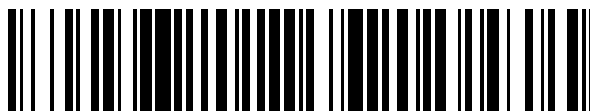


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 702**

51 Int. Cl.:

**A61P 7/04** (2006.01)

**A61K 38/38** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61L 24/10** (2006.01)

**A61K 9/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012 E 12778721 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2771027**

54 Título: **Composiciones hemostáticas**

30 Prioridad:

**27.10.2011 US 201161552270 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2015**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)**  
**One Baxter Parkway**  
**Deerfield, IL 60015, US y**  
**BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MCCOY, JILL;**  
**DWYER, JOSEPH F. y**  
**YANG, ZIPING**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 553 702 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****Composiciones hemostáticas****CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se refiere a composiciones hemostáticas y a procesos para producir dichas composiciones.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- 10 Los documentos WO98/008550A, WO2003/007845A o US 2005/284809 A1, por ejemplo, dan a conocer composiciones hemostáticas en una forma con estabilidad de almacenamiento que comprenden un material granular estable seco, biocompatible y biodegradable. Estos productos han sido aplicados con éxito en la técnica de la hemostasia. El Floseal® es un ejemplo de agente hemostático altamente eficaz que consiste en una matriz de gelatina granular hinchada en una solución que contiene trombina para formar una pasta fluida.

- 15 Dado que estos productos se administran a humanos, es necesario satisfacer los más altos estándares de seguridad en cuanto a calidad, estabilidad de almacenamiento y esterilidad de los productos finales y de sus componentes. Además, la producción y manipulación deben ser lo más prácticas y eficientes posible.

- 20 Un producto exitoso en este campo (el producto Floseal® arriba mencionado) utiliza una matriz de gelatina en conjugación con una solución de trombina liofilizada reconstituida. La matriz de gelatina se aplica como una forma granular fluida de gelatina y trombina, con un contenido en gelatina de aproximadamente el 11 al 14,5%. Un contenido menor de gelatina resulta en un producto muy fluido con rendimiento reducido debido a las dificultades para que el producto permanezca en el punto de tratamiento, en especial bajo condiciones de altos flujos sanguíneos. Una concentración mayor de partículas de gelatina conduce a un producto difícil de suministrar por los medios de administración usuales, como jeringuillas o catéteres, debido a la mayor resistencia al flujo. También se ha sugerido la inclusión de plastificantes en la composición, por ejemplo polietilenglicoles, sorbitol, glicerol y similares (EP0927053B1), que puede disminuir la fuerza de extrusión, pero la inclusión de estos materiales no mejora necesariamente el rendimiento.

- 30 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición hemostática basada en una gelatina reticulada con propiedades de adherencia y hemostáticas mejoradas en comparación con los productos de gelatina de acuerdo con el estado actual de la técnica, como Floseal, y métodos para producir dichas composiciones hemostáticas. Las composiciones también deberían proporcionarse en una forma conveniente y útil, en concreto como una pasta fluida para su uso en cirugía endoscópica y microcirugía. Los productos deben tener una fuerza de extrusión de 40 N o menos, preferentemente menos de 35 N, de forma especialmente preferente menos de 20 N. Preferiblemente, los productos deben proporcionarse en formatos de producto que permitan una provisión conveniente de composiciones hemostáticas "listas para el uso", que se puedan aplicar directamente en una lesión sin un paso de reconstitución de larga duración.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

- 40 Así, la presente invención proporciona una composición hemostática que comprende gelatina reticulada en forma particulada adecuada para su uso en la hemostasia, estando presente la composición en forma de una pasta que contiene entre un 15,0 y un 19,5% (p/p) de gelatina reticulada, preferentemente entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), de forma particularmente preferente entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), y comprendiendo la composición un potenciador de extrusión, siendo el potenciador de extrusión albúmina en una cantidad entre un 0,5 y un 5,0% (p/p).

- 45 La invención también se refiere al uso de esta composición hemostática para el tratamiento de una lesión seleccionada de entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado y/o tejido sangrante, incluyendo la administración de una composición hemostática, y kits para producir una composición hemostática de este tipo para el tratamiento de dicha lesión.

**DESCRIPCION DE REALIZACIONES ESPECIFICAS DE LA INVENCION**

- 50 La presente invención proporciona una composición hemostática que comprende gelatina reticulada en forma particulada adecuada para su uso en la hemostasia, estando presente la composición en forma de una pasta que contiene entre un 15,0 y un 19,5% (p/p) de gelatina reticulada (= peso de gelatina reticulada seca por peso de la composición final), preferentemente entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente

entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), de forma particularmente preferente entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), y comprendiendo la composición un potenciador de extrusión, siendo el potenciador de extrusión albúmina en una cantidad entre un 0,5 y un 5,0% (p/p).

5 En el curso de la presente invención se ha comprobado sorprendentemente que la provisión de potenciadores de extrusión, como albúmina, en la cantidad apropiada, permite el uso de mayores concentraciones de gelatina, y que el uso de mayores concentraciones de gelatina mejora las propiedades hemostáticas de estos productos. Este es un efecto que no ha sido sugerido con anterioridad. Además, también resultó sorprendente que una mayor concentración de gelatina reticulada condujera a mejores propiedades de adhesión (a diferencia de los resultados conocidos en el estado anterior de la técnica (por ejemplo, en la Fig. 4 de WO2008/076407A2).

15 Para facilitar las propiedades preferentes debido a las mayores concentraciones de gelatina en la pasta de acuerdo con la presente invención es necesario proporcionar los potenciadores de extrusión en cantidades apropiadas. Las cantidades deben ser lo suficientemente altas como para obtener el efecto de extrusión, es decir, para obtener una pasta fluida incluso con cantidades entre un 15 y un 19,5% de gelatina reticulada, de modo que la composición hemostática se pueda aplicar por ejemplo en microcirugía. Por otro lado, las cantidades deben ser lo suficientemente bajas como para evitar propiedades funcionales negativas de la composición hemostática, por ejemplo adherencia a heridas o rendimiento hemostático. El potenciador de extrusión de albúmina (en especial seroalbúmina humana) debe ser suministrado en una cantidad entre un 0,5 y un 5,0% (p/p) (= peso del potenciador de extrusión por peso de composición final), preferentemente entre un 1,0 y un 5,0% (p/p), preferentemente entre un 2,0 y un 4,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 1,5 y un 5,0% (p/p), de forma particularmente preferente aproximadamente un 1,5% (p/p).

Otra clase de potenciadores de extrusión son los fosfolípidos, como fosfatidilcolina y fosfatidilserina, o mezclas complejas tales como lecitinas o aceites de soja.

25 En otra realización preferente, la presente invención proporciona una composición hemostática que comprende gelatina reticulada en forma particulada adecuada para su uso en la hemostasia, estando presente la composición en forma de una pasta que contiene entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), preferentemente entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), de forma particularmente preferente entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), y comprendiendo la composición el potenciador de extrusión consistente en albúmina. Preferentemente, el potenciador de extrusión es seroalbúmina humana.

30 En otra realización preferente, la presente invención proporciona una composición hemostática gelatina reticulada en forma particulada adecuada para su uso en hemostasia, estando presente la composición en forma de una pasta que contiene entre un 15,0 y un 19,5% (p/p) de gelatina reticulada, preferentemente entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), en particular entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), y comprendiendo la composición un potenciador de extrusión en una concentración de más de un 0,8% (p/p), de forma preferente aproximadamente un 3,3% (p/p). El potenciador de extrusión es preferiblemente seroalbúmina humana, por ejemplo en las concentraciones arriba mencionadas.

40 Las composiciones hemostáticas de la presente invención tienen ventajas específicas con respecto a las composiciones donde se utilizan cantidades menores de gelatina reticulada (entre un 13 y un 14,5%), en especial tienen una mayor eficacia *in vivo*. Inesperadamente, en el curso de la presente invención se puso de manifiesto que una formulación con una mayor concentración de partículas de gelatina conduce a un mayor rendimiento hemostático tanto en métodos de ensayo *ex vivo*, que utilizan sangre humana total, como en experimentos preclínicos con animales. Los productos según la presente invención posibilitan un menor tiempo de cirugía y una mayor rapidez de hemostasia.

Las composiciones según la presente invención tienen una fuerza de extrusión media (empleando el método de ensayo descrito en el ejemplo 1) de 40 N o menos, preferentemente menos de 35 N, de forma especialmente preferente menos de 20 N.

50 De acuerdo con la realización preferente de la presente invención, la composición hemostática comprende gelatina reticulada con glutaraldehído o gelatina reticulada con genipín ((1*R*,2*R*,6*S*)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo), preferiblemente gelatina de tipo B, de forma especialmente preferente gelatina de tipo B de origen oculto.

Preferentemente, la gelatina reticulada está presente como un material granular.

55 La composición hemostática según la presente invención comprende preferentemente un polímero de gelatina que, en especial, es un polímero de gelatina de tipo B. La gelatina de tipo B ha demostrado ser

específicamente ventajosa para su uso en agentes hemostáticos, ya que el tratamiento de base es altamente eficaz para generar gelatina con propiedades apropiadas y para mitigar el riesgo de infección viral y zoonótica. Una preparación de gelatina específicamente preferente se puede preparar procesando corion de bovino joven con NaOH 2N durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, neutralizándolo a pH 7-8 y calentándolo a 70°C. El corion se solubiliza después por completo a gelatina con un 3-10% (p/p), preferentemente un 7-10% (p/p), de gelatina en solución. Esta solución se puede moldear, secar y moler para obtener polvo de gelatina de tipo B.

Preferentemente, la gelatina tiene una fuerza Bloom de 200 a 400, en especial una gelatina de tipo B con una fuerza Bloom de 200 a 400. Bloom es un ensayo para medir la fuerza de la gelatina. El ensayo determina el peso (en gramos) que necesita una sonda (normalmente con un diámetro de 1,27 cm, 0,5 pulgadas) para desviar la superficie del gel 4 mm sin romperla. El resultado se expresa en Bloom (grados). Para realizar el ensayo Bloom en gelatina, una solución de gelatina al 6,67% se mantiene durante 17-18 horas a 10°C antes del ensayo.

La composición hemostática de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente la gelatina reticulada en forma particulada, en especial como un material granular. Este material granular se puede hinchar rápidamente cuando se expone a un fluido (es decir, el diluyente) y en esta forma hinchada puede contribuir a formar una pasta fluida que se puede aplicar a un sitio sangrante. De acuerdo con una realización preferente, la gelatina reticulada se proporciona a partir de una gelatina reticulada seca. Este polvo de gelatina reticulada seca se puede preparar para que se rehidrate rápidamente al entrar en contacto con un diluyente farmacéuticamente aceptable. Los gránulos de gelatina, en especial en forma de un polvo de gelatina, comprenden preferentemente partículas relativamente grandes, también denominadas fragmentos o subunidades, tal como se describe en los documentos WO98/08550A y WO2003/007845A. Un tamaño de partícula (mediana) preferente oscila entre 10 y 1.000 µm, preferentemente entre 200 y 800 µm, pero en muchas circunstancias se pueden utilizar tamaños de partícula fuera de este intervalo preferente.

Normalmente, las partículas de gelatina tienen un diámetro de partícula medio ("diámetro de partícula medio" es la mediana del tamaño medido por difracción láser; la "mediana del tamaño" (o diámetro de partícula mediano en masa) es el diámetro de partícula que divide la distribución de frecuencias por la mitad; un cincuenta por ciento de las partículas de una preparación dada tiene un diámetro mayor y un cincuenta por ciento de las partículas tiene un diámetro menor) de 10 a 1.000 µm, preferentemente de 50 a 700 µm, de 200 a 700 µm, de 300 a 550 µm, de forma especialmente preferente de 350 a 550 µm (mediana del tamaño). Aunque los términos polvo y granular (o granulados) se utilizan a veces para diferentes clases de material independientes, el concepto "polvos" se define aquí como una subclase especial de materiales granulares. En particular, el concepto "polvos" se refiere a aquellos materiales granulares que tienen los tamaños de grano más finos y que, por tanto, tienen una mayor tendencia a aglutinarse al fluir. Los gránulos incluyen materiales granulares más gruesos que no tienden a aglutinarse excepto cuando están húmedos.

La presente gelatina reticulada en forma particulada adecuada para su uso en la hemostasia puede incluir formas dimensionalmente isotrópicas o no isotrópicas. Por ejemplo, la gelatina reticulada en el kit de acuerdo con la presente invención puede consistir en gránulos o fibras; y puede estar presente en estructuras discontinuas, por ejemplo en formas en polvo.

La composición de gelatina seca es absorbente de líquidos. Por ejemplo, al entrar en contacto con líquidos, por ejemplo soluciones o suspensiones acuosas (en especial un tampón o sangre), la gelatina reticulada absorbe el líquido y presenta un grado de hinchamiento, dependiendo de la magnitud de la hidratación. El material preferentemente absorbe entre al menos un 400%, de forma preferente aproximadamente un 500% y aproximadamente 2.000%, en especial entre aproximadamente un 500% y aproximadamente un 1.300% de agua o tampón acuoso en peso, lo que corresponde a un aumento nominal del diámetro o la anchura de una partícula o subunidad individual por ejemplo entre aproximadamente un 50% y aproximadamente un 500%, normalmente entre aproximadamente un 50% y aproximadamente un 250%. Por ejemplo, si las partículas granulares (secas) tienen un intervalo de tamaño preferente de 0,01 mm a 1,5 mm, en especial de 0,05 mm a 1 mm, la composición totalmente hidratada (por ejemplo, después de la administración en una herida o después de contacto con una solución tampón acuosa), puede tener un intervalo de tamaño de 0,05 mm a 3 mm, en especial de 0,25 mm a 1,5 mm.

Las composiciones secas también presentarán un considerable "hinchamiento de equilibrio" cuando se exponen a un medio de rehidratación acuoso (= diluyente farmacéuticamente aceptable, también denominado medio de reconstitución). Preferentemente, el hinchamiento oscilará entre un 400% y un 1.300%, preferentemente entre un 400% y un 1.000%, de forma especialmente preferente entre un 500% y un 1100%, de forma particularmente preferente entre un 500% y un 900%, dependiendo de su uso previsto. Este hinchamiento de equilibrio se puede controlar, por ejemplo (en caso de un polímero reticulado) variando el grado de reticulación, lo que a su vez se logra variando las condiciones de reticulación, como la duración de la exposición a un agente reticulante, la concentración de agente reticulante, la temperatura de reticulación y similares. Materiales con valores de hinchamiento de equilibrio diferentes se comportan de modo diferente en

diferentes aplicaciones. La capacidad para controlar la reticulación y el hinchamiento de equilibrio permite optimizar las composiciones de la presente invención para diversos usos. Además del hinchamiento de equilibrio, también es importante controlar la hidratación del material inmediatamente antes de suministrarlo a un lugar objetivo. Evidentemente, la hidratación y el hinchamiento de equilibrio están íntimamente relacionados. Un material con un 0% de hidratación no estará hinchado. Un material con un 100% de hidratación estará en su equilibrio de contenido de agua. Las hidrataciones entre el 0% y el 100% corresponderán a un hinchamiento entre las cantidades mínima y máxima. El "hinchamiento de equilibrio" se determinará restando el peso seco del polvo de hidrogel de gelatina de su peso cuando está completamente hidratado y, en consecuencia, completamente hinchado. Después, la diferencia se divide entre el peso seco y se multiplica por 100 para obtener la magnitud del hinchamiento. El peso seco se debería medir después de exponer el material a una temperatura elevada durante un tiempo suficiente para eliminar esencialmente toda la humedad residual, por ejemplo durante dos horas a 120°C. La hidratación de equilibrio del material se puede lograr sumergiendo el material seco en un diluyente farmacéuticamente aceptable, como una solución salina acuosa, durante un período de tiempo suficiente para que el contenido en agua se mantenga constante, normalmente entre 18 y 24 horas, a temperatura ambiente.

La gelatina reticulada se puede suministrar en forma de una película, que después se puede moler para formar un material granular. La mayor parte de las partículas contenidas en un el granular (por ejemplo más de un 90% p/p) preferiblemente tienen un tamaño de partícula de 10 a 1.000 µm, preferentemente de 50 a 700 µm, de 200 a 700 µm, de 300 a 550 µm, de forma especialmente preferente de 350 a 550 µm.

Preferiblemente, la forma fluida de la composición hemostática contiene partículas de las que más de un 50% (p/p) tienen un tamaño de 100 a 1.000 µm, preferentemente más de un 80% (p/p) tienen un tamaño de 100 a 1.000 µm.

Ejemplos de materiales de gelatina adecuados para la reticulación se describen, entre otros, en los ejemplos 1 y 2 del documento EP 1803417 B1 y en el ejemplo 14 de los documentos US 6.066.325 A y US 6.063.061 A. La gelatina también puede emplearse con ayudas de procesamiento, como PVP, PEG y/o dextrano como ayudas de rehidratación.

En un aspecto particular de la presente invención, las composiciones comprenden polvo de gelatina reticulada con un contenido en humedad de un 20% (p/p) o inferior, habiendo sido reticulado el polvo en presencia de una ayuda de rehidratación, de modo que el polvo presenta una tasa de rehidratación acuosa que es al menos un 5% mayor que la tasa de rehidratación de un polvo similar preparado sin la ayuda de rehidratación. De acuerdo con el documento EP 1803417 B1, la "tasa de rehidratación" se define como la cantidad de solución acuosa, normalmente solución salina al 0,9% (p/p), que es absorbida por gramo de polvo (con respecto al peso seco) en un plazo de treinta segundos, expresada como g/g. La tasa de rehidratación se mide mezclando la gelatina reticulada con la solución salina durante 30 segundos y depositando la gelatina húmeda sobre una membrana de filtro bajo vacío para eliminar la solución acuosa libre. Después se registra el peso de la gelatina húmeda retenida en el filtro, se seca (por ejemplo 2 horas a 120°C), se registra el peso seco de la gelatina y se calcula el peso de la solución que ha sido absorbida por gramo de gelatina seca.

Las composiciones preferentes de la presente invención tienen una tasa de rehidratación de al menos 3 g/g, preferentemente al menos 3,5 g/g, y con frecuencia 3,75 g/g o más. Las tasas de rehidratación de polvos similares preparados sin las ayudas de rehidratación son normalmente inferiores a tres, y un aumento porcentual de la tasa de rehidratación será normalmente de al menos el 5%, preferentemente al menos el 10% y de forma especialmente preferente al menos el 25% o más.

La reticulación se puede llevar a cabo con cualquier reticulante adecuado, por ejemplo glutaraldehído, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO98/08550A y WO2003/007845A. La reticulación también se puede llevar a cabo con un reticulante no tóxico, como genipín y similares.

El coste de producción es menor en caso de un producto de gelatina reticulada con genipín según la presente invención que en caso de un producto de gelatina reticulada con glutaraldehído, ya que los costes de reactivo, energía y tiempo son menores. La reacción de gelatina reticulada con genipín se puede llevar a cabo en agua a pH neutro, a temperatura ambiente, durante un tiempo ≤ 16 horas. El producto se puede limpiar mediante lavado con etanol y/o agua, que no solo es más barato, sino que también, y aún más importante, es más seguro para el operador.

El método preferentemente aplica la gelatina presente en forma seca antes del paso de reticulación.

El reticulante de tipo genipín preferente de acuerdo con la invención es, evidentemente, genipín ((1R,2R,6S)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]-nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo); no obstante, también se pueden utilizar otros reticulantes de tipo iridoide o secoiridoide, como oleuropeína. Las concentraciones

preferentes de genipín para la reticulación oscilan entre 0,5 y 20 mM, preferentemente entre 1 y 15 mM, en especial entre 2 y 10 mM.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, la gelatina reticulada con genipín se somete a un paso de extinción/oxidación con agentes oxidantes como lejía, tBu-hidroperóxido, etc., preferentemente a un tratamiento con percarbonato de sodio, hipoclorito de sodio, agua clorada o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), siendo especialmente preferente un tratamiento con percarbonato de sodio o  $H_2O_2$  y particularmente preferente un tratamiento con percarbonato.

Las concentraciones de  $H_2O_2$  preferentes son del 0,5 al 20% (p/p), en especial del 1 al 15% (p/p), de forma particularmente preferente de aproximadamente el 5% (p/p). En una realización especialmente preferente, la concentración de genipín oscila entre 5 y 10 mM, el tiempo de reacción de gelatina con genipín oscila entre 3 y 10 horas, en especial 6 horas, la concentración de  $H_2O_2$  oscila entre el 3 y el 5% (p/p) y el tiempo de reacción de la gelatina reticulada con genipín con  $H_2O_2$  es de aproximadamente 20 horas.

Las concentraciones de percarbonato preferentes oscilan entre el 1 y el 10% (p/p), en especial entre el 1 y el 5% (p/p), de forma particularmente preferente entre el 1 y el 4% (p/p). En una realización especialmente preferente, la concentración de genipín oscila entre 5 y 10 mM (en especial es de aproximadamente 8 mM), el tiempo de reacción de la gelatina con genipín oscila entre 3 y 10 horas (en especial es de aproximadamente 5 horas), la concentración de percarbonato oscila entre el 1 y el 10% (p/p), de forma especialmente preferente entre el 1 y el 4% p/p, y el tiempo de reacción de la gelatina reticulada con genipín con percarbonato oscila entre 1 y 20 horas, preferentemente entre 1 y 5 horas (por ejemplo 1, 2 o 3 horas).

La extinción también se puede llevar a cabo en presencia de antioxidantes tales como ascorbato de sodio, o controlando el potencial de oxidación del entorno de reacción, por ejemplo llevando a cabo la extinción y/o la reacción de genipín en una atmósfera inerte, como nitrógeno o argón.

Las condiciones de la reacción de reticulación preferentes incluyen la realización en solución acuosa, preferentemente en solución salina tampón fosfato (PBS)/tampón etanol, en especial a un pH de 4 a 12, preferentemente de 5,0 a 10,0, en especial de 6 a 8, o en agua desionizada u otros tampones acuosos que pueden contener entre un 0 y un 50% de un disolvente orgánico miscible con agua. Un ejemplo de tampón PBS contiene NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM-2  $H_2O$ ,  $KH_2PO_4$  1,76 mM (pH = 7,4). Otro ejemplo de tampón PBS es NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $Na_2HPO_4$  4,3 mM y  $KH_2PO_4$  1,4 mM (pH = 7,5).

La reacción también se puede llevar a cabo en un tampón acuoso que contiene hasta un 50% de un disolvente orgánico miscible con agua y/o ayudas de procesamiento, como PEG, PVP, manitol, percarbonato de sodio, lactato de sodio, citrato de sodio, ascorbato de sodio, etc.

Preferentemente, el paso de reticulación se lleva a cabo a una temperatura de 4°C a 45°C, preferentemente de 15 a 45°C, en especial de 20 a 40°C.

El paso de reticulación puede ir seguido de un paso de extinción, en especial con un agente de extinción que contiene grupos amino, preferentemente un aminoácido, en especial glicina. Con el agente de extinción, los reticulantes de tipo genipín todavía no reaccionados se inactivan (por ejemplo por reacción con el agente de extinción en exceso) para evitar que continúe la reticulación. La extinción también se puede llevar a cabo aumentando el pH de la solución a un valor entre 8 y 14, o utilizando compuestos nucleófilos que contienen grupos amino, tiol o hidroxilo, y también mediante una combinación de aumento del pH y utilización de compuestos nucleófilos. El paso de extinción después de la reacción de reticulación de genipín-gelatina de acuerdo con la presente invención se puede dirigir activamente para impartir el comportamiento físico deseado, como el hinchamiento y TEG, que son determinantes importantes de la actividad hemostática por encima y más allá de la reticulación general con genipín por sí sola.

Preferentemente, la gelatina reticulada se lava después del paso de reticulación, preferiblemente con metanol, etanol o agua, en especial con agua desionizada. Otro paso de lavado preferente aplica un tampón acuoso que contiene hasta un 50% (v/v) de disolvente orgánico miscible con agua y/o una o más ayudas de procesamiento.

De acuerdo con una realización preferente, la gelatina reticulada se seca. Una vez en estado seco, la composición hemostática es estable en almacenamiento durante un período de tiempo largo incluso a temperaturas elevadas, por ejemplo más de 20°C, más de 30°C o incluso más de 40°C. Las condiciones de sequedad preferentes incluyen polímeros biocompatibles reticulados que se secan hasta que tienen un contenido de humedad inferior al 15% (p/p), preferentemente inferior al 10%, de forma especialmente preferente inferior al 5%, en particular inferior al 1%. En otra realización preferente, el producto se puede suministrar en un estado hidratado o húmedo, pudiendo consistir la solución hidratante en un tampón o una solución biocompatible. Un producto de Glu-Gel tiene tendencia a camuflarse en el tejido circundante, ya que su color ligeramente amarillo se mezcla con éste. Esto hace que la evaluación visual de la aplicación deseada

5 resulte problemática. Los productos de gelatina reticulada con genipín de acuerdo con la presente invención presentan un color variable desde amarillo claro hasta azul oscuro o verde, según el grado de las condiciones de la reacción de reticulación y los posteriores pasos de procesamiento y acabado. Esta posibilidad de ajustar el color y la capacidad para obtener el color deseado del producto acabado tienen la ventaja añadida de proporcionar a los médicos una indicación visual de una aplicación apropiada del producto en sitios de lesión, ya que su color lo diferencia del tejido circundante, en lugar de camuflarlo potencialmente. Esta es otra característica nueva de esta invención. Por otro lado, el color se puede eliminar para obtener un producto incoloro, dependiendo de las necesidades con respecto a los productos finales.

10 En una realización preferente, el polímero biocompatible, por ejemplo gelatina, reticulado con un reticulante de tipo genipín, por ejemplo genipín, es un polímero reticulado homogéneamente (uniformemente), tal como se puede comprobar por ejemplo por mediciones de fluorescencia, como se describe en el Ejemplo 3 de la presente solicitud. En una realización especialmente preferente, el polímero biocompatible, como gelatina, está presente como un polímero biocompatible reticulado homogéneamente con genipín, como gelatina, en forma particulada.

15 Es preferible una composición hemostática de acuerdo con la presente invención que incluye excipientes, como lubricantes, por ejemplo ácido hialurónico.

En otra realización de la presente invención están excluidos los excipientes, como lubricantes, por ejemplo ácido hialurónico.

20 El diluyente farmacéuticamente aceptable preferentemente es una solución acuosa y puede contener una sustancia seleccionada entre el grupo consistente en NaCl, CaCl<sub>2</sub> y acetato de sodio. Por ejemplo, un diluyente farmacéuticamente aceptable comprende agua para inyección y (independientemente entre sí) NaCl de 50 a 200 mM (preferentemente 150 mM), CaCl<sub>2</sub> de 10 a 80 mM (preferentemente 40 mM) y acetato de sodio de 1 a 50 mM (preferentemente 20 mM). En otra realización, el diluyente farmacéuticamente aceptable comprende menos de 35 g/l de manitol, preferentemente menos de 25 g/l, de forma especialmente preferente  
25 menos de 10 g/l, y de forma particularmente preferente el diluyente farmacéuticamente aceptable está esencialmente libre de manitol.

De acuerdo con una realización preferente, el diluyente farmacéuticamente aceptable comprende trombina, preferentemente de 10 a 1.000 U.I. trombina/ml, en especial de 250 a 700 U.I. trombina/ml. Preferiblemente, la composición hemostática en esta forma lista para el uso contiene de 10 a 100.000 Unidades Internacionales (U.I.) de trombina, de forma especialmente preferente de 100 a 10.000 U.I., en particular de 500 a 5.000 U.I. La trombina (o cualquier otro agente inductor de la coagulación, como veneno de serpiente, un activador plaquetario, un péptido activador de receptores de trombina y un agente precipitador de fibrinógeno) se puede derivar de cualquier preparación de trombina que sea adecuada para su uso en humanos (es decir, farmacéuticamente aceptable). Fuentes de trombina adecuadas incluyen sangre, plasma  
30 o suero humano y bovino (también se puede utilizar trombina de otras fuentes animales si no se prevé ninguna reacción inmunológica adversa), la trombina de origen recombinante (por ejemplo trombina recombinante humana) y la trombina humana autóloga pueden ser preferibles para algunas aplicaciones.

El diluyente farmacéuticamente aceptable se utiliza en una cantidad adecuada para obtener la concentración final deseada en la composición lista para el uso. La preparación de trombina puede contener otros componentes útiles, como iones, tampones, excipientes, estabilizadores, etc. Preferentemente, la preparación de trombina contiene albúmina humana como potenciador de extrusión. Las sales preferentes son NaCl y/o CaCl<sub>2</sub>, ambas utilizadas en las cantidades y concentraciones usuales aplicadas para trombina (por ejemplo del 0,5 al 1,5% de NaCl (por ejemplo el 0,9%) y/o CaCl<sub>2</sub> de 20 a 80 mM (por ejemplo 40 mM)).  
40

En otra realización, el diluyente también puede incluir un tampón o sistema tampón para tamponar el pH de la composición seca reconstituída, preferentemente a un pH de 3,0 a 10,0, de forma especialmente preferente de 6,4 a 7,5, en particular a un pH de 6,9 a 7,1.  
45

El establecimiento de cantidades apropiadas de gelatina reticulada, diluyente y potenciador de extrusión se puede realizar en el kit de acuerdo con los prerequisites arriba mencionados: por ejemplo, se puede proporcionar un vial con 0,736 a 0,995 g de gelatina reticulada seca (correspondientes a una proporción del 15,0 al 19,5% (p/p) en el producto final), b) un segundo vial con 4 ml de diluyente con 60 a 240 mg de albúmina y, opcionalmente, trombina en una concentración de 500 U.I./ml y/o CaCl<sub>2</sub> 40 mM. Alternativamente se puede añadir albúmina en forma liofilizada al componente de gelatina seca a) del kit. Por ejemplo, se puede proporcionar un vial con 0,573 a 0,775 g de gelatina reticulada seca (correspondientes a una proporción del 15,0 al 19,5% (p/p) en el producto final), de los que 48 a 192 mg son albúmina, b) un segundo vial con 3,2 ml de diluyente con 60 a 240 mg de albúmina y, opcionalmente, trombina en una concentración  
50 de 500 U.I./ml y/o CaCl<sub>2</sub> 40 mM.  
55

El componente de gelatina reticulada del kit de acuerdo la presente invención se proporciona preferentemente en forma de una composición seca, estando presente la gelatina reticulada en forma seca.

- 5 Una composición de gelatina reticulada esencialmente seca de acuerdo con la presente invención tiene un contenido residual de humedad que corresponde al contenido de humedad de productos comparables disponibles, como Floseal® (el Floseal, por ejemplo, tiene una humedad de aproximadamente un 8-12% como producto seco).

- 10 La gelatina reticulada seca en forma particulada adecuada para su uso en hemostasia en el kit de acuerdo con la presente invención es preferentemente gelatina en forma de polvo, en especial teniendo las partículas de polvo una mediana del tamaño de partícula de 10 a 1.000 µm, preferentemente de 50 a 700 µm, de 200 a 700 µm, de 300 a 550 µm, de forma especialmente preferente de 350 a 550 µm. Por ejemplo, el documento WO98/08550A da a conocer en principio una "preparación granular seca de gelatina reticulada" de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la gelatina reticulada es un material granular estable, seco, biocompatible y biodegradable.

- 15 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición hemostática de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de una lesión seleccionada de entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado, tejido sangrante y/o defectos óseos.

- 20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para suministrar una composición hemostática de acuerdo con la invención a un lugar objetivo en el cuerpo de un paciente, consistiendo dicho método en suministrar una composición hemostática producida mediante el proceso de acuerdo con la presente invención al lugar objetivo. Aunque la composición seca también se puede aplicar directamente en el lugar objetivo (y, opcionalmente, ponerla en contacto con un diluyente en el lugar objetivo, en caso necesario), es preferible poner en contacto la composición hemostática seca con un diluyente farmacéuticamente aceptable antes de la administración en el lugar objetivo, para obtener una composición hemostática de acuerdo con la presente invención en forma de pasta.

- 25 En este método se puede aplicar un kit para preparar una pasta fluida de gelatina reticulada para el tratamiento de una lesión seleccionada entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado y/o tejido sangrante, incluyendo dicho kit

- 30 a) una composición hemostática seca que incluye gelatina reticulada en forma particulada para ser reconstituida en una pasta fluida que contiene entre un 15,0 y un 19,5% (p/p) de gelatina reticulada (= el peso de la gelatina seca con respecto al peso de la composición final), preferentemente entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), de forma particularmente preferente entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), de gelatina reticulada, y
- 35 b) un diluyente farmacéuticamente aceptable para la reconstitución de la composición hemostática, comprendiendo la composición o el diluyente el potenciador de extrusión albúmina en una cantidad que conduce a una concentración de albúmina en la pasta reconstituida entre un 0,5 y un 5,0% (p/p) (= peso de potenciador de extrusión por peso de composición final), preferentemente entre un 1,0 y un 5,0% (p/p), preferiblemente entre un 2,0 y un 4,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 1,5 y un 40 5,0% (p/p), de forma particularmente preferente aproximadamente un 1,5% (p/p).

- 45 Otro componente preferente de dicho kit (específicamente si el kit incluye la composición hemostática en forma seca) es un diluyente para la reconstitución (= medio de rehidratación) de la composición hemostática. Otros componentes del kit pueden ser medios de administración, como jeringuillas, catéteres, pinceles, etc. (si las composiciones no se suministran ya en el medio de administración) u otros componentes necesarios para la práctica (quirúrgica) médica, como agujas o catéteres de repuesto, viales adicionales u otros medios de cubrimiento de heridas. Preferentemente, el kit de acuerdo con la presente invención comprende una jeringuilla que aloja la composición hemostática seca y estable y una jeringuilla que contiene el diluyente (o prevista para extraer el diluyente de otro recipiente de diluyente).

- 50 En una realización preferente, el diluyente farmacéuticamente aceptable se suministra en un recipiente independiente. Éste puede consistir preferiblemente en una jeringuilla. El diluyente en la jeringuilla se puede aplicar fácilmente al recipiente final para la reconstitución de las composiciones hemostáticas de acuerdo con la presente invención. Si el recipiente final es también una jeringuilla, las dos jeringuillas se pueden disponer juntas en un envase. Por consiguiente, es preferible suministrar las composiciones hemostáticas de acuerdo con la presente invención en una jeringuilla que está suplementada con una jeringuilla de diluyente con un 55 diluyente farmacéuticamente aceptable para reconstituir dicha composición hemostática seca y estable.



De acuerdo con una realización preferente, el recipiente final contiene además una cantidad de un estabilizador eficaz para inhibir la modificación del polímero al exponerlo a la radiación de esterilización, preferentemente ácido ascórbico, ascorbato de sodio, otras sales de ácido ascórbico, o un antioxidante.

- 5 Con dicho diluyente farmacéuticamente aceptable se puede suministrar una forma lista para el uso de la presente composición hemostática. que se puede aplicar después directamente al paciente. Por tanto, también se proporciona un método para suministrar una forma lista para el uso de una composición hemostática de acuerdo con la presente invención, donde la composición hemostática se suministra en una primera jeringuilla y un diluyente para reconstitución se suministra en una segunda jeringuilla, la primera y la segunda jeringuilla están conectadas entre sí, y el fluido se introduce en la primera jeringuilla para producir una forma fluida de la composición hemostática; y opcionalmente la forma fluida de la composición hemostática se devuelve a la segunda jeringuilla al menos una vez. Preferentemente, las preparaciones listas para el uso se presentan o suministran como hidrogeles. En principio, en la técnica se conocen productos de este tipo, pero en un formato diferente. Por consiguiente, un método para suministrar una forma lista para el uso de una composición hemostática de acuerdo con la presente invención, donde la composición hemostática se suministra en una primera jeringuilla y un diluyente para reconstitución se suministra en una segunda jeringuilla, la primera y la segunda jeringuilla están conectadas entre sí, y el diluyente se introduce en la primera jeringuilla para producir una forma fluida de la composición hemostática; y opcionalmente la forma fluida de la composición hemostática se devuelve a la segunda jeringuilla al menos una vez, es una realización preferente de la presente invención. Este proceso (también designado como "arrastré") proporciona una forma adecuada lista para el uso de las composiciones de acuerdo con la presente invención que además se puede preparar fácil y eficientemente en poco tiempo, por ejemplo en situaciones de emergencia durante cirugías. La forma fluida de la composición hemostática proporcionada por dicho método es específicamente adecuada para ser utilizada en el tratamiento de una lesión seleccionada entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado, tejido sangrante y/o defectos óseos.
- 20 Por motivos de estabilidad, los productos de este tipo (así como los productos de acuerdo con la presente invención) se suministran normalmente en forma seca en un recipiente final y se preparan en la forma lista para el uso (que normalmente es la forma de un (hidro)gel, una suspensión o una solución) inmediatamente antes de su uso, para lo que se requiere la adición de un diluyente farmacéuticamente aceptable (= medio de rehidratación).
- 25 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para proporcionar una forma lista para el uso de una composición hemostática de acuerdo con la presente invención, donde la composición hemostática se suministra en una primera jeringuilla y un diluyente para reconstitución se suministra en una segunda jeringuilla, la primera y la segunda jeringuilla están conectadas entre sí, y el fluido se introduce en la primera jeringuilla para producir una forma fluida de la composición hemostática; y opcionalmente la forma fluida de la composición hemostática se devuelve a la segunda jeringuilla al menos una vez.
- 30
- 35

Preferentemente, la forma fluida de la composición hemostática de la presente invención contiene más de un 50% (p/p) de partículas con un tamaño de 100 a 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente más de un 80% (p/p) de partículas con un tamaño de 100 a 1.000  $\mu\text{m}$ .

- 40 Una vez aplicado en una herida, el polímero reticulado hemostático biocompatible de acuerdo con la presente invención forma una matriz eficiente que puede formar una barrera para el flujo sanguíneo. Específicamente, las propiedades de hinchamiento del polímero hemostático pueden convertirlo en una barrera mecánica eficaz contra procesos de hemorragia y hemorragias reiteradas.

- 45 La presente composición puede contener adicionalmente un componente polimérico hidrófilo (también denominado "componente hidrófilo reactivo" o "reticulante (polimérico) hidrófilo"), que además aumenta las propiedades adhesivas de la presente composición. Este componente polimérico hidrófilo de la composición hemostática según la presente invención actúa como un reticulante hidrófilo que puede reaccionar con sus grupos reactivos una vez que la composición hemostática ha sido aplicada a un paciente (por ejemplo en una herida de un paciente o en otro lugar en el que el paciente necesite una actividad hemostática). Por tanto, para la presente invención es importante que los grupos reactivos del componente polimérico hidrófilo sean reactivos después de ser aplicados al paciente. Por ello es necesario producir la composición hemostática de la presente invención de modo que los grupos reactivos del componente polimérico que deberían reaccionar una vez aplicados a una herida sean retenidos durante el proceso de producción.
- 50

- 55 En el caso de los reticulantes poliméricos hidrófilos cuyos grupos reactivos son hidrolizables es necesario evitar el contacto prematuro con agua o líquidos acuosos antes de administrar la composición hemostática al paciente, en especial durante la producción. No obstante, también es posible procesar el componente polimérico hidrófilo durante la producción en un medio acuoso en condiciones de inhibición de las reacciones de los grupos reactivos (por ejemplo, un pH bajo). Si los componentes poliméricos hidrófilos se pueden fundir, los componentes poliméricos hidrófilos fundidos se pueden pulverizar o imprimir sobre la matriz de gelatina reticulada. También es posible mezclar una forma seca (por ejemplo un polvo) del componente polimérico

- hidrófilo con una forma seca de la gelatina reticulada. En caso necesario, después se puede aplicar un aumento de la temperatura para fundir el componente polimérico hidrófilo rociado en la gelatina reticulada con el fin de obtener un revestimiento permanente de la composición hemostática. Alternativamente, estos componentes poliméricos hidrófilos se pueden recoger en disolventes orgánicos inertes (inertes frente a los grupos reactivos de los componentes poliméricos hidrófilos) y aplicar sobre la matriz de gelatina reticulada. Ejemplos de estos disolventes orgánicos son etanol seco, acetona seca o diclorometano seco (que son inertes, por ejemplo, frente a componentes poliméricos hidrófilos, como PEG sustituidos por NHS-éster). Alternativamente también se pueden añadir grupos nucleófilos (por ejemplo PEG-SH).
- En una realización preferente, el componente polimérico hidrófilo es un componente polimérico hidrófilo y es un polímero de óxido de polialquileno, preferentemente un polímero que incluye PEG. Los grupos reactivos de este polímero reactivo son preferentemente grupos electrófilos.
- El componente hidrófilo reactivo puede ser un polímero de óxido de polialquileno multielectrófilo, por ejemplo un PEG multielectrófilo. El componente hidrófilo reactivo puede incluir dos o más grupos electrófilos, preferentemente un PEG que incluye dos o más grupos reactivos seleccionados entre ésteres de succinimidilo ( $-\text{CON}(\text{COCH}_2)_2$ ), aldehídos ( $-\text{CHO}$ ) e isocianatos ( $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ), por ejemplo un componente tal como se da a conocer en el documento WO2008/016983 A.
- Grupos electrófilos preferentes del reticulante polimérico hidrófilo de acuerdo con la presente invención son grupos reactivos frente a los grupos amino, carboxi, tiol e hidroxil proteicos, o mezclas de los mismos.
- Grupos reactivos preferentes específicos para los grupos amino son grupos NHS-éster, grupos imidoéster, grupos aldehído, grupos carboxi en presencia de carbodiimidas, isocianatos o THPP (ácido beta-[tris(hidroximetil)fosfina] propiónico), siendo especialmente preferente el pentaeritritolpoli(etilenglicol)éter tetrasuccinimidil glutarato (= pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato-2-poli-oxoetilenglicol]éter (= a NHS-PEG con peso molecular 10.000).
- Grupos reactivos preferentes específicos para grupos carboxi son grupos amino en presencia de carbodiimidas.
- Grupos reactivos preferentes específicos para grupos tiol son maleimidas o haloacetilos.
- Un grupo reactivo preferente específico para grupos hidroxil es el grupo isocianato.
- Los grupos reactivos del reticulante hidrófilo pueden ser idénticos (homofuncionales) o diferentes (heterofuncionales). El componente polimérico hidrófilo puede tener dos grupos reactivos (homobifuncional o heterobifuncional) o más (homo/heterotrifuncional o más).
- En realizaciones especiales, el material consiste en un polímero sintético que preferiblemente incluye PEG. El polímero puede ser un derivado de PEG que incluye grupos laterales activos adecuados para la reticulación y la adhesión a un tejido.
- Gracias a los grupos reactivos, el polímero reactivo hidrófilo tiene la capacidad de reticular proteínas sanguíneas y también proteínas tisulares de superficie. También es posible reticular la gelatina reticulada.
- El óxido de polialquileno multielectrófilo puede incluir dos o más grupos succinimidilo. El óxido de polialquileno multielectrófilo puede incluir dos o más grupos maleimida.
- Preferentemente, el óxido de polialquileno multielectrófilo es un polietilenglicol o un derivado del mismo.
- En una realización totalmente preferente, el componente polimérico hidrófilo es pentaeritritolpoli(etilenglicol)éter tetrasuccinimidilglutarato (=COH102, también pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato-2-poli-oxo-etilenglicol]éter).
- El componente polimérico hidrófilo es un reticulante hidrófilo. De acuerdo con una realización preferente, este reticulante tiene más de dos grupos reactivos para la reticulación ("brazos"), por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más brazos con grupos reactivos para la reticulación. Por ejemplo, el NHS-PEG-NHS es un reticulante hidrófilo eficaz de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, en algunas realizaciones puede ser preferible un polímero de 4 brazos (por ejemplo p-NP-PEG de 4 brazos) y, en base al mismo razonamiento, para las realizaciones donde resulta beneficiosa una reticulación multirreactiva puede ser preferible un polímero de 8 brazos (por ejemplo NHS-PEG de 8 brazos). Además, el reticulante hidrófilo es un polímero, es decir, una molécula grande (macromolécula) compuesta por unidades estructurales repetidas que normalmente están unidas por enlaces químicos covalentes. El componente polimérico hidrófilo debería tener un peso molecular de al menos 1.000 Da (para que sirva apropiadamente como reticulante en la composición hemostática de acuerdo con la presente invención); preferentemente, el polímero reticulante de

acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de al menos 5.000 Da, en especial al menos 8.000 Da.

- 5 En el caso de algunos reticulantes hidrófilos, la presencia de condiciones de reacción básicas (por ejemplo en el lugar de administración) es preferible o necesaria para el rendimiento funcional (por ejemplo, para una reacción de reticulación más rápida en el lugar de administración). Por ejemplo, en el lugar de administración se pueden aplicar adicionalmente iones carbonato o bicarbonato (por ejemplo como un tampón con un pH de 7,6 o más, preferentemente 8,0 o más, en especial 8,3 o más) (por ejemplo en forma de una solución tampón o como una tela o compresa empapada con dicho tampón), para posibilitar un mejor rendimiento de la composición hemostática de acuerdo con la presente invención o para posibilitar un uso eficiente como material hemostático y/o adherente a la herida.

- 10 La reactividad del componente polimérico hidrófilo (que actúa como reticulante, como ya se ha mencionado) en la composición de acuerdo con la presente invención se mantiene en la composición. Esto significa que los grupos reactivos del reticulante todavía no han reaccionado con la composición hemostática y no se han hidrolizado con agua (o al menos no en una cantidad significativa que tenga consecuencias negativas en la funcionalidad hemostática de las presentes composiciones). Esto se puede lograr combinando la gelatina reticulada con el reticulante hidrófilo de un modo que no conduzca a la reacción de los grupos reactivos del reticulante con el polímero hemostático o con agua. Normalmente, esto incluye la omisión de condiciones acuosas (o humectación), en especial humectación sin la presencia de condiciones ácidas (si los reticulantes no son reactivos bajo condiciones ácidas). Esto posibilita la provisión de materiales hemostáticos reactivos.

- 15 20 Las proporciones preferentes entre al gelatina reticulada y el componente polimérico hidrófilo en la composición hemostática según la presente invención son del 0,1 al 50% (p/p), preferiblemente del 5 al 40% (p/p).

- 25 La composición hemostática de acuerdo con la presente invención puede incluir otros componentes. De acuerdo con realizaciones preferentes, las composiciones hemostáticas de la presente invención pueden incluir adicionalmente una sustancia seleccionada de entre el grupo consistente en antifibrinolíticos, procoagulantes, activadores plaquetarios, antibióticos, vasoconstrictores, factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas óseas y analgésicos.

- 30 La presente invención también se refiere a un recipiente final acabado que contiene la composición hemostática de acuerdo con la presente invención. El recipiente acabado contiene la composición hemostática de acuerdo con la presente invención en una forma estéril, estable en almacenamiento y comercializable. El recipiente final puede ser cualquier recipiente adecuado para alojar (y almacenar) compuestos administrables farmacéuticamente. Es posible utilizar jeringuillas, viales, tubos, etc.; no obstante, el suministro de las composiciones hemostáticas de acuerdo con la presente invención en una jeringuilla es específicamente preferente. Las jeringuillas han sido un medio de administración preferente para composiciones hemostáticas tal como se da a conocer en la técnica anterior también debido a las ventajas de manipulación de las jeringuillas en la práctica médica. En este caso, las composiciones se pueden aplicar preferentemente (después de su reconstitución) a través de agujas específicas de la jeringuilla o a través de catéteres adecuados. Las composiciones hemostáticas reconstituidas (que preferentemente están reconstituidas formando un hidrogel) también se pueden aplicar por otros medios diversos, por ejemplo con una espátula, una brocha, manualmente a presión, o mediante cualquier otra técnica convencional. La administración de la composición hemostática reconstituida a un paciente por medios endoscópicos (laparoscópicos) es específicamente preferente. Normalmente, las composiciones hemostáticas reconstituidas de acuerdo con la presente invención se aplicarán utilizando una jeringuilla o aplicador similar capaz de extrudir la composición reconstituida a través de un orificio, abertura, aguja, tubo u otro paso para formar una perla, capa o porción similar de material. La rotura mecánica de las composiciones se puede llevar a cabo mediante extrusión a través de un orificio en la jeringuilla u otro aplicador, normalmente con un tamaño entre 0,01 mm y 5,0 mm, preferentemente entre 0,5 mm y 2,5 mm. No obstante, preferentemente, la composición hemostática se preparará inicialmente a partir de una forma seca con un tamaño de partícula deseado (que después de la reconstitución, en especial por hidratación, produce subunidades del tamaño requerido (por ejemplo subunidades de hidrogel)) o se romperá parcial o totalmente hasta el tamaño requerido antes de una extrusión final u otro paso de aplicación. Evidentemente, estos componentes mecánicos han de ser proporcionados en forma estéril (por dentro y por fuera) para satisfacer los requisitos de seguridad para uso humano.

- 55 La composición hemostática según la presente invención se aplica preferentemente en forma de pasta a un paciente desde un recipiente tal como se describe en el Ejemplo 1, con una fuerza de extrusión de 40 N o menos, como menos de 30 N o menos de 20 N, preferentemente en el intervalo entre 15 y 30 N.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para proporcionar una composición hemostática lista para el uso que incluye poner en contacto una composición hemostática de acuerdo con la presente invención.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos y figuras, pero sin limitarse a los mismos.

Figura 1: muestra la fuerza de extrusión media de pastas de gelatina reticulada con glutaraldehído que contienen un 17,5% (p/p) de gelatina reticulada con diversas concentraciones de seroalbúmina humana en el componente de trombina (fuerza de extrusión necesaria para empujar producto fuera de la jeringuilla a una velocidad de compresión de 250 mm/min, calculada a una distancia de 35 mm; todos los productos incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente, rearrastré rápido poco antes de la medición de la fuerza de extrusión). El eje X muestra la concentración de seroalbúmina humana en el componente de trombina en [g/l], el eje Y muestra la fuerza de extrusión media en [N].

Figura 2: muestra la consistencia de pastas de gelatina reticulada que contienen un 17,5% (p/p) de gelatina reticulada dependiendo de la concentración de seroalbúmina humana.

Figura 3: muestra la fuerza de extrusión media de pastas de gelatina reticulada con genipín que contienen un 17,5% (p/p) de gelatina con diversas concentraciones de seroalbúmina humana en el componente de trombina. El eje X muestra la concentración de seroalbúmina humana en el componente de trombina en [g/l], el eje Y muestra la fuerza de extrusión media en [N].

Figura 4: muestra la evaluación de la gravedad de la hemorragia después de la aplicación y aproximación del artículo de ensayo.

Figuras 5-8: muestran la eficiencia hemostática en el Modelo de Biopsia con Aguja de Hígado Porcino de diferentes preparaciones. El eje X muestra el tiempo después de la aplicación en [segundos], el eje Y muestra el porcentaje de éxito hemostático (definido como "ausencia de hemorragia" en la Figura 5 y como "ausencia de hemorragia" o "rezumado" en la Figura 6).

Los símbolos en las Figuras 5 y 6 significan:

\_\_\_\_\_ gelatina reticulada con glutaraldehído con 50 g/l de seroalbúmina humana en la solución de trombina (n = 8)

----- gelatina reticulada con glutaraldehído con 75 g/l de seroalbúmina humana en la solución de trombina (n = 8)

Los símbolos en las Figuras 7 y 8 significan:

\_\_\_\_\_ ≈ 17,5% (p/p) gelatina reticulada con glutaraldehído

---- ≈ 14,5% (p/p) gelatina reticulada con glutaraldehído

..... ≈ 17,5% /p/p) gelatina reticulada con glutaraldehído más 2,5% PEG10.000 en solución de trombina

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Determinación de la Fuerza de Extrusión (FE)

Para medir las fuerzas de extrusión necesarias para extrudir el producto desde una jeringuilla se utilizó una máquina de ensayo Instron modelo 5544 equipada con una célula de carga que funciona con una velocidad de paso de 250 mm/min. Las fuerzas de extrusión necesarias se midieron durante el desplazamiento de paso completo (34 mm de desviación), que corresponde a la distancia que se mueve el émbolo de jeringuilla para extrudir prácticamente todo el producto de la jeringuilla. A partir de estas fuerzas se calcularon las fuerzas de extrusión medias de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Energía total (mJ)}}{\text{Desviación máxima (mm)}} = \text{Fuerza media (N)}$$

Las muestras para este ensayo se prepararon de la siguiente manera: una jeringuilla estándar de 5 ml (con un cuerpo cilíndrico de diámetro interior 12,2 mm) con un sistema *luer lock* macho (el diámetro del lumen de boquilla interior en el que se une el adaptador mide 2,54 mm) se rellena con 0,704 g de masa seca de la muestra sólida (aproximadamente 0,8 g teniendo en cuenta la humedad residual de aproximadamente un 12%). Como diluyente se utilizaron 3,2 ml de una solución de trombina que contenía 500 UI/ml de trombina en cloruro de calcio 40 mM y 0, 5, 15, 25, 50 o 75 mg/ml de seroalbúmina humana. El diluyente y el componente sólido se mezclaron conectando la jeringuilla que contenía el diluyente (una jeringuilla de 5 ml estándar con un sistema *luer lock* hembra) y la jeringuilla que contenía el componente seco, y empujando el contenido adelante y atrás al menos 10 veces (esta técnica de mezclado se denomina "arrastré"). Después, la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la medición. Después de la incubación, cada muestra fue sometida a "arrastré" dos veces y la jeringuilla que contenía el producto (la jeringuilla que previamente contenía el componente seco tal como se ha mencionado más arriba) se conectó

con un aplicador maleable (sistema conector *luer* hembra, diámetro interior del tubo de 2,29 mm que tiene dos alambres y una longitud total de 141,5 mm). La jeringuilla se montó en el aplicador, se dispuso en el sistema Instron y se llevó a cabo el ensayo.

- 5 Las jeringuillas y el aplicador eran comerciales como partes del producto Floseal Hemostatic Matrix de Baxter.

Los resultados de una gelatina reticulada con glutaraldehído como en Floseal están representados en la Figura 1 y los de una gelatina reticulada con genipín tal como se describe más abajo están representados en la Figura 3 y también se muestran como la Tabla 1 y la Tabla 2 correspondientes.

- 10 La consistencia de pastas de gelatina reticulada que contienen un 17,5% (p/p) de gelatina reticulada dependiendo de la concentración de albúmina se muestran en la Figura 2 (con 0, 25, 50 y 75 g/l de seroalbúmina humana provista en el componente de trombina).

**Tabla 1**

c(albúmina) [g/l] en el componente de trombina	fuerza de extrusión	desv. estándar
0	40	2,4
5	38	1,5
15	30	2,6
25	25	2,2
50	19	1,5
60	19	1,0

**Tabla 2**

c(albúmina) g/l en el componente de trombina	fuerza de extrusión	desv. estándar
0	54	1,9
15	29	3,6
50	17	2,2

15

*Preparación de Gelatina Reticulada con Genipín:* un colágeno derivado de bovino se procesó mediante tratamiento alcalino y a continuación se lavó con agua de proceso desionizada (APD) para eliminar sales residuales. La gelatina se extrajo por tratamiento térmico y se secó en láminas. Las láminas se molieron para obtener un polvo con el fin de procesarlo utilizando genipín como agente reticulante.

- 20 A una solución de 20 l de una solución de genipín 10 mM en APD se le añadió 1 kg de gránulos de gelatina. La reacción se llevó a cabo con pH neutro (7,2) en un tanque con cubierta de temperatura controlada a 23°C. La mezcla se llevó a cabo durante 6 horas y la solución se drenó, reteniendo los sólidos dentro de unamalla, y se lavó a fondo con APD para eliminar el genipín residual. El material se resuspendió en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% durante 20 horas. El material se lavó a fondo con APD para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los sólidos se
- 25 secaron previamente sobre papel de filtro bajo vacío y después se secaron en horno durante 2,5 días. La matriz seca se molió para obtener un polvo, que se introdujo en jeringuillas de plástico individuales antes de exponerlo a radiación gamma.

## **Ejemplo 2: Determinación de la Eficiencia Hemostática**

### *Materiales y Métodos:*

- 30 Modelo Animal

- Para este modelo se lleva a cabo una laparotomía media, seguida de electrocauterización para detener la hemorragia de la incisión quirúrgica. El hígado queda expuesto y se aísla un lóbulo. Después se utiliza una biopsia con aguja de 10 mm de diámetro para crear una serie de 2 lesiones de espesor no completo con una profundidad de aproximadamente 5 mm, con el tejido de núcleo retirado. Se lleva a cabo una evaluación
- 35 previa al tratamiento de la lesión, que incluye la recogida de la sangre que fluye de cada lesión durante 10 segundos con una gasa previamente pesada.

- Los artículos de ensayo se aleatorizan y se presentan al cirujano, que es ciego con respecto al tratamiento de las muestras. Aproximadamente 1,0 ml del artículo de ensayo asignado se aplica tópicamente a una lesión. Para ayudar a aproximar los artículos de ensayo a las lesiones designadas se utiliza una gasa humedecida con solución salina, y se pone en marcha el cronómetro. La gasa de aproximación humedecida con solución salina se retira después de 30 segundos.
- 40

El grado de hemorragia se evalúa a los 30, 60, 90, 120, 300 y 600 segundos después de la aplicación de los artículos de ensayo a las lesiones designadas conforme a las representaciones de la Figura 3 (calificación de la hemorragia: 0: sin hemorragia (producto saturado con sangre); 1: rezumado (sangre fuera del producto pero sin gotas de sangre); 2: muy suave (gotas de sangre sobre el producto); 3: suave (flujo de gotas de sangre); 4: moderada (flujo de una pequeña cantidad de chorros de sangre); 5: grave (flujo de una gran cantidad de chorros de sangre)).

El producto saturado con sangre pero sin hemorragia activa se califica como "0" (cero). Para irrigar los artículos de ensayo en exceso apartados de las lesiones después de los 300 segundos de evaluación se utiliza solución salina. El procedimiento se repite y se lleva a cabo en múltiples lóbulos hepáticos. Un solo cirujano crea, trata y realiza las evaluaciones de observación.

#### Síntesis de Artículos de Ensayo

Los artículos de ensayo para la evaluación *in vivo* en el modelo de hígado porcino se realizaron preparando pastas de gelatina reticulada (en concentraciones de un 14,5% y un 17,5% con 25 o 50 g/l de seroalbúmina humana en la solución de trombina (con o sin un 2,5% de PEG adicional)).

Los resultados están representados en las Figuras 5 a 8, mostrando un rendimiento mejorado con un 17,5% de gelatina y menos eficacia en presencia de plastificantes (PEG).

#### Ejemplo 3:

Se formularon muestras de gelatina de acuerdo con el prospecto de Floseal con un par de excepciones clave. En primer lugar, se utilizó cloruro de sodio en lugar de cloruro de calcio y la gelatina se formuló con un 125% de sólidos en lugar de un 100%. Las formulaciones de gelatina/trombina se dejaron reposar durante 25 minutos y después se desechó 1 ml de la preparación. El otro ml de material se aplicó al sistema de hemostasia tópica (SHT). El aparato de SHT se cebó previamente con plasma pobre en plaquetas.

El SHT es un aparato diseñado para simular una herida sangrante. La herida artificial es un orificio cilíndrico en un sustrato de silicona. La superficie del cilindro de silicona estaba revestida con una capa de fibrinógeno. Una bomba de jeringuilla expulsaba el fluido de coagulación (sangre total, plasma, etc.), en este caso plasma pobre en plaquetas, mientras que se registraba la contrapresión. En este experimento, el plasma fluía a una velocidad fija de 0,25 ml/min a través de un orificio pequeño en el centro del fondo de la herida cilíndrica. El plasma en exceso se absorbió con gas inmediatamente antes de la aplicación de la matriz hemostática. Cuando el plasma continuó fluyendo, se aplicó 1 ml de la matriz hemostática a la herida cilíndrica. Ésta se cubrió inmediatamente con gasa húmeda y se aplicó una presión fija. Después de 30 segundos se retiró el peso y el plasma continuó fluyendo durante 8-10 minutos, momento en el que el flujo se interrumpió y el coágulo se retiró a una cámara de humedad, donde permaneció durante más de 2 horas. Al final de las dos horas, el coágulo se montó sobre un Vibratome a 8°C, donde se seccionaron del coágulo placas con un espesor de aproximadamente 500 µm. Estas secciones se sumergieron en un tampón de PBS. Las placas se guardaron en un refrigerador a 5°C mientras no fueron utilizadas. La placa se colocó sobre un cubreobjetos y se tomaron imágenes con un microscopio confocal Nikon A1R que ejecuta el *software* NIS-Elements Advanced Research v3.22.00 Build 710. Para reunir micrografías se utilizó un objetivo Plan Fluor 10x con luz de excitación láser a 488 nm y una ventana de recogida de emisión de 500-550 nm. Simultáneamente se recogió una imagen de luz transmitida utilizando un detector de luz transmitida. Con estos parámetros de toma de imágenes se utilizó una puntada automática realizada por el *software* para generar mapas macroscópicos de muestras. Las áreas más pequeñas de las muestras también se caracterizaron recogiendo pilas z de imágenes 3D con un espesor de placa óptica de 5,125 µm. El mapa confocal compuesto se utilizó para identificar los gránulos de gelatina localizados en la superficie y que habían sido seccionados. Esto era importante para posicionar la medición de elasticidad en el microscopio de fuerzas atómicas (MFA). La placa de coágulo se montó en un MFA Veeco Multimode. El Multimode se equipó con un controlador Nanoscope V y un escáner piezoeléctrico JV. Las mediciones de fuerza se realizaron con una pluma de MFA Novascan que soportaba una esfera de poliestireno de 4,5 µm. La constante de la fuerza de la pluma se determinó en 0,779 N/m mediante el método de sintonía térmica. La pluma se posicionó por encima del centro del gránulo de gelatina, y después se realizó una serie de 16 x 16 mediciones de fuerza. Cada curva de fuerza implicaba mover el gránulo de gelatina hasta ponerlo en contacto con la esfera de poliestireno, y continuar moviendo el gránulo hacia arriba hasta que la desviación de la pluma alcanzó un valor de activación prefijado de 2 voltios, momento en el que la gelatina se retrajo una distancia de 1,00 micras del lugar de activación.

#### Discusión

Los datos de fluorescencia muestran que la gelatina reticulada con glutaraldehído no está reticulada uniformemente. En su lugar, la densidad de reticulación parece mayor alrededor de los bordes de los gránulos, estando la parte central del gránulo considerablemente menos reticulada que los bordes. Por el contrario, la gelatina reticulada con genipín parece reticulada uniformemente (homogéneamente) por todo el

- gránulo. No hay ningún efecto de borde esencial en la intensidad de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia de los materiales reticulados con genipín y glutaraldehído no se puede comparar directamente, debido a las diferencias de fluorescencia potenciales atribuidas a los propios reticulantes. Sin embargo, la medición del módulo elástico medido por MFA muestra que la gelatina reticulada con genipín es más rígida que la gelatina reticulada con glutaraldehído, que parece ser más blanda (más flexible).
- 5

# Reivindicaciones

1. Composición hemostática que comprende gelatina reticulada en forma particulada adecuada para su uso en la hemostasia, estando presente la composición en forma de una pasta que contiene entre un 15,0 y un 19,5% (p/p) de gelatina reticulada, preferentemente entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), de forma particularmente preferente entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), y comprendiendo la composición un potenciador de extrusión, siendo el potenciador de extrusión albúmina en una cantidad entre un 0,5 y un 5,0% (p/p).
2. Composición hemostática según la reivindicación 1, caracterizada porque el potenciador de extrusión es albúmina en una cantidad entre un 1,0 y un 5,0% (p/p), preferentemente entre un 2,0 y un 4,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 1,5 y un 5,0% (p/p), en particular aproximadamente un 1,5% (p/p).
3. Composición hemostática según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la gelatina reticulada es gelatina reticulada con glutaraldehído o gelatina reticulada con genipín.
4. Composición hemostática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la gelatina reticulada es gelatina de tipo B.
5. Composición hemostática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la gelatina reticulada está presente como un material granular.
6. Composición hemostática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la gelatina reticulada tiene un tamaño de partícula de 100 a 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 200 a 800  $\mu\text{m}$ , de forma totalmente preferente de 350 a 550  $\mu\text{m}$ .
7. Composición hemostática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque contiene trombina, preferentemente de 10 a 1.000 U.I. de trombina/ml, en especial de 250 a 700 U.I. de trombina/ml.
8. Composición hemostática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de una lesión seleccionada entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado, tejido sangrante y/o defectos óseos.
9. Kit para preparar una pasta fluida de gelatina reticulada para el tratamiento de una lesión seleccionada entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado y/o tejido sangrante, que comprende
  - a) una composición hemostática seca que incluye gelatina reticulada en forma particulada para ser reconstituida en una pasta fluida que contiene entre un 15,0 y un 19,5% (p/p) de gelatina reticulada, preferentemente entre un 16,0 y un 19,5% (p/p), entre un 16,5 y un 19,5% (p/p), entre un 17,0 y un 18,5% (p/p) o entre un 17,5 y un 18,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 16,5 y un 19,0% (p/p) o entre un 16,8 y un 17,8% (p/p), de forma particularmente preferente entre un 16,5 y un 17,5% (p/p), y
  - b) un diluyente farmacéuticamente aceptable para la reconstitución de la composición hemostática, comprendiendo la composición o el diluyente albúmina en una cantidad que conduce a una concentración de albúmina en la pasta reconstituida entre un 0,5 y un 5,0% (p/p), preferentemente entre un 1,0 y un 5,0% (p/p), preferiblemente entre un 2,0 y un 4,5% (p/p), de forma especialmente preferente entre un 1,5 y un 5,0% (p/p), de forma particularmente preferente aproximadamente un 1,5% (p/p).
10. Kit según la reivindicación 9, caracterizado porque el diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un tampón o sistema tampón, preferentemente con un pH de 3,0 a 10,0.
11. Kit según la reivindicación 9 o 10, caracterizada porque el diluyente farmacéuticamente aceptable comprende trombina, preferentemente de 10 a 1.000 U.I. de trombina/ml, en especial de 250 a 700 U.I. de trombina/ml.
12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada porque el diluyente farmacéuticamente aceptable contiene una sustancia seleccionada entre el grupo consistente en NaCl, CaCl<sub>2</sub> y acetato de sodio.



- 5
- 13.** Método para proporcionar una forma lista para el uso de una composición hemostática según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la composición hemostática se suministra en una primera jeringuilla y un diluyente para reconstitución se suministra en una segunda jeringuilla, la primera y la segunda jeringuilla están conectadas entre sí, y el fluido se introduce en la primera jeringuilla para producir una forma fluida de la composición hemostática; y opcionalmente la forma fluida de la composición hemostática se devuelve a la segunda jeringuilla al menos una vez.
- 14.** Método según la reivindicación 13, caracterizado porque la forma fluida de la composición hemostática contiene partículas de las cuales más de un 50% (p/p) tienen un tamaño de 100 a 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente más de un 80% (p/p) tienen un tamaño de 100 a 1.000  $\mu\text{m}$ .

10

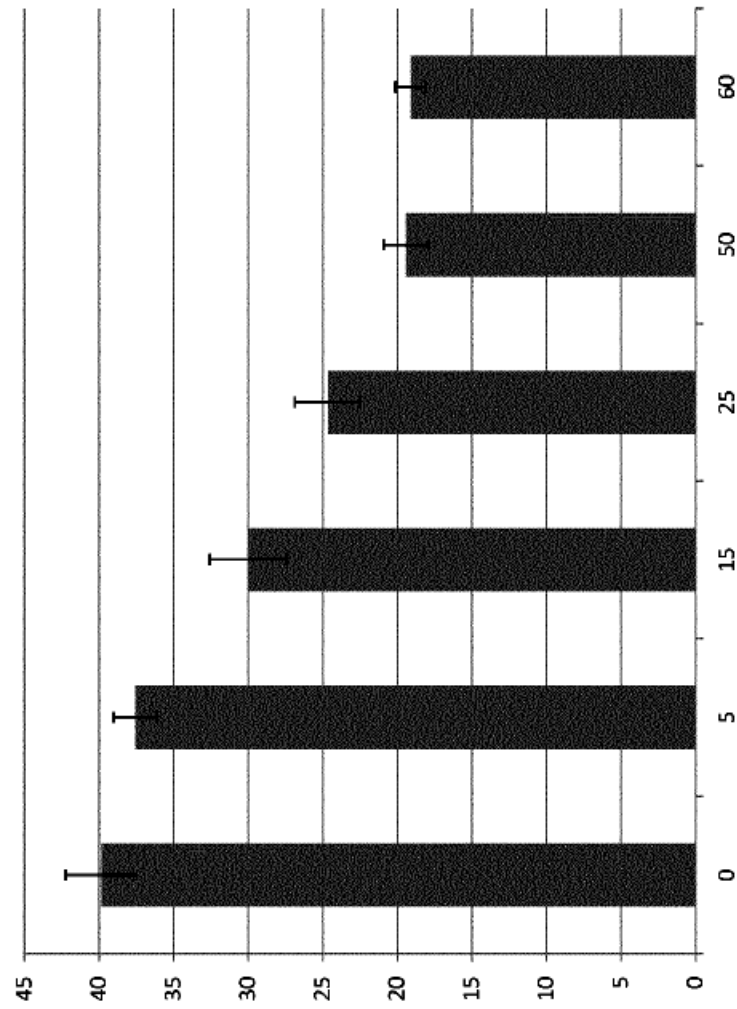


Fig. 1

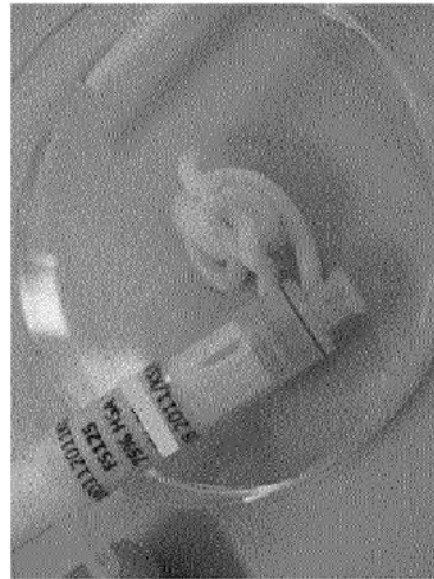


Fig. 2



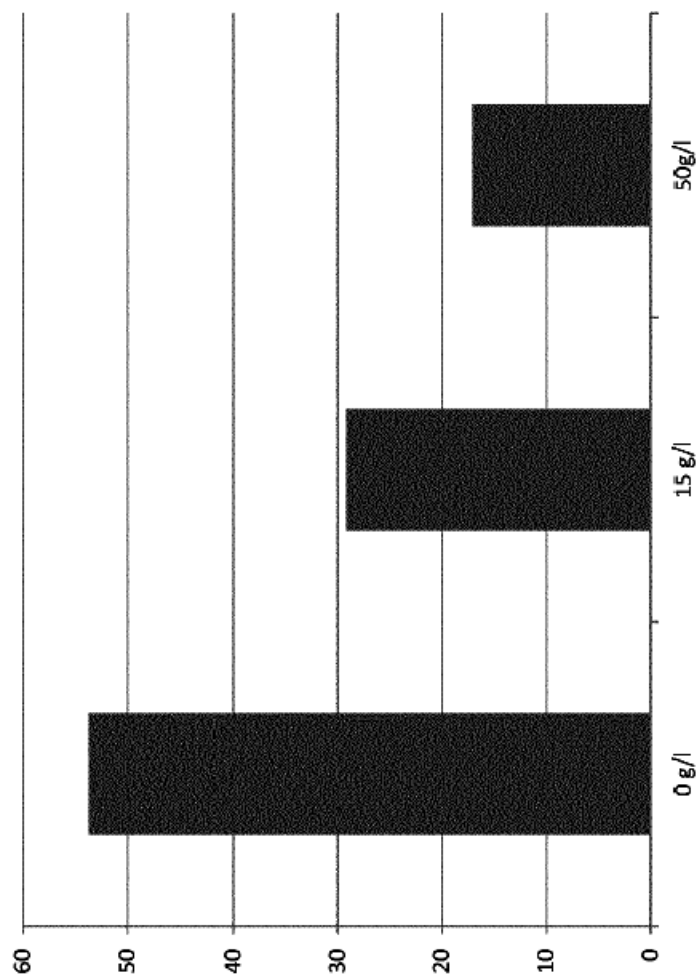


Fig 3

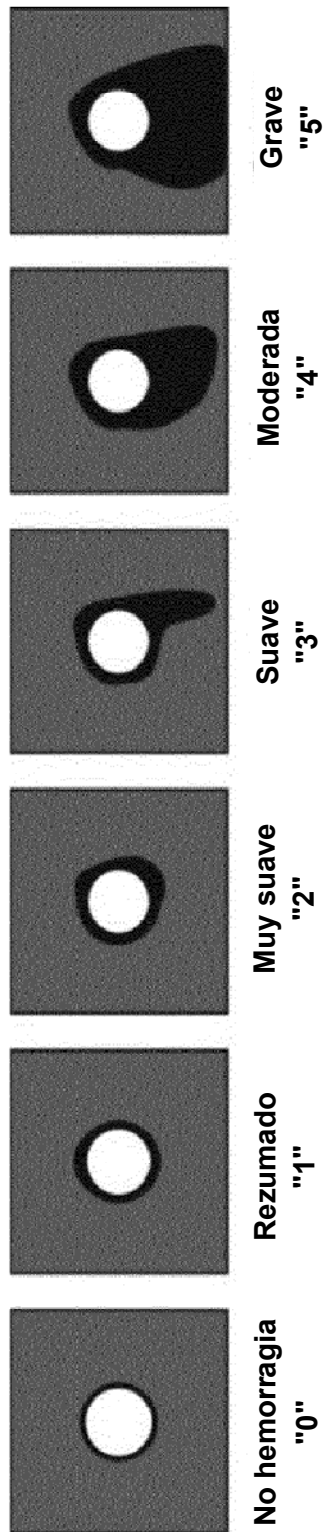


Fig. 4

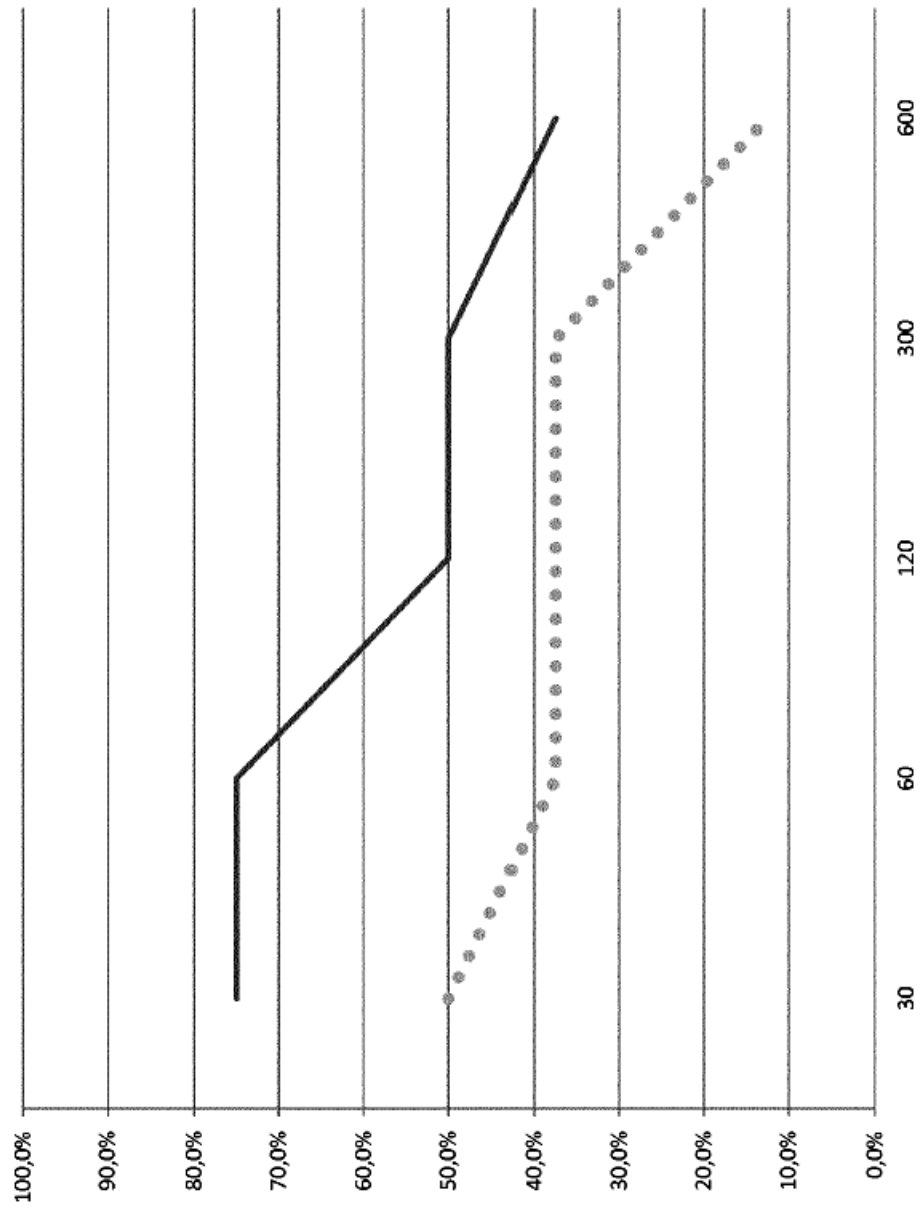


Fig. 5

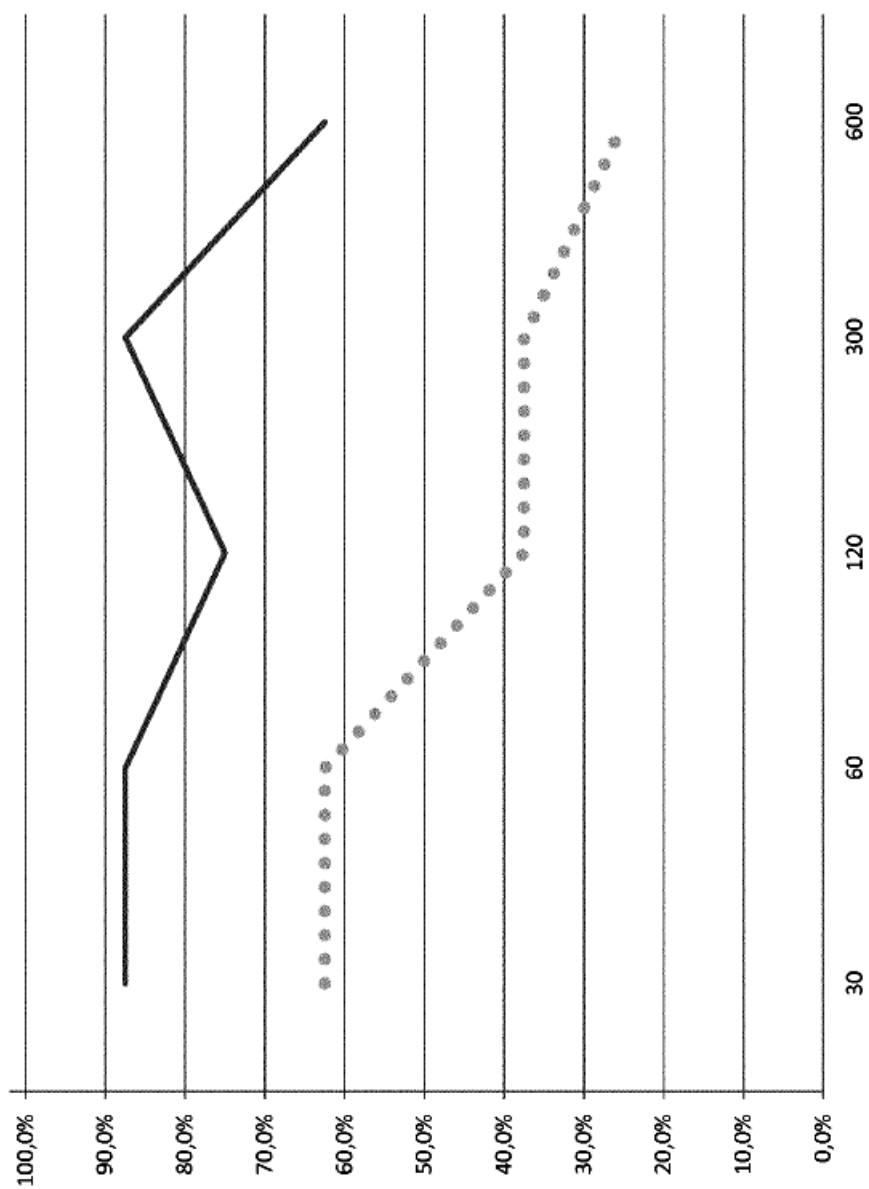


Fig. 6

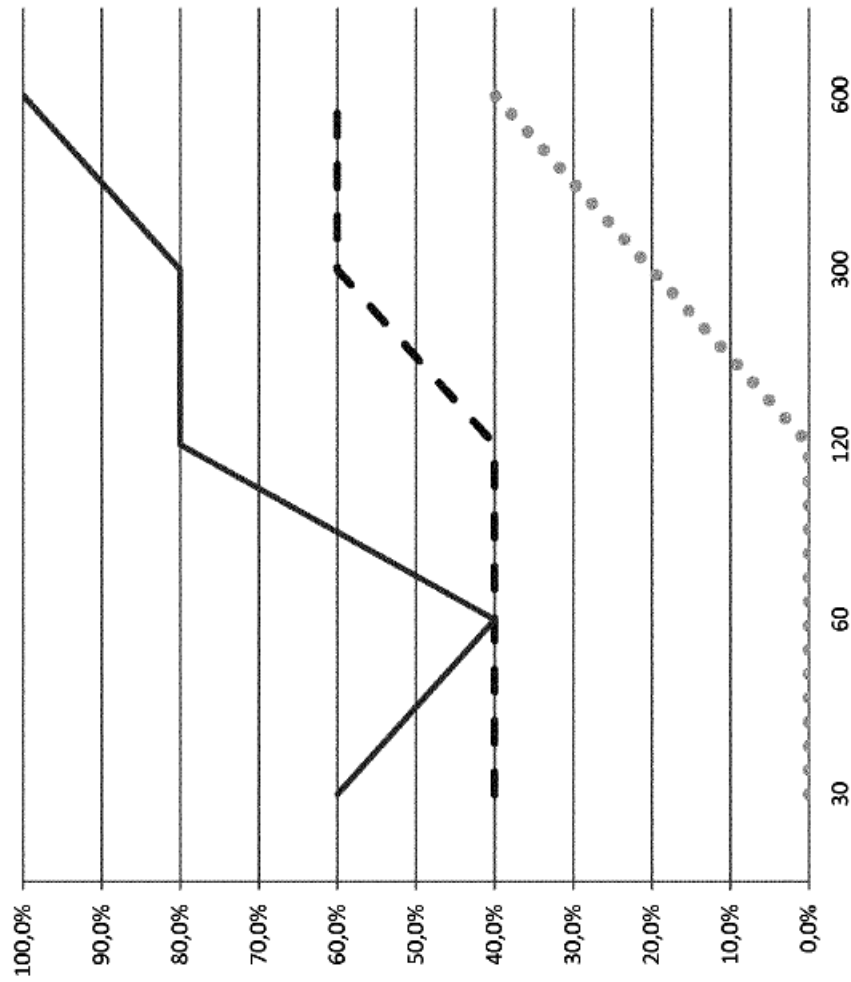


Fig. 7



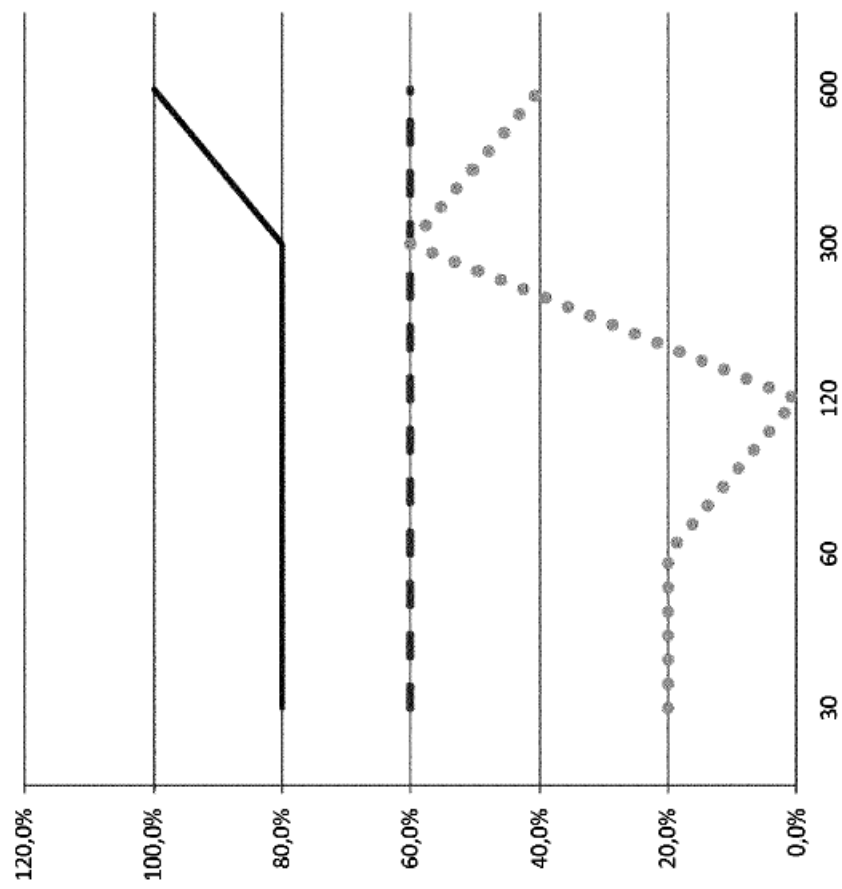


Fig. 8