

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 671**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/22** (2006.01)

**A61L 15/42** (2006.01)

**A61L 15/58** (2006.01)

**A61L 24/00** (2006.01)

**A61L 24/04** (2006.01)

**A61L 26/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2011 E 16178209 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023 EP 3103481**

54 Título: **Esponja hemostática**

30 Prioridad:

**07.04.2010 US 321661 P**

**16.12.2010 US 424031 P**

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

**06.06.2024**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)**

**One Baxter Parkway**

**Deerfield, IL 60015, US y**

**BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HEDRICH, HANS CHRISTIAN y**

**HOEFINGHOFF, JORIS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 971 671 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**

España hemostática

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las esponjas hemostáticas, a un método para producirlas y a sus diversos usos.

10 Antecedentes de la invención

15 Son conocidos desde hace tiempo adhesivos biológicos basados en factores de coagulación de origen humano o animal. En los documentos US 4.362.567, US 4.298.598 y US 4.377.572 se describe un método para producir 10 adhesivos tisulares basados en fibrinógeno y factor XIII. Los adhesivos tisulares se aplican normalmente junto con un componente independiente que contiene trombina, que actúa enzimáticamente sobre el fibrinógeno formando fibrina y sobre el factor XIII formando el factor activo XIIIa, que retícula la fibrina para obtener un coágulo de fibrina estable.

20 Durante muchos años se han utilizado compresas de colágeno para favorecer la cicatrización o detener hemorragias. Su mecanismo de acción en la hemostasia se basa en la agregación y activación plaquetaria, la formación de trombina sobre la superficie de las plaquetas activadas y la formación de un coágulo de fibrina hemostática mediante la acción catalítica de la trombina sobre el fibrinógeno. Para mejorar la acción hemostática de las compresas o láminas de colágeno se ha sugerido la inclusión de factores de hemostasia dentro de dichas compresas.

25 En el documento US 4.600.574 se describe un adhesivo tisular basado en colágeno combinado con fibrinógeno y factor XIII. Este material se suministra liofilizado, listo para el uso. El fibrinógeno y el factor XIII se combinan con el colágeno impregnando el material plano de colágeno con una solución que incluye fibrinógeno y factor XIII, y liofilizando dicho material.

30 El documento WO 97/37694 describe una esponja hemostática basada en colágeno y un activador o proactivador de la coagulación sanguínea distribuidos homogéneamente en su interior. Esta esponja se suministra en forma seca, que puede haber sido secada al aire o liofilizada. Sin embargo, sigue teniendo un contenido en agua de al menos un 2%.

35 La US 5.614.587 se refiere a composiciones bioadhesivas que incluyen colágeno reticulado utilizando un polímero hidrófilo sintético activado de modo multifuncional, y también a métodos de utilización de estas 30 composiciones para producir la adhesión entre una primera superficie y una segunda superficie, pudiendo consistir al menos una de estas dos superficies en una superficie de tejido nativo.

40 La WO2004028404 describe un sellante tisular compuesto por un colágeno o una gelatina sintéticos y un agente reticulante electrófilo que se suministran en estado seco. Al humedecer esta composición a un pH apropiado se produce una reacción entre los 2 componentes y se forma un gel con propiedades sellantes. Este sellante actúa esencialmente de forma análoga a otros dos componentes sellantes conocidos (compuestos por un reactivo con múltiples grupos electrófilos y un reactivo con múltiples grupos nucleófilos) que son conocidos en el estado actual de la técnica o que están disponibles en el mercado, por ejemplo Coseal™. En una realización especial de la invención, los dos componentes del sellante (el reticulante electrófilo y el colágeno/gelatina sintético) están aplicados sobre un biomaterial.

45 En los documentos US 5.428.024, US 5.352.715 y US 5.204.382 se describen composiciones que contienen colágeno y que han modificadas mecánicamente para alterar sus propiedades físicas. Estas patentes se refieren en general a colágenos fibrilares e insolubles. En el documento US 4.803.075 se describe una composición de colágeno inyectable. En el documento US 5.516.532 se describe una composición inyectable de hueso/cartilago. En el documento WO 96/39159 se describe una matriz de suministro basada en colágeno que incluye partículas secas en un rango de tamaño de 5 µm a 850 µm, que se puede suspender en agua y que tiene una densidad de carga superficial particular. En el documento US 5.196.185 se describe una preparación de colágeno con un tamaño de partícula de 1 µm a 50 µm útil como spray de aerosol para formar un apósito. Otras patentes que describen composiciones de colágeno incluyen los documentos US 5.672.336 y US 5.356.614.

55 El documento US 2006/0258560 A1 da a conocer una composición de sellado tisular seca, en donde la composición incluye un andamio matriz recubierto con una capa adhesiva, que se adhiere a un tejido sólo al entrar en contacto con una solución acuosa, tal como sangre o fluido tisular.

60 Sumario de la invención

65 El objeto de la invención es un material compuesto hemostático que comprende un material hemostático y un reticulante polimérico hidrófilo simple, dicho reticulante tiene grupos reactivos electrófilos, dicho material compuesto comprende poros que permiten que los fluidos externos, especialmente la sangre humana, accedan a dicho material compuesto, en donde dicho material hemostático es una tela no tejida o tejida de una fibra hemostática, en donde dicho reticulante es un polímero de óxido de polialquileño; en donde dicho reticulante se recubre sobre la superficie de dicho material hemostático;

y en donde el espesor de este recubrimiento es de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 1 mm.

Las realizaciones preferidas se definen en las subreivindicaciones. Se ha comprobado que anteriores compresas de biomateriales fibrosos para la cicatrización, en particular compresas de colágeno, han fallado a la hora de inducir la hemostasia en condiciones de hemostasia deficiente (por ejemplo después de heparinización). El material compuesto según la presente invención mejora la hemostasia. Además, el material compuesto de acuerdo con la presente invención presenta una fuerte adherencia al tejido cuando se aplica a una herida. Adicionalmente, el material compuesto de la presente invención tiene un mejor comportamiento de hinchamiento, es decir, poco hinchamiento, después de su aplicación a una herida.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la invención es una esponja hemostática compuesta porosa que comprende una esponja hemostática compuesta porosa que comprende

- i) una matriz de un biomaterial y
- ii) un componente polimérico hidrófilo que comprende grupos reactivos

en donde i) y ii) están asociados entre sí de modo que se conserva la reactividad del componente polimérico, donde el término "asociado" significa que

- dicho componente polimérico se recubre sobre una superficie de dicha matriz de un biomaterial, por ejemplo, como una capa continua o discontinua sobre al menos una superficie de dicha esponja, o bien
- dicha matriz está impregnada con dicho material polimérico o
- ambas cosas.

El término "impregnado" tal como se utiliza aquí incluye el concepto de "absorción polimérica en una matriz de biomaterial".

Los términos "esponja", "compresa" y "velo" se utilizan indistintamente en la descripción de la presente invención.

Preferentemente, el biomaterial es colágeno, una proteína, un biopolímero o un polisacárido. Es especialmente preferente un biomaterial seleccionado de entre el grupo consistente en colágeno, gelatina (en especial gelatina 40 reticulada), fibrina, un polisacárido (en especial quitosano, celulosa oxidada, dextranos activados con aldehído, polialdehídos basados en almidón (obtenibles por oxidación de peryodato)), un biomaterial biodegradable sintético (en especial ácido poliláctico o ácido poliglicólico) y derivados de los mismos, de forma particularmente preferente colágeno. De acuerdo con la presente invención se proporciona un material compuesto poroso que incluye una matriz insoluble en agua de un biomaterial con propiedades hemostáticas y un agente reticulante polimérico hidrófilo asociado a la misma.

Al entrar en contacto con tejido sangrante, la reacción de reticulación del reticulante polimérico hidrófilo con las proteínas de la sangre conduce a la formación de un gel con propiedades sellantes y hemostáticas. También se produce una reticulación con las proteínas de la superficie del tejido y, dependiendo de la naturaleza del biomaterial de matriz insoluble en agua, además se puede producir una reticulación con el biomaterial de la matriz. Esta última reacción contribuye a una mejor adhesión del material compuesto a la superficie del tejido lesionado.

Además, para la eficacia hemostática del material compuesto de acuerdo con la presente invención es importante que la matriz del biomaterial tenga capacidad de impregnación, es decir, que pueda impregnarse y/o absorber líquidos tales como sangre, suero, plasma.

Esta capacidad de impregnación depende particularmente de la naturaleza hidrófila del polímero del que está hecha la matriz, y de una estructura tridimensional de poros abiertos interconectados, o de una red tridimensional de fibras hidrófilas. El tamaño de poro y la elasticidad de la matriz también son importantes para la capacidad de impregnación. El término "elasticidad" significa que la matriz se puede comprimir en solución acuosa y que vuelve a su volumen inicial una vez eliminada la fuerza que provoca la compresión.

La esponja es una red porosa de un biomaterial fibroso capaz de absorber fluidos corporales cuando se aplica sobre una herida. Esto permite que la sangre de una herida (incluyendo todos los componentes sanguíneos, como células sanguíneas o proteínas de coagulación) entre en la esponja. Por tanto, la esponja porosa de acuerdo con la presente invención tiene un volumen interior que es accesible para fluidos externos, como sangre, cuando se aplica a un paciente. Por ejemplo, una esponja porosa de colágeno se puede producir liofilizando un gel, suspensión o solución de colágeno mediante criodesecación (mientras que un secado al aire normal conduce a una película de colágeno). En el caso del colágeno, la esponja porosa resultante de acuerdo con la presente invención tiene normalmente entre 5 y 100 mg de colágeno/cm<sup>3</sup>, mientras que las películas de colágeno tienen entre 650 y 800 mg de colágeno/cm<sup>3</sup>. Si fluidos externos, como sangre, entran en contacto con la esponja de acuerdo con la presente invención, el componente polimérico hidrófilo que comprende grupos reactivos puede reaccionar con los componentes de la sangre y/o con la superficie de la matriz del biomaterial, con lo que se reticularan los componentes, que se unen a los (al menos dos) grupos reactivos.

Además, la esponja normalmente es flexible y adecuada para ser aplicada sobre diversos tejidos y lugares con formas diferentes.

El colágeno utilizado para la presente invención puede proceder de cualquier material colágeno, incluyendo líquidos, pastosos, fibrosos o en polvo que se pueden procesar formando una matriz porosa, en especial una matriz porosa y fibrosa. La preparación de un gel de colágeno para la producción de una esponja se describe, por ejemplo, en el documento EP 0891193 (incorporado aquí como referencia) y puede incluir una acidificación hasta que se produce la formación de gel y una neutralización subsiguiente del pH. Con el fin de mejorar la capacidad de formación de gel o la solubilidad, el colágeno se puede hidrolizar (parcialmente) o modificar, siempre que no se menoscabe la propiedad de formar una esponja estable después del secado.

Preferentemente, el colágeno o la gelatina de la matriz de la esponja son de origen animal, preferiblemente bovino o equino. No obstante, en caso de una hipersensibilidad del paciente frente a proteínas xenógenas, también se podría utilizar colágeno humano. Además se puede utilizar colágeno sintético o recombinante. Los demás componentes de la esponja son preferiblemente de origen humano, lo que hace que la esponja sea especialmente adecuada para la aplicación a seres humanos.

En una realización preferente, la esponja porosa de colágeno contiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50, por ejemplo entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30, de forma preferente aproximadamente 25 mg de colágeno/cm<sup>3</sup> de esponja seca.

El biomaterial puede estar o no reticulado. Preferentemente, el biomaterial ha sido reticulado.

El componente polimérico hidrófilo de la esponja de acuerdo con la presente invención es un reticulante hidrófilo que puede reaccionar con sus grupos reactivos electrófilos una vez que la esponja es aplicada a un paciente (por ejemplo en una herida del paciente o en otro lugar donde el paciente requiera una actividad hemostática). Por tanto, para la presente invención es importante que los grupos reactivos del componente polimérico sean reactivos cuando se aplican al paciente. Por ello es necesario fabricar la esponja de acuerdo con la presente invención de modo que, durante el proceso de fabricación, se conserven los grupos reactivos del componente polimérico que deben reaccionar una vez aplicados a una herida.

Esto puede hacerse de diferentes modos. Por ejemplo, algunos componentes poliméricos hidrófilos usuales pueden tener grupos reactivos susceptibles a la hidrólisis después de entrar en contacto con el agua. Por consiguiente, es necesario evitar el contacto prematuro con agua o con líquidos acuosos antes de la administración de la esponja al paciente, en especial durante la fabricación. No obstante, el procesamiento del componente polimérico hidrófilo durante la fabricación también puede ser posible en un medio acuoso en condiciones donde las reacciones de los grupos reactivos están inhibidas (por ejemplo, a pH bajo). Si los componentes poliméricos hidrófilos se pueden fundir, los componentes poliméricos hidrófilos fundidos se pueden pulverizar o imprimir sobre la matriz del biopolímero. También es posible rociar una forma seca (por ejemplo un polvo) del componente polimérico hidrófilo sobre la matriz. En caso necesario, después se puede aplicar un aumento de la temperatura para fundir el componente polimérico hidrófilo rociado en la matriz con el fin de obtener un revestimiento permanente para la esponja. Alternativamente, estos componentes poliméricos hidrófilos se pueden recoger en disolventes orgánicos inertes (inertes en relación con los grupos reactivos de los componentes poliméricos hidrófilos) y disponer sobre la matriz del biomaterial. Ejemplos de estos disolventes orgánicos son etanol seco, acetona seca o diclorometano seco (que son inertes, por ejemplo, en relación con los componentes poliméricos hidrófilos, como PEG sustituidos por éster de NHS).

En una realización preferente, el componente polimérico hidrófilo es un único componente polimérico hidrófilo y es un polímero de óxido de polialquileno, de forma especialmente preferente un polímero que contiene PEG, en adelante llamado "el material". Los grupos reactivos de dicho material son preferentemente grupos electrófilos.

El material puede ser un polímero de óxido de polialquileno multielectrófilo, por ejemplo un PEG multielectrófilo. El material puede incluir dos o más grupos electrófilos, como -CON(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -CHO, -N=C=O, y/o -N(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, por ejemplo un componente tal como se describe en el documento WO2008/016983 (incorporado aquí en su totalidad por referencia) y uno de los componentes comerciales de la marca registrada CoSeal®.

Grupos electrófilos preferentes del reticulante polimérico hidrófilo de acuerdo con la presente invención son grupos reactivos con los grupos amino, carboxi, tiol e hidroxilo de proteínas, o mezclas de los mismos.

Grupos reactivos específicos de grupos amino son grupos éster de NHS, grupos imidoéster, grupos aldehído, grupos carboxi en presencia de carbodiimidias, isocianatos o THPP (ácido beta[tris(hidroximetil)fosfino]propiónico). Es especialmente preferente el pentaeritritolpoli(etilenglicol)éter tetrasuccinimidil glutarato (= pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidil]pentanoato-2-polioxoetilenglicol]éter (= a NHS-PEG con peso molecular 10.000).

Grupos reactivos específicos de grupos carboxi son grupos amino en presencia de carbodiimidias.

Grupos reactivos específicos de grupos tiol son maleimidias y haloacetilos.

Un grupo reactivo específico de grupos hidroxilo 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 (homobifuncionales o heterobifuncionales) o más (homo/heterotrifuncionales o más).

En realizaciones especiales, el material es un polímero sintético que preferentemente comprende PEG. El polímero puede ser un derivado de PEG que comprende grupos laterales activos adecuados para la reticulación y adherencia a un tejido.

Gracias a los grupos reactivos, el polímero hidrófilo tiene la capacidad de reticular proteínas sanguíneas y también proteínas de la superficie del tejido. También es posible la reticulación del biomaterial.

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 particularmente preferente, el componente polimérico es pentaeritritolpoli(etilenglicol)éter tetrasuccinimidil glutarato (=COH102, también pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato-2-polioxoetilenglicol] éter).

En una realización preferente, la esponja de la presente invención comprende colágeno como biomaterial y el componente polimérico, por ejemplo COH102, está aplicado sobre la superficie del colágeno (= forma revestida). De forma especialmente preferente, el revestimiento es un revestimiento discontinuo, por ejemplo, tal como muestra la Fig. 6.

En otra realización preferente, el revestimiento es un revestimiento delgado continuo, tal como se obtiene, por ejemplo, pulverizando el componente polimérico de la masa fundida sobre la matriz de biomaterial. Un revestimiento de este tipo es comparable con una estructura de tipo película o cristal, por ejemplo tal como muestra la Fig. 7.

En otra realización preferente, la esponja de la presente invención comprende colágeno como biomaterial y el componente polimérico, por ejemplo COH102, está impregnado en el colágeno (= forma impregnada).

El peso molecular del componente polimérico oscila preferentemente entre 500 y 50.000, de forma especialmente preferente es de aproximadamente 10.000.

La cantidad de revestimiento de componente polimérico sobre la esponja de dicho biomaterial oscila entre aproximadamente 1 mg/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 20 mg/cm<sup>2</sup>, de forma especialmente preferente entre aproximadamente 2 mg/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 14 mg/cm<sup>2</sup> en el caso de la esponja revestida. La concentración de componente polimérico oscila preferentemente entre aproximadamente 5 mg/cm<sup>3</sup> y aproximadamente 100 mg/cm<sup>3</sup>, de forma especialmente preferente entre aproximadamente 10 mg/cm<sup>3</sup> y aproximadamente 70 mg/cm<sup>3</sup> en el caso de una esponja impregnada.

En otra realización preferente, la esponja de la presente invención comprende una combinación de formas impregnadas y revestidas. Además, la esponja de acuerdo con la presente invención mantiene la reactividad de los grupos reactivos del componente polimérico hidrófilo que comprende grupos reactivos al estar seca, por ejemplo con un contenido total en agua inferior al 10%, en especial inferior al 2% y en especial inferior al 1% en caso de que el componente polimérico tenga grupos reactivos hidrolizables, por ejemplo NHS-PEG. Contenidos mayores en agua (por ejemplo superiores al 10%) también resultarían en una esponja funcional, pero la estabilidad de almacenamiento sería peor. Por consiguiente, contenidos en agua por debajo del 2% (p/p) son preferentes, por debajo del 1% son incluso más preferentes; por debajo del 0,5% son particularmente preferentes.

En otra realización preferente está presente una capa adicional de otro biomaterial. La capa adicional puede ser del mismo biomaterial que la matriz o puede ser de un biomaterial diferente, por ejemplo la matriz de biomaterial es de colágeno y la capa adicional es de celulosa oxidada. También pueden estar incluidas todas las combinaciones de los biomateriales arriba mencionados.

La esponja en conjunto puede ser biodegradable, siendo adecuada para la descomposición *in vivo*, o biorreabsorbible, es decir, capaz de ser reabsorbida *in vivo*, por ejemplo mediante la degradación de proteasas presentes *in vivo* y grupos que son hidrolizables *in vivo*. El concepto "reabsorción completa" significa que no 25 queda ningún fragmento extracelular significativo. Un material biodegradable se diferencia de un material no biodegradable en que el material biodegradable se puede descomponer biológicamente en unidades que pueden ser eliminadas del sistema biológico y/o incorporadas químicamente al sistema biológico. En una realización preferente, el material particular, el material de matriz o la esponja en conjunto pueden ser degradados por un sujeto, en particular un sujeto humano, en menos de 6 meses, menos de 3 meses, menos de 1 mes o menos de 2 semanas.

La esponja puede contener además un activador o proactivador de la coagulación sanguínea, incluyendo fibrinógeno, trombina o un precursor de trombina, por ejemplo como se describe en la US 5.714.370 (incorporada aquí como referencia). Por trombina o precursor de la trombina se entiende una proteína que tiene actividad trombina y que induce

la actividad de la trombina cuando entra en contacto con sangre o tras ser aplicada a un paciente, respectivamente. Su actividad se expresa como actividad trombina (Unidad-NIH) o como actividad equivalente de trombina desarrollada por la correspondiente Unidad-NIH. La actividad de la esponja puede ser de 100 10.000, preferentemente 500 - 5.000. En lo que sigue, la actividad de trombina se entiende que comprende ambas, la actividad trombina o cualquier actividad equivalente.

5 Se puede seleccionar una proteína con actividad trombina de entre el grupo consistente en alfa-trombina, meizotrombina, un derivado de trombina o una trombina recombinante. Es posible seleccionar un precursor adecuado de entre el grupo consistente en: protrombina, factor Xa opcionalmente junto con fosfolípidos, factor IXa, complejo de protrombina activado, FEIBA, cualquier activador o un proactivador de la coagulación intrínseca o extrínseca, o mezclas de los mismos.

10 La esponja hemostática de la presente invención se puede emplear junto con otras sustancias fisiológicas. Por ejemplo, preferente la esponja comprende además sustancias farmacológicamente activas, entre ellas antifibrinolíticos, como un activador-inhibidor de plasminógeno o un inhibidor de plasmina o un inactivador de fibrinolíticos. Un antifibrinolítico preferente se selecciona de entre el grupo consistente en aprotinina o un derivado de aprotinina, alfa-2-macroglobulina, un inhibidor o inactivador de proteína C o proteína C activada, un sustrato mimético que se enlaza a plasmina que actúa competitivamente con sustratos naturales y un anticuerpo inhibidor de la actividad fibrinolítica.

15 Junto con la esponja según la invención puede emplear un antibiótico como sustancia farmacológicamente activa, tal como un antibacteriano o un antimicótico, preferentemente como un componente distribuido homogéneamente en la esponja. Además, también pueden estar presentes en la esponja de la invención otras sustancias bioactivas, como factores de crecimiento y/o agentes contra el dolor. Tales esponjas pueden ser útiles, por ejemplo, en la cicatrización de heridas.

20 Son preferentes otras combinaciones con enzimas o inhibidores enzimáticos específicos, los cuales pueden regular, esto es acelerar o inhibir, la reabsorción de la esponja. Entre éstas están la colagenasa, sus promotores o inhibidores. También puede emplearse un conservante junto con la esponja o estar contenido en ésta. Aunque una realización preferente se refiere al uso de la esponja hemostática que contiene el activador o proactivador de la coagulación sanguínea como único componente activo, también pueden estar incluidas otras sustancias que influyen en la velocidad de la coagulación sanguínea, en la hemostasis y en la calidad del sellado, por ejemplo en la resistencia a la tracción, la fuerza adhesiva (interna) y la durabilidad.

25 Pueden emplearse procoagulantes que favorecen o mejoran la coagulación intrínseca o extrínseca, tales como factores o cofactores de la coagulación sanguínea, factor XIII, factor tisular, complejo de protrombina, complejo de protrombina activado o partes de los complejos, un complejo de protrombinasa, fosfolípidos e iones de calcio, protamina. En caso de un procedimiento quirúrgico donde es necesario un sellado preciso, podría ser preferible prolongar el periodo de trabajo después de que esponja hemostática se ha aplicado al paciente y antes de que se afecte a la coagulación. La prolongación de la reacción de coagulación se asegura si la esponja según la invención comprende además inhibidores de la coagulación sanguínea en cantidades adecuadas. Son preferentes inhibidores tales como antitrombina III opcionalmente junto con heparina o cualquier inhibidor de la serina proteasa.

30 Es también preferente que estos aditivos, en particular trombina o un precursor de trombina, estén igualmente distribuidos en el material con el fin de evitar una inestabilidad local o la hipercoagulación del material. Incluso con un cierto contenido de agua, la actividad de la trombina es sorprendentemente estable, probablemente debido al contacto íntimo de la trombina y el colágeno en la mezcla homogénea. Sin embargo, de acuerdo con la invención, pueden emplearse estabilizadores de trombina, preferentemente seleccionados de entre el grupo consistente en un poliol, un polisacárido, un polialquilenglicol, aminoácidos o mezclas de los mismos. El uso por ejemplo de sorbitol, glicerol, polietilenglicol, polipropilenglicol, mono- o disacáridos como glucosa o sacarosa o cualquier azúcar o aminoácido sulfonado capaz de estabilizar la actividad trombina es preferente.

35 Otros ejemplos de aditivos que pueden emplearse según la presente invención incluyen sustancias tales como vasoconstrictores, antibióticos o fucoidanos.

40 Una esponja de la presente invención puede contener además un colorante, por ejemplo riboflavina, u otro colorante biocompatible conocido en el estado de la técnica. El colorante se puede incluir, por ejemplo, como capa adicional (revestimiento) y en especial puede ayudar al cirujano a identificar cuál de las superficies de una esponja revestida de la presente invención es la superficie activa o inactiva, respectivamente.

45 Preferentemente, la esponja de la presente invención tiene un espesor total inferior a 3 cm, preferentemente entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 3 cm, de forma especialmente preferente entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 2 cm, de forma totalmente preferente entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 2 mm.

50 En una esponja de la presente invención, preferentemente el espesor del revestimiento oscila entre aproximadamente 0,01 mm y aproximadamente 1 mm.

55 La esponja de la presente invención se utiliza preferentemente en cirugía mínimamente invasiva, por ejemplo para aplicación laparoscópica.

60

65

La esponja de puede secar y, después del secado, la esponja puede tener un contenido en agua de al menos 0,5 (los porcentajes se indican aquí en p/p). En determinadas realizaciones, la esponja se puede liofilizar o secar al aire.

5 La presente invención también proporciona una cobertura de heridas que incluye una esponja de acuerdo con la invención. La esponja y todas las capas adicionales se pueden suministrar en forma de una cobertura de heridas lista para el uso de dimensiones adecuadas. La esponja y/o la cobertura pueden consistir en una compresa o una lámina, preferentemente con un espesor de al menos 1 mm o al menos 2 mm, o al menos 5 mm y/o hasta 20 mm, dependiendo de la indicación. Cuando la esponja flexible relativamente gruesa se aplica a una herida, es importante que la sangre y el fibrinógeno puedan ser absorbidos por toda la esponja antes de que se forme fibrina, que podría actuar como una barrera para la absorción de más secreción de la herida.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir una esponja hemostática porosa (= proceso I), que comprende

- 15 a) proporcionar una esponja porosa que comprende una matriz de un biomaterial en forma seca,  
b) proporcionar un material polimérico reactivo en forma de polvo seco,  
c) poner en contacto a) y b) de modo que el material b) esté presente al menos en una superficie de dicha esponja, y  
d) fijar el material de b) sobre la esponja de a).

20 La fijación se puede conseguir fundiendo el componente polimérico sobre la esponja en un horno precalentado, por ejemplo a temperaturas entre 30°C y 80°C, preferentemente entre 60°C y 65°C, durante un período de tiempo suficiente para la fijación, por ejemplo, entre 1 minuto y 10 minutos, preferentemente durante aproximadamente 4 minutos. Alternativamente, la fijación se puede lograr mediante una lámpara de rayos infrarrojos y otra fuente de calor. La distancia entre la compresa y el calentador, la intensidad del calentador y el tiempo de exposición a la irradiación infrarroja se ajustan para lograr la fusión del revestimiento con un mínimo de exposición al calor.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para fabricar una esponja hemostática (= proceso II), que comprende

- 30 a) proporcionar una esponja porosa que comprende una matriz de un biomaterial en forma seca,  
b) proporcionar un único componente polimérico hidrófilo simple, dicho componente comprendiendo grupos reactivos electrófilos, donde dicho material grupo polimérico hidrofílico es un reticulante 20 hidrófilo en forma de solución, por ejemplo una solución acuosa con un pH inferior a 5, preferentemente de aproximadamente 3, o una solución anhidra basada en un disolvente orgánico, por ejemplo basada en etanol, acetona, cloruro de metileno y similares,  
35 c) poner en contacto a) y b) de modo que el material de a) se impregne con b), y  
d) secar el material obtenido en el paso c).

El contacto para lograr la impregnación se puede llevar a cabo disponiendo la solución polimérica sobre la esponja y dejando que la solución empape dicha esponja durante un tiempo suficiente para la absorción, por ejemplo entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente 30 minutos.

40 El secado puede incluir liofilización o secado al aire y comprende eliminar los componentes volátiles del fluido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una esponja hemostática obtenible mediante un método de fabricación de acuerdo con el proceso (I) o (II).

45 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una esponja de la presente invención para el tratamiento de una lesión seleccionada de entre el grupo consistente en una herida, una hemorragia, tejido dañado y/o tejido sangrante. Preferentemente, la esponja de la presente invención se utiliza para sellar tejidos, por ejemplo pulmón, bazo e hígado, y para la hemostasia.

50 El material compuesto de la presente invención también puede utilizarse como un sellante de tejido listo para el uso dondequiera que la concentración proteínica de los fluidos corporales sea lo suficientemente alta como para posibilitar la formación de un gel sellante tal como se describe más arriba.

55 La esponja de la presente invención está especialmente indicada en procedimientos quirúrgicos abiertos y endoscópicos/laparoscópicos/ toracoscópicos/MIS (cirugía mínimamente invasiva) como un complemento para 40 la hemostasia, para tratar hemorragias quirúrgicas, desde un sangrado lento hasta una hemorragia activa, cuando el control de la hemorragia por ligadura o los procedimientos convencionales son ineficaces o poco prácticos.

60 En una realización preferente, la esponja de la presente invención se aplica junto con una solución tampón, por ejemplo una solución tampón alcalina, como una solución de bicarbonato, tal como  $\text{NaHCO}_3$  al 8,4%, pH 8,3, 45 por ejemplo en una gasa.

65 Se ha comprobado que la velocidad de reacción aumenta después de la aplicación de una gasa impregnada con una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 8,4% en comparación con una gasa impregnada con una solución salina. Esto se constató mediante una mayor adherencia de la esponja con el tejido después de 2 minutos en el caso de la aplicación de  $\text{NaHCO}_3$ .

La presente invención proporciona además un *kit* que comprende una esponja según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una solución tampón, por ejemplo una solución tampón alcalina, como un bicarbonato o carbonato, junto con sus instrucciones de uso. La solución tampón alcalina tiene preferentemente un pH de aproximadamente 8, tal como 8,3.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un material hemostático compuesto que comprende un material hemostático insoluble en agua (matriz) y un reticulante polimérico hidrófilo con grupos reactivos, incluyendo dicho material compuesto poros que permiten que fluidos externos, en especial sangre humana, accedan al interior del mismo. El material hemostático puede ser cualquier material arriba mencionado como "matriz de un biomaterial" que ya tiene por sí mismo ciertas propiedades hemostáticas. En principio, en el estado actual de la técnica se conocen materiales de este tipo, así como sus propiedades hemostáticas. El material compuesto de acuerdo con la presente invención tiene poros que permiten que fluidos externos accedan a la parte interior del mismo, de modo que si se aplica por ejemplo a una herida, la sangre de esta herida puede penetrar en el material compuesto. El material compuesto se puede impregnar a través de estos poros. Ejemplos importantes en la práctica incluyen telas tejidas o no tejidas de una fibra hemostática. Preferentemente, este material hemostático es una esponja de colágeno, un tejido de celulosa regenerada oxidada, una esponja de fibrina o una esponja de gelatina. Específicamente es preferible que la esponja de colágeno sea esencialmente de colágeno nativo (es decir, la estructura de fibra de colágeno nativo se conserva en gran medida o se regenera mediante fibrilgénesis durante el procesamiento).

La reactividad del reticulante polimérico hidrófilo se conserva en el material compuesto de acuerdo con la presente invención. Esto significa que los grupos reactivos del reticulante todavía no han reaccionado con (la superficie de) el material hemostático y no han sido hidrolizados con agua. Esto se puede lograr combinando el material hemostático con el reticulante de modo que no se produzca ninguna reacción de los grupos reactivos del reticulante con el material hemostático o con agua, por ejemplo tal como se describe aquí mediante fusión, pulverización, impregnación bajo condiciones inertes, etc. Normalmente, esto incluye la supresión de condiciones acuosas (o la humectación), en especial la humectación sin la presencia de condiciones ácidas (si los reticulantes no son reactivos bajo condiciones ácidas). Esto posibilita la provisión de materiales hemostáticos reactivos. Preferentemente, el material compuesto de acuerdo con la presente invención contiene un polietilenglicol (PEG) como reticulante polimérico hidrófilo con grupos reactivos, en especial un PEG que incluye dos o más, preferentemente 4, grupos reactivos seleccionados de entre ésteres de succinimidilo ( $\text{CON}(\text{COCH}_2)_2$ ), aldehídos ( $-\text{CHO}$ ) e isocianatos ( $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ), de forma especialmente preferente ésteres de succinimidilo, como el componente COH102 tal como se define más abajo CoSeal®.

En una realización preferente, el material de matriz que forma la red porosa de la esponja constituye entre el 1 y el 50%, entre el 1 y el 10% o aproximadamente el 3% de la esponja porosa seca (% p/p).

En general, la matriz de un biomaterial, en especial el colágeno, de acuerdo con la presente invención no es soluble, en particular no es soluble en agua. No obstante, dado que la esponja es porosa y/o higroscópica, se puede hinchar cuando se junta con fluidos acuosos, en especial sangre, suero, plasma, etc. u otros fluidos presentes en heridas, y absorbe estos fluidos.

La esponja hemostática de acuerdo con la presente invención es absorbente de fluidos. El concepto "absorbente de fluidos" se ha de considerar como el proceso físico de retención de fluidos al entrar en contacto con ellos, que pueden provocar o no el hinchamiento de la esponja. Preferentemente, la esponja puede retener una cantidad de un fluido, en particular sangre, de al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 4 veces, o al menos 10 veces y/o hasta 100 veces, hasta 20 veces o hasta 10 veces el peso seco de la esponja. El material de la esponja de acuerdo con la presente invención puede absorber fluidos incluso bajo presión.

El material de la esponja porosa de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente un tamaño de poro de 5 a 500  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 10 a 200  $\mu\text{m}$ . Este tamaño de poro se puede ajustar apropiadamente durante la producción del biomaterial de la esponja, en especial dirigiendo de forma adecuada un proceso de secado durante dicha producción.

La esponja de acuerdo con la presente invención se suministra preferentemente en una forma "lista para el uso", de modo que se puede aplicar directamente a un paciente que la requiera, por ejemplo en una herida de este paciente (tras lo cual comienza la reticulación). Por consiguiente, la esponja de acuerdo con la invención se envasa en un envase estéril que la protege de la contaminación (por ejemplo por humedad o microorganismos) durante el almacenamiento. Antes de su uso, el envase se puede abrir (preferentemente también bajo condiciones estériles) y la esponja se puede aplicar directamente al paciente ("lista para el uso").

Tal como ya se ha mencionado, el componente polimérico hidrófilo es un reticulante hidrófilo. De acuerdo con una realización preferente, el 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, para algunas realizaciones puede ser preferible un polímero de 4 brazos (por ejemplo p-NP-PEG de 4 brazos). Con el mismo fundamento, un polímero de 8 brazos (por ejemplo NHS-PEG de 8 brazos) puede ser incluso más preferible para aquellas realizaciones donde resulte beneficiosa una reticulación multirreactiva. Además, el reticulante hidrófilo de acuerdo con la presente invención es un polímero, es decir, una molécula grande (macromolécula) compuesta por unidades estructurales repetitivas que

normalmente 5 están unidas por enlaces químicos covalentes. Los polímeros de acuerdo con la presente invención deberían tener un peso molecular de al menos 1.000 Da (para que sirvan adecuadamente como reticulantes para la esponja de acuerdo con la presente invención). Preferentemente, los polímeros reticulantes de acuerdo con la presente invención tienen un peso molecular de al menos 5.000 Da, en especial de al menos 8.000 Da.

Para 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, adicionalmente se pueden suministrar iones carbonato o bicarbonato (por ejemplo como un tampón con un pH 7,6 o superior, preferentemente 8,0 o superior, en especial 8,3 y superior) en el sitio de administración (por ejemplo en forma de una solución tampón o como una tela o compresa impregnada con un tampón de este tipo), para lograr un mayor rendimiento de la esponja de acuerdo con la presente invención o para posibilitar un uso eficiente como material hemostático y/o adherente a las heridas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Eficiencia hemostática de una compresa de colágeno revestida con NHS-PEG.

Se produce una compresa hemostática de acuerdo con el ejemplo 2 y se reviste con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 (tal como se 20 define más abajo). La eficiencia hemostática se evalúa de acuerdo con el animal tal como se describe más abajo. La hemorragia se detiene 2 minutos después de la aplicación de la compresa. No se observan nuevas hemorragias.

Figura 2: Eficiencia hemostática de una compresa de colágeno revestida con NHS-PEG.

Se produce una compresa hemostática de acuerdo con el ejemplo 3 y se impregna con 8 mg/cm<sup>2</sup> de COH102. La eficiencia hemostática se evalúa de acuerdo con el animal tal como se describe más abajo. La hemorragia se detiene 2 minutos después de la aplicación de la compresa. No se observan nuevas hemorragias.

Figura 3: Eficiencia hemostática de una compresa de colágeno que incluye tela de celulosa oxidada revestida con NHS-PEG.

Se produce una compresa hemostática de acuerdo con el ejemplo 5 y se reviste con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102. La eficiencia hemostática se evalúa de acuerdo con el animal tal como se describe más abajo. La hemorragia se detiene 2 minutos después de la aplicación de la compresa. No se observan nuevas hemorragias.

Figura 4: Eficiencia hemostática de una tela de celulosa oxidada revestida con NHS-PEG.

Se produce una compresa hemostática de acuerdo con el ejemplo 6 y se reviste con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102. La eficiencia hemostática se evalúa de acuerdo con el animal tal como se describe más abajo. La hemorragia se detiene 2 minutos después de la aplicación de la compresa. No se observan nuevas hemorragias.

Figura 5: Eficiencia hemostática de una compresa de colágeno que incluye fucoídano como sustancia reforzadora de la hemostasia, revestida con NHS-PEG.

Se produce una compresa hemostática de acuerdo con el ejemplo 7 y se reviste con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102. La eficiencia hemostática se evalúa de acuerdo con el animal tal como se describe más abajo. La hemorragia se detiene 2 minutos después de la aplicación de la compresa. No se observan nuevas hemorragias.

Figura 6: Imagen de microscopía de barrido electrónico (aumento: x500) de la superficie de una esponja de colágeno con revestimiento discontinuo.

Figura 7: Imagen de microscopía de barrido electrónico (aumento: x500) de la superficie de una esponja de colágeno con revestimiento continuo.

Figura 8: Gelfoam revestido con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 en el modelo de abrasión de lóbulo hepático.

Figura 9: Chitoskin revestido con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 en el modelo de abrasión de lóbulo hepático.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, sin limitarse a los mismos.

En las siguientes secciones se utilizan las siguientes abreviaturas:

TCA	tiempo de coagulación activada
AcOH	ácido acético
NaOAc	acetato de sodio
ac.	acuoso
COH102	pentaeritritolpoli(etilenglicol)éter tetrasuccinimidil glutarato = pentaeritritol tetraquis[1-1'-oxo-5'-succinimidilpentanoato-2-poli-oxoetilenglicol]éter (= un NHS-PEG con peso molecular 10.000)
EtOH	etanol

PEG	polietilenglicol
PET	tereftalato de polietileno
min	minutos
NHS-PEG-NHS	$\alpha$ -[6-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-6-oxohexil]- $\omega$ -[6-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-6-oxohexiloxi]polioxietileno
NHS-PEG de 8 brazos	hexaglicerol octa(succinimidiloxiglutaril)polioxietileno
p-NP-PEG de 4 brazos	pentaeritrioltetra(4-nitrofenoxicarbonil) polioxietileno
CHO-PEG-CHO	aldehído-polietilenglicol homobifuncional
epoxi-PEG-epoxi	epoxi-polietilenglicol homobifuncional
epoxi-PEG de 4 brazos	epoxi-polietilenglicol homomultifuncional
ISC-PEG-ISC	isocianato-polietilenglicol homobifuncional
AA-dextrano	dextrano activado con aldehído
DSS	suberato de disuccinimidilo
EGS	éster N-hidroxisuccinimida de ácido etilenglicol-bis(succínico)

### Ejemplos

5 Modelo de hemostasia animal para analizar la eficacia de compresas hemostáticas de la presente invención (modelo de abrasión superficial hepática)

10 La eficacia de las compresas hemostáticas de la presente invención se analiza en un modelo de abrasión superficial del hígado en cerdos heparinizados (2 x TCA). Con una herramienta de abrasión giratoria redonda y plana se crea una herida sangrante circular (1,8 cm de diámetro) sobre la superficie del hígado. Sobre la herida sangrante se aplica una compresa de la presente invención (tamaño 3 x 3 cm) en su estado seco y se mantiene sujeta ejerciendo una ligera presión con una gasa humedecida con solución salina durante 2 minutos. Después se evalúa la eficacia para detener la hemorragia.

#### Ejemplo 1: Preparación de una suspensión de colágeno bovino

15 50 g de corion bovino rebanado se dispersan en 500 ml de una solución de NaOH y la dispersión se agita durante aproximadamente 90 minutos a 25°C. El corion se retira por tamizado y se lava con H<sub>2</sub>O destilada hasta que el H<sub>2</sub>O efluente alcanza un pH de aproximadamente 8,0. Las rebanadas de corion lavadas se resuspenden en H<sub>2</sub>O y el pH se ajusta con HCl a aproximadamente 2,0. La suspensión obtenida se agita 35 durante una noche a aproximadamente 25°C y se obtiene una solución de colágeno. La solución obtenida se enfría a 5°C y el pH se ajusta con NaOH a un valor neutro.

20 La precipitación del colágeno se lleva a cabo durante una noche manteniendo la solución a 18°C sin agitación. El colágeno precipitado obtenido se separa por filtración. La concentración de colágeno del material obtenido se determina por gravimetría. Opcionalmente se puede llevar a cabo una reticulación química con glutaraldehído preparando una suspensión acuosa de colágeno al 1% y añadiendo 5.000 ppm de glutaraldehído a 12°C. La suspensión obtenida se agita durante una noche. El colágeno reticulado obtenido se filtra y se lava con H<sub>2</sub>O. La concentración de colágeno del material

25 obtenido se determina tal como se describe más arriba.

#### Ejemplo 2: Compresa de colágeno revestida con NHS-PEG

30 Se distribuye homogéneamente polvo COH102 sobre una superficie de una esponja de colágeno comercial (Matristypt®, Dr. Suwelack Skin- and Healthcare, Alemania, grosor 1 mm o 2 mm). Para el revestimiento se utiliza COH102 en cantidades de 2 mg/cm<sup>2</sup>, 7 mg/cm<sup>2</sup>, 10 mg/cm<sup>2</sup>, 14 mg/cm<sup>2</sup>, 20 mg/cm<sup>2</sup>. El polvo de COH102 se fija sobre la superficie de la esponja por fusión. La fusión se lleva a cabo a una temperatura de 60°C a 65°C durante 4 minutos, disponiendo la esponja con la mezcla de polvo de PEG en un horno precalentado.

35 La esponja seca obtenida se sella junto con un sobre de desecante en una bolsa impermeable a los gases y se esteriliza por irradiación y a 25 kGray.

#### Ejemplo 3: Compresa de colágeno impregnada con NHS-PEG

40 Se preparan soluciones ácidas acuosas (pH 3,0, AcOH) de COH102 con concentraciones de 10 mg/cm<sup>3</sup>, 20 mg/cm<sup>3</sup>, 30 mg/cm<sup>3</sup> y 40 mg/cm<sup>3</sup> y se cargan en bandejas de PET de 9 x 7 cm. Se disponen de colágeno bovino comerciales (Matristypt®), 9 x 7 x 0,1 o 0,2 cm, con el mismo volumen que la solución de COH102 previamente cargada sobre las soluciones para su impregnación durante 20 minutos. La solución de COH102 es absorbida y el material colágeno obtenido se liofiliza. Las esponjas obtenidas se pueden revestir adicionalmente con COH102 tal como se describe en el

45 ejemplo 2.

Después de la liofilización y/o el revestimiento, cada esponja seca obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases y se esteriliza por irradiación y a 25 kGray.

#### 50 Ejemplo 4: Compresa de colágeno que contiene polvo de celulosa oxidada revestida con NHS-PEG

0,5 g o 1 g de polvo Traumastem® P (Bioster, República Checa) se distribuye de forma homogénea en 22 ml de suspensión

acuosa de colágeno neutra (2,15 mg/ml; 4,3 mg/ml y 10 mg/ml) producida de acuerdo con el ejemplo 1. La mezcla obtenida se carga en bandejas de PET planas de 9 x 7 cm y se liofiliza. El velo obtenido tiene un grosor de aproximadamente 3-4 mm y está revestido con COH102 tal como se describe en el ejemplo 2.

5 Después del revestimiento, cada esponja seca obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases y se esteriliza por irradiación y a 25 kGray.

**Ejemplo 5: Compresa de colágeno que contiene tela de celulosa oxidada revestida con NHS-PEG**

10 Una tela ligera de 6 x 5 cm de Traumastem® TAF (Bioster, República Checa) se sumerge en una suspensión de colágeno bovino al 1% tal como se describe en el ejemplo 1. La tela de celulosa oxidada de 6 x 5 cm retiene aproximadamente 6 g de la suspensión de colágeno. Se obtiene una tela impregnada con la suspensión de colágeno, que se deposita en una bandeja y se liofiliza. El velo obtenido tiene un espesor de 3-4 mm y se reviste con COH102 tal como se describe en el ejemplo 2.

15 Después del revestimiento, cada esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases y se esteriliza por irradiación y a 25 kGray.

**Ejemplo 6: Tela de celulosa oxidada revestida con NHS-PEG**

20 Una capa doble de velo Traumastem® P (Bioster, República Checa) se reviste con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 tal como se describe en el ejemplo 2. La compresa obtenida tiene un espesor de aproximadamente 1-2 mm.

**Ejemplo 7: Compresa de colágeno que contiene fucoidano como sustancia reforzadora de la hemostasia revestida con NHS-PEG**

25 Una esponja de colágeno bovino Matristypt® (9 x 7 x 0,2 cm) se impregna con el mismo volumen de una solución de Fucoidano de *A. nodosum* (10 mM y 200 mM en solución de Ca<sup>2+</sup> 40 mM) y se liofiliza. La esponja obtenida se reviste con COH102 tal como se describe en el ejemplo 2.

**Ejemplo 8: Compresa de colágeno que contiene trombina como sustancia reforzadora de la hemostasia revestida con NHS-PEG**

30 Una esponja de colágeno bovino Matristypt® (9 x 7 x 0,2 cm) se impregna con el mismo volumen de una solución de trombina (500 IU/ml) y se liofiliza. La esponja obtenida se reviste con COH102 tal como se describe en el ejemplo 2.

**Ejemplo 9: Eficacia de sellado de una compresa de colágeno revestida con NHS-PEG**

35 Se produce una compresa hemostática revestida con 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 de acuerdo con el ejemplo 2. En el pulmón de un cerdo se realiza una lesión de aproximadamente 1,5 a 2 cm de diámetro con un escalpelo. Sobre la herida se aplica una muestra de 3 x 3 cm de dicha compresa y se sujeta ejerciendo una ligera presión con ayuda de una gasa durante 2 minutos. La gasa se humedece previamente con una solución salina o de bicarbonato básica (pH 8,3). Después de la aplicación, la compresa está firmemente adherida a la superficie del pulmón (véase la Figura 6). La velocidad a la que se obtiene la adherencia aumenta al utilizar una gasa humedecida con bicarbonato. Para controlar la estanqueidad al aire y la adherencia de la compresa con el tejido, el pecho se rellena con solución de Ringer después de 10 minutos. No se observa ninguna fuga de gas o desprendimiento de la compresa.

**Ejemplo 10: Eficacia de sellado de una compresa de colágeno impregnada con NHS-PEG**

40 Se produce una compresa hemostática impregnada con 40 mg/cm<sup>3</sup> de COH102 de acuerdo con el ejemplo 3.

45 En el pulmón de un cerdo se realiza una lesión de aproximadamente 1,5 a 2 cm de diámetro con un escalpelo. Sobre la herida se aplica una muestra de 3 x 3 cm de dicha compresa y se sujeta ejerciendo una ligera presión con ayuda de una gasa durante 2 minutos. La gasa se humedece previamente con una solución salina de bicarbonato básica (pH 8,3). Después de la aplicación, la compresa está firmemente adherida a la superficie del pulmón. La estanqueidad al aire y la adherencia de la compresa con el tejido se determinan tal como se describe en el ejemplo 9.

**Ejemplo 11: Marcado con color de una superficie de la compresa**

50 Una plantilla hecha con una placa de acero inoxidable (1 mm de grosor) con un patrón de agujeros se dispone sobre una cara de una esponja de colágeno de 1 o 2 mm de espesor (Matristypt®, Dr. Suwelack Skin- and Healthcare, Alemania). Los agujeros de la plantilla tienen un diámetro de 2 mm y están situados a una distancia de 1 cm entre sí en los nodos de un retículo cuadrado vertical. Sobre los agujeros de la plantilla se pulveriza una solución acuosa de Erioglaucine al 0,5% (Fluka, Suiza) con un aerógrafo. Después se retira la plantilla y la lámina de colágeno con el patrón de puntos azules obtenida se seca en atmósfera ambiente, en un horno de vacío o en un desecador. El patrón de puntos en un lado tiene la función de distinguir la superficie activa y la superficie inactiva de una compresa revestida. El revestimiento se puede

aplicar sobre la cara con puntos o sobre la cara sin puntos.

**Ejemplo 12: Preparación de un velo de fibrina**

5 Una solución de 2,5 mg/ml de fibrinógeno, Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y un volumen igual de 55 IU de trombina/ml, CaCl<sub>2</sub> 10 mM se mezclan utilizando una mezcladora estática e inmediatamente se cargan en una bandeja con una altura de 0,7 cm. Se obtiene así un coágulo de fibrina en la bandeja. Mediante liofilización del coágulo se obtiene un velo de fibrina.

10 **Ejemplo 13: Preparación de una compresa de colágeno revestida con NHS-PEG-NHS y análisis de la misma en un modelo animal**

15 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm (producida tal como se describe en el ejemplo 11) se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> y 28 mg/cm<sup>2</sup> de NHS-PEG-NHS bifuncional (peso molecular 10.000, NOF Corporation, Japón) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a aproximadamente 70°C durante 4 minutos colocando la esponja revestida con el polvo de PEG en un horno precalentado.

Las esponjas obtenidas se sellan junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

20 El rendimiento hemostático de dichas compresas se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

25 **Ejemplo 14: Preparación de una compresa de colágeno revestida con NHS-PEG de 8 brazos y análisis de la misma en un modelo animal**

30 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de NHS-PEG de 8 brazos (peso molecular 15.000, NOF Corporation, Japón) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 65°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

35 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

40 **Ejemplo 15a: Preparación de una compresa de colágeno revestida con p-NP-PEG de 4 brazos y análisis de la misma en un modelo animal**

45 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de p-NP-PEG de 4 brazos (peso molecular 10.000, NOF Corporation, Japón) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 65°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

50 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido no es suficiente.

**Ejemplo 15b: Preparación de una compresa de colágeno revestida con p-NP-PEG de 4 brazos y análisis de la misma en un modelo animal**

55 El rendimiento hemostático de la compresa preparada en el Ejemplo 15a se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba, pero modificado de modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato de Na al 8%. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

60 **Ejemplo 16a: Preparación de una compresa de colágeno revestida con CHO-PEG-CHO y análisis de la misma en un modelo animal**

65 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 9,5 mg/cm<sup>2</sup> de CHO-PEG-CHO (peso molecular 3.400, Interchim, Francia) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 70°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

5 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 16b: Preparación de una compresa de colágeno revestida con CHO-PEG-CHO y análisis de la misma en un modelo animal**

10 El rendimiento hemostático de la compresa preparada en el Ejemplo 16a se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba, pero modificado de modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato de Na. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 17a: Preparación de una compresa de colágeno revestida con epoxi-PEG-epoxi y análisis de la misma en un modelo animal**

20 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 9,5 mg/cm<sup>2</sup> de epoxi-PEG-epoxi (peso molecular 3.400, Interchim, Francia) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 70°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

25 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos no se logra la hemostasia. La adherencia de la compresa sobre el tejido no es suficiente.

**Ejemplo 17b: Preparación de una compresa de colágeno revestida con epoxi-PEG-epoxi y análisis de la misma en un modelo animal**

30 El rendimiento hemostático de la compresa preparada en el Ejemplo 17a se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba, pero modificado de tal modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato de Na. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 5 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 18: Preparación de una compresa de colágeno revestida con epoxi-PEG de 4 brazos y análisis de la misma en un modelo animal**

40 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de epoxi-PEG de 4 brazos (peso molecular 10.000, Interchim, Francia) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 70°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

50 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba, pero modificado de modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato de Na. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 5 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 19: Preparación de una compresa de colágeno revestida con ISC-PEG-ISC y análisis de la misma en un modelo animal**

55 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 9,5 mg/cm<sup>2</sup> de ISC-PEG-ISC (peso molecular 3.400, Interchim, Francia) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 70°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

60 La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

65 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 20: Preparación de una compresa de colágeno revestida con AA-dextrano y análisis de la 20 misma en un modelo animal**

5 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de una mezcla de 0,1 mg/cm<sup>2</sup> de AA-dextrano (peso molecular 40.000, Pierce, EEUU) y 13,9 mg/cm<sup>2</sup> de PEG no sustituido (peso molecular 10.000, Sigma Aldrich, Alemania) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 80°C durante 4 minutos colocando la esponja con la mezcla de polvo en un horno precalentado.

10 La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

15 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de lóbulo hepático tal como se describe más arriba, pero modificado de modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato de Na. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 21a: Preparación de una compresa de colágeno revestida con DSS y análisis de la misma en un modelo animal**

20 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 20 mg/cm<sup>2</sup> de una mezcla 1:1 de DSS (peso molecular 368,35, Sigma Aldrich, Alemania) y PEG no sustituido (peso molecular 10.000, Sigma Aldrich, Alemania) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 80°C durante 4 minutos colocando la esponja con la mezcla de polvo en un horno precalentado.

25 La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de lóbulo hepático tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos no se logra la hemostasia. La adherencia de la compresa sobre el tejido no es suficiente.

**Ejemplo 21b: Preparación de una compresa de colágeno revestida con DSS y análisis de la misma en un modelo animal**

35 El rendimiento hemostático de la compresa preparada en el Ejemplo 21a se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de lóbulo hepático tal como se describe más arriba, pero modificado de modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 22a: Preparación de una compresa de colágeno revestida con EGS y análisis de la misma en un modelo animal**

45 Sobre el lado no coloreado de una compresa de colágeno de 6 x 6 cm, producida tal como se describe en el ejemplo 11, se distribuyen homogéneamente 26 mg/cm<sup>2</sup> de una mezcla 1:1 de EGS (peso molecular 456,36, Sigma Aldrich, Alemania) y PEG no sustituido (peso molecular 10.000, Sigma Aldrich, Alemania) y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 80°C durante 4 minutos colocando la esponja con la mezcla de polvo en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

50 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de lóbulo hepático tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos no se logra la hemostasia. La adherencia de la compresa sobre el tejido no es suficiente.

**Ejemplo 22b: Preparación de una compresa de colágeno revestida con EGS y análisis de la misma en un modelo animal**

55 El rendimiento hemostático de la compresa preparada en el Ejemplo 22a se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de lóbulo hepático tal como se describe más arriba, pero modificado de modo que la compresa se aplica con una gasa previamente humedecida con una solución básica de bicarbonato de Na. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 23: Velo de fibrina revestido con NHS-PEG**

65 Sobre un lado del velo de fibrina producido tal como se describe en el ejemplo 12 se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 65°C durante 4 minutos colocando la esponja revestida con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

5 El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos. La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

**Ejemplo 24: Correlación entre la fuerza de adherencia al tejido y el reticulante utilizado para el revestimiento de la compresa de colágeno**

10

Después de aplicar las compresas sobre el tejido sangrante en el modelo de abrasión de hígado se evalúa la adherencia de la compresa sobre el tejido hepático. Con la parte lateral de un fórceps se aplica una ligera fuerza tangencial. Se considera que existe adherencia (unión al tejido) si no es posible desplazar la compresa del lugar de aplicación. Puntuación de adherencia: 1 = el desplazamiento no es posible 5 minutos después de la aplicación; 2 = el desplazamiento no es posible 10 minutos después de la aplicación; 3 = desplazamiento (sin adherencia) 10 minutos después de la aplicación.

15

Ej. nº	Reticulante	Puntuación de adherencia
13	NHS-PEG-NHS	1
14	NHS-PEG de 8 brazos	1
15a	p-NP-PEG de 4 brazos	3
15b	p-NP-PEG de 4 brazos - aplicación básica	2
16a	CHO-PEG-CHO	1
16b	CHO-PEG-CHO - aplicación básica	2
17a	Epoxi-PEG-epoxi	3
17b	Epoxi-PEG-epoxi - aplicación básica	2
18	Epoxi-PEG de 4 brazos - aplicación básica	2
19	ISC-PEG-ISC	1
20	AA-dextrano - aplicación básica	1
21a	DSS	3
21b	DSS - aplicación básica	2
22a	EGS	3
22b	EGS - aplicación básica	2

**Ejemplo 25: Esponja de quitosano/gelatina revestida con NHS-PEG y análisis de la misma en un modelo animal**

20

Sobre una esponja de quitosano/gelatina comercial (Chitoskin®, Beese Medical, Alemania) se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a 65°C durante 4 minutos colocando la esponja con el polvo de PEG en un horno precalentado.

25

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

El rendimiento hemostático de dicha compresa se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 2 minutos se logra la hemostasia. No se observa ninguna nueva hemorragia después de 10 minutos (Figura 9). La adherencia de la compresa sobre el tejido es suficiente.

30

**Ejemplo 26: Preparación de una compresa de gelatina revestida con NHS-PEG y análisis de la misma en un modelo animal**

35

Sobre una esponja de gelatina comercial (Gelfoam®, Pfizer, EEUU) se distribuyen homogéneamente 14 mg/cm<sup>2</sup> de COH102 y se fijan por fusión. Esto se lleva a cabo a aproximadamente 70°C durante 4 minutos colocando las esponjas revestidas con el polvo de PEG en un horno precalentado.

La esponja obtenida se sella junto con un sobre que contiene desecante en una bolsa impermeable a los gases.

40

El rendimiento hemostático de dichas compresas se analiza en cerdos mediante el modelo de abrasión de hígado tal como se describe más arriba. Después de 10 minutos no se logra la hemostasia debido a una falta de adherencia sobre el tejido y a una absorción lenta del líquido por la esponja.

**Ejemplo 27: Velocidad de absorción de agua**

## ES 2 971 671 T3

Una pieza de 2 x 2 cm de una esponja de colágeno seca (Matristypt®, Dr. Suwelack, Alemania) o de una esponja de gelatina reticulada seca (Gelfoam®, Pfizer) se disponen sobre la superficie de H<sub>2</sub>O destilada en un vaso de precipitados. Las esponjas secas flotan sobre la superficie del agua y absorben agua a través de la superficie de contacto de 2 x 2 cm.

5 Después de 6 segundos, la esponja Matristypt® está totalmente impregnada con H<sub>2</sub>O y se retira de la superficie del agua. La esponja Gelfoam®, más gruesa, no está totalmente impregnada con H<sub>2</sub>O después de 13 segundos, pero se retira de la superficie del agua después de 13 segundos. A partir de los pesos de las esponjas de 2 x 2 cm antes y después del contacto con la superficie del agua, del tiempo de contacto con la superficie del agua y del área de contacto con la superficie del agua se calculan las velocidades iniciales de absorción de agua de las esponjas (en mg de agua/s) por

10 superficie de contacto (en cm<sup>2</sup>). Las velocidades iniciales de absorción de agua son de 35 mg x cm<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> en el caso de la esponja Matristypt® y de 0,8 mg x cm<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> en el caso de la esponja Gelfoam®.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Material compuesto hemostático que comprende un material hemostático y un reticulante polimérico hidrófilo simple, dicho reticulante tiene grupos reactivos electrófilos, dicho material compuesto comprende poros que permiten el acceso de fluidos externos, especialmente sangre humana, a dicho material compuesto, en donde dicho material hemostático es una tela no tejida o tejida de una fibra hemostática, en donde dicho reticulante es un polímero de óxido de polialquileno; en donde dicho reticulante está recubierto sobre la superficie de dicho material hemostático; y en donde el espesor de este recubrimiento es de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 1 mm.
- 10 2. El material compuesto hemostático de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho material hemostático es una tela de celulosa oxidada.
- 15 3. El material compuesto hemostático de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho reticulante polimérico hidrófilo con grupos reactivos electrófilos es un polietilenglicol (PEG), preferiblemente un PEG que comprende dos o más reactivos de succinimidilésteres (-CON(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), aldehídos (-CHO) e isocianatos (-N=C=O), de manera especialmente preferible succinimidilésteres.

Figura 1

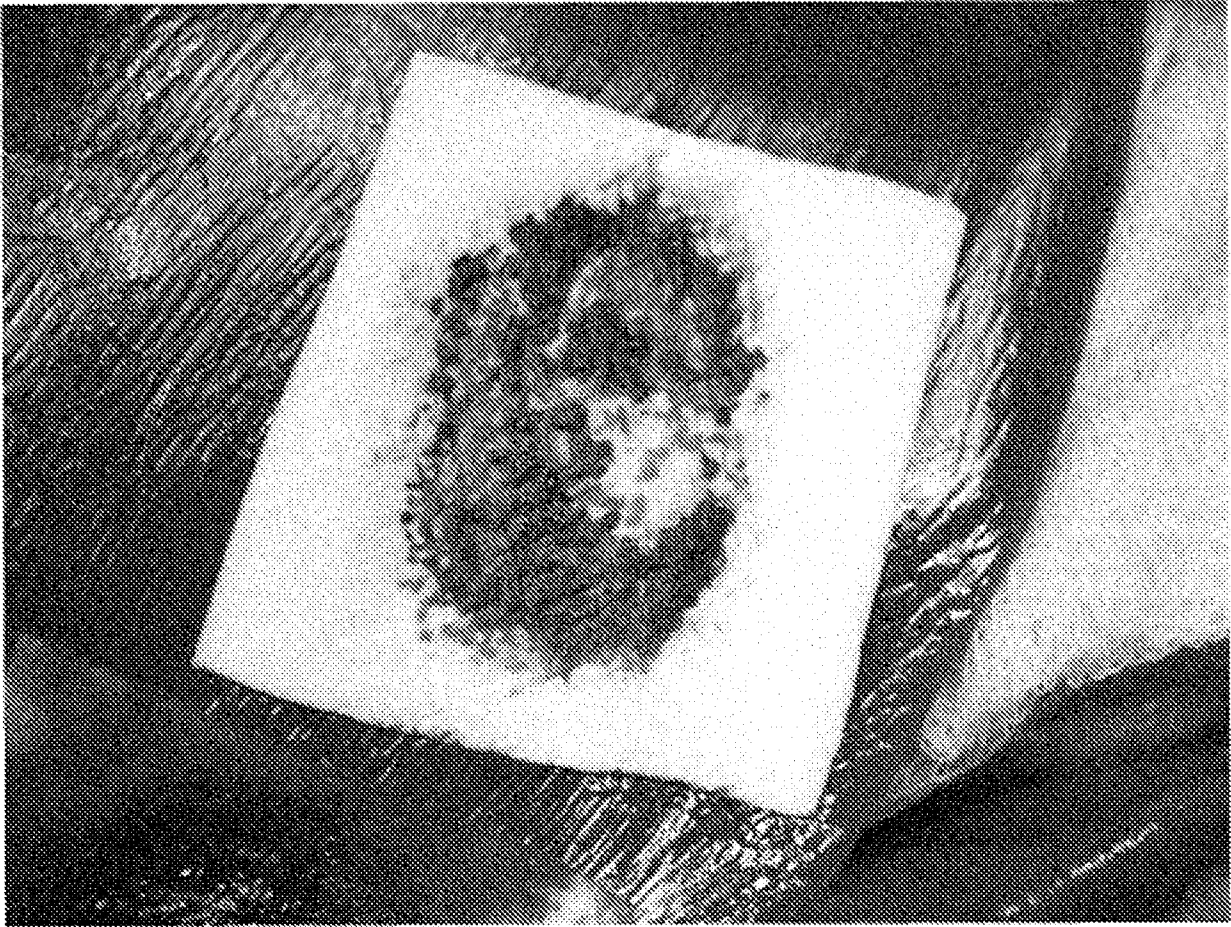


Figura 2

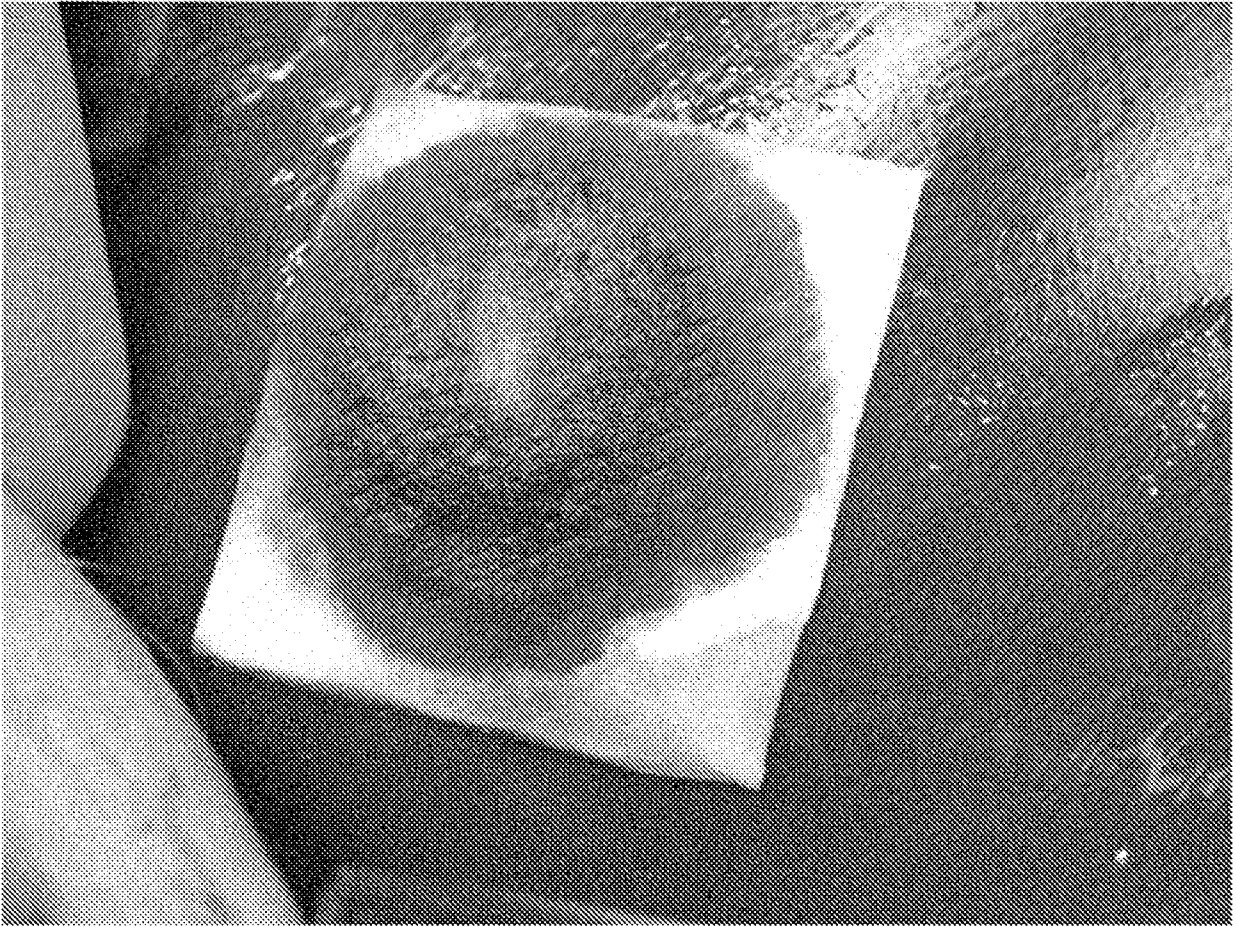


Figura 3

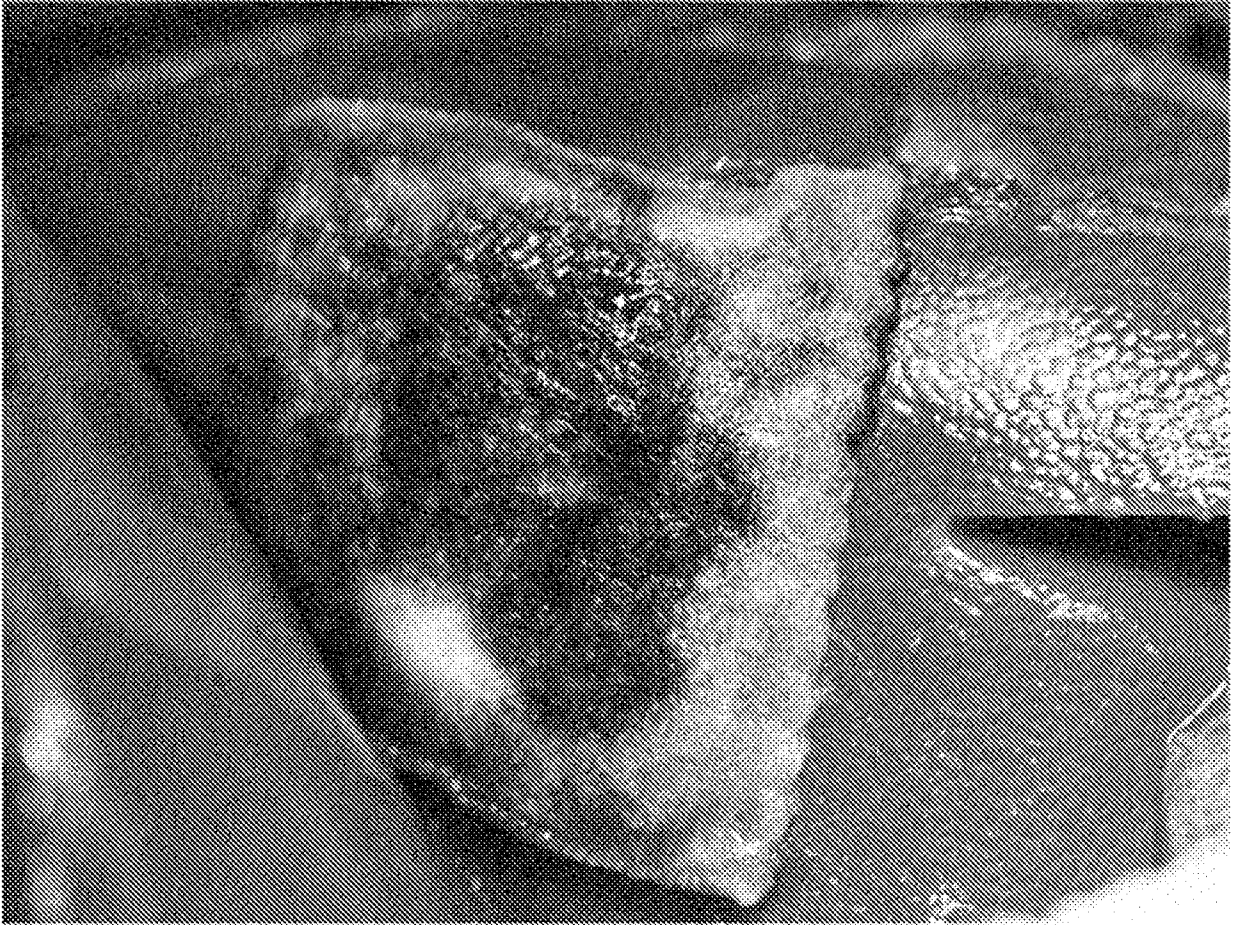


Figura 4

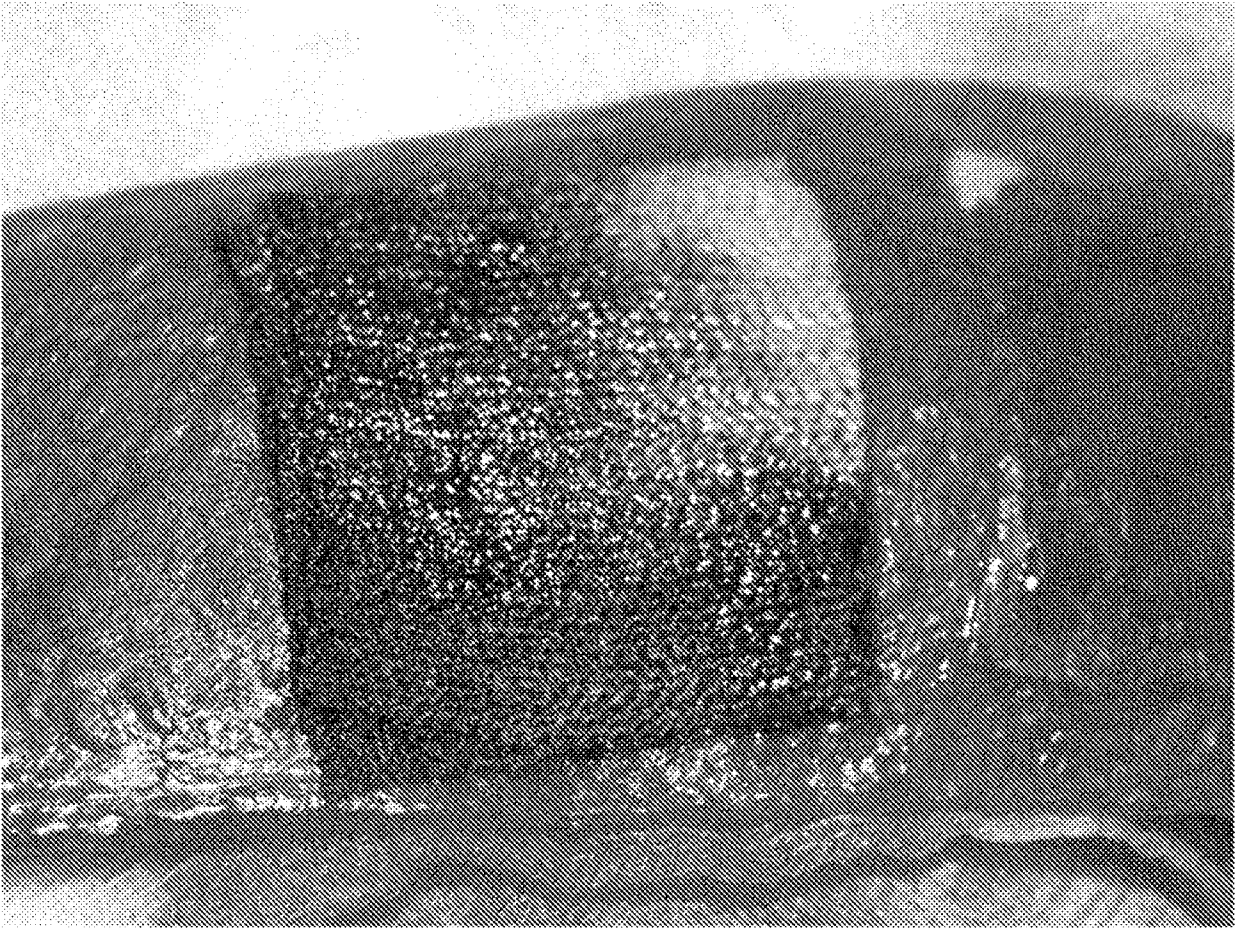


Figura 5

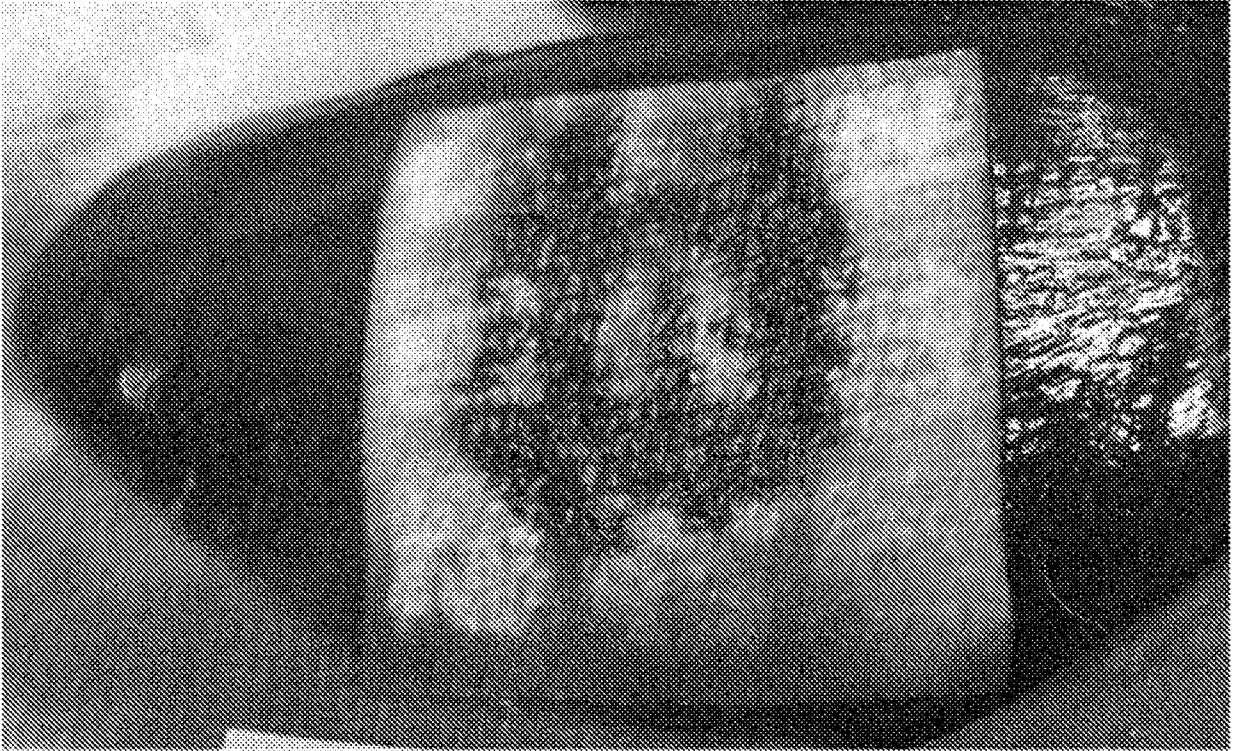


Figura 6

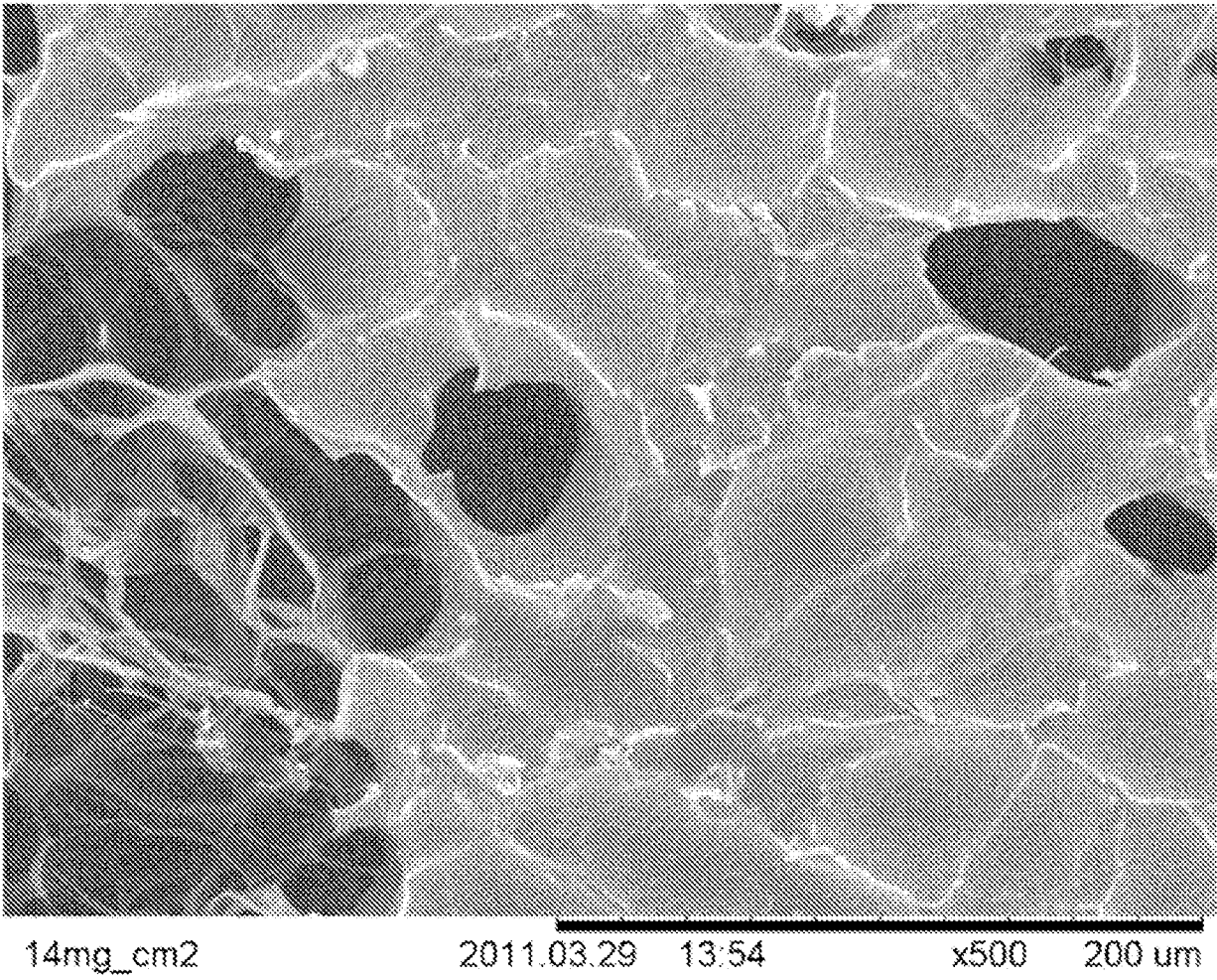


Figura 7

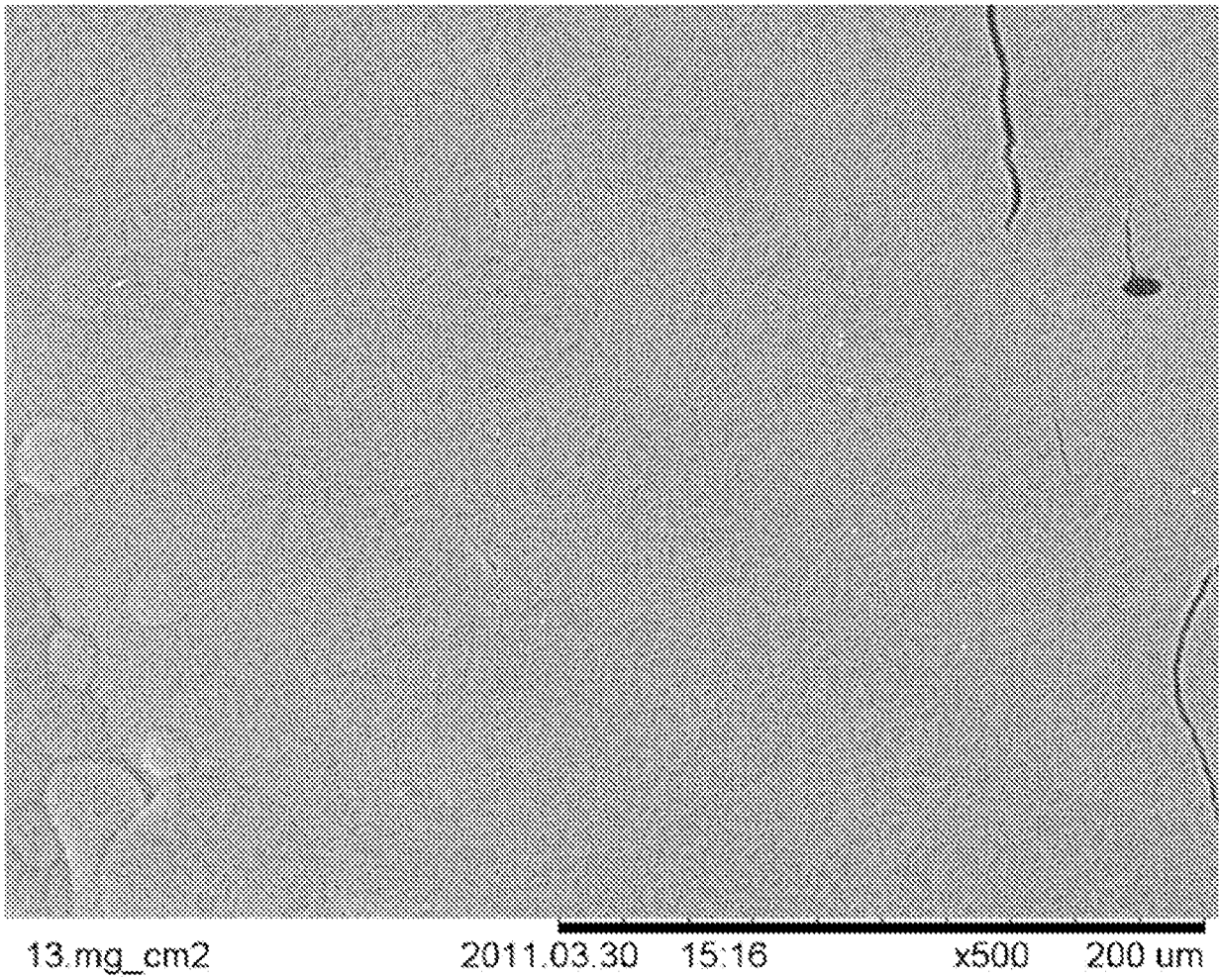


Figura 8

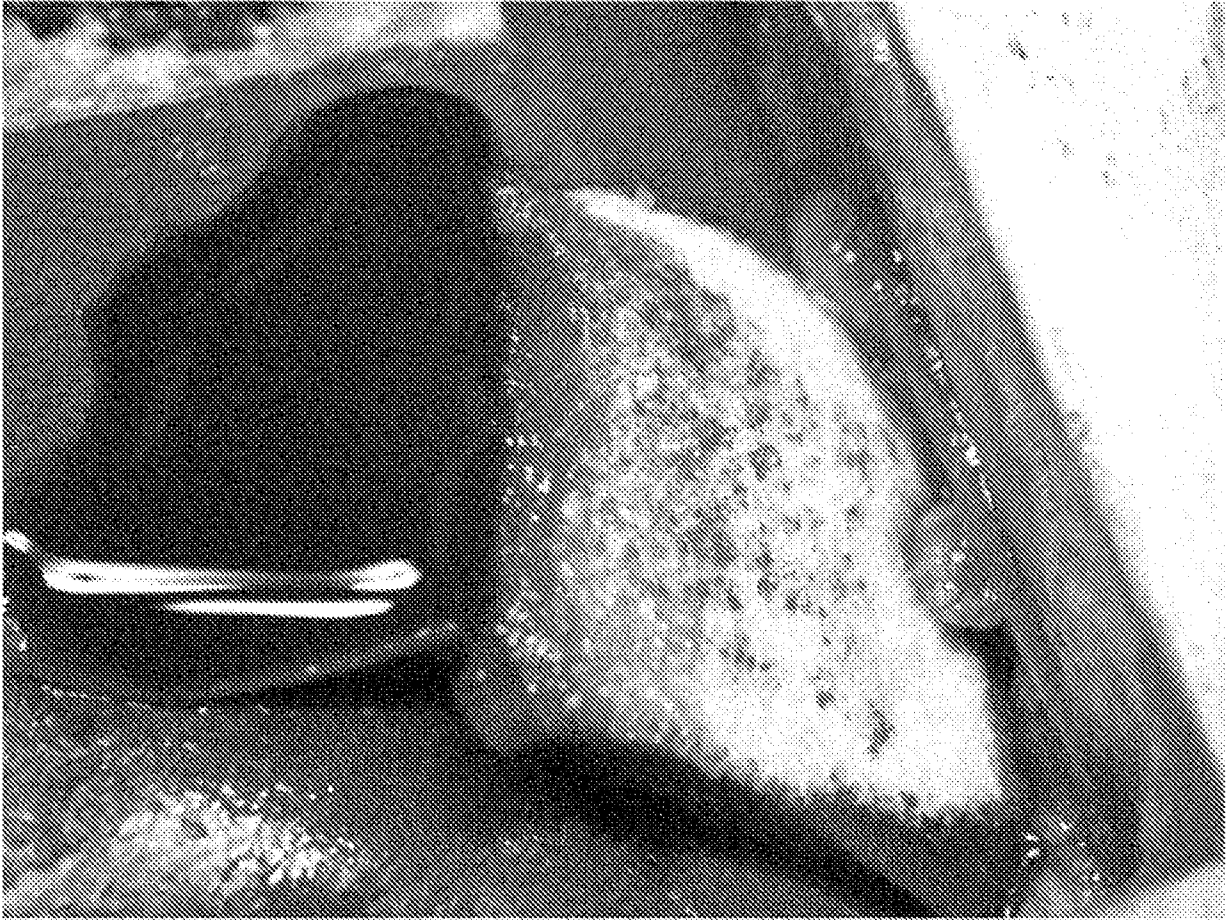


Figura 9

