



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 317 600**

⑮ Int. Cl.:

A61F 2/02 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **07005206 .3**

⑯ Fecha de presentación : **21.06.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1803417**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

⑭ Título: **Composiciones hemostáticas secas y procedimientos para su preparación.**

⑩ Prioridad: **17.07.2001 US 908464**

⑬ Titular/es: **Baxter International Inc.**
One Baxter Parkway
Deerfield, Illinois 60015, US
Baxter Healthcare S.A.

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

⑭ Inventor/es: **Osawa, Edward, A.;**
Reich, Cary, J. y
Qian, Zhen

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

⑭ Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 317 600 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 secas y procedimientos para su preparación.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

En general, la presente invención se refiere a composiciones de colágeno y derivadas de colágeno y a métodos para su preparación. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir una gelatina reticulada seca u otra composición de colágeno o derivada de colágeno que sea capaz de absorber el agua a una mayor velocidad.

Fusion Medical Technologies, Inc., cessionario de la presente solicitud, produce una composición hemostática con el nombre comercial FloSeal®. Se dispone del producto FloSeal® en un envase que comprende dos jeringuillas. Una primera jeringuilla contiene gránulos de gelatina bovina reticulada que están prehidratados con una solución tampón. El hidrogel de gelatina contiene aproximadamente un 85% (peso/peso) de agua y se encuentra en forma de un hidrogel fluido. Inmediatamente antes de su utilización en el quirófano, la trombina en solución salina acuosa se mezcla con el hidrogel de gelatina. La trombina se prepara en una solución salina y es aspirada en una segunda jeringuilla, y se conectan las jeringuillas una con otra, lo que permite mezclar la trombina y la gelatina.

20 Se ha descubierto que la mezcla resultante de los gránulos de hidrogel de gelatina y de trombina constituyen un sellador hemostático muy eficaz cuando se aplica en un punto de sangrado. Típicamente, el sellador se aplicará al punto de sangrado con la jeringuilla en la cual ha sido mezclado. La sangre se filtra a través del lecho de gránulos de hidrogel resultante y la trombina reacciona con el fibrinógeno de la sangre para formar un coágulo de fibrina alrededor 25 de la gelatina sellando el punto de sangrado.

Aunque sea muy eficaz, el presente producto FloSeal® tiene una vida útil de almacenamiento limitada. Se piensa que la estabilidad de la gelatina es reducida debido a la hidrólisis del hidrogel envasado. Para limitar la posible degradación hidrolítica, el producto FloSeal® se transporta generalmente en un envase protegido frente a la temperatura.

30 Por estas razones, sería deseable proporcionar composiciones hemostáticas selladoras mejoradas del tipo que combinan un colágeno, gelatina u otro hidrogel derivado de colágeno con una solución acuosa que contiene trombina. En particular, sería deseable proporcionar estas composiciones en una forma que fuera resistente a la degradación hidrolítica y que, por tanto, tuviera una vida útil de almacenamiento más larga. Sería particularmente deseable proporcionar 35 composiciones mejoradas que tuvieran tanto una actividad hemostática comparable con el presente producto FloSeal® como una vida útil de almacenamiento mayor. Estas composiciones serían mucho más ventajosas si se pudieran rehidratar rápidamente para su posterior uso, típicamente para que pudieran ser expulsadas por medio de una jeringuilla. Al menos algunos de estos objetivos serán satisfechos por las invenciones descritas a continuación.

40 Descripción del estado de la técnica anterior

El producto FloSeal® del que dispone Fusion Medical Technologies, Inc. viene descrito en Hood y col., *Efficacy of Topical Hemostat FloSeal™ in Vascular Surgery*, Extracto financiado por Fusion Medical Technologies, Inc., que fue presentado públicamente en Septiembre 1999. Las patentes que cubren el producto FloSeal® incluyen las Patentes de Estados Unidos Nº 6.063.061 y 6.066.325. Se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.908.054 un sistema de doble jeringuilla adecuado para mezclar y suministrar un componente de colágeno, gelatina o derivado de colágeno y un componente de trombina del producto FloSeal™.

Breve sumario de la invención

50 La presente invención proporciona composiciones selladoras hemostáticas mejoradas, métodos para preparar estas composiciones mejoradas y kits que comprenden las composiciones mejoradas. Los métodos y composiciones serán particularmente útiles para proporcionar hemostasis en puntos de sangrado, incluidos aquellos quirúrgicos, traumáticos y similares. Un uso ilustrativo de las composiciones puede ser el sellado de la zona tisular por encima de una penetración en un vaso sanguíneo creada para la cateterización vascular.

Las composiciones comprenden un polvo de gelatina reticulada seca que ha sido preparado para rehidratarse rápidamente. El polvo de gelatina comprende preferentemente partículas relativamente grandes, también denominadas fragmentos o subunidades, tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.063.061 y 6.066.325. Un 55 tamaño de partícula preferente se encontrará en el rango de 150 μm a 750 μm , pero tamaños de partícula fuera de este rango preferente pueden encontrar su utilidad en muchas circunstancias. Las composiciones secas presentarán también un “esponjamiento de equilibrio” notable al exponerse a un medio de rehidratación acuoso. Preferentemente, el esponjamiento se situará entre el 400% y el 1.000%, pero puede caer fuera de este rango, tal como se expone en las 60 patentes anteriormente mencionadas. El “esponjamiento de equilibrio” puede determinarse sustrayendo el peso seco del polvo de hidrogel de gelatina de su peso cuando está totalmente hidratado y, por tanto, completamente esponjado. Entonces se divide la diferencia entre el peso seco y se multiplica por 100 para dar la medida del esponjamiento. El peso seco debe medirse después de la exposición del material a una temperatura elevada durante el tiempo suficiente 65 para eliminar sustancialmente toda humedad residual, por ejemplo, dos horas a 120°C. La hidratación de equilibrio

ES 2 317 600 T3

del material puede lograrse mediante la inmersión del material seco en un medio de rehidratación adecuado, tal como una solución salina acuosa, durante un período de tiempo suficiente para que el contenido en agua sea constante, típicamente durante 18 a 24 horas a temperatura ambiente.

- 5 Los polvos de gelatina reticulada seca de la presente invención tendrán normalmente una humedad residual, pero estarán lo suficientemente secos para conseguir la estabilidad deseada y una más larga vida útil de almacenamiento. Típicamente, las composiciones secas tendrán un contenido en humedad por debajo del 20% en peso (peso/peso) o inferior, preferentemente un contenido en humedad situado en el rango de un 5% en peso a un 15% en peso. Para mantener la sequedad, las composiciones estarán envasadas típicamente de forma adecuada para impedir la incursión 10 de la humedad, tal como se describe de forma más detallada con relación a los kits de la presente invención.

En un aspecto particular de la presente invención, las composiciones comprenderán polvos de gelatina reticulada que tienen un contenido en humedad del 20% (peso/peso) o inferior, en las cuales el polvo ha sido reticulado en presencia de un adyuvante de rehidratación para que el polvo tenga una velocidad de rehidratación acuosa al menos un 15% más alta que la velocidad de rehidratación de un polvo similar preparado sin el adyuvante de rehidratación. La "velocidad de rehidratación" se define aquí como la cantidad de solución acuosa, típicamente salina al 0,9% (peso/peso), que es absorbida por un gramo de polvo (base de peso seco) en treinta segundos, expresada en gm/gm. Las técnicas 20 particulares para medir esta velocidad están descritas en la Sección Experimental, a continuación. Las composiciones preferente de la presente invención tendrán una velocidad de rehidratación de al menos 3 gm/gm, preferentemente de al menos 3,5 gm/gm y a menudo de 3,75 gm/gm o mayor. Las velocidades de rehidratación de polvos similares preparados sin adyuvantes de rehidratación se encuentran típicamente por debajo del tres por ciento y el aumento porcentual de la velocidad de rehidratación será normalmente del 5% como mínimo, siendo preferentemente del 10% como mínimo y en especial de al menos el 25% o mayor.

- 25 Los polvos de gelatina reticulada seca de la presente invención que tienen una mayor velocidad de rehidratación se obtienen preferentemente preparando los polvos en presencia de ciertos adyuvantes de rehidratación. Estos adyuvantes de rehidratación estarán presentes durante la preparación de los polvos, pero serán eliminados de los productos finales. Por ejemplo, los adyuvantes de rehidratación que están presentes en aproximadamente un 20% del contenido total en 30 sólidos, serán reducidos típicamente hasta por debajo de un 1% en el producto final, a menudo por debajo del 0,5% en peso. Ejemplos de adyuvantes de rehidratación incluyen polietilenoglicol (PEG), con un peso molecular preferente de aproximadamente 1.000; polivinilpirrolidona (PVP), con un peso molecular promedio preferente de aproximadamente 50.000; y dextrano, con un peso molecular promedio típico de aproximadamente 40.000. Es preferente emplear al menos dos de estos adyuvantes de rehidratación cuando se preparan las composiciones de la presente invención, y en particular los tres.

35 Así, los métodos de la presente invención comprenden el suministro de una solución acuosa de una gelatina no reticulada combinada con un adyuvante de rehidratación. La gelatina no reticulada estará presente típicamente en solución acuosa al 5% (peso/peso) hasta el 15% (peso/peso) y los adyuvantes de rehidratación estarán presentes típicamente en un 5% hasta un 30% (peso/peso), con respecto al peso de gelatina en solución acuosa. Preferentemente, el adyuvante de rehidratación comprende PEG en un 2,5% hasta un 20% (peso/peso) con respecto al peso de la gelatina, PVP en un 1,25% hasta un 20% (peso/peso) y dextrano en un 1,25% hasta un 20% (peso/peso).

45 La gelatina no reticulada junto con el adyuvante de rehidratación entonces se reticula por cualquier método adecuado para formar el hidrogel. Por ejemplo, las moléculas poliméricas pueden reticularse mediante agentes de reticulación bi- o poli-funcionales que se unen covalentemente a dos o más cadenas de moléculas poliméricas. Ejemplos de agentes de reticulación bifuncionales incluyen aldehídos, epoxi, succinimidas, carbodiimidas, maleimidas, azidas, carbonatos, 50 isocianatos, divinilsulfonas, alcoholes, aminas, imidatos, anhídridos, haluros, silanos, diazoacetato, aziridinas y similares. Alternativamente, la reticulación puede realizarse utilizando oxidantes y demás agentes, tales como periodatos, que activan las cadenas laterales o partes del polímero para que puedan reaccionar con otras cadenas laterales o partes formando los enlaces de reticulación. Otro método adicional de reticulación comprende la exposición de los polímeros a una radiación, tal como rayos gamma, con el fin de activar las cadenas poliméricas, permitiendo reacciones de reticulación. También pueden resultar adecuados los métodos de reticulación deshidrotérmica. A continuación se describen los métodos preferentes para reticular las moléculas de gelatina.

55 Métodos ilustrativos para la producción de gelatinas reticuladas son los siguientes. Se obtiene la gelatina y se suspende en una solución acuosa para formar un hidrogel no reticulado, que tiene típicamente un contenido en sólidos del 1% al 70% en peso, normalmente del 3% al 10% en peso. La gelatina se reticula, habitualmente mediante su exposición a glutaraldehído (por ejemplo, del 0,01% al 0,05% peso/peso, durante toda la noche a 0°C hasta 15°C en un tampón acuoso), periodato de sodio (por ejemplo, 0,05M mantenido a 0°C hasta 15°C durante 48 horas) o 1-60 etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ("EDC") (por ejemplo, del 0,5% al 1,5% peso/peso durante toda la noche a temperatura ambiente), o mediante su exposición a aproximadamente 0,3 hasta 3 megarads de radiación de haz electrónico o gamma. Como alternativa, las partículas de gelatina pueden suspenderse en un alcohol, preferentemente en alcohol metílico o etílico, con un contenido en sólidos del 1% al 70% en peso, normalmente del 3% al 10% en peso, y reticularse mediante su exposición a un agente de reticulación, típicamente glutaraldehído (por ejemplo, del 0,01% al 0,1% peso/peso, durante toda la noche a temperatura ambiente). En el caso de los aldehídos, el pH debe mantenerse a aproximadamente 6 a 11, preferentemente de 7 a 10. Cuando la reticulación se realiza con glutaraldehído, los enlaces de reticulación se forman a través de bases de Schiff, que pueden estabilizarse mediante una reducción posterior, por ejemplo por tratamiento con borohidruro de sodio. Después de la reticulación, los gránulos resultantes pueden lavarse

ES 2 317 600 T3

en agua y opcionalmente enjuagarse en un alcohol, y se secan. Los polvos secos resultantes pueden cargarse entonces en los aplicadores de la presente invención, tal como se describe con más detalle a continuación.

Después de la reticulación, al menos el 50% (peso/peso) del adyuvante de rehidratación será eliminado del hidrogel resultante. Normalmente, el adyuvante de rehidratación se elimina por filtración del hidrogel seguida de lavado de la torta del filtro resultante. Estos pasos de filtración/lavado pueden repetirse una o más veces más con el fin de limpiar el producto hasta el nivel deseado y eliminar al menos el 50% del adyuvante de rehidratación, eliminando preferentemente al menos el 90% (peso/peso) del adyuvante de rehidratación originalmente presente.

Después de la filtración se seca la gelatina obtenida, típicamente secando la torta final del filtro. La torta seca del filtro entonces puede romperse o triturarse para producir el polvo reticulado, que tiene un tamaño de partícula dentro de los rangos deseados establecidos anteriormente.

Los kits según la presente invención comprenderán un primer recipiente que contiene el polvo de gelatina reticulada seca de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente. Los kits comprenderán además un segundo recipiente que contiene un medio de rehidratación acuoso, típicamente una solución salina u otra solución acuosa que comprende trombina, la cual se pretende mezclar con la gelatina a medida que se rehidrata la gelatina. Los recipientes pueden tener cualquier forma pero preferentemente tendrán forma de jeringuillas de forma que permitan la mezcla de la gelatina seca con el medio de rehidratación.

20

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra un kit construido de acuerdo con los principios de la presente invención.

25

Descripción de las realizaciones específicas

Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración.

30

Ejemplo 1

Preparación del polvo de gelatina

35

Se suspendieron unas tiras de piel bovina en una solución de hidróxido de sodio con una concentración de 1M a 2M durante 1 hora, a temperatura ambiente, se neutralizaron con ácido fosfórico y se enjuagaron. Entonces se volvieron a suspender las tiras tratadas en agua desionizada, se ajustaron a un pH 7-8 y se calentaron a 70°C. Se utilizó un homogeneizador para reducir además el tamaño de las tiras. Después de 1 hora a 70°C, el corium se solubilizó ampliamente en gelatina. La cantidad de corium se eligió de forma que el contenido en sólidos de la solución de gelatina resultante fuera de aproximadamente el 3-10% (peso/peso), típicamente del 7-10%. Se vertió la solución en capas finas sobre bandejas metálicas recubiertas de Teflon®, se secaron y se trituraron para formar polvo de gelatina.

45 Ejemplo 2

Preparación de “polvo de gelatina modificada”

Se disolvieron los adyuvantes de rehidratación (Tabla 1) en 500 ml de agua desionizada a 50°C y luego se añadió a la solución una cantidad de polvo de gelatina de origen bovino preparado según el Ejemplo 1. Se eligió que la concentración final de gelatina en solución fuera de aproximadamente un 8% (peso/peso, base de polvo de gelatina en masa) y la cantidad total de adyuvantes de rehidratación en la solución se eligió como en los Ejemplos 9-44 (Tablas 1 y 2). Después de haberse disuelto la gelatina, se vertió la solución en bandejas metálicas recubiertas de Teflon® y se secó. Se trituró la lámina de gelatina seca para formar el “polvo de gelatina modificada”.

55

Alternativamente, se suspendieron tiras de piel bovina en una solución de hidróxido de sodio con una concentración de 1M a 2M durante 1 hora a temperatura ambiente, se neutralizaron con ácido fosfórico y se enjuagaron. Se volvieron a suspender las tiras tratadas en agua desionizada, se ajustaron a un pH de 7-8, y se calentaron a 70°C. Se utilizó un homogeneizador para reducir además el tamaño de las tiras. Después de 1 hora a 70°C, se solubilizó ampliamente el corium en gelatina. Se eligió la cantidad de corium para que el contenido en sólidos de la solución de gelatina resultante fuera de aproximadamente un 3-10% (peso/peso), típicamente del 7-10%. Se eligieron las cantidades de adyuvantes de rehidratación como en los Ejemplos 9-44 (Tablas 1 y 2) y luego se añadieron a la solución de gelatina, en forma sólida o disueltos en un pequeño volumen de agua. Se vertió la solución en capas finas sobre bandejas metálicas recubiertas de Teflon®, se secaron y se trituraron para formar “polvo de gelatina modificada”. Se dan ejemplos de varias formulaciones para la gelatina modificada en las Tablas 1 y 2.

ES 2 317 600 T3

Ejemplo 3

Preparación de polvo de gelatina reticulada a partir de “polvo de gelatina modificada”

5 600 ml de tampón de fosfato 0,2M (pH 9,2 ± 0,2) se enfriaron a una temperatura inferior a 12°C. Se añadieron 0,32 ml de glutaraldehído (25%) a la solución tampón y luego se añadieron 20 g de polvo de gelatina modificada, lo que resultó en una concentración de glutaraldehído de 4.000 ppm (glutaraldehído con respecto a la gelatina modificada, base de peso en masa). Se suspendió la gelatina en la solución de glutaraldehído con una barra de agitación. Se ajustó el pH de cada suspensión a un rango de 9,2 ± 0,2 y luego se mantuvo a una temperatura de 9 a 12°C y un pH de 9,2 ± 10 0,2 durante 19 horas.

15 Se filtró la suspensión y se lavó la torta del filtro con agua desionizada tres veces, cubriendo completamente la torta del filtro con agua desionizada y luego dejando que el vacío extrajera el agua de enjuague por toda la torta. Se dejó la torta del filtro en el embudo durante cada enjuague.

15 Se disolvieron 0,2 g de NaBH₄ en 600 ml de tampón de fosfato 25 mM, pH 7,4 ± 0,2, en una cubeta. La torta del filtro anteriormente mencionada se suspendió en la solución de NaBH₄ a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) durante 3 horas, luego se filtró para eliminar el líquido.

20 Entonces se suspendió la torta en 600 ml de solución tampón a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) durante 30 minutos y se volvió a filtrar. El tampón estaba compuesto de fosfato de sodio (monohidrato monobásico y dibásico anhidro) y ascorbato de sodio. Se repitió el procedimiento anterior dos veces para garantizar que existiera una proporción adecuada de sales con respecto a la gelatina para formar la composición tampón deseada a su reconstitución. La torta se secó, luego se trituró con un Mezclador Waring, lo que resultó en un “polvo de gelatina 25 reticulada”.

Se utilizó también este método para preparar polvo de gelatina reticulada a partir de polvo de gelatina no modificada; es decir, la gelatina a la cual no se añadieron adyuvantes de rehidratación durante su preparación.

30 Ejemplo 4

Preparación de producto irradiado a partir de polvo de gelatina reticulada

35 Se colocaron aproximadamente 800 mg (peso en masa) de polvo de gelatina reticulada preparado como en el Ejemplo 2 en cada una de varias jeringuillas de 5 cc. Las jeringuillas que contenían el polvo se esterilizaron por irradiación con rayos gamma a temperatura ambiente.

Ejemplo 5

40 Utilización del producto como agente hemostático

A partir de polvo de gelatina modificada se preparó una jeringuilla de producto que contenía aproximadamente 0,8 g de polvo de gelatina reticulada irradiada. Se preparó el polvo de gelatina modificada como en el Ejemplo 2. Luego, la gelatina modificada fue reticulada e irradiada como en los Ejemplos 3 y 4. Se mezcló el producto con 4 ml de solución salina que contenía aproximadamente 1.000 unidades de trombina bovina por mililitro. Se realizó la mezcla mediante el paso para adelante y para atrás entre dos jeringuillas conectadas con un conector Luer recto hembra-hembra. El polvo en la jeringuilla se hidrató a medida que se mezclaba con la solución de trombina, formando gránulos de hidrogel.

50 Se creó una lesión cuadrada, de aproximadamente 1 cm x 1 cm x 0,2 cm de profundidad, en el hígado de un cerdo de granja. El cerdo había sido sometido a una anticoagulación con heparina para que su tiempo de coagulación activado (ACT) fuera de tres a cinco veces su valor base y que la lesión sangrara libremente antes del tratamiento. Despues de aproximadamente 30 segundos del inicio de la mezcla, aproximadamente se expulsaron aproximadamente 2 ml de polvo hidratado desde la jeringuilla sobre la lesión y se mantuvieron en su lugar mediante compresión durante 55 dos minutos. Despues de retirar la compresión, se sometió a observación la lesión tratada en cuanto al sangrado 3 minutos, 10 minutos y 50 minutos despues de la aplicación. No se vio ningún sangrado de la lesión tratada a los 3 minutos y 10 minutos de observación. A los 10 minutos de observación, se irrigó la lesión tratada con una solución salina. Mientras se eliminaba el material en exceso, no se observó ningún nuevo sangrado. A los 50 minutos despues de la aplicación se volvió a observar la lesión y no se observó ningún sangrado.

60 Ejemplo 6

Determinación de la velocidad de rehidratación de un polvo

65 Se midió la “velocidad de rehidratación” de un polvo como sigue. El polvo, envasado en una jeringuilla de 5 cc, se mezcló en una jeringuilla que contenía un volumen de solución acuosa mediante su paso entre las dos jeringuillas conectadas con un conector Luer durante 30 segundos. Se eligió el volumen de solución acuosa para que estuviera en exceso con respecto a lo que se prevé se absorbería en 30 segundos. Típicamente, 0,8 g (peso masivo) de polvo se

ES 2 317 600 T3

mezcló con 3 ml de una solución de cloruro de sodio al 0,9%. Entonces, la mezcla resultante se filtró inmediatamente para eliminar todo líquido no absorbido. El material filtrado húmedo se pesó, luego se secó en una estufa a 120°C durante dos horas y se volvió a pesar. Esta medida proporcionó la cantidad total de agua eliminada del material húmedo y el peso del polvo seco. La cantidad de agua que había sido absorbida por el polvo se calculó entonces 5 después de realizar una pequeña corrección en la humedad residual que estaba presente originalmente en el polvo. La “velocidad de rehidratación” se calculó como masa de solución salina absorbida por cada gramo en peso seco de polvo en un intervalo de 30 segundos.

10 En el cálculo, a continuación, se midieron las fracciones sólidas de polvo en masa (“S”) independientemente, secando la masa de polvo a 120°C durante 2 horas y pesando el polvo antes y después del secado. El valor de S viene dado por:

$$15 S = \frac{\text{peso después del secado a } 120^{\circ}\text{C, 2 horas}}{\text{peso antes del secado}}$$

Cálculo de la velocidad de rehidratación:

20 A: peso inicial del recipiente y del papel filtrante

B: peso del recipiente, papel filtrante y polvo hidratado

C: peso del recipiente, papel filtrante y muestra después de secado en estufa

25 S: fracciones sólidas de la masa de polvo original en la jeringuilla

M: gramos de solución salina absorbidos por cada gramo de polvo (peso en seco) durante la mezcla (“velocidad de absorción”)

$$30 M = \frac{(B - A) - (C - A)/S}{(C - A)}$$

Ejemplo 7

35 *Velocidad de rehidratación y determinación de las propiedades físicas para varios lotes de producto en polvo*

Las Tablas 1 y 2 describen los resultados de las medidas de la velocidad de rehidratación llevadas a cabo en un producto en polvo con respecto a varios lotes (Ejemplos 9-23). Éstas se realizaron según los métodos de los 40 Ejemplos 1, 2, 3 y 4. Salvo para los Ejemplos 9 y 17, éstos se prepararon a partir de gelatinas modificadas que estaban elaboradas con varias proporciones de gelatina y los siguientes adyuvantes de rehidratación: polietilenglicol (PEG), peso molecular promedio 1.000; polivinilpirrolidona (PVP), designación “k-30”, correspondiente a un peso molecular promedio de aproximadamente 50.000; y dextrano, peso molecular promedio de 40.000.

45 Se observa que la utilización de varias combinaciones distintas de gelatina y adyuvantes de rehidratación pueden resultar en un producto en polvo que absorbe más solución salina acuosa en 30 segundos por cada gramo de polvo que el producto en polvo obtenido a partir de una gelatina a la que no se han añadido adyuvantes de rehidratación. También se observa que la combinación de gelatina, PEG, PVP y dextrano en una proporción en peso masivo de 80:10:5:5 en la gelatina modificada (Ejemplo 10) genera un producto en polvo que absorbe aproximadamente un 33% más de solución salina por cada gramo en 30 segundos que el producto en polvo elaborado a partir de gelatina no modificada.

55 La Tabla 1 muestra también los valores para otras propiedades físicas determinadas para los lotes de producto en polvo. El “porcentaje de sólidos” se determinó pesando el polvo antes y después de su secado a 120°C durante dos horas para quitar la humedad residual. La “temperatura máxima DSC” se refiere a la temperatura a la cual se muestra un pico máximo en un termograma de una medida de calorimetría de exploración diferencial realizada a 1°C hasta 70°C. El “esponjamiento de equilibrio” se determinó suspendiendo el polvo en un exceso de solución salina durante al menos 18 horas a temperatura ambiente. Se pesó el polvo hidratado para determinar su “peso húmedo de equilibrio”, se secó a 120°C durante dos horas y se volvió a pesar para determinar su “peso en seco”. El esponjamiento de equilibrio se da como:

$$60 \text{ Esponjamiento de equilibrio (\%)} = 100\% \times \frac{\text{peso en húmedo en equilibrio} - \text{peso en seco}}{\text{peso en seco}}$$

65 Los valores para el “tamaño medio de partícula” se midieron por fotodispersión en un analizador de tamaño de partícula Coulter LS.

A partir de los datos presentados en la Tabla 1, parece que la utilización adecuada de adyuvantes de rehidratación puede cambiar la velocidad de rehidratación del producto en polvo sin cambiar notablemente otras propiedades físicas.

ES 2 317 600 T3

Ejemplo 8

Medida de los niveles de polietilenglicol, polivinilpirrolidona y dextrano en el polvo de gelatina modificada y en el polvo reticulado

5 Aproximadamente 50 mg de gelatina modificada o 250 mg de producto en polvo reticulado irradiado fueron suspendidos en 10 ml de agua desionizada y calentados durante 3 horas a 65°C. Luego se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 2.000 rpm. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro Gelman Acrodisc de 0,45 µm, desechándose el primer ml. Luego la muestra resultante se sometió a ensayo por medio de tres métodos distintos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para cuantificar en la muestra el polietilenglicol (PEG), la polivinilpirrolidona (PVP) y el dextrano. En cuanto al PEG, se inyectaron 100 µl de la muestra en una columna Ultrahydrogel 120 de Waters, de 7,8 x 300 mm, con columna protectora y prefiltro, utilizando agua desionizada como fase móvil. Se utilizó un detector de índice de refracción para controlar el efluente. En cuanto a la PVP, se inyectaron 100 µl de la muestra en una columna Kingsorb C18 de Phenomenex de 5 µm, de 4,6 x 150 mm, con columna protectora y prefiltro, utilizando un gradiente de metanol y fosfato de sodio acuoso como fase móvil. Se utilizó un detector de absorbancia ultravioleta para controlar el efluente. En cuanto al dextrano, se inyectaron 100 µl de la muestra en una columna Ultrahydrogel Linear de Waters, de 7,8 x 300 mm, con columna protectora y prefiltro, utilizando fosfato de sodio 0,1M, pH = 7 y acetonitrilo en una proporción 90:10 como fase móvil. Se utilizó un detector de índice de refracción para controlar el efluente. Se calentaron todas las columnas a 40°C para los análisis. El límite de cuantificación 10 era de aproximadamente un 0,1% (muestra peso/peso) para el PEG y la PVP y de un 0,2% (muestra peso/peso) para el dextrano. 15 20 25

30 Se preparó la gelatina modificada según el Ejemplo 2. Se analizó la gelatina modificada en cuanto al PEG, a la PVP y el dextrano de la forma descrita anteriormente. Los resultados indicaron que PEG, PVP y dextrano estaban presentes en un 16%, 8% y 3% respectivamente (peso/peso, masivo). Se sometió posteriormente la gelatina modificada a reticulación, tratamiento con borohidruro de sodio y enjuague según el Ejemplo 3 para formar polvo de gelatina reticulada modificada. Cuando se analizó este polvo en cuanto a PEG, PVP y dextrano mediante HPLC de la forma descrita anteriormente, se descubrió que el contenido de cada uno de los tres adyuvantes de rehidratación se encontraba por debajo del límite de cuantificación.

Ejemplo 9

Producto en polvo elaborado sin adyuvantes de rehidratación

35 Se preparó gelatina no modificada -es decir, gelatina a la cual no se añadieron adyuvantes de procesamiento- a partir de tiras de corium bovino como en el Ejemplo 1 y se reticuló como en el Ejemplo 3. Luego la gelatina reticulada no modificada fue envasada en jeringuillas e irradiada con rayos gamma como en el Ejemplo 4. Se midieron las propiedades físicas del producto resultante como en los Ejemplos 6 y 7 y éstas figuran en la Tabla 1.

Ejemplos 10-23

Producto en polvo elaborado con adyuvantes de rehidratación

40 Se prepararon lotes de gelatina modificada como en el Ejemplo 2 a partir de polvo de gelatina o de tiras de corium y a partir de uno, dos o tres adyuvantes de rehidratación. La Tabla 1 muestra las proporciones de gelatina en masa y de adyuvantes de rehidratación empleadas. Luego se reticuló la gelatina modificada como en el Ejemplo 3. Excepto para el Ejemplo 17, los adyuvantes de rehidratación utilizados procedían de la lista siguiente: polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000; polivinilpirrolidona (PVP), designación "k-30", con un peso molecular promedio de aproximadamente 50.000; y dextrano, de un peso molecular promedio de aproximadamente 50. En el Ejemplo 17, se utilizó PEG de un peso molecular promedio de aproximadamente 400. Luego, la gelatina reticulada modificada se envasó en jeringuillas y se irradió con rayos gamma como en el Ejemplo 4. Las propiedades físicas del producto en polvo resultante procedente de cada una de estas preparaciones se midieron como en los Ejemplos 6 y 7 y éstas figuran en la Tabla 1. Los datos dados con la formulación del Ejemplo 10 son la desviación media y estándar de nueve lotes preparados de acuerdo con aquella formulación.

Ejemplos 24-44

Producto en polvo elaborado con varios adyuvantes de rehidratación

55 60 Los lotes de gelatina modificada se prepararon como en el Ejemplo 2 a partir de polvo de gelatina o de tiras de corium y a partir de uno de varios adyuvantes de rehidratación. La Tabla 2 muestra la identidad y concentración del adyuvante de rehidratación utilizado en cada lote como coeficiente del peso en masa de gelatina con respecto al adyuvante de rehidratación y como porcentaje de soluto en masa total utilizado para preparar la gelatina modificada. Luego la gelatina modificada fue reticulada como en el Ejemplo 3. Entonces la gelatina reticulada modificada se envasó en jeringuillas y se irradió con rayos gamma como en el Ejemplo 4. Las propiedades físicas del producto en polvo resultante procedente de cada una de estas preparaciones se midieron como en los Ejemplos 6 y 7 y figuran en la Tabla 2. Los datos para la formulación del Ejemplo 9 se proporcionan en la Tabla 2 para su comparación.

		Porcentaje objetivo del peso masivo en la gelatina modificada				Propiedades del producto en polvo después de reticulación e irradiación con rayos gamma (adyuvantes de rehidratación ampliamente eliminados)				
Lote		Gelatina (peso masivo)	PEG PM =1.000D	PVP PM~ 50.000D	dextrano 40.000 D	% de sólidos	Pico de temp. DSC(°C)	Espionaje equilibrio (%)	Tamaño medio de partícula (μm)	Rehidratación*
Sin adyuvante	rehidratador	100	0	0	0	88,6	41,3	551	440	2,85
Ejemplo 9	208-32 (Mezcla de 4 maneras)									
Composición preferente	Promedio de 9 lotes	80	10	5	5	87,6	42,1	595	423	3,79
Ejemplo 10	Des. estd. de 9 lotes									
	Mezclas de tres maneras					1,0	1,4	43	65	0,15
Ejemplo 11	228-69-1	80	10	10	0	88,1	40,8	667	387	3,51
Ejemplo 12	228-69-2	80	10	0	10	88,4	40,6	670	367	3,14
Ejemplo 13	228-78	80	0	10	10	86,7	41,1	632	414	3,20
Mezcla gelatina -PEG										
Ejemplo 14	212-39-2	94	6	0	0	86,2	44,4	502	372	2,68
Ejemplo 15	228-42-3	89	11	0	0	88,6	42,8	594	428	3,16

ES 2 317 600 T3

Ejemplo 16	228-42-1	80	20	0	0	88,9	42,4	575	312	3,47
Ejemplo 17	214-62-1	89	11**	0	0	87,1	40,7	599	406	3,11
<i>Mezcla gelatina -PVP</i>										
Ejemplo 18	228-38-3	94	0	6	0	88,2	42,2	567	399	3,26
Ejemplo 19	228-38-2	89	0	11	0	88,3	41,0	605	422	3,44
Ejemplo 20	228-38-1	80	0	20	0	88,6	42,4	596	401	3,52
<i>Mezcla gelatina -dextrano</i>										
Ejemplo 21	228-35-3	94	0	0	6	88,1	40,5	631	395	3,18
Ejemplo 22	228-35-2	89	0	0	11	88,3	41,4	598	345	3,03
Ejemplo 23	228-35-1	80	0	0	20	88,5	41,9	624	392	3,01

seco) en 30 segundos.

*** PEG (PM = 400) utilizado en lugar de PM = 1.000.

Tabla 1

Tabla 2

Lote	Adyuvante de rehidratación				Propiedades físicas				
	Tipo	PM u otro	Peso en masa	Conc. ady. de proceso en gel. mod. (% peso en masa)	% de sólidos	Pico de temp. DSC(°C)	Esponja- miento de equilibrio (%)	Tamaño medio de partícula (μm)	Vel. de rehidrata- ción*
Ejemplo 9	208-32	Ningún adyuvante de rehidratación			88,6	41,3	551	440	2,85
Ejemplo 24	214-11-1	glicerol	r/a	4	20%	85,5	43,4	483	653
Ejemplo 25	214-11-2	glicerol	r/a	8	11%	86,4	43,4	529	421
Ejemplo 26	214-11-3	glicerol	r/a	16	6%	86,5	43,0	543	398
Ejemplo 27	214-44-1	dextrano	148.000D	4	20%	85,5	nc	634	433
Ejemplo 28	214-44-2	dextrano	148.000D	8	11%	85,4	nc	607	453
Ejemplo 29	214-44-3	dextrano	148.000D	16	6%	85,5	nc	603	527
Ejemplo 30	214-44-4	dextrano	148.000D	32	3%	85,7	nc	531	491
Ejemplo 31	228-35-4	dextrano	4000D	32	3%	84,5	41,4	633	380
Ejemplo 32	214-50-1	PVP	k-90	4	20%	85,3	44,0	612	664
Ejemplo 33	214-50-2	PVP	k-90	8	11%	85,6	44,3	538	581
Ejemplo 34	214-50-3	PVP	k-90	16	6%	85,6	44,1	527	593
Ejemplo 35	214-50-4	PVP	k-90	32	3%	86,1	43,0	597	538

ES 2 317 600 T3

Ejemplo	36	214-53-4	PVP	k-30	32	3%	87,3	41,1	580	447	2,72
Ejemplo	37	214-59-1	PEG	400	4	20%	86,7	42,0	595	407	2,18
Ejemplo	38	214-66-1	PEG	400	6	14%	86,5	40,8	603	501	2,63
Ejemplo	39	212-39-1	PEG	400	16	6%	86,2	43,8	513	403	2,11
Ejemplo	40	212-39-2	PEG	1000	16	6%	86,2	44,4	502	372	2,68
Ejemplo	41	214-59-3	PEG	8000	4	20%	87,4	41,5	548	429	2,87
Ejemplo	42	214-66-3	PEG	8000	6	14%	86,9	41,4	581	426	3,80
Ejemplo	43	214-62-3	PEG	8000	8	11%	86,8	42,0	631	511	2,78
Ejemplo	44	212-39-3	PEG	8000	16	6%	86,4	44,6	546	518	2,72

nc = no comunicado * Velocidad de rehidratación definida como gramos de solución salina absorbidos por cada gramo de producto en polvo (peso en seco) en 30 segundos.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un polvo de gelatina reticulada sustancialmente seca, comprendiendo dicho método:
 - 5 la provisión de una solución de una gelatina no reticulada;
 - 10 la reticulación de la gelatina no reticulada mientras se encuentra en solución en presencia de un adyuvante de rehidratación;
 - 15 el lavado de la gelatina reticulada para eliminar al menos un 50% peso/peso del adyuvante de rehidratación; y el secado de la gelatina reticulada y trituración del sólido seco para producir el polvo de gelatina reticulada.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el adyuvante de rehidratación comprende uno o más de los materiales seleccionados de entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y dextrano.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el adyuvante de rehidratación está presente a una concentración situada en el rango del 5% al 30% en peso con respecto al peso de la gelatina presente en la solución acuosa.
4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el adyuvante de rehidratación comprende PEG en un 2,5% hasta un 20% en peso, PVP en un 1,25% hasta un 20% en peso y dextrano en un 1,25% hasta un 20% en peso.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el paso de reticulación comprende la adición de un agente de reticulación a la solución de gelatina.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el agente de reticulación comprende glutaraldehído.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la gelatina reticulada se filtra para producir una torta de filtrado que después se lava para eliminar el adyuvante de rehidratación.
- 35 8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el lavado de la torta de filtrado elimina al menos el 90% (peso/peso) del adyuvante de rehidratación originalmente presente en la gelatina.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque paso de secado comprende secar la torta de filtrado después del lavado.
- 40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polvo de gelatina reticulada se seca para que el contenido en humedad sea inferior al 20% (peso/peso).
11. Composición que comprende un polvo de gelatina reticulada, **caracterizada** porque el polvo se reticula en presencia de un adyuvante de rehidratación de forma que el polvo tiene una velocidad de rehidratación en agua de al menos 3,0 g/g.
- 45 12. Composición según la reivindicación 11, **caracterizada** porque que comprende un polvo de gelatina reticulada, **caracterizada** porque el polvo tiene una velocidad de rehidratación en agua de al menos 3,5 g/g.
- 50 13. Composición según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizada** porque el polvo tiene esponjamiento de equilibrio situado en el rango del 400 al 1.000%.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizada** porque el polvo tiene un tamaño medio de partícula situado en el rango de 150 μm a 750 μm .
- 55 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizada** porque el polvo tiene un contenido en humedad del 20% (peso/peso) o inferior.
- 60 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, **caracterizada** porque el adyuvante de rehidratación comprende uno o más de los materiales seleccionados del grupo consistente en polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y dextrano.
17. Kit que comprende:
 - 65 un primer recipiente que contiene una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16; y un segundo recipiente que contiene un medio acuoso de rehidratación.

ES 2 317 600 T3

18. Kit según la reivindicación 17, **caracterizado** porque uno o ambos primero y segundo recipientes son jeringuillas.
19. Kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el primero y segundo recipientes son jeringuillas que permiten la mezcla de la composición con el medio de rehidratación.
20. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, **caracterizado** porque el medio acuoso de rehidratación comprende trombina.
- 10 21. Kit según la reivindicación 20, **caracterizado** porque el medio acuoso de rehidratación es una solución salina que comprende trombina.
- 15 22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, que además comprende un envase para guardar los recipientes primero y segundo.
- 15 23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, **caracterizado** porque la composición contenida en el primer recipiente está envasada para impedir la incursión de la humedad.
- 20 24. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23 que comprende además instrucciones para su uso que exponen un método para combinar el polvo de gelatina reticulada y el medio de rehidratación, para producir un hidrogel de gelatina fragmentada que contiene trombina, y aplicar el hidrogel a una herida.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

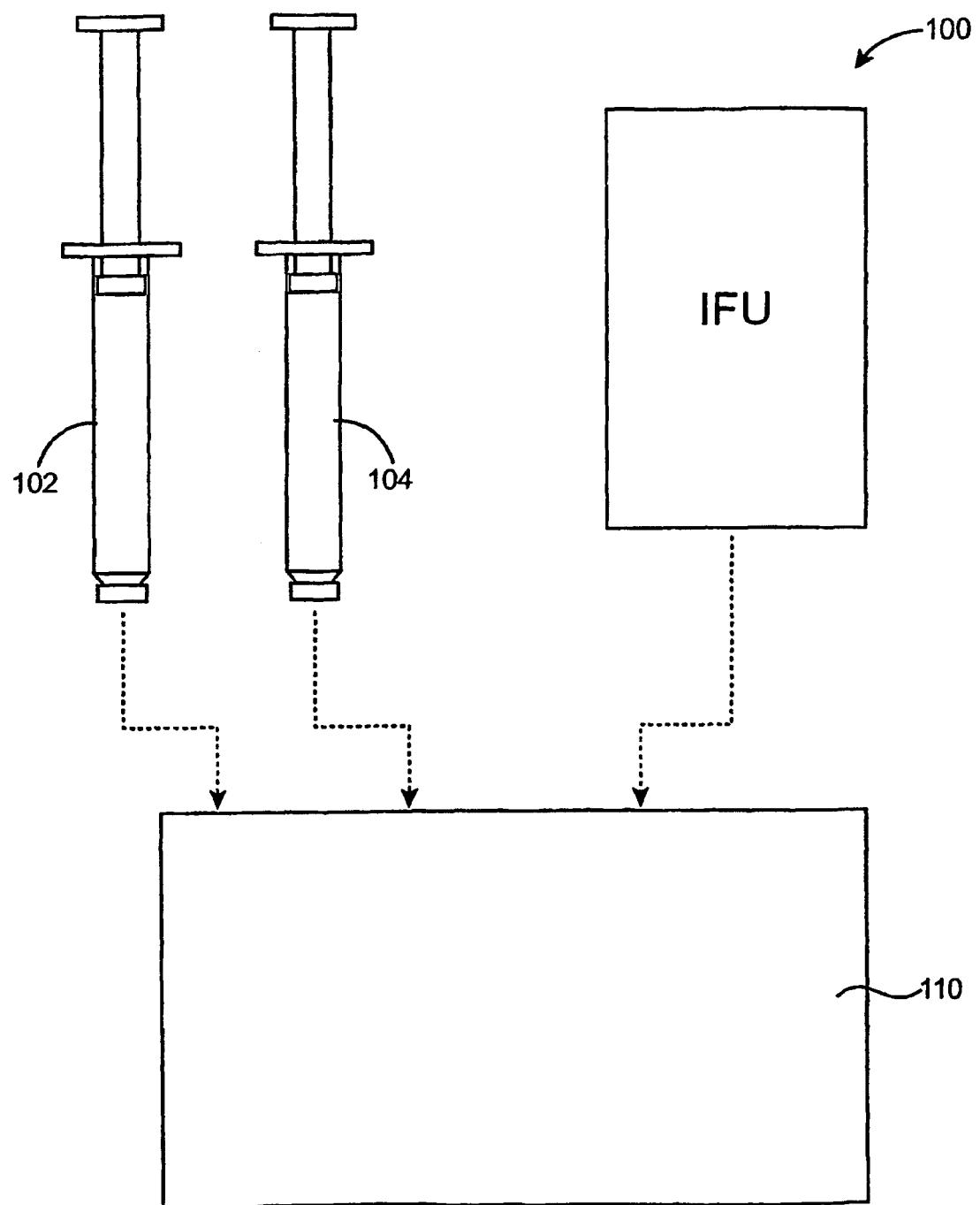


FIG. 1