

COMPOSICIÓN HEMOSTÁTICA QUE COMPRENDE UN INTERCAMBIADOR DE ANIONES Y UNA SAL DE CALCIO

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona con el campo de las composiciones hemostáticas. Más particularmente, la invención se relaciona con composiciones hemostáticas que comprenden un intercambiador de aniones y calcio; y métodos de uso de estas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Sangrado es el término usado comúnmente para describir el escape de sangre del sistema circulatorio de un vertebrado. El sangrado puede ocurrir dentro del cuerpo (sangrado interno) o fuera del cuerpo (sangrado externo). El sitio de sangrado puede ser en casi cualquier área del cuerpo. Típicamente, el sangrado interno ocurre cuando la sangre se filtra a través del daño a un vaso sanguíneo u órgano. El sangrado externo
15 ocurre cuando la sangre sale a través de una ruptura en la piel o cuando la sangre sale a través de una abertura natural en el cuerpo, tal como la boca, la nariz, la oreja, la vagina o el recto.

 El sangrado puede ser causado por una amplia variedad de incidentes o condiciones, que incluyen lesiones traumáticas (incluso abrasiones, rozaduras, laceraciones, incisiones,
20 heridas por punción de artículos tales como una aguja o un cuchillo, lesiones por aplastamiento y heridas de bala) o ciertas afecciones médicas, tales como aquellas asociadas a coagulaciones que comprometen a personas que tienen deficiencias de los factores de coagulación. Además, el sangrado puede ser causado por el uso de ciertos

medicamentos, tales como algunos medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, por sus siglas en inglés) o medicamentos anticoagulantes, p. ej., warfarina, heparina de bajo peso molecular, Apixaban (ELIQUIS®), Dabigatran (PRADAXA®), Edoxaban (SAVAYSA®) y Rivaroxaban (XARELTO®).

- 5 El sangrado continuo sin tratamiento puede ocasionar una exsanguinación, es *decir*, una disminución excesiva del volumen sanguíneo (hipovolemia), que conduce a la muerte.

La detención o el control del sangrado se denomina hemostasia, que implica la coagulación de la sangre, y la promoción, aceleración o mejora de este mecanismo, es una
10 parte importante de los primeros auxilios y la cirugía. Los agentes y las composiciones que mejoran promueven o aceleran la hemostasia se denominan “agentes hemostáticos”.

Los agentes hemostáticos pueden comprender hemostatos, selladores o adhesivos. Típicamente, los hemostatos se subdividen en hemostatos mecánicos (gelatina, colágeno, celulosa regenerada oxidada, etc.), hemostatos activos (tales como
15 trombina), hemostatos dispersables (tales como matrices de gelatina junto con trombina) y selladores de fibrina.

Algunos hemostatos conocidos requieren una preparación prolongada antes de su uso, que implica numerosas etapas, lo que desperdicia un tiempo valioso en situaciones de emergencia.

- 20 Los hemostatos biológicos son muy eficaces, pero conllevan un riesgo potencial para la seguridad y sus costos de producción son altos

Muchos hemostatos conocidos requieren refrigeración, que puede no estar disponible o puede ser muy costosa en los países en desarrollo, así como en diversas

situaciones (incluso en campos de batalla, en áreas aisladas, en situaciones de emergencia) o durante fallas eléctricas. Además, el requisito de refrigeración aumenta los costos de producción, envío y almacenamiento.

Muchos hemostatos conocidos son ineficaces para los pacientes que usan
5 medicamentos anticoagulantes, tales como heparina, aspirina o coumadin.

Muchos hemostatos conocidos incluyen procoagulantes, que conllevan un riesgo potencial de contaminación, tienen altos costos de producción, un corto tiempo de caducidad y, usualmente, requieren refrigeración.

Por lo tanto, existe la necesidad de un hemostato seguro y eficaz, que esté
10 desprovisto de al menos algunas de las desventajas de la técnica anterior.

Los antecedentes de la técnica incluyen las patentes de los EE. UU. núms. 5.502.042 y 8.741.335; la publicación de los EE. UU. núm. 2009/0062849; y las publicaciones PCT núms. WO 2013/071235 y 1993/05822.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones; calcio y un portador farmacéuticamente aceptable, así como métodos de uso de esta para inducir la hemostasia.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención,
20 se proporciona un método para inducir la hemostasia en un sitio de sangrado en un sujeto que lo necesite, el método comprende aplicar al sitio de sangrado una cantidad eficaz de una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones comprende uno o más grupos cargados positivamente unidos a una matriz.

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente (denominados, además, policationes) se proporcionan mediante una base seleccionada del grupo que consiste en una base fuerte, una base débil y una combinación de estas.

De acuerdo con algunas modalidades, la base fuerte comprende grupos amino cuaternarios.

De acuerdo con algunas modalidades, la base débil comprende un grupo amino seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino primario, un grupo amino secundario, un grupo amino terciario y una combinación de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la base débil consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE).

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz se selecciona del grupo que consiste en un poliéster alifático, un polisacárido, un polipéptido, poliestireno-divinilbenceno, una proteína (tal como gelatina de colágeno o albúmina), sílice y una combinación de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz está reticulada, opcionalmente, covalentemente reticulada.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición está sustancialmente desprovista de cualquier proteína de la cascada de coagulación sanguínea.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una suspensión, un polvo, una fibra, una película, un parche y un líquido.

De acuerdo con algunas modalidades, en donde la composición en la forma de suspensión o líquido, la composición comprende, además, un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con algunas modalidades, la aplicación se realiza al aplicar presión sobre
5 la composición, opcionalmente, hacia el sitio de sangrado.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones; una sal de calcio; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones comprende
10 uno o más grupos cargados positivamente unidos a una matriz.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones está unido a una fase sólida.

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente consisten en una base seleccionada del grupo que consiste en una base fuerte, una
15 base débil y una combinación de estas.

De acuerdo con algunas modalidades, la base fuerte comprende grupos amino cuaternarios.

De acuerdo con algunas modalidades, la base débil comprende un grupo amino seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino primario, un grupo amino
20 secundario, un grupo amino terciario y una combinación de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la base débil consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE).

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz se selecciona del grupo que consiste en un poliéster alifático, un polisacárido, un polipéptido, poliestireno-divinilbenceno, sílice y una combinación de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz está reticulada, opcionalmente
5 reticulada covalentemente.

De acuerdo con algunas modalidades, el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en celulosa, dextrano, agarosa y combinaciones de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la proteína es una proteína estructural tal como colágeno o gelatina, o proteínas que tienen alta abundancia en el plasma
10 sanguíneo tal como albúmina.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición está sustancialmente desprovista de cualquier proteína de la cascada de coagulación sanguínea.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una suspensión, un polvo, una película, un
15 parche y un líquido.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición en la forma de suspensión o líquido comprende, además, un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que comprende dietilaminoetilo (DEAE) unido
20 a una matriz; y una sal de calcio.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona un método para la preparación de una composición hemostática que comprende preparar un intercambiador de aniones al unir covalentemente uno o más

grupos cargados positivamente a una matriz reticulada; y añadir una sal de calcio a dicho intercambiador de aniones.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que puede obtenerse mediante el método
5 descrito en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, el término “inducir la hemostasia” se refiere a causar, provocar, promover, acelerar y/o mejorar la hemostasia.

Como se usa en la presente descripción, el término “un sitio de sangrado” se refiere a un sitio que sangra activamente y a un sitio que puede ser propenso o
10 susceptible a complicaciones hemorrágicas, tal como, por ejemplo, un sitio quirúrgico, un sitio de anastomosis y/o un sitio de sutura.

Como se usa en la presente descripción, el término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier diluyente o vehículo inerte que no tiene actividad biológica y que es adecuado para usar en humanos u otros animales. El portador puede
15 seleccionarse de cualquiera de los portadores conocidos en la técnica, tales como, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), solución salina, solución de cloruro de sodio, solución de cloruro de calcio, anilladores lactados (LR, por sus siglas en inglés), dextrosa al 5 % en solución salina normal, diferentes sacáridos, alcoholes de azúcar (tales como manitol, sorbitol) y agua para
20 inyección.

Como se usa en la presente descripción, el término “suspensión” se refiere a una sustancia espesa, blanda y húmeda. Típicamente, una suspensión se produce al mezclar ingredientes secos (p. ej., polvo o partículas hidrófilas sólidas) con un líquido. La

concentración de ingredientes secos puede ser de 0,5 % a 99 % p/p de la composición de suspensión completa. Típicamente, una suspensión es un material moldeable en el rango de temperatura de 15-40 °C.

5 Como se usa en la presente descripción, el término “desprovisto de” con respecto a un componente de una composición se refiere a un componente que está presente en la composición a una concentración de menos de 0,1 % p/p de la composición total.

 Como se usa en la presente descripción, los términos “que comprende”, “que incluye”, “que tiene” y las variantes gramaticales de estos deben tomarse como la
10 especificación de las características, números enteros, etapas o componentes mencionados, pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos adicionales de estos. Estos términos abarcan los términos “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”.

 Como se usa en la presente descripción, los artículos indefinidos “un” y “uno”
15 significan “al menos uno” o “uno o más”, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera.

 Como se usa en la presente descripción, el término “aproximadamente” se refiere a ± 10 %.

 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y
20 científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece la invención. Además, las descripciones, los materiales, métodos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden

ser limitantes. Métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en la presente descripción pueden usarse en las prácticas de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 Algunas modalidades de la invención se describen en la presente descripción con referencia a las figuras adjuntas. La descripción, junto con las figuras, demuestra a la persona con experiencia en la técnica cómo pueden ponerse en práctica algunas modalidades de la invención. Las figuras son para el propósito de una discusión ilustrativa y no intenta mostrar detalles estructurales de una modalidad en más detalle
10 del necesario para una comprensión fundamental de la invención. En aras de la claridad, algunos objetos representados en las figuras no están a escala.

En las figuras:

La Figura 1 muestra la reducción en el sangrado en un modelo de perforación circular de bazo porcino heparinizado *in vivo* (4 mm de diámetro/2 mm de profundidad)
15 después de la aplicación de DEAE SEPHADEX™ A-50 (10 % p/v) y un hemostato de gelatina comercial, con un tiempo de compresión de 30 segundos (para DEAE SEPHADEX™ A-50) o 60 segundos (para el hemostato de gelatina comercial).

La Figura 2a muestra un dispositivo usado para un modelo de sangrado problemático de bazo porcino para crear una herida de “tipo bala”. La Figura 2b muestra
20 una herida creada mediante el dispositivo de la Figura 2a en un bazo porcino. Como puede observarse en la Figura 2b, la herida produce un sangrado severo en el bazo. DEAE SEPHADEX™ A-50 se preparó como una suspensión de 10 % p/v en CaCl₂ 20 mM y se aplicó a la herida. Después de la aplicación de la suspensión y el tiempo de

compresión de 4 minutos, se evaluó la intensidad de sangrado posterior a la aplicación como se describe en la Figura 1. La Figura 2c muestra la herida de tipo bala después de la aplicación de DEAE SEPHADEX™ A-50 y taponamiento, que logró una hemostasia completa de la herida que sangraba severamente.

DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS MODALIDADES DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones; una sal de calcio y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable, así como métodos de uso de esta para lograr la hemostasia.

Los principios, usos y las implementaciones de las enseñanzas en la presente descripción pueden entenderse mejor con referencia a la descripción adjunta. Después de una revisión exhaustiva de la descripción, un experto en la técnica puede implementar la invención sin un esfuerzo o una experimentación excesivos.

Antes de explicar al menos una modalidad en detalle, debe entenderse que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes y/o métodos expuestos en la siguiente descripción. La invención es capaz de otras modalidades o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras.

La fraseología y terminología que se emplea en la presente descripción son para propósitos descriptivos y no deben considerarse como limitantes.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona un método para inducir la hemostasia en un sujeto que lo necesita en un sitio de sangrado, el método comprende aplicar al sitio de sangrado una cantidad eficaz de una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio para usar en la inducción de hemostasia en un sitio de sangrado.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona el uso de una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio en la fabricación de un medicamento para inducir la hemostasia.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona el uso de una composición farmacéutica hemostática que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio en la fabricación de un medicamento para inducir la hemostasia.

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición para usar, el uso o método de preparación descritos en la presente descripción, el intercambiador de aniones comprende uno o más grupos cargados positivamente (a un pH entre 2 a 10) (denominados, además, policationes) unidos a una matriz. En algunas de tales modalidades, la composición hemostática está desprovista de polianiones.

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición farmacéutica para usar, el uso o método de preparación descritos en la presente descripción, el intercambiador de aniones comprende uno o más grupos cargados positivamente (a un pH entre 2 a 10) (denominados, además, policationes) unidos a una matriz. En algunas de tales modalidades, la composición hemostática está desprovista de polianiones (tales como polímeros polianiónicos).

Los polianiones son moléculas o complejos químicos que tienen más de una carga negativa. Los policationes son moléculas o complejos químicos que tienen más de una carga positiva.

En una modalidad, la matriz puede incluir residuos aniónicos; sin embargo, la
5 carga neta total del intercambiador de aniones será positiva.

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente están presentes en la composición hemostática a una capacidad iónica total de no menos de 2 mmol/g, p. ej., entre 2 a 5, 3 a 4 mmol/g.

Como se usa en la presente descripción, el término “capacidad iónica total” se
10 refiere a la cantidad total de sitios cargados en la composición que están disponibles para el intercambio. La capacidad iónica total se expresa en una base de peso seco, peso húmedo o volumen húmedo.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones está presente a una concentración de 0,5-99 % p/v de la composición hemostática total, opcionalmente,
15 a una concentración de 5-15 % p/v de la composición hemostática total, tal como, por ejemplo, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 % 14 % o 15 %.

De acuerdo con algunas modalidades, en donde el intercambiador de aniones está presente a una concentración de al menos 10 % p/v de la composición hemostática total, una relación entre el intercambiador de aniones y el calcio en la composición
20 hemostática está en el rango de entre 1:5 a 1:70. En algunas modalidades, la relación es aproximadamente 1:34.

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente consisten en una base seleccionada del grupo que consiste en una base fuerte (tal como una que

comprende grupos amino cuaternarios), una base débil (tal como una que comprende un grupo amino seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino primario, un grupo amino secundario, un grupo amino terciario) y una combinación de estas.

De acuerdo con algunas modalidades, la base débil consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE).

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente están unidos a la matriz, p. ej., un soporte de matriz a través de un enlazador presente entre el soporte de matriz y los grupos cargados positivamente.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz se selecciona del grupo que consiste en un poliéster alifático, un polisacárido, un polipéptido (tal como gelatina, albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) o colágeno, o combinaciones de estos), poliacrilamida, copolímero de acrilato, poliestireno-divinilbenceno, sílice y una combinación de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz está reticulada, opcionalmente reticulada covalentemente. En algunas de tales modalidades, la matriz está desprovista de enlaces cruzados iónicos.

De acuerdo con algunas modalidades, el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en celulosa, dextrano, agarosa y combinaciones de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz comprende SEPHADEX™ (dextrano), SEPHACEL™ (celulosa) o TOYOPEARL™ (polímero metacrílico hidroxilado) o combinaciones de estos. De acuerdo con algunas modalidades, la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una suspensión, un polvo, una película, un parche y un líquido. De acuerdo con algunas de

tales modalidades, en donde la composición en la forma de suspensión o líquido, la composición comprende, además, un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con algunas modalidades del método descrito en la presente descripción, la aplicación de la composición hemostática al sitio de sangrado se realiza al aplicar presión
5 (p. ej., con una gasa) sobre la composición hacia un sitio de sangrado.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que comprende un intercambiador de aniones; una sal de calcio; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones comprende
10 uno o más grupos cargados positivamente (denominados, además, policationes) unidos a una matriz. En algunas de tales modalidades, la composición hemostática está sustancialmente desprovista de polianiones.

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente están presentes en la composición hemostática a una capacidad iónica total de no menos de
15 2 mmol/g, p. ej., entre 2 a 5, 3 a 4 mmol/g

De acuerdo con algunas modalidades, en donde el intercambiador de aniones está presente a una concentración de al menos 10 % p/v de la composición hemostática total, una relación entre el intercambiador de aniones y el calcio en la composición hemostática está en el rango de entre 1:5 a 1:70. En algunas modalidades, la relación
20 es aproximadamente 1:34.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones está presente a una concentración de 1-99 % p/v de la composición hemostática total, opcionalmente,

a una concentración de 5-15 % p/v de la composición hemostática total, tal como, por ejemplo, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 %.

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente se proporcionan mediante una base seleccionada del grupo que consiste en una base fuerte (tal como una que comprende grupos amino cuaternarios), una base débil (tal como una que comprende un grupo amino seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino primario, un grupo amino secundario, un grupo amino terciario y una combinación de estos) y una combinación de estas.

De acuerdo con algunas modalidades, la base débil comprende grupos dietilaminoetilo (DEAE).

De acuerdo con algunas modalidades, los grupos cargados positivamente están unidos a la matriz a través de un enlazador presente entre el soporte de matriz y los grupos cargados positivamente.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, un polipéptido (tal como gelatina, albúmina de suero bovino (BSA) o colágeno, o combinaciones de estos), poliacrilamida, copolímero de acrilato, poliestireno-divinilbenceno, sílice y una combinación de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz está reticulada, opcionalmente reticulada covalentemente. En algunas de tales modalidades, la matriz está desprovista de enlaces cruzados iónicos.

De acuerdo con algunas modalidades, el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en celulosa, dextrano, agarosa y combinaciones de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz comprende SEPHADEX™ (dextrano), SEPHACEL™ (celulosa) o TOYOPEARL™ (polímero metacrílico hidroxilado) o combinaciones de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una suspensión, un polvo, una película, un parche y un líquido. De acuerdo con algunas de tales modalidades, en donde la composición en la forma de suspensión o líquido, la composición comprende, además, un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con algunas modalidades, la sal usada en la presente descripción es un catión divalente positivo.

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición para usar, el uso o la composición hemostática descritos en la presente descripción, el calcio está presente en la composición hemostática como una sal de calcio tal como cloruro de calcio, acetato de calcio, lactato de calcio, oxalato de calcio, carbonato de calcio, gluconato de calcio, fosfato de calcio, glicerofosfato de calcio o combinaciones de estos. En algunas modalidades, la sal de calcio es cloruro de calcio, opcionalmente, presente como una solución, además, opcionalmente, a una concentración de 1 a 100 mM. En algunas de tales modalidades, el calcio presente en la composición hemostática es cloruro de calcio.

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición para usar, el uso o la composición hemostática descritos en la presente descripción, la composición hemostática está sustancialmente desprovista de todas las proteínas de la cascada de coagulación sanguínea.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz está desprovista de los siguientes polímeros polianiónicos: alginatos y/o hialuronatos.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz está desprovista de uno o más polímeros polianiónicos reticulables seleccionados del grupo que consiste en sulfonato de poliestireno (tal como sulfonato de poliestireno de sodio), un poliacrilato (tal como poliacrilato de sodio), un polimetacrilato (tal como polimetacrilato de sodio), un sulfato de polivinilo (tal como sulfato de polivinilo de sodio), un polifosfato (tal como polifosfato de sodio), carragenina Iota, carragenina Kappa, goma de gelano, carboxil metil celulosa, carboxil metil agarosa, carboxil metil dextrano, carboxil metil quitina, carboxil metil quitosano, un polímero modificado con un grupo carboxil metil, un alginato (tal como alginato de sodio), un polímero que contiene una pluralidad de grupos carboxilato, una goma de xantano y combinaciones de estos.

De acuerdo con algunas modalidades, los polímeros de la matriz no se modifican mediante la adición de grupos carboximetilo (CM).

De acuerdo con algunas modalidades, un polímero biocompatible se modifica con un grupo dietilaminoetilo (DEAE) para obtener grupos funcionales catiónicos para convertirse en un polímero policationico.

De acuerdo con algunas modalidades, el polímero policationico se selecciona del grupo que consiste en un quitosano (tal como cloruro de quitosano), quitina, dietilaminoetil-dextrano, dietilaminoetil-celulosa, dietilaminoetil-agarosa, dietilaminoetil-alginato, un polímero modificado con un grupo dietilaminoetilo, un polímero que contiene una pluralidad de grupos amino protonados, y un polipéptido que tiene un punto

isoeléctrico de residuos promedio por encima de 7, y combinaciones de estos. Preferentemente, el polímero policationico es dietilaminoetil-dextrano (DEAE-Dextrano).

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición para usar, el uso o la composición hemostática descritos en la presente descripción, la matriz está desprovista de ácido algínico y ácido péctico.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que comprende dietilaminoetilo (DEAE) unido a una matriz; y una sal de calcio.

De acuerdo con un aspecto de algunas modalidades de la presente invención, se proporciona un método para la preparación de una composición hemostática que comprende preparar un intercambiador de aniones al unir covalentemente al menos un grupo cargado positivamente a una matriz reticulada; y añadir una sal de calcio a dicho intercambiador de aniones.

De acuerdo con un aspecto adicional de tales modalidades de la presente invención, se proporciona una composición hemostática que puede obtenerse mediante el método descrito en la presente descripción.

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición para usar, el uso o la composición hemostática descritos en la presente descripción, la composición hemostática está sustancialmente desprovista de todos los hemostatos biológicos, es decir, desprovista de todos los componentes proteicos de la cascada de coagulación sanguínea, a saber, fibrinógeno, fibrina, Factor V, Factor Va, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIII, Factor VIIIa, Factor IX, Factor IXa, Factor X, Factor Xa, Factor XIa, Factor XI, Factor XII, Factor XIIa, factor tisular (TF, por sus siglas en inglés), y trombina, y complejo de protrombinasa,

protrombina y vWF., complejo de tenasa, cininógeno de alto peso molecular (HMWK, por sus siglas en inglés), Prekallikrein, kallikrein, tromboplastina.

De acuerdo con algunas modalidades del método, la composición para usar, el uso o la composición hemostática descritos en la presente descripción, la composición hemostática está sustancialmente desprovista de todas las proteínas de la cascada de coagulación sanguínea (tales como trombina, protrombina y fibrinógeno).

En algunas modalidades, el intercambiador de aniones comprende una matriz (denominada, además, “soporte”, “respaldo”, “fondo”, “cuentas base” o “resina”), que puede ser sólida o semisólida, opcionalmente, en la forma de cuentas a las que se unen uno o más grupos cargados positivamente.

Ventajosamente, la matriz puede soportar la presión como se ejerce, típicamente, durante la cirugía cuando se usan materiales adyuvantes para detener el sangrado sin desintegrarse.

En algunas modalidades, la matriz comprende un polímero reticulado. En algunas modalidades, el material de la matriz sólida o semisólida no se disuelve ni se desintegra hasta que se logra la hemostasia (al menos 1 minuto desde la aplicación de la composición hemostática).

De acuerdo con algunas modalidades, el polímero a partir del cual se forma la matriz es insoluble en agua, y es preferentemente poroso, con un límite de exclusión de al menos 20 K Da.

De acuerdo con algunas modalidades, la matriz no se desintegra cuando se somete a compresión física manual.

Como se usa en la presente descripción, el término “grupos cargados positivamente” se refiere a una molécula que comprende grupos químicos que portan una carga positiva a un rango de pH de 2,0 a 10 tales como amonio, alquilamónio, dialquilamónio, trialquilamónio, amonio cuaternario, dietilaminoetilo (DEAE),
5 dimetilaminoetilo (DMAE), trietilaminoetilo, trimetilaminoetilo, grupos alquilo, grupos con funcionalidad amino (p. ej., NR_2H^+), dietil-(2-hidroxipropil) aminoetilo, trimetilamino-hidroxipropilo y una combinación de estos.

En una modalidad, el intercambiador de iones tiene múltiples valores de pKa que varían de 6 a 14. En una modalidad adicional, el intercambiador de iones tiene un único
10 valor de pKa por encima de 9.

De acuerdo con algunas modalidades, el intercambiador de aniones comprende DEAE unido a cualquier matriz que se sabe que tiene propiedades hemostáticas, para aumentar la eficacia hemostática de la matriz. Los ejemplos de matrices adecuadas incluyen, sin limitarse a, gelatina, celulosa, colágeno y almidón.

15 De acuerdo con algunas modalidades, la composición hemostática comprende una mezcla de al menos un intercambiador de aniones y calcio. El término “mezcla” pretende referirse a cualquier forma de mezcla, homogénea o no homogénea, de al menos el intercambiador de aniones y el calcio. La mezcla puede incluir, además, opcionalmente, otros ingredientes.

20 De acuerdo con algunas modalidades, la mezcla está sustancialmente libre o desprovista de cualquier componente proteico de la cascada de coagulación sanguínea (es decir, tales componentes están presentes en la composición a una concentración

de menos de 0,1 % p/p de la composición total), *p. ej.*, la mezcla puede estar sustancialmente libre o desprovista de trombina y fibrinógeno.

De acuerdo con algunas modalidades, la mezcla es una mezcla en suspensión, en polvo o líquida.

- 5 De acuerdo con algunas modalidades, la mezcla se proporciona en un estado congelado, de tal manera que antes de usar, el producto se descongela y se lleva hasta la temperatura ambiente (*es decir*, en el rango de 15-40 °C), en donde la mezcla está en su estado utilizable.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición descrita en la presente
10 descripción detiene el sangrado de una herida en 1 minuto.

Como se usa en la presente descripción, el término “hemostato” o “composición hemostática” se refiere a un material o una composición que funciona al hacer que la sangre se coagule, *es decir*, induce la hemostasia. Típicamente, un hemostato aumenta la coagulación de la sangre.

- 15 En una modalidad, el término “induce la hemostasia” con respecto a una composición se refiere a una composición que hace que la sangre se coagule mediante la activación de los factores de coagulación, tal como protrombina, que produce el cese del sangrado o la reducción de la intensidad de sangrado.

Como se usa en la presente descripción, el término “detiene el sangrado” o “cese
20 del sangrado” con respecto a una composición se refiere a una composición que, cuando se aplica en el sitio de una herida, interrumpe el sangrado, *p. ej.*, en una escala de 0 (sin sangrado) a 5 como se describe en la sección MATERIALES Y MÉTODOS más abajo.

Como se usa en la presente descripción, el término “reducción de la intensidad de sangrado” (que se denomina, además, “eficacia hemostática”) se refiere a la diferencia entre la intensidad de sangrado inicial y la intensidad de sangrado posterior a la aplicación.

Como se usa en la presente descripción, el término “intensidad de sangrado inicial”
5 se refiere a la intensidad de sangrado como se evalúa inmediatamente después de la formación de una herida y antes de la aplicación de una composición, p. ej., en una escala de 0 a 5 como se describe en la sección MATERIALES Y MÉTODOS más abajo.

Como se usa en la presente descripción, el término “intensidad de sangrado posterior a la aplicación” para un tiempo de compresión específico se refiere a la
10 intensidad de sangrado como se evalúa tras la aplicación de una composición y después del tiempo de compresión, p. ej., en una escala de 0 a 5 como se describe en la sección MATERIALES Y MÉTODOS más abajo.

La eficacia hemostática de la composición puede evaluarse en términos del tiempo de compresión cuando se aplica a una herida sangrante.

15 Como se usa en la presente descripción, el término “tiempo de compresión” se refiere al tiempo durante el cual se aplica compresión manual a una herida sangrante después de la aplicación de una composición. Típicamente, esta fuerza es igual a la fuerza que ejerce usualmente un cirujano después del uso de productos adyuvantes para lograr la hemostasia. En algunas modalidades, en donde no se aplica compresión,
20 el tiempo de compresión se denomina 0 segundos.

En algunas modalidades, el tiempo de compresión es de aproximadamente 8 a 12 minutos. En algunas modalidades, en el sangrado problemático, el tiempo de compresión es de aproximadamente 5 minutos. En algunas modalidades, en el sangrado encontrado

en un procedimiento quirúrgico general, el tiempo de compresión es de aproximadamente 1 a 2 minutos. El “sangrado problemático” se define como hemorragia clase III y superior de acuerdo con la clasificación de la OMS. Típicamente, la hemorragia clase III implica una pérdida de 30-40 % del volumen sanguíneo circulante. Los síntomas
5 típicos incluyen: una caída en la presión arterial del paciente, aumento de la frecuencia cardíaca, hipoperfusión periférica (conmoción).

Sin desear estar supeditados a la teoría, los inventores plantean la hipótesis de que cuando una composición, como se describe en la presente descripción, se aplica a una herida o un sitio sangrante, la trombina se genera *in situ*. Sorprendentemente, se
10 descubrió que esta generación de trombina *in situ* se produce en un grado suficiente y con la velocidad suficiente para lograr la hemostasia.

Ventajosamente, la presencia de una matriz física permite que la composición hemostática se aplique fácilmente al sitio de sangrado, opcionalmente, con compresión. Además, la propia matriz puede contribuir a la coagulación al atrapar las plaquetas,
15 similar a la celulosa regenerada oxidada (ORC, por sus siglas en inglés).

Como se muestra en la sección Ejemplos más abajo, se descubrió que una matriz es un requisito previo para las capacidades hemostáticas de un grupo funcional con carga positiva, tal como DEAE. Típicamente, la matriz debe ser de tal naturaleza que no se disuelva al contacto inicial con los líquidos y mantenga su integridad hasta que se logre la
20 hemostasia, por ejemplo, durante al menos 1 minuto, y permita que la agregación de proteínas de la sangre se concentre localmente en el sitio de la herida, permitiendo, por lo tanto, el inicio de la cascada de coagulación. Ventajosamente, la matriz es estable bajo la presión que ejerce usualmente un cirujano durante la cirugía general para lograr la

hemostasia. Ventajosamente, la naturaleza de la matriz es tal que esta se distribuye en y/o dentro de la herida después de la aplicación, opcionalmente, con el uso de compresión.

De acuerdo con la invención, se descubrió que diferentes tipos de Sephadex y hemostato de gelatina comercial no lograron detener el sangrado (en un modelo de sangrado hepático),

5 es decir, no se observó ninguna reducción de la intensidad de sangrado.

Los diferentes tipos de Sephadex al incluir el mismo polímero base, es decir, dextrano reticulado proporcionado como polvos, a partir del cual se prepararon las suspensiones, redujeron sorprendentemente el sangrado.

Además, después de la aplicación de DEAE Sephadex, el bazo se manipuló manualmente
10 doblando el órgano por ambos lados y no se produjo un nuevo sangrado.

Se descubrió que mientras el hemostato de gelatina comercial no pudo detener el sangrado después de un tiempo de compresión de 60 segundos, 10 % (p/v) de DEAE SEPHADEX™ A-50 detuvo el sangrado de manera satisfactoria, incluso después de un tiempo de compresión corto de 30 segundos. Además, se descubrió que una
15 composición que comprende un intercambiador de aniones, tal como DEAE unido a una matriz, junto con una sal de calcio, conduce a la hemostasia completa.

Estas composiciones conducen sustancialmente a una hemostasia completa independientemente de la matriz específica usada.

Además, se descubrió que una composición que comprende un intercambiador de
20 aniones, tal como DEAE unido a una matriz, tal como SEPHADEX™, SEPHACEL™ y TOYOPEARL™ (dextrano, celulosa y polímero metacrílico hidroxilado, respectivamente) junto con una sal de calcio, conduce a la hemostasia completa.

Más particularmente, se descubrió que DEAE Sephadex en CaCl_2 pudo detener el sangrado después de 60 y 30 segundos de compresión.

Se descubrió que la aplicación de DEAE SEPHADEX™ A-50 (8 % p/v) podía usarse, sin compresión, para reducir la intensidad de sangrado.

5 Se descubrió que las capacidades hemostáticas de una composición que comprende DEAE Sephadex (tal como DEAE SEPHADEX™ A-50) y una sal de calcio exhiben una eficacia similar a la del hemostato de gelatina comercial con trombina, p. ej., cuando se usa el mismo tiempo de compresión (tal como 30 segundos o 10 segundos de compresión). Sin embargo, la capacidad hemostática de un hemostato
10 basado en un intercambiador de aniones que comprende DEAE unido a una matriz, y una sal de calcio, fue sustancialmente superior a la del hemostato de gelatina comercial en ausencia de un componente biológicamente activo, tal como trombina.

De acuerdo con la invención, se descubrió que una composición que comprendía DEAE Sephadex preparada con NaCl, pero que carecía de una sal de calcio, no reducía
15 la intensidad de sangrado.

Los resultados muestran que el uso de una composición que comprende grupos DEAE unidos a una matriz en presencia de una sal de calcio logró eficazmente la hemostasia.

Además, los resultados mostraron que el tiempo de compresión de 30 y
20 60 segundos después de la aplicación de DEAE Sephadex en presencia de una sal de calcio produjo una hemostasia completa.

El tiempo hasta la hemostasia (TTH, por sus siglas en inglés) del plasma normal en presencia de calcio (p. ej., como se mide mediante un ensayo de coagulación) es

de aproximadamente 200 segundos. Mientras que el TTH del plasma normal en presencia de calcio y un intercambiador de aniones, de acuerdo con la invención, está en el rango de aproximadamente 10 a 180 segundos, tal como en el rango de aproximadamente 10 a 60 segundos, en el rango de aproximadamente 10 a 30 segundos, en el rango de aproximadamente 15 a 60 segundos, en el rango de aproximadamente 15 a 30 segundos, y en el rango de aproximadamente 30 a 60 segundos. En una modalidad, el TTH es de aproximadamente 30 segundos.

De acuerdo con la invención, se mostró que un intercambiador de aniones tal como DEAE unido a una matriz junto con una sal de calcio proporcionaba una hemostasia completa. Este resultado se obtuvo independientemente de la matriz usada. Los resultados son comparables a los obtenidos cuando se usa un hemostato comercial tal como gelatina junto con trombina.

Se descubrió que QAE SEPHADEX™ junto con una sal de calcio redujo el sangrado.

Una composición desprovista de una sal de calcio y/o una matriz no tuvo ningún efecto sobre la intensidad de sangrado.

Estos resultados con DEAE y QAE, sugieren que una composición que comprende un intercambiador de aniones unido a una matriz y que incluye una sal de calcio es eficaz como un hemostato.

Las capacidades hemostáticas de DEAE unido a un polímero reticulado en presencia de una sal de calcio se corroboraron adicionalmente en un modelo más desafiante de sangrado problemático, modificado del descrito por Holcomb JB, Pusateri AE, Harris RA, et al. (Effect of dry fibrin sealant dressings versus gauze packing on blood loss in grade V liver injuries in resuscitated swine. J Trauma. 1999; 46:49–58), que se

incorpora como referencia como si se expusiera completamente en la presente descripción.

Se mostró que DEAE unido a una matriz reticulada de acuerdo con la invención tuvo éxito en lograr una hemostasia completa *in vivo* en un modelo de perforación circular de bazo porcino heparinizado, mientras que DEAE no unido a una matriz no logró disminuir la intensidad de sangrado.

La densidad (*es decir*, la presencia) de los grupos cargados positivamente que se unen a una matriz como se describe en la presente descripción muestra que estos son importantes para lograr la hemostasia. Las cargas en una matriz pueden estar presentes ventajosamente a una densidad que sea suficiente para lograr la hemostasia de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, se descubrió que no todas las cargas positivas evaluadas proporcionaban el mismo nivel de eficacia hemostática. Por lo tanto, para evaluar la densidad de carga y el tipo de carga, se puede realizar un análisis para asegurar que esté presente un rango de densidad óptimo.

Por ejemplo, la matriz sintetizada se puede monomerizar, tal como por hidrólisis ácida, y se puede aplicar a un instrumento analítico (p. ej., cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gases), capaz de separar los monómeros con base en las diferentes cargas que portan. De esta manera, se puede realizar un análisis para evaluar la densidad de carga en una determinada molécula.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1: Materiales

5	Composición	Fabricante	Descripción y preparación
	SEPHADEX™ G-50 Medio	GE healthcare Cat. núm. 17-0043-01	Matriz: Dextrano reticulado. Tamaño de partícula (seco): 50 µm-150 µm. Se suministra como un polvo y se prepara como una suspensión (un material dispersable) para la aplicación al añadir una solución de CaCl ₂ 20 mM al polvo.
10	SEPHADEX™ G-75 Superfino	GE healthcare Cat. núm. 17-0051-01	Matriz: Dextrano reticulado. Tamaño de partícula (seco): 10 µm-40 µm. Se suministra como un polvo y se prepara como una suspensión para la aplicación al añadir una solución de CaCl ₂ 20 mM al polvo.
15	DEAE SEPHADEX™ A-50	GE healthcare Cat. núm. 17-0180-01	Matriz: Dextrano reticulado. Tamaño de partícula (seco): 40 µm-120 µm. Ligando (grupo catiónico): dietilaminoetilo (DEAE). Se suministra como un polvo y se prepara como una suspensión para la aplicación al añadir soluciones de NaCl o CaCl ₂ 20 mM al polvo.
20	DEAE SEPHACEL™	GE healthcare Cat. núm. 17-0500-01	Matriz: Celulosa en cuentas. Tamaño de partícula: 40 µm-160 µm. Ligando: DEAE. Se suministra como una suspensión en etanol al 24 % (v/v). La suspensión se decantó al dejar la suspensión durante 40 minutos a temperatura ambiente (20 °C-25 °C) para permitir que las partículas se sedimentaran, después, el sobrenadante se eliminó y se reemplazó con una solución de CaCl ₂ 20 mM. El procedimiento se repitió 3 veces.

		En la siguiente etapa, la suspensión se colocó en un papel para secar (durante 1-2 minutos) para obtener una suspensión para la aplicación.
5	TOYOPEARL DEAE-650M™	TOSOH Cat. núm. 0043201 Matriz: Cuentas metacrílicas hidroxiladas. Tamaño de partícula (medio): 65 µm. Ligando: DEAE. Se suministra como una suspensión en etanol al 20 % (v/v). Se prepara como un polvo para la aplicación al secar la suspensión durante 12 horas en un horno de vacío a 25 °C, el polvo resultante se mezcló con CaCl ₂ al 10 % (p/p) (añadido como una sal).
10	SP SEPHADEX™ C-50	GE healthcare Cat. núm. 17-0240-01 Matriz: Dextrano reticulado. Tamaño de partícula seco: 40 µm-120 µm. Ligando (grupo aniónico): Sulfopropilo (SP) Se suministra como un polvo y se prepara como una suspensión para la aplicación al añadir una solución de CaCl ₂ 20 mM al polvo.
15	QAE SEPHADEX™	GE healthcare Cat. núm. 17-0200-01 Matriz: Dextrano reticulado. Tamaño de partícula (seco): 40 µm-120 µm. Ligando (grupo catiónico): Dietil-(2-hidroxi-propil) aminoetilo (QAE) Se suministra como un polvo y se prepara como una suspensión para la aplicación al añadir una solución de CaCl ₂ 20 mM al polvo.
	Solución de CaCl ₂ 20 mM	Sigma Cat. núm. 21097 0,294 g de sal disuelta en 100 ml de agua purificada (PW) para preparar una solución 20 mM.
20	DEAE puro	Sigma Cat. núm. 471321 Líquido incoloro Pureza (GC) > 99,50 %
	DEAE con calcio	Se prepara al mezclar 2 ml de DEAE (Sigma; Cat. núm. 471321) con 2 ml de solución de CaCl ₂ 40 mM para proporcionar iones de calcio a una concentración final de 20 mM

	Hemostato de gelatina comercial	Suspensión, preparada para la aplicación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Concentración de gelatina 11 % p/v.
5	Hemostato de gelatina comercial con trombina	Suspensión, preparada para la aplicación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Concentración de gelatina 11 % p/v. Concentración final de trombina: 250 IU/ml. Concentración final de iones de calcio: 10 mM.
10	DEAE Dextran 500	Pharmacosmos Matriz: dextrano Ligando: DEAE. Masa molecular promedio Mw: 450.000 – 550.000. Se suministra como un polvo Se prepara como un polvo para la aplicación al mezclar con CaCl ₂ al 10 % (p/p) (se añade como una sal).

Modelo de perforación circular *in vivo*.

El modelo se basó en un modelo descrito anteriormente en la patente núm. WO 2012087774 A1, con algunas modificaciones. Este modelo evalúa la eficacia de una composición probada para reducir el sangrado *in vivo* (eficacia hemostática).

Inicialmente, el órgano en el que se iba a estudiar la hemostasia se expuso y, después, se sometió a una sola perforación de biopsia (4 mm de diámetro, 2 mm de profundidad en los Ejemplos 1 y 5; 4 mm de diámetro, 2 mm de profundidad u 8 mm de diámetro, 3 mm de profundidad en el Ejemplo 2, segundo experimento). Se extrajo el tejido en la perforación. La Intensidad de sangrado inicial se clasificó (“sangrado inicial”) en una escala de 0 a 5 en donde: 0 - “Sin sangrado”; 1- “Sangrado mínimo”; 2- “Sangrado muy leve”; 3- “Sangrado leve”; 4- “Sangrado moderado”; 5- “Sangrado severo”.

Para evaluar la eficacia hemostática de cada composición probada, se aplicó aproximadamente 0,5 ml de suspensión o 100 mg de polvo (para las composiciones que se aplicaron como polvo) en la herida sangrante por perforación. Las composiciones que se aplicaron como una suspensión se aplicaron en la herida mediante el uso de una jeringa; las composiciones que se aplicaron como un polvo se aplicaron directamente sobre la herida.

Después de la aplicación de las composiciones, se aplicó, opcionalmente, compresión manual durante un tiempo específico (denominado, además, en la presente descripción “tiempo de compresión”), mediante el uso de una gasa. Después de la compresión, se retiró la gasa y se evaluó inmediatamente la intensidad de sangrado posterior a la aplicación y después de 1 minuto adicional, ya sea cualitativa (sí/no) o cuantitativamente (mediante el uso de la escala de 0 a 5 como se describió anteriormente).

Una composición probada que redujo la intensidad de sangrado (que comenzó al menos en 3) a 1 (Sangrado mínimo) o 0 (Sin sangrado) se consideró eficaz. Para la determinación cualitativa, la presencia o ausencia de sangrado se examinó visualmente, así como con un trozo de gasa presionado sobre el borde del área tratada.

El modelo de perforación de biopsia heparinizada se considera un modelo adecuado para evaluar la hemostasia fuerte.

El tiempo hasta la hemostasia (TTH) se evaluó después de la aplicación de la composición. El tiempo hasta la hemostasia (TTH) se evaluó después de la aplicación de la composición. TTH se define como el intervalo de tiempo desde la aplicación de la composición hasta que se observó la hemostasia completa (puntuación 0).

Ejemplo 1: Las propiedades hemostáticas de una composición que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio en un modelo de bazo *in vivo*.

La evaluación inicial de las propiedades hemostáticas de una composición que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio se realizó en un modelo de perforación circular de bazo porcino heparinizado *in vivo* como se describió anteriormente, mediante el uso de DEAE unido covalentemente a Sephadex (DEAE-SEPHADEX™) como el intercambiador de aniones. En este experimento, el tamaño de perforación fue de 4 mm de diámetro, 2 mm de profundidad. Se usó un tiempo de compresión de 30 o 60 segundos después de la aplicación. DEAE SEPHADEX™ A-50 se probó a dos concentraciones. En este experimento, la Intensidad de sangrado posterior a la aplicación se evaluó cualitativamente.

Las siguientes composiciones (ver la elaboración en la Tabla 1 anterior) se evaluaron para determinar su eficacia hemostática:

1. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 10 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM, (0,5 ml contiene 50 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50) (tiempo de compresión de 30 segundos);
2. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 6,6 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM, (0,5 ml contiene 33 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50) (tiempo de compresión de 60 segundos);
3. SEPHADEX™ G-75 Superfino, preparado como una suspensión al 10 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM, (0,5 ml contiene 50 mg de SEPHADEX™ G-75 Superfino) (tiempo de compresión de 60 segundos);

4. SEPHADEX™ G-50 Medio, preparado como una suspensión al 10 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM, (0,5 ml contiene 50 mg de SEPHADEX™ G-50 Medio) (tiempo de compresión de 60 segundos);

5. Hemostato de gelatina comercial preparado como una suspensión (0,5 ml contiene 55 mg de gelatina) (tiempo de compresión de 60 segundos).

Las cuatro muestras de SEPHADEX™ comprenden el mismo polímero base, dextrano reticulado. Las composiciones 1-4 se proporcionaron como polvos, a partir de los cuales se prepararon las suspensiones como se describe en la Tabla 1 anterior. Se usó un hemostato dispersable de gelatina comercial como control.

10 Se descubrió que SEPHADEX™ G-50 Medio, SEPHADEX™ G-75 Superfino y el hemostato de gelatina comercial no lograron detener el sangrado, es *decir*, no se observó una reducción de la intensidad de sangrado (no se muestran los resultados).

Sorprendentemente, DEAE SEPHADEX™ A-50 redujo el sangrado en todos los tiempos de compresión probados. Después de la aplicación de DEAE SEPHADEX™ A-
15 50, el bazo se manipuló manualmente al doblar el órgano desde ambos lados. No se produjo un nuevo sangrado en ninguna de las concentraciones probadas ni después de los dos tiempos de compresión diferentes (no se muestran los resultados). Ya que la hemostasia solo se produjo en la matriz suplementada con grupos DEAE, se llegó a la conclusión de que el efecto hemostático se debía a la presencia de los grupos DEAE.

20 La Figura 1 muestra un resultado ilustrativo obtenido mediante el uso de 10 % (p/v) de DEAE SEPHADEX™ A-50 y gelatina comercial. Como se muestra en la figura, el hemostato de gelatina comercial no pudo detener el sangrado después de un tiempo de compresión de 60 segundos, mientras que 10 % (p/v) de DEAE SEPHADEX™ A-50

detuvo el sangrado de manera satisfactoria, incluso después de un tiempo de compresión más corto de 30 segundos.

Ejemplo 2: Efecto de las composiciones que comprenden un intercambiador de aniones y calcio sobre la hemostasia en un modelo de hígado porcino *in vivo*.

En el siguiente Ejemplo, se evaluó el efecto sobre la hemostasia de cada uno de los componentes de una composición que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio, por separado y en combinación, mediante el uso de un modelo de perforación circular de hígado porcino heparinizado *in vivo*, como se describió anteriormente. Este experimento identifica cuáles de los componentes de la composición son necesarios para lograr la hemostasia.

La preparación de cada composición se describe en la Tabla 1 anterior. El tiempo de compresión se enumera en la Tabla 2 más abajo. En este experimento, la intensidad de sangrado inicial y la intensidad de sangrado posterior a la aplicación se evaluaron de acuerdo con la escala de 0-5.

Se evaluaron las siguientes composiciones:

1. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 8 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50);
2. Hemostato de gelatina comercial, preparado como una suspensión (0,5 ml contiene 55 mg de gelatina);
3. Hemostato de gelatina comercial con trombina, preparado como una suspensión (0,5 ml contiene 55 mg de gelatina);

4. SEPHADEX™ G-50 Medio, preparado como una suspensión al 14 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM (0,5 ml contiene 70 mg de SEPHADEX™ G-50 Medio).
5. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 8 % p/v en una solución de NaCl 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50);
- 5 6. SP SEPHADEX™ C-50, preparado como una suspensión al 8 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de SP SEPHADEX™ C-50);
7. QAE SEPHADEX™, preparado como una suspensión al 8 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de QAE SEPHADEX™);
8. DEAE SEPHACEL™, preparado como una suspensión (100 mg); y
- 10 9. TOYOPEARL DEAE-650M™, preparado en forma de polvo (100 mg).

El tiempo de compresión después de la aplicación de cada composición probada y los resultados de la intensidad de sangrado se muestran en la Tabla 2. La reducción de la intensidad de sangrado se calculó al restar la intensidad de sangrado posterior a la aplicación de la intensidad de sangrado inicial.

15

Tabla 2: Efecto de las composiciones probadas en la reducción de la intensidad de sangrado (modelo de sangrado de hígado)

20

Composición probada	Sal de calcio	Tiempo de compresión (segundos)	Intensidad de sangrado		
			Inicial	Posterior a la aplicación	Reducción*
DEAE SEPHADEX™ A-50 (8 % p/v)	+	60	5	0	5
	+	30	3	0	3
	+	10	4	1	3
	+	0	2	1	1

* Se calculó al restar la intensidad de sangrado posterior a la aplicación de la intensidad de sangrado inicial.

Tabla 3: Efecto de las composiciones probadas en la reducción de la intensidad de sangrado (modelo de sangrado de hígado)

Composición probada	Sal de calcio	Intensidad de sangrado		
		Inicial	Posterior a la aplicación	Reducción*
DEAE SEPHACEL™ (100 g de suspensión)	+	3	0	3
TOYOPEARL DEAE-650M™ (100 mg de polvo)	+	4	0	4
QAE SEPHADEX™ (8 % p/v)	+	4	3	1
DEAE SEPHADEX™ A-50 (8 % p/v) con NaCl 20 mM	-	3	3	0
SEPHADEX™ G50 (14 % p/v)	+	3	3	0
SP SEPHADEX™ C-50 (8 % p/v)	+	3	3	0
Hemostato de gelatina comercial con trombina	+	3	0	3
Hemostato de gelatina comercial	-	3	3	0

* Se calculó al restar la intensidad de sangrado posterior a la aplicación de la intensidad de sangrado inicial.

Generalmente, se puede observar que una composición que comprende un intercambiador de aniones, tal como DEAE unido a una matriz, junto con una sal de

calcio, conduce a una hemostasia completa (ver la Tabla 2 para DEAE SEPHADEX™ A-50, DEAE SEPHACEL™ y TOYOPEARL DEAE-650M™, todos los cuales contienen una sal de calcio). Estas composiciones conducen sustancialmente a una hemostasia completa independientemente de la matriz específica usada. Por ejemplo, matrices tales como SEPHADEX™, SEPHACEL™ y TOYOPEARL™ (dextrano, celulosa y polímero metacrílico hidroxilado, respectivamente) tuvieron un efecto similar en la reducción de la intensidad de sangrado.

Más particularmente, 8 % p/v de DEAE SEPHADEX™ A-50 en CaCl₂ pudo detener el sangrado después de 60 y 30 segundos de compresión. Además, los resultados mostraron que la aplicación de DEAE SEPHADEX™ A-50 (8 % p/v) podía usarse, sin compresión, para reducir la intensidad de sangrado (Tabla 2).

Las capacidades hemostáticas de una composición que comprende DEAE SEPHADEX™ A-50 y una sal de calcio exhibieron una eficacia similar a la del hemostato de gelatina comercial con trombina, cuando se usa el mismo tiempo de compresión (30 segundos) e incluso con solo 10 segundos de compresión. Sin embargo, la capacidad hemostática de un hemostato basado en un intercambiador de aniones que comprende DEAE unido a una matriz, y una sal de calcio, fue sustancialmente superior a la del hemostato de gelatina comercial en ausencia de un componente biológicamente activo, tal como trombina.

Como se muestra en la Tabla 3, una composición que comprende DEAE SEPHADEX™ preparada con NaCl y que carece de una sal de calcio no produjo una reducción de la intensidad de sangrado, de tal manera que se puede llegar a la conclusión de que la muestra no fue eficaz para detener el sangrado.

Al evaluar el impacto del grupo de intercambio de iones sobre la capacidad hemostática, se mostró que SP SEPHADEX™ que contenía un grupo aniónico, sulfopropilo (SP) con una sal de calcio, no redujo la intensidad de sangrado. En otras palabras, un material con un grupo negativo (SP), en lugar de un grupo positivo (DEAE) no fue eficaz como un hemostato.

Además, se mostró que un aminoetilo cuaternario, QAE SEPHADEX™ con una sal de calcio pudo reducir la intensidad de sangrado.

Además, se mostró, como en el Ejemplo 1, que la matriz sola, en ausencia de un grupo funcional (SEPHADEX™ G-50 con una sal de calcio, pero sin grupos DEAE) no tenía ninguna eficacia hemostática.

Los resultados muestran que el uso de una composición que comprende grupos DEAE unidos a una matriz en presencia de una sal de calcio logró eficazmente la hemostasia.

Los resultados mostraron, además, que el tiempo de compresión de 30 y 60 segundos después de la aplicación de DEAE SEPHADEX™ A-50 (8 % p/v) produjo una hemostasia completa y, por lo tanto, el TTH se definió como 30 segundos.

Por lo tanto, se mostró que un intercambiador de aniones tal como DEAE unido a una matriz junto con una sal de calcio proporcionaba una hemostasia completa. Este resultado se obtuvo independientemente de la matriz usada. Los resultados son comparables a los obtenidos cuando se usa un hemostato comercial tal como gelatina con trombina.

Se descubrió que QAE SEPHADEX™ junto con una sal de calcio redujo el sangrado.

Una composición desprovista de una sal de calcio y/o una matriz no tuvo ningún efecto sobre la intensidad de sangrado.

Estos resultados sugieren que una composición que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio es eficaz como un hemostato.

5

Ejemplo 3: Efecto de las composiciones que comprenden un intercambiador de aniones y una sal de calcio sobre la hemostasia en un modelo de bazo porcino *in vivo*.

El experimento anterior mostró que una composición que comprende un
10 intercambiador de aniones que consiste en DEAE unido a un polímero reticulado, y una sal de calcio, fue eficaz para reducir la intensidad de sangrado en un modelo de perforación circular de bazo *in vivo*.

En este experimento, la actividad hemostática de la composición se corroboró en otro modelo, el modelo de perforación circular de bazo porcino heparinizado *in vivo* (realizado
15 como se describió anteriormente). Este modelo fue más severo que el modelo anterior con respecto a la intensidad de sangrado. El tiempo de compresión para todas las muestras fue de 30 segundos. Para las muestras 1-6, el tamaño de perforación fue de 4 mm de diámetro, 2 mm de profundidad. Para las muestras 7-9, el tamaño de perforación fue de 8 mm de diámetro y 3 mm de profundidad. Típicamente, la gravedad del sangrado aumentó con el
20 aumento en el tamaño de perforación y/o la adición de heparina.

Se probaron las siguientes muestras para determinar su eficacia hemostática:

1. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 8 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50);

2. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 10 % p/v en una solución de CaCl_2 20 mM (0,5 ml contiene 50 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50), probado por duplicado;
3. Hemostato de gelatina comercial, preparado como una suspensión (0,5 ml contiene 55 mg de gelatina);
4. Hemostato de gelatina comercial con trombina, preparado como una suspensión (0,5 ml contiene 55 mg de gelatina);
5. SEPHADEX™ G-50 Medio, preparado como una suspensión al 14 % p/v en una solución de CaCl_2 20 mM (0,5 ml contiene 70 mg de SEPHADEX™ G-50 Medio);
6. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 8 % p/v en una solución de NaCl 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50);
7. DEAE puro;
8. CaCl_2 (20 mM); y
9. DEAE con CaCl_2 .

15

Se observó que 8 % y 10 % p/v de DEAE SEPHADEX™ A-50 en presencia de CaCl_2 pudieron reducir la intensidad de sangrado (se observó una reducción de aproximadamente 2-3 puntos), y el porcentaje más alto proporcionó los mejores resultados. En este modelo, las capacidades hemostáticas de DEAE SEPHADEX™ A-50 fueron superiores a las del hemostato basado en gelatina comercial con o sin trombina.

20

Como se muestra para el experimento con el hígado, tanto SEPHADEX™ G-50 solo como DEAE SEPHADEX™ con una sal de sodio no lograron reducir la intensidad de sangrado.

El DEAE puro no logró reducir la intensidad de sangrado. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que cuando DEAE no está unido a un polímero reticulado, este no funciona como un hemostato eficaz (es decir, no se produjo una reducción significativa del sangrado). La adición de una sal de calcio no mejoró las capacidades hemostáticas de DEAE en ausencia de una matriz, como puede observarse para la composición que comprende DEAE con una composición de sal de calcio (reducción de 0 puntos). Además, se demostró que una sal de calcio sola no poseía capacidades hemostáticas.

Este experimento respaldó aún más el experimento anterior y mostró que se requería la combinación de una sal de calcio, grupos DEAE y una matriz para demostrar la eficacia hemostática.

Ejemplo 4: Las propiedades hemostáticas de una solución que comprende un intercambiador de aniones y una sal de calcio en un modelo de sangrado problemático de bazo porcino *in vivo*.

En este Ejemplo, las capacidades hemostáticas de DEAE unido a un polímero reticulado en presencia de una sal de calcio se probaron adicionalmente en un modelo más desafiante de sangrado problemático, modificado del descrito por Holcomb JB, Pusateri AE, Harris RA, et al. (Effect of dry fibrin sealant dressings versus gauze packing on blood loss in grade V liver injuries in resuscitated swine. J Trauma. 1999; 46:49–58), que se incorpora como referencia como si se expusiera completamente en la presente descripción.

DEAE SEPHADEX™ A-50 se preparó como una suspensión al 10 % p/v en una solución de CaCl₂ 25 mM. Se realizó una perforación mediante el uso de un dispositivo

dedicado (ver la Figura 2a), que produjo una herida en forma de X, donde cada brazo tiene 5,5 cm de largo y el orificio central tiene 1,5 cm de profundidad, forma de bala y 9,5 mm de diámetro (Figura 2b). La herida representó un sangrado problemático (tal como una lesión de bala).

- 5 Se aplicó aproximadamente 20 ml de la composición probada sobre la herida. Se aplicó compresión manual en el sitio de la herida durante cuatro minutos. La composición probada detuvo el sangrado.

El experimento se realizó por triplicado (dos repeticiones más) y se obtuvieron resultados similares.

- 10 Si en un primer ensayo no había suficiente material presente para lograr la hemostasia completa, entonces se aplicó material adicional y se ejerció compresión durante tres minutos adicionales. Después, se logró la hemostasia completa.

Ejemplo 5: Evaluación del requisito de la matriz

- 15 En el siguiente ejemplo, los requisitos de la matriz a la que se une DEAE se evaluaron adicionalmente mediante el uso de un modelo de perforación circular de bazo porcino heparinizado *in vivo*, como se describió anteriormente. La preparación de las composiciones se describe en la Tabla 1 anterior. El tiempo de compresión fue de 60 segundos. En este experimento, la intensidad de sangrado inicial y la intensidad de sangrado posterior a la
- 20 aplicación se evaluaron de acuerdo con la escala de 0-5.

DEAE Dextran 500 es un derivado policatónico de Dextrano, preparado a partir de dextrano de peso molecular promedio de 500 kD, en el que las cadenas de dextrano no están reticuladas.

Se evaluaron las siguientes composiciones:

1. DEAE SEPHADEX™ A-50, preparado como una suspensión al 10 % p/v en una solución de CaCl₂ 20 mM (0,5 ml contiene 40 mg de DEAE SEPHADEX™ A-50);
2. DEAE dextran 500, preparado con polvo de CaCl₂ al 10 % (p/p) (100 mg de polvo contenía 90 mg de DEAE dextrano y 10 mg de CaCl₂).

Los resultados de la intensidad de sangrado de las diferentes composiciones probadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Efecto de las composiciones probadas en la reducción de la intensidad de sangrado en un modelo de sangrado de bazo

Composición probada	Sal de calcio	Índice de sangrado		
		Inicial	Posterior a la aplicación	Reducción*
DEAE SEPHADEX™ A-50 (10 % p/v)	+	3	0	3
DEAE Dextran 500 100 mg	+	3	3	0
DEAE Dextran 500 100 mg	+	2	3	0

El DEAE unido a una matriz reticulada tuvo éxito en lograr una hemostasia completa, mientras que el DEAE no unido a una matriz no logró disminuir la intensidad de sangrado.

Ejemplo 6: Efecto de los grupos cargados positivamente en la hemostasia

La densidad (es decir, la presencia) de los grupos cargados positivamente que se unen a una matriz como se describe en la presente descripción muestra que estos son importantes para lograr la hemostasia. Las cargas en una matriz deben estar presentes ventajosamente a una densidad que sea suficiente para lograr la hemostasia como se definió anteriormente.

Se mostró en los ejemplos anteriores que no todas las cargas positivas evaluadas proporcionaban el mismo nivel de eficacia hemostática. Por lo tanto, para evaluar la densidad de carga y el tipo de carga, se realiza un análisis para asegurar que esté presente un rango de densidad óptimo.

Para este fin, la matriz sintetizada se monomeriza, tal como por hidrólisis ácida, y se aplica a un instrumento analítico (p. ej., cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gases), capaz de separar los monómeros con base en las diferentes cargas que portan. De esta manera, se realiza un análisis para evaluar la densidad de carga en una determinada molécula.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de modalidades separadas pueden proporcionarse, además, en combinación en una sola modalidad. A la inversa, diversas características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola modalidad, pueden proporcionarse, además, separadamente o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuada en cualquier otra modalidad descrita de la invención. Ciertas características que se describen en el contexto de diversas modalidades no

deben considerarse características esenciales de estas modalidades, a menos que la modalidad sea inoperante sin esos elementos.

Aunque la invención se describe junto con modalidades específicas de esta, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para
5 los expertos en la técnica. En consecuencia, se pretende abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la invención.