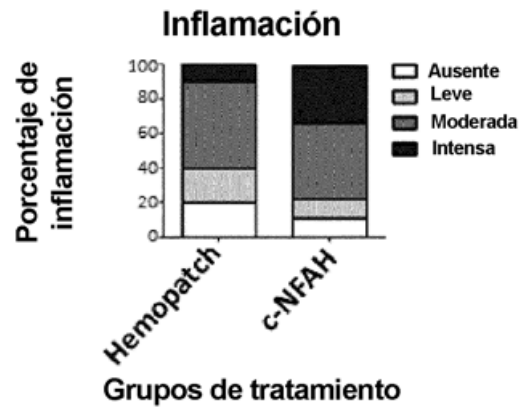
Fig. 11

Análisis histológico de resección hepática de 0,5 cm

A



B



C

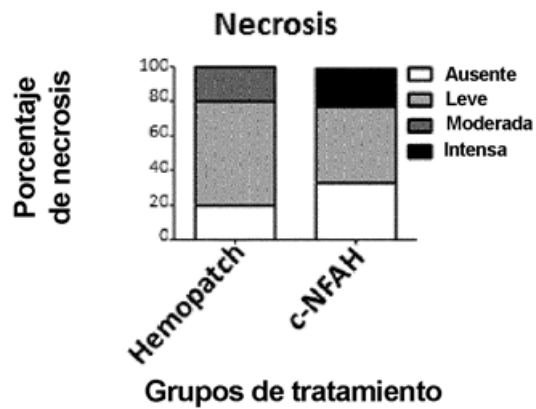
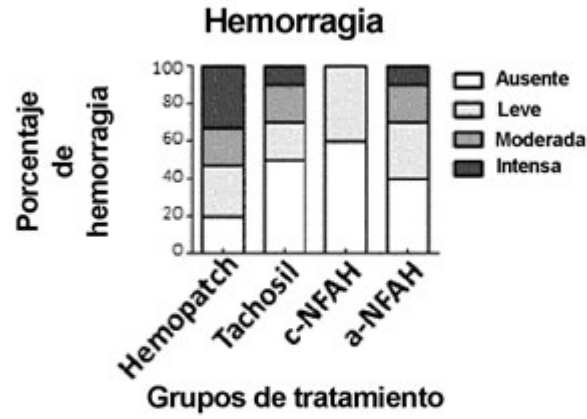


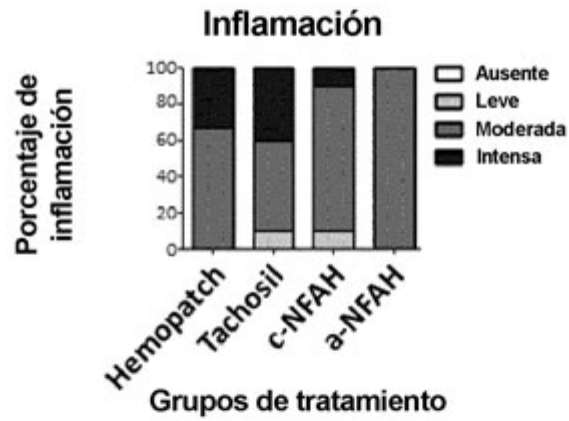
Fig. 12

Análisis histológico de resección hepática de 1,5 cm

D



E



F

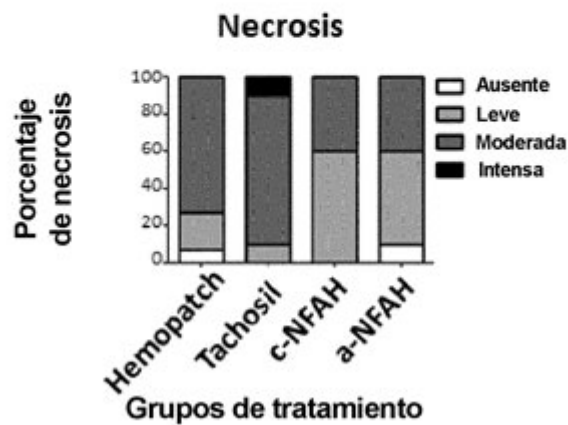


Fig. 12 (Cont.)

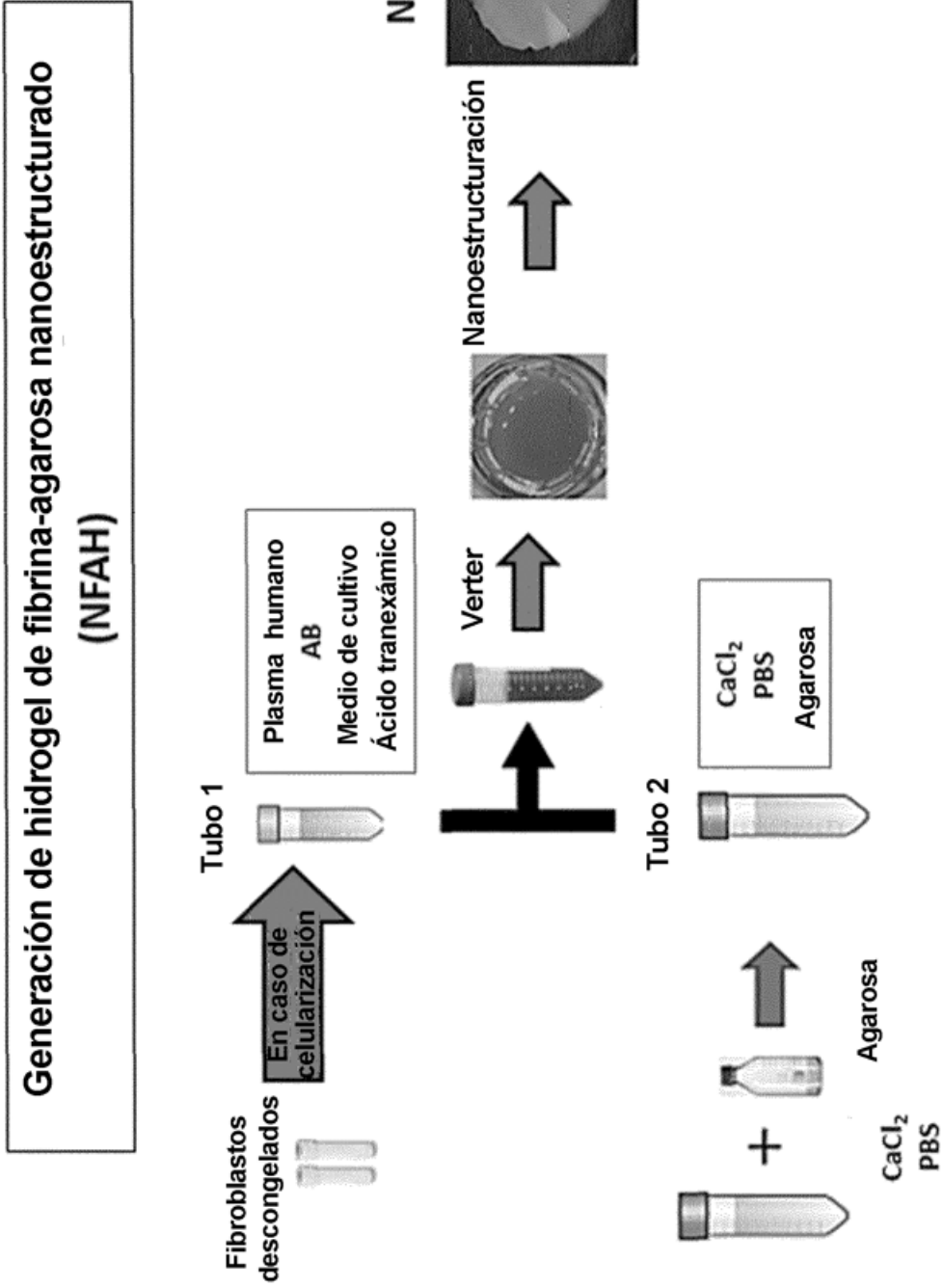


Fig.13