

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 397**

51 Int. Cl.:

A61L 15/18 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2007 PCT/US2007/000645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2007 WO07081996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2007 E 07717956 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1973534**

54 Título: **Tejido hemostático**

30 Prioridad:

11.01.2006 US 758261 P
08.01.2007 US 650670

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2017

73 Titular/es:

ENTEGRION, INC. (50.0%)
79 T W Alexander Drive 4401 Research Commons
Research Triangle Park, NC 27709, US y
THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (50.0%)

72 Inventor/es:

FISCHER, THOMAS H.;
ESKRIDGE, STAN E., JR.;
MALLOY, WILLIAM M., JR. y
EVANS, MALLOY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 610 397 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

Tejido hemostático

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a tejidos, tales como vendajes, suturas, o telas, y más particularmente a tejidos hemostáticos que incluyen agentes que pueden controlar el sangrado rápidamente y se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 A pesar del considerable progreso en el entendimiento de los procesos patofisiológicos implicados en la hemostasia superficial (tópica), queda una considerable necesidad no satisfecha de materiales que se puedan aplicar a sitios de hemorragia para contener el sangrado. La herida traumática es la causa principal de muerte de individuos por debajo de 44 años de edad (Bozeman, W. Shock, Hemorrhage (2001)). Aproximadamente la mitad de las 100.000 muertes anualmente en los Estados Unidos de herida traumática, o 50.000 casos, son de desangramientos, (Peng, R., Chang, C., Gilmore, D. & Bongard, F. Am Surg Vol. 64 950-4 (1998)) y aproximadamente el mismo número de
15 pacientes con hemorragia sobreviven después de transfusión masiva de glóbulos rojos (Vaslef, S., Knudsen, N., Neligan, P., and Sebastian, M. J. Trauma-Inj. Inf. Crit. Care Vol. 53 291-296 (2002)). De este modo, aproximadamente 100.000 pacientes están en necesidad crítica de control de hemorragia en los EE.UU. cada año. La situación es igualmente crítica en el cuidado de las bajas por combate; en una reciente revisión de las bajas militares (Burlingame, B. DOD's experiences in Afghanistan Advanced Technological Applications for Combat
20 Casualty Care 2002 Conference in www.usacc.org (2002)), el control del sangrado no compresible se identificó como la necesidad más importante no satisfecha en medicina de emergencia militar. El cuidado estándar es frecuentemente la aplicación de un torniquete para el control "compresible" del sangrado y a continuación gasa para controlar el sangrado "no compresible" residual. Sin embargo, la pérdida de sangre continua a través de la gasa es un contribuidor principal de la morbilidad y mortalidad.

25 La técnica anterior está repleta de patentes que se refieren a distintas formas de vendas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 3.419.006 de King describe una venda transparente estéril para una herida y hecha de un gel polimérico hidrófilo de un polímero insoluble, y la patente de EE.UU. No. 4.323.061 de Usukura describe un vendaje rígido hecho de fibras de vidrio y fibras no de vidrio. Además el documento JP5200104 A describe un vendaje hecho de
30 fibras de vidrio con una capa de refuerzo de algodón. Además, se han intentado varios métodos para detener rápidamente el sangrado en una persona herida. Varios de estos métodos incluyen artículos tales como vendajes complementados con sustancias que aceleran químicamente los procesos de coagulación natural del cuerpo. Los ejemplos de tales artículos incluyen los siguientes:

La Patente de EE.UU. No. 3.328.259 de Anderson describe un vendaje o venda para heridas que incorpora polímeros tales como carboximetilcelulosa de sodio, hidroxietilcelulosa, polioxietileno, polivinilpirrolidona y similares.

35 La Patente de EE.UU. No. 4.192.299 de Sabatano describe un vendaje que incluye un paquete que contiene una sustancia antiséptica.

La Patente de EE.UU. No. 4.390.519 de Sawyer describe un vendaje en forma de una esponja y que contiene colágeno o una sustancia del tipo del colágeno.

40 La Patente de EE.UU. No. 4.453.939 de Zimmerman et al. describe una composición útil como venda para heridas y fabricada a partir de una combinación de colágeno, fibrinógeno y trombina.

La Patente de EE.UU. No. 4.606.337 de Zimmerman et al. describe una lámina de resorción para cerrar y tratar heridas, y está compuesta de una matriz de glicoproteína que contiene fibrinógeno y trombina.

La Patente de EE.UU. No. 4.616.644 de Saferstein et al. describe un vendaje adhesivo que incluye óxido de polietileno de alto peso molecular como agente hemostático.

45 La Patente de EE.UU. No. 5.800.372 de Bell et al. describe una venda hecha de un polímero absorbente e incluye colágeno microfibrilar.

La Patente de EE.UU. No. 5.902.608 de Read et al. describe ayudas quirúrgicas tales como vendajes, gasas, suturas y similares, que contienen células sanguíneas secas fijas que expresan factores de crecimiento derivados de plaquetas.

50 La Patente de EE.UU. No. 6.638.296 de Levinson describe un vendaje que incluye una almohadilla que contiene glucosamina o un derivado de glucosamina.

La Patente de EE.UU. No. 6.762.336 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO/99/59647 de MacPhee et al. describe un vendaje multicapa que incluye una capa de trombina intercalada entre dos capas de fibrinógeno.

5 La Patente de EE.UU. No. 6.897.348 de Malik describe un vendaje adhesivo que contiene un agente antimicrobiano y un agente hemostático (por ejemplo quitosano, niacinamida o ácido ascórbico) o un solo agente cicatrizante que contiene actividades tanto antimicrobianas como hemostáticas (por ejemplo, sal de ascorbato de niacinamida quitosano).

10 La patente de EE.UU. No. 6.891.077 de Rothwell et al. describe vendajes de fibrinógeno que incluyen un procoagulante tal como galato de propilo, ácido gálico, o uno de sus derivados. También se pueden incluir ingredientes opcionales tales como trombina o un agente antimicrobiano.

La publicación de solicitud de patente internacional No. WO 97/28823 de New Generation Medical Corporation describe un vendaje hemostático que contiene fibrinógeno en polvo y trombina adherida a una matriz fibrosa con un adhesivo viscoso no acuoso tal como un polisacárido viscoso, glicol o vaselina.

15 A pesar de los considerables progresos en la comprensión de los procesos fisiopatológicos implicados en la hemostasia, remodelación de tejidos y resolución en los sitios de la herida, sigue habiendo una necesidad crítica no satisfecha de un material que se pueda aplicar a sitios de herida para acelerar estos procesos. Se cree que la presente invención es una respuesta a esa necesidad.

Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a un tejido hemostático, que comprende: un material que comprende una combinación de fibras de vidrio y fibras de rayón, como se define por la reivindicación 1, en la que el tejido hemostático es capaz de activar sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un tejido hemostático, que comprende un material que comprende una combinación de alrededor de 65% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 35% en peso de fibras de bambú regeneradas; el tejido hemostático capaz de activar los sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida.

30 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un tejido hemostático, que comprende: un material que comprende una combinación de alrededor del 65% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 35% en peso de fibras de bambú regeneradas; y de alrededor de 0,1 a alrededor de 5% en peso de trombina o una fracción que comprende trombina basada en el peso total del tejido; el tejido hemostático capaz de activar los sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida.

35 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un tejido hemostático, que comprende: un material que comprende una combinación de alrededor de 65% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 35% en peso de fibras de bambú regeneradas; y uno o más agentes hemostáticos seleccionados del grupo que consiste en plaquetas RL, células sanguíneas RL, fibrina, y fibrinógeno, en el que las plaquetas RL y las células sanguíneas RL comprenden de alrededor de 0,1 a alrededor de 20% y la fibrina y el fibrinógeno comprenden de alrededor de 0,1 a alrededor de 5% en peso, basado en el peso total del tejido; el tejido hemostático capaz de activar los sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida.

40 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una tejido hemostático, que comprende: un material que comprende una combinación de alrededor de 65% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 35% en peso de fibras de bambú regeneradas; de alrededor de 0,1 a alrededor de 5% en peso de trombina o una fracción que comprende trombina basado en el peso total de tejido; y uno o más agentes hemostáticos seleccionados del grupo que consiste en plaquetas RL, células sanguíneas RL, fibrina, y fibrinógeno, en el que las plaquetas RL y las células sanguíneas RL comprenden de alrededor de 0,1 a alrededor de 20% y la fibrina y el fibrinógeno comprenden de alrededor de 0,1 a alrededor de 5% en peso, basado en el peso total del tejido; el tejido hemostático capaz de activar los sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida.

Estos y otros aspectos serán evidentes al leer la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá mejor cuando se toma junto con las siguientes figuras en las que:

50 La Figura 1 muestra curvas representativas de generación de trombina usando una realización de la presente invención;

La Figura 2 muestra tiempos para la generación de trombina usando realizaciones de la presente invención;

La Figura 3 muestra el análisis tromboelastográfico de materiales según la presente invención;

La Figura 4 muestra una comparación de células sanguíneas sobre fibra doble y gasa;

La Figura 5 muestra la interacción de glóbulos rojos (RBCs) con materiales según la presente invención;

La Figura 6 muestra la activación de plaquetas sobre los filamentos de vidrio usados en la presente invención; y

La Figura 7 muestra la pérdida total de sangre usando los materiales de la presente invención.

5 Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han encontrado inesperadamente que se puede preparar un tejido hemostático a partir de un composite de fibras de vidrio y una o más fibras secundarias. El tejido hemostático hecho a partir del composite de fibras presenta excelentes propiedades hemostáticas y absorción de fluidos. Para mejorar adicionalmente las propiedades hemostáticas del tejido hemostático hecho del composite, se pueden añadir factores sanguíneos adicionales tales como trombina, células sanguíneas liofilizadas, plaquetas liofilizadas, fibrina, fibrinógeno o sus combinaciones. Estos factores adicionales ayudan a activar la cascada de la hemostasia natural del cuerpo y dan como resultado un material que puede detener rápidamente el sangrado. Los inventores han descubierto que la combinación de fibras de vidrio, fibras secundarias y factores sanguíneos adicionales produce un nuevo tejido hemostático que rápidamente detiene el sangrado y es útil en situaciones en las que existen grandes hemorragias o cuando un paciente no puede ser inmediatamente admitido en un hospital o centro de tratamiento de traumas.

El tejido hemostático de la presente invención proporciona importantes ventajas sobre los productos actuales que activan la hemostasia. La presente invención es capaz de activar rápidamente los sistemas hemostáticos naturales del cuerpo, tales como la cascada de coagulación de la sangre, proporcionando concentraciones localmente altas de sustancias que activan esa cascada. Además, usando proteínas sanguíneas liofilizadas, el tejido hemostático de la presente invención se puede almacenar en estado seco listo para su uso inmediato durante largos períodos de tiempo. Este aspecto es particularmente ventajoso debido a que los productos y sistemas anteriores requerían proteínas hidratadas para la activación.

Como se indica anteriormente, la presente invención es un tejido hemostático, como se define por la reivindicación 1, que comprende un material que comprende una combinación de fibras de vidrio y fibras de rayón. Cada uno de estos componentes se discute con más detalle a continuación.

El componente de fibra de vidrio es preferentemente una fibra de vidrio preparada por procedimientos de extrusión o electrohilado, y tiene diámetros de fibra de 5 nanómetros a 15 micrómetros. Los tipos de vidrio contemplados para uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, vidrios de aluminoborosilicato con bajo contenido de óxido de sodio, vidrio de borosilicato, vidrio de plomo, aluminosilicato, álcali-silicato de bario, sílice vítrea, vidrio de calcogenuro, vidrio de fosfato y vidrio bioactivo vendido con el nombre comercial "BIOGLASS". Las dimensiones del componente de fibra de vidrio se pueden describir por nomenclatura convencional, que incluye las siguientes designaciones: B (3,5 micrómetros de diámetro); C (4,5 micrómetros de diámetro); D (5 micrómetros de diámetro); DE (6 micrómetros de diámetro); E (7 micrómetros de diámetro); G (diámetro de 9 micrómetros); H (10 micrómetros de diámetro); o K (13 micrómetros de diámetro). Además, el recuento de las hebras del componente de fibra de vidrio puede variar de 900 a 37. El grado de la fibra de vidrio puede ser cualquiera de grado eléctrico ("E"), grado químico ("C"), o alta resistencia ("S"), y los filamentos pueden estar en cualquier disposición, por ejemplo, continua, cortada o texturizada. Las fibras de fibra de vidrio también se pueden usar individualmente o en un estado plegado usando de 2 a 20 o más fibras. El material de fibra de vidrio está disponible comercialmente de diversos proveedores tales como Owens Corning, y está disponible comercialmente como Grados G75, fibra de vidrio de grado E, y similares, usando las designaciones descritas anteriormente.

Las fibras secundarias usadas en el tejido de la invención son fibras de rayón.

Las fibras secundarias preferidas incluyen fibras de bambú regeneradas (por ejemplo, químicamente procesadas), que tienen alta absorbancia de humedad y que son capaces de activar la cascada intrínseca de coagulación. Las fibras secundarias se pueden preparar usando métodos convencionales, que incluyen hilatura de anillo, extremo abierto (OE), rotor, o chorro de aire, y pueden tener recuentos que varían de 1/1 a 100/1 Ne.

Como se apreciará por un experto en la técnica, las fibras secundarias se pueden usar individualmente, o en combinaciones de dos, tres, cuatro o más en un estado mezclado o en hebras. Por ejemplo, en una realización, se pueden producir individualmente dos o más fibras secundarias y a continuación se mezclan o se retuercen entre sí para formar un hilo compuesto. En otra realización, las fibras secundarias se pueden formar en forma de un conjugado que comprende bloques de los tipos seleccionados de fibras, por ejemplo, bloques alternos de poliésteres y polisacáridos. En otra realización más, las fibras secundarias se pueden formar en forma de una combinación homogénea de diferentes hilos.

Las cantidades relativas de fibras de vidrio y fibras secundarias pueden variar ampliamente, por ejemplo, de alrededor de 0,1 a 99,9% en peso de fibras de vidrio y de alrededor de 99,9% a 0,1% en peso de fibras secundarias,

basado en el peso total del tejido seco. Las cantidades preferibles de estos materiales varían de alrededor de 30 a 80% en peso de fibras de vidrio y de alrededor de 70 a 20% en peso de fibras secundarias y más preferentemente de alrededor de 50 a 80% en peso de fibras de vidrio a de alrededor de 50 a 20% en peso de fibras secundarias. Los ejemplos de proporciones útiles de fibras de vidrio y secundarias en el tejido hemostático de la invención incluyen alrededor de 50% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 50% en peso de fibras secundarias; alrededor de 40% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 60% en peso de fibras secundarias; alrededor de 30% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 70% en peso de fibras secundarias; o alrededor de 20% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 80% en peso de fibras secundarias. Una combinación particularmente útil es alrededor de 65% en peso de fibras de vidrio y 35% en peso de fibras de bambú. El componente de fibra de vidrio y el componente de fibra secundaria se combinan usando métodos convencionales tales como hilado o tricotado.

En uso, el tejido hemostático de la invención puede adoptar cualquier configuración. En una realización, el tejido hemostático consiste en una capa hemostática diseñada para acelerar la hemostasia, y una capa exterior diseñada para la textura superficial, transferencia de humedad, adsorción de fluido y protección microbiana. En otra realización, el tejido hemostático consiste en tres capas: una capa hemostática diseñada para acelerar la hemostasia, una capa media para la resistencia y elasticidad de la venda, y una capa exterior diseñada para la textura superficial, la transferencia de humedad, la adsorción de fluidos y la protección microbiana. Se pueden concebir configuraciones adicionales por los expertos en la técnica.

El tejido hemostático de la invención también se puede tratar con varios agentes que mejoran su efectividad. Los ejemplos de agentes adicionales incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos que son microstaticos o microcidas; compuestos orgánicos o inorgánicos que reaccionan covalentemente con proteínas de coagulación sanguínea; compuestos orgánicos o inorgánicos que reaccionan covalentemente con tejido herido para formar enlaces covalentes para una adhesión mejorada a tejidos; compuestos orgánicos o inorgánicos que se polimerizan para formar una red polimérica tridimensional en o sobre la herida; agentes de formación de imágenes tales como agentes de contraste de ultrasonidos (por ejemplo, microburbujas rellenas de gas, nanopartículas metálicas y similares), agentes radio-opacos (por ejemplo, moléculas pequeñas yodadas tales como iopromida, polímeros yodados de alto peso molecular y similares), sondas de resonancia magnética (por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro, nanopartículas metálicas superparamagnéticas, gadolinio quelado con dietilenotriaminopentaacetato (DTPA), y polímeros que contienen gadolinio quelado con DTPA, y similares).

Otros agentes adicionales que se pueden incluir en el tejido hemostático de la invención incluyen acondicionadores de la piel tales como aloe vera, vitamina E, coenzima Q, colágeno y similares; agentes anti-inflamatorios tales como aspirina, ibuprofeno, acetaminofeno, vitamina C, inhibidores de la COX-2, esteroides, y similares; analgésicos tales como lidocaína, tetrocaína, opiáceos, cocaína, antihistaminas y similares; agentes antimicrobianos o antifúngicos tales como bacitracina, sales de plata, yoduro y similares; vasoconstrictores tales como epineferina, norepinefrina, vasopresina, hemoglobina, endotelinas, tromboxanos, eliminadores de NO y similares; factores de crecimiento tales como inhibidores de MMP, PDGF, y similares; agentes anti-cicatriz tales como IL-11, compuestos anti-queloides, y similares; agentes cauterizantes que experimentan una reacción exotérmica tras la rehidratación tales como zeolitas; agentes deshidratantes que son hidroscópicos tales como dextrano; agentes protrombóticos, tales como zeolita, sulfato de dextrano, polifosfato, interfaces minerales, fosfatidilserina, calcio y similares.

La matriz textil de la invención puede incluir también factores adicionales que actúan para activar los sistemas hemostáticos naturales del cuerpo y de este modo ayudan a detener rápidamente el sangrado. Tales factores adicionales incluyen trombina o una fracción de plasma que incluye trombina, plaquetas rehidratadas liofilizadas (RL), células sanguíneas RL, fibrina, fibrinógeno y sus combinaciones. En una realización preferida, la trombina se incorpora dentro del tejido para impartir una acción hemostática adicional. La trombina puede ser de cualquier fuente (naturalmente aislada, recombinante, etc.) o puede estar en forma de una fracción de plasma o suero que contiene trombina y factores de coagulación adicionales tales como factor XII, factor XIIa, factor XI, factor XIa, factor XIII, factor XIIIa, factor IX, factor IXa, factor VIII, factor VIIIa, factor vWF, factor V, factor Va, factor X, factor Xa, y sus combinaciones, u otros cofactores de coagulación tales como componentes de veneno animal, tales como reptilasa, o agentes vasoactivos tales como endotelinas, tromboxanos, eliminadores de óxido nitroso (NO), o sus combinaciones. Estos factores, o cualquiera de los factores listados anteriormente, pueden estar en forma seca o líquida cuando se incorporan al tejido de la invención.

La trombina contemplada para su uso en el tejido de la invención puede adoptar cualquier forma incluyendo trombina Ila muy purificada de fuentes humanas o animales, plantas modificadas genéticamente u otros sistemas de expresión de proteínas naturales o recombinantes. Además, en la presente invención se puede usar trombina parcialmente purificada de fuentes humanas o animales, plantas modificadas genéticamente u otros sistemas de expresión de proteínas naturales o recombinantes. La trombina contemplada para uso en la presente invención también puede estar contenida en suero o plasma purificado o parcialmente purificado. En una realización, la trombina usada en el tejido de la presente invención es una fracción de suero parcialmente purificada que contiene trombina Ila.

La cantidad preferida de trombina en el tejido de la invención varía de alrededor de 0,01% en peso a alrededor de 10% en peso, basado en el peso total del tejido seco. Las cantidades más preferidas de trombina incluidas en el

tejido de la invención varían de alrededor de 0,05% en peso a alrededor de 7% en peso y lo más preferentemente de alrededor de 0,1% en peso a alrededor de 5% en peso, todas basadas en el peso total del tejido seco.

5 Como se explica con más detalle en los ejemplos a continuación, para producir un tejido hemostático que incluye trombina, la matriz textil se empapa en una disolución que contiene trombina y se congela y liofiliza. Se pueden incluir conservantes tales como glicerol, propanodiol, polioxietilenglicol (PEG) trehalosa, y similares, en la disolución de empapado para prevenir que el tejido se vuelva quebradizo o calcáreo durante la liofilización. En general, las concentraciones de conservante en la disolución de trombina varían hasta un máximo de alrededor de 20% (v/v). En realizaciones preferidas, se usa alrededor de 12% (v/v) de glicerol.

10 En otra realización preferida, se incorporan en el tejido una o más de las plaquetas rehidratadas liofilizadas (RL), células sanguíneas RL, fibrina o fibrinógeno para impartir una acción hemostática adicional. Se conocen en la técnica células sanguíneas liofilizadas rehidratadas y plaquetas rehidratadas y métodos para su fabricación. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. No. 4.287.087; 5.651.966; 5.891.393; 5.902.608; 5.993.804.

15 Brevemente, las plaquetas RL se preparan aislando las plaquetas, exponiéndolas a un fijador tal como formaldehído, y secando. Las plaquetas RL también se pueden adquirir comercialmente de Entegrión, Inc. (Research Triangle Park, NC) con el nombre comercial "STASIX". También se conocen métodos de aislamiento y purificación de fibrina y fibrinógeno en la técnica.

20 Brevemente, para producir células sanguíneas RL, se puede obtener sangre de voluntarios sanos, después del consentimiento informado firmado, en citrato-fosfato-dextrosa con adenina (CPDA-I) y se someten a centrifugación a 1000xg durante 20 min para obtener RBCs. Los eritrocitos se diluyen hasta un hematocrito = 5% en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugan a 2.000xg durante 10 min. Esta etapa se puede repetir dos veces adicionales para separar RBCs de proteínas de plasma. Los RBCs a continuación se pueden reticular con glutaraldehído (para RBCs glut-RL) o una mezcla de paraformaldehído y glutaraldehído (para RBCs para-RL). El aldehído sin reaccionar se puede retirar de los RBCs por centrifugación (como para la retirada de las células de las proteínas de plasma), y finalmente las células se congelan y liofilizan a -30°C.

25 La fibrina y el fibrinógeno también están disponibles comercialmente de diversas fuentes. Por ejemplo, el material de grado clínico se vende con el nombre comercial HAEMOCOMPLETTAN P de ZLB Behring (Marburg, Alemania) y TISSEEL de Baxter (Deerfield, IL USA). El material de grado de investigación está disponible en Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN USA). La fibrina y el fibrinógeno también se pueden aislar según procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, van Ruijven-Vermeer IA, et al., Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 360: 633-7 (1979)). La fibrina y el fibrinógeno también se pueden aislar usando precipitaciones en glicina, sulfato de amonio o etanol que se conocen en la técnica.

35 Las plaquetas RL, las células sanguíneas RL, la fibrina o el fibrinógeno, se pueden añadir en forma de polvo esparciendo o soplando el material seco sobre la matriz y liofilizando. Alternativamente, estos materiales se pueden añadir a la matriz en forma de disolución, y congelar y secar como se describe anteriormente. Se pueden incluir conservantes tales como glicerol, propanodiol, polioxietilenglicol (PEG) trehalosa, y similares, en la disolución de remojo para prevenir que el tejido se vuelva quebradizo o calcáreo durante la liofilización. En general, las concentraciones de conservante en la disolución de trombina varían hasta un máximo de alrededor de 20% (v/v). En realizaciones preferidas, se usa glicerol al 12% (v/v).

40 Cualquier combinación de células sanguíneas RL, plaquetas RL, fibrina y/o fibrinógeno se puede incorporar al tejido de la presente invención. Preferentemente, la cantidad total de células sanguíneas RL, plaquetas RL, fibrina y/o fibrinógeno varía de alrededor de 0,1% a alrededor de 50% en base al peso total del tejido seco. En realizaciones ejemplares, el tejido hemostático de la invención puede incluir las siguientes combinaciones (todos los porcentajes en peso se expresan en base al peso total del tejido seco):

Intervalo	Plaquetas RL o células sanguíneas RL (% en peso)	Fibrina o fibrinógeno (% en peso)
Intervalo preferido	de 0,1 a 20	de 0,1 a 5
Intervalo más preferido	de 1,0 a 10	de 0,5 a 2
El intervalo más preferido	de 3 a 7	de 0,75 a 1,5

45 En otra realización más, la matriz textil de la invención incluye tanto trombina o una fracción que contiene trombina como una o más de plaquetas rehidratadas liofilizadas (RL), células sanguíneas RL, fibrina o fibrinógeno. Por ejemplo, una combinación preferida de plaquetas secas, fibrinógeno y trombina es de alrededor de 3 a 7% en peso de plaquetas RL, de 0,75 a 1,5% en peso de fibrinógeno y de 0,1 a 5% en peso de trombina, todas basadas en el peso total del tejido seco. En una realización particularmente preferida, se usa una combinación de alrededor de 5%

en peso de plaquetas RL, alrededor de 1% en peso de fibrinógeno y alrededor de 0,1% en peso de trombina.

Se prepara preferentemente un tejido hemostático que contiene tanto trombina como una o más de las plaquetas rehidratadas liofilizadas (RL), células sanguíneas RL, fibrina o fibrinógeno incorporando primero trombina en la matriz seguido de la incorporación de una o más de las plaquetas rehidratadas liofilizadas (RL), células sanguíneas RL, fibrina o fibrinógeno usando las técnicas descritas generalmente anteriormente. En una realización, el tejido hemostático de la invención se puede infundir con una combinación de fibrinógeno y trombina como se describe en la patente de EE.UU. No. 6.113.948, incorporada aquí como referencia, y disponible en ProFibrix BV (Leiderdorp, Países Bajos) con el nombre comercial "FIBROCAPS"(una combinación de microesferas de fibrinógeno y microesferas de trombina). Se pueden incluir conservantes tales como glicerol, propanodiol, polioxietilenglicol (PEG) trehalosa, y similares, en la disolución de remojo para evitar que el tejido se vuelva quebradizo o calcáreo durante la liofilización. En general, las concentraciones de conservante en la disolución de trombina varían hasta un máximo de alrededor de 20% (v/v). En realizaciones preferidas, se usa glicerol al 12% (v/v).

Generalmente, el tejido hemostático de la invención se fabrica mediante las siguientes etapas:

1. Se preparan plaquetas RL o células sanguíneas RL y se liofilizan según los procedimientos publicados;
2. El tejido hemostático se fabrica a partir de los componentes textiles. Durante esta etapa, el tejido se puede tratar químicamente por adición de una cantidad definida de agentes tales como glicerol, propanodiol, polioxietilenglicol (PEG) para conservar el tejido y ayudar a la adhesión de proteínas hemostáticas. Adicionalmente, en esta etapa, se liofiliza suero o plasma que contiene trombina sobre la matriz textil.
3. Las proteínas hemostáticas tales como las plaquetas RL, células sanguíneas RL, fibrina, o fibrinógeno se aplican directamente a una superficie seleccionada del tejido hemostático (por ejemplo, una superficie que se pondrá en contacto con tejido herido) con una densidad de partícula preseleccionada (proteína por área cuadrada de superficie textil) o porcentaje en peso basado en el peso total del tejido. Las proteínas hemostáticas se pueden aplicar en cualquier orden, y se pueden aplicar al tejido en forma de disolución en una forma seca. En una realización, las plaquetas RL se pueden estabilizar con aldehído, aplicar al tejido en un estado líquido, y a continuación liofilizar sobre el tejido.
4. El tejido hemostático infundido se envasa y se somete opcionalmente a esterilización (por ejemplo, irradiación gamma o UV).

Los ejemplos detallados de tejidos hemostáticos y su método de fabricación se describen a continuación.

La matriz textil de la invención es capaz de activar los sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida, incluyendo los sistemas de coagulación sanguínea y sistemas de vasoconstricción. Se sabe desde hace mucho tiempo que varios materiales activan las plaquetas y otros factores de coagulación de la sangre cuando entran en contacto con un sitio herido. Las plaquetas, como principal componente celular de la sangre que proporcionan hemostasia en respuesta al daño vascular, se activan con el contacto cuando se exponen a materiales extraños tales como vidrios metálicos y plásticos. Véase por ejemplo, Barr, H. The stickiness of platelets. Lancet ii, 775 (1941)). Además, es bien conocido que la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina en la cascada de coagulación de la sangre. La combinación de componentes en el tejido hemostático de la presente invención actúa conjuntamente localmente y sinérgicamente para activar la cascada de coagulación de la sangre en una forma muy concentrada y localizada cuando se aplica a una herida.

El tejido hemostático de la invención es útil como vendaje de heridas, por ejemplo, una venda, gasa, y similares, o se puede dar forma en suturas para uso en cirugía. Los usos adicionales incluyen formar el tejido hemostático de la invención en forma de telas para uso en la fabricación de ropa protectora o forros para ropa, o para uso en torniquetes. Adicionalmente, en otra realización, el tejido hemostático de la presente invención está en la forma de un kit para uso en cirugía o situaciones de emergencia o trauma. El kit incluye el tejido hemostático de la invención en rollos, láminas, u otra forma apropiada, y se puede usar con o sin los factores sanguíneos adicionales.

45 Ejemplos

Todas las partes y porcentajes son en peso y todas las temperaturas son en grados Celsius a menos que se afirme explícitamente de otro modo.

Materiales

Se usaron las siguientes disoluciones en los Ejemplos descritos a continuación

50 Anticoagulante citrato de dextrosa (ACD): Na₃Citrato 0,042 M, ácido cítrico 0,035 M, dextrosa anhidra al 20% peso/v, pH a 4,5.

Disolución salina citratada: Na₃Citrato 6,2 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5.

Disolución salina tamponada con imidazol: imidazol 84 mM, NaCl 150 mM, pH 6,8.

Paraformaldehído al 4%: 20 gramos de paraformaldehído y 9,4 gramos de NaH_2PO_4 se suspenden en 400 ml de H_2O desionizada y se calientan a alrededor de 60°C en un baño de agua hasta que se disuelvan. El pH se establece a 7,2 y se añade agua hasta 500 ml.

- 5 Disolución fijadora (preparada inmediatamente antes del uso): combinar 1 ml de ACD, 10 ml de NaH_2PO_4 0,135 molar, pH = 6,5, y 9 ml de paraformaldehído al 4% (peso/v).

Tampón de imidazol: imidazol 84 mM, pH = 6,8.

Disolución patrón de citrato: citrato de sodio al 3,2%, pH = 7,4.

Ejemplos 1-7: Preparación de tejidos hemostáticos

- 10 Las siguientes combinaciones textiles específicas se realizaron y usaron en los experimentos a continuación:

Tejido 1: estilo de tejido; fibra de vidrio G75 en la urdimbre; 30/1 rayón de bambú al 100% OE en la trama.

La combinación anterior era un co-tejido de fibra de vidrio/bambú con las fibras de vidrio (G75, hilo hilado de grado electrónico E225 de vidrio extruido de grado E) en la orientación "larga" (urdimbre) y las fibras de bambú que van "a través" del tejido (relleno).

- 15 Tejido 2: Estilo de tejido; ECBC150 1/0 1.0 Z fibra de vidrio en la urdimbre; 18/1 100% rayón de bambú MJS en la trama.

Tejido 3: Estilo de tejido; ECE225 2/0 4.0 Z fibra de vidrio en la urdimbre; 18/3 100% de rayón de bambú RS en la trama.

- 20 Tejido 4: Estilo de punto; 1 extremo - ECG75 1/2 Fibra de vidrio; 1 extremo - 18/1 100% rayón de bambú OE en la trama.

Tejido 5: Estilo de punto; 2 capas - ECGI 50 1/0 fibra de vidrio retorcida con 20/1 100% rayón de bambú.

Tejido 6: Estilo de tejido; ECE225 2/0 4.0 Z fibra de vidrio en la urdimbre; 16/2 100% de lino en la trama.

Tejido 7: Estilo de tejido; ECH 18 1/0 0,7 Z fibra de vidrio en la urdimbre; 18/2 100% Lyocel MJS en la trama.

Ejemplo 8: Preparación de una matriz textil hemostática que incluye trombina

- 25 Se combinaron 120 mg de fibra de vidrio de grado pelo de ángel con 8 ml de plasma (Innovative Research, Inc., Southfield, MI) y 80 μl de CaCl_2 1M y se colocaron sobre un balancín. La mezcla se mezcló suavemente sobre el balancín durante alrededor de 90 minutos, y la fibra de vidrio se separó de la mezcla por centrifugación (300xg durante 5 minutos). El sobrenadante se recogió y se añadió glicerol hasta una concentración final de 9% en peso. El producto final es un suero que contiene trombina IIa.

- 30 50 cm^2 del Tejido 1 anterior se empaparon durante alrededor de 1 minuto en aproximadamente 5 ml del suero anterior. Se dejó escurrir el exceso de suero y la matriz textil empapada se congeló a -20°C y se liofilizó.

Ejemplo 9: Preparación de una matriz textil hemostática que incluye trombina y un agente hemostático adicional

A. Matriz textil que incluye trombina y plaquetas liofilizadas rehidratadas (RL).

- 35 Se detallan aquí dos métodos para preparar matrices hemostáticas basadas en tejido con plaquetas y trombina rehidratadas liofilizadas (RL). La calidad de los preparados se puede evaluar usando el Análisis de Generación de Trombina descrito a continuación.

1. Método 1

En este método, las plaquetas RL se fabrican por separado, y a continuación se añaden a la matriz textil.

(a). Preparación de plaquetas RL

- 40 Las plaquetas RL se preparan como se describe en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.651.966 y 6.139.878. Alternativamente, se puede usar el procedimiento siguiente:

Se prepara plasma rico en plaquetas (PRP) extrayendo primero sangre venosa fresca en ACD (por ejemplo, 42,5 ml de sangre en 7,5 ml de ACD en una jeringa de 50 cm^3). La sangre se somete a centrifugación (10 minutos, 1.200 rpm a $25\text{-}27^\circ\text{C}$) para depositar los glóbulos rojos. El PRP se encuentra en el sobrenadante. Alternativamente, el PRP se puede aislar de plaquetas almacenadas y/o caducadas retirando las células de la bolsa de almacenamiento y

- 45

centrifugando durante 10 minutos a alrededor de 1200 rpm para retirar los glóbulos rojos contaminantes y las plaquetas agregadas.

5 Las proteínas plasmáticas se eliminan del PRP usando centrifugación (10 minutos a alrededor de 2.400 rpm) y resuspendiendo las plaquetas aisladas en tampón salino citratado. Las plaquetas se lavan dos veces en tampón salino citratado y se resuspenden en tampón salino citratado hasta una concentración final de alrededor de 8×10^9 plaquetas/ml. Alternativamente, las proteínas plasmáticas se pueden retirar del PRP usando cromatografía de tamaño (Sepharose 4B equilibrada con tampón salino citratado). Las fracciones de turbidez se pueden recoger, combinar, y aislar las plaquetas por centrifugación. A continuación, las plaquetas se resuspenden en tampón salino citratado hasta una concentración final de alrededor de 8×10^9 plaquetas/ml.

10 Las plaquetas aisladas se reticulan añadiendo gota a gota 3,5 ml de disolución fijadora a 1,25 ml de plaquetas aisladas a una concentración de alrededor de 8×10^9 plaquetas/ml con agitación suave. La disolución fijadora se añade hasta un volumen final de alrededor de 10 ml y la mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente sin mezcla o agitación. Las plaquetas reticuladas se aíslan por centrifugación (10 min a 2.400 rpm) y se resuspenden en disolución salina tamponada con imidazol, se lavan, y finalmente se resuspenden en disolución salina tamponada con imidazol hasta una concentración final de aproximadamente 1×10^9 plaquetas/ml.

15 Las plaquetas reticuladas se congelan y se liofilizan suspendiéndolas en primer lugar en disolución salina tamponada con imidazol con seroalbúmina bovina al 5% a pH 6,8 hasta una concentración final de plaquetas de aproximadamente $0,8 \times 10^9$ plaquetas/ml. La mezcla se distribuye en alícuotas de 1 ml, se congela a -80°C y se liofiliza durante la noche o más. El producto liofilizado se puede almacenar a -20°C . Las plaquetas reticuladas liofilizadas se pueden rehidratar resuspendiéndolas en tampón de imidazol.

(b). Adición de plaquetas RL a una matriz.

20 Para preparar una matriz que contiene plaquetas RL, se muelen primero plaquetas RL en estado seco hasta un polvo fino. El polvo fino se esparce uniformemente sobre una superficie estéril plana, tal como una placa Petri y un lado de la matriz cargada con trombina liofilizada preparada en el Ejemplo 8 anterior se presiona sobre el polvo RL y se retira. Las plaquetas RL en polvo también se pueden soplar dentro del tejido usando técnicas de soplado conocidas. Como método alternativo, se pueden preparar plaquetas RL sin liofilizar y en ausencia de seroalbúmina, y resuspender en el suero de trombina preparado en el Ejemplo 8 anterior. Empapar la matriz deseada en esta disolución produce el producto final. Como segunda alternativa, las plaquetas RL rehidratadas se pueden resuspender en el suero de trombina descrito en el Ejemplo 8 anterior y usar para empapar la matriz deseada para producir el producto final.

2. Método 2

25 En este método, las plaquetas RL se estabilizan en aldehído después de unirse a la matriz textil, como un componente de la matriz. El principio aquí es permitir primero que las plaquetas se activen por contacto y se adhieran a la matriz por medio de procedimientos interactivos normales entre las células hemostáticas y las fibras textiles. Las plaquetas y la matriz textil a continuación se conducen al proceso de estabilización de aldehído conjuntamente. Este método incluye las siguientes etapas:

(a) Se prepara plasma rico en plaquetas (PRP) como se describe anteriormente o alternativamente se obtiene plasma rico en plaquetas almacenado normalmente líquido.

30 (b) El plasma rico en plaquetas se incuba con una cantidad de la matriz textil que se ha predeterminado que se une al 90% de las plaquetas. Para predeterminar el alcance de la unión, se incuba una muestra de matriz con exceso de plaquetas (más que suficiente para saturar la matriz) y se calcula la cantidad de plaquetas que quedan en la mezcla después de que se retira la matriz.

(c) Se retira la matriz del PRP y se mide la concentración de plaquetas en el fluido residual.

35 (d) Se incuba el tejido en un volumen 10x de disolución salina citratada durante 5 minutos en un balancín y se drena el exceso de fluido. Esta etapa se repite tres veces. La matriz textil empapada se coloca a continuación en un volumen apropiado de disolución salina citratada para un recuento de plaquetas textiles unidas de 8×10^9 plaquetas/ml para uso en la etapa de reticulación descrita a continuación.

40 (e) Se añaden gota a gota 3,5 ml de disolución fijadora a 1,25 ml de plaquetas-matriz empapada (con 8×10^9 plaquetas/ml) con suave vórtice para mezclar. La mezcla se diluye adicionalmente hasta un volumen final de 10 ml con una adición rápida de disolución fijadora para un recuento final de plaquetas unidas al tejido de 1×10^9 plaquetas/ml. La incubación se realiza durante 1 h a temperatura ambiente sin mezcla o agitación. Finalmente, la matriz textil con plaquetas se diluye en unos diez volúmenes de disolución salina tamponada con imidazol y se incuba durante 5 min en un balancín, se retira por drenado el fluido en exceso. Esta etapa se repite tres veces.

45 (f) Para incluir trombina, se retira la disolución salina tamponada con imidazol en exceso de la matriz textil con plaquetas tan concienzudamente como sea posible y a continuación se empapa en exceso de suero Ila como se

describe anteriormente. El suero Ila en exceso se retira y la matriz textil se congela y liofiliza como se describe anteriormente.

(g) Caracterizar la matriz hemostática liofilizada usando análisis de generación de trombina (descrito a continuación).

5 Se apreciará por los expertos en la técnica que aunque los Ejemplos 8 y 9 utilizan el Tejido 1 anterior para preparar una realización de la presente invención, se puede usar alternativamente cualquier combinación textil descrita aquí (por ejemplo, los tejidos 2-7 descritos anteriormente).

Análisis de generación de trombina

10 Este procedimiento sigue Fischer, T.H. et al. Synergistic platelet integrin signaling and factor XII activation in poly-N-acetyl glucosamine fiber-mediated hemostasis. *Biomaterials* 26, 5433-43 (2005). Brevemente, la cinética de generación de trombina se puede usar para reflejar la capacidad de las matrices hemostáticas de funcionar como una superficie catalítica para componentes (por ejemplo, factor XII) de la cascada de coagulación. En este ensayo, la trombina (Ila) escinde el sustrato sintético no fluorescente péptido-D-Phe-Pro-Arg-ANSNH para generar un producto fluorescente. Se sigue la secuencia temporal para la generación de fluorescencia en un lector de plaquetas fluorescentes de 96 pocillos en modo cinético.

15 Se llenan placas de 96 pocillos con 150 μ l de BSA al 5% y disolución salina citratada durante la noche a 37°C, a continuación se almacenan a 4°C hasta su uso. Se preparan piezas de matriz hemostática de 4 mm (aproximadamente) de diámetro con un punzón Trepine de 4 mm o una navaja o una tijera afilada. El sustrato fluorométrico Ila D-Phe-Pro-Arg-ANSNH (Cat # SN-17a- C₆H₁₁ de Haematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT) se diluye 1/200 en plasma, seguido de CaCl₂ hasta una concentración final de 10 mM. Las mezclas se colocan en un fluorímetro y se mide la fluorescencia (490 nm) durante aproximadamente dos horas. Los datos se analizan representando la secuencia temporal de cada pocillo y midiendo la pendiente inicial y máxima de la curva de cambio de fluorescencia relativa y el tiempo requerido para obtener la pendiente máxima. Las pendientes inicial y máxima, junto con el tiempo hasta la pendiente máxima, son las métricas de calidad. Cuanto más altas sean las pendientes y más corto sea el tiempo hasta la pendiente máxima, más pro-hemostática será la matriz.

25 Ejemplo 10: Preparación de un tejido de fibra doble

Este Ejemplo ilustra la preparación de un tejido hecho de fibras de vidrio en combinación con otra fibra textil seleccionada. Dos líneas de evidencia apuntan hacia el hilo de vidrio de filamento continuo como un componente potencial de un tejido hemostático. En primer lugar, se descubrió que las plaquetas se activaban y adherían al vidrio (Barr, H. *Lancet* 238, 609 - 610 (1941)). Como consecuencia, los vasos de vidrio se evitan generalmente en el manejo in vitro de plaquetas, y la unión a vidrio es un método de larga data para evaluar la actividad plaquetaria (McPherson, J. & Zucker, M.B. *Blood* 47, 55-67 (1976); Tsukada, T. & Ogawa, T. *Rinsho Ketsueki* 14, 777-84 (1973); Cooper, R.G., Cornell, C.N., Muhrer, M.E. & Garb, S. *Tex Rep Biol Med* 27, 955-61 (1969)). En segundo lugar, las proteínas plasmáticas (Stouffer, J.E. & Lipscomb, H.S. *Endocrinology* 72, 91 - 4 (1963); Lissitzky, S., Roques, M. & Benevent, M.T. *CR Seances Soc Biol Fil* 154, 396-9 (1960), H.B. *Biochim Biophys Acta* 19, 464 - 71. (1956)), FXII (Ratnoff, O.D. & Rosenblum, J.M. *Am J Med* 25, 160 - 8 (1958)) y fibrinógeno (Sit, P.S. & Marchant, R.E. *Thromb Haemost* 82, 1053-60 (1999); Rapoza, R.J. & Horbett, T.A., J. *Biomed Mater Res.* 24, 1263-87 (1990), Perez-Luna, V.H., Horbett, T.A. & Ratner, B.D. J. *Biomed Mater Res* 28, 1111-26 (1994)) que son ejemplos bien estudiados, experimentan procesos de adsorción química y física sobre superficies extrañas (Silberberg, A.J. *Physical Chem.* 66, 1872-1883 (1962)). Se encontró que el FXII (Factor de Hageman) es particularmente importante porque inicia la coagulación humoral en la interfase vidrio/sangre (Ratnoff, supra; Ratnoff, O.D. & Margolius, A., Jr. *Trans Assoc Am Physicians* 68, 149-54 (1955)). La activación plaquetaria y la producción de la coagulación intrínseca son mecanismos altamente interrelacionados, en parte debido al papel de las plaquetas como superficie catalítica para el montaje del complejo Va/Xa para la generación de trombina. La activación de plaquetas por biomateriales (por ejemplo, vía la señalización interna-externa de integrina) puede dar como resultado la presentación superficial de fosfatidilserina, un componente importante de complejos catalíticos para la generación de trombina (Fischer, T.H., Connolly, R., Thatte, H.S. & Schwaizberg, S.S. *Microsc Res Tech* 63, 168-74 (2004)). Se ha encontrado que el factor XII está periféricamente asociado con la superficie de las plaquetas para la activación del camino de coagulación intrínseca en el microambiente de la célula (Iatridis, P.G., Ferguson, J.H. & Iatridis, S.G. *Thromb Diath Haemorrh* 11, 355-71 (1964); Shibayama, Y., Reddigari, S. & Kaplan, A.P. *Immunopharmacology Vol.* 32 24-7 (1996)), aunque la serie de etapas proteolíticas que implican el factor XII que ocurren en la superficie de las plaquetas son pobremente entendidas. El efecto neto de la estrecha relación entre la coagulación mediada por XIIa y la activación plaquetaria es sinergismo para la iniciación más temprana de la polimerización de fibrina.

La interacción de fluidos con vidrios se controla en gran parte por fenómenos de tensión superficial relacionados con la hidrofobicidad, el potencial zeta y la humectabilidad. Existe una interacción mínima de fluidos con el interior de los filamentos. De este modo, se buscó un segundo tipo de fibra más absorbente para compensar el bajo transporte de fluido y la absorción del vidrio. Se ensayó un panel de fibras naturales y sintéticas para determinar la tendencia a activar las plaquetas y la cascada de coagulación intrínseca. Un producto de doble fibra que consiste en vidrio de tipo E de filamento continuo y rayón especial se preparó y ensayó para determinar la efectividad hemostática en modelos porcinos para hemorragia.

5 Materiales. El vidrio de filamento continuo de tipo E (fibra de vidrio ECDE 11.6) se proporcionó por Carolina Narrow Fabrics, Inc. (Winston-Salem, NC). El rayón especial hecho de bambú (*Bambusa textiles*) y otras fibras naturales y sintéticas fueron proporcionados por Cheraw Yarn Mills, Inc. (Cheraw, SC). La tela de tejido de doble fibra de vidrio/rayón especial fue preparada por Carolina Narrow Fabrics, Inc. (Winston-Salem, NC). La gasa era originaria de Kendall (Mansfield, MA).

10 Aislamiento de plasma rico en plaquetas. La sangre periférica de voluntarios normales que dieron su consentimiento se extrajo en citrato anticoagulante, a continuación se aisló plasma rico en plaquetas con centrifugación diferencial como se detalla en Fischer, T.H. et al. *Biomaterials* 26, 5433-43 (2005). La concentración de plaquetas en el plasma rico en plaquetas se midió con un analizador hematológico Hiska, y la concentración de plaquetas se ajustó a 150.000 plaquetas/ul diluyendo la muestra con plasma libre de plaquetas.

15 Cinética de generación de trombina. El efecto de las fibras sobre la cinética de la generación de trombina en plasma rico en plaquetas (a 150.000 plaquetas/ul) se investigó siguiendo la hidrólisis del sustrato de trombina D-Phe-Pro-Arg-ANSNH para dar un producto de reacción fluorescente. Se ensayaron 300 µg de cada fibra en 100 µl de plasma rico en plaquetas por triplicado con el sustrato fluorogénico D-Phe-Pro-Arg-ANSNH. La secuencia temporal para la generación de trombina se inició añadiendo CaCl₂ para 10 mM a cada muestra. El tiempo de retraso para la generación de trombina se definió como el momento en el que se incrementó la fluorescencia un 10% sobre el valor base inicial.

20 Tromboelastografía. Se realizaron mediciones tromboelastográficas (TEG) con un Analizador de Hemostasia Thrombelastograph TEG-5000 (Haemoscope Corporation, Niles, IL). Los ensayos se iniciaron añadiendo CaCl₂ a 10 mM a plasma rico en plaquetas (a 150.000 plaquetas/µl) y a continuación transfiriendo inmediatamente 327 µl del plasma rico en plaquetas calcificado a la cámara de tromboelastografía que contenía los materiales en 33 µl de disolución salina citratada. La concentración final de fibra era 3,0 mg/ml. Las medidas se realizaron durante una hora por triplicado a 37°C, y a continuación se extrajeron parámetros relevantes de la curva de "rigidez".

25 Microscopía electrónica de barrido. El análisis SEM de materiales basados en glucosamina se realizó como sigue. Se dejó que la sangre periférica entera procedente de voluntarios humanos normales fluyera directamente desde la mariposa de venopunción sobre el tejido o la gasa de fibra doble de modo que 1 cm x 1 cm de cada material estuviera cubierto por 2 ml de sangre entera. Los materiales se dejaron incubar durante un minuto, a continuación se diluyeron a 50 ml con disolución salina citratada + EGTA 1 mM para enfriar los procesos hemostáticos. Los materiales se dejaron sedimentar durante 5 minutos por gravedad, a continuación se rediluyeron con disolución salina citratada. Este procedimiento se repitió dos veces más para obtener cada material libre de RBCs sin unir. Después de un minuto de contacto con la sangre y los múltiples ciclos de dilución y de sedimentación del complejo de material/RBC, se añadió glutaraldehído para 0,1% (peso/v) y las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una hora. Las muestras se diluyeron 1/1 (v/v) con paraformaldehído al 4% para una concentración final de 2%, y a continuación se añadió glutaraldehído adicional para una concentración final de 0,5%. Se ha demostrado que la etapa de estabilización inicial con glutaraldehído al 0,1% minimiza las alteraciones osmóticas en la morfología de los glóbulos rojos (RBC) debido a la exposición al paraformaldehído (Fischer, T.H. et al., *Microsc Res Tech* 65, 62-71 (2004)). Las muestras se almacenaron a 4°C durante la noche y a continuación se examinaron con un microscopio electrónico de barrido Cambridge S200 a 20 kV.

40 Medida de RBCs unidos - Muestras de 10 mg de fibra doble o gasa se expusieron directamente a 1,0 ml de sangre periférica entera y se lavaron según se detalla para microscopía electrónica de barrido. Las pGlcNAc se colocaron a continuación en 10 ml de agua destilada con TX-100 al 1% para liberar hemoglobina de RBCs unidos. Las muestras se centrifugaron a 10.000xg durante cinco minutos, a continuación se midió la absorbancia a 414 nm para cuantificar la cantidad total de hemoglobina (y de este modo el número de glóbulos rojos) asociada con cada material.

45 Medida de la extensión de la lisis de RBC debido al contacto con el material. Se expusieron muestras de 10 mg de fibra doble o gasa a 1,0 ml de sangre periférica entera como en las dos últimas secciones. Después de un minuto de exposición, las muestras se centrifugaron a 10.000xg durante cinco minutos para formar pelets de células sanguíneas y otros materiales. Se midió la densidad óptica a 414 nm para cuantificar la cantidad de hemoglobina liberada en los sobrenadantes, y de este modo la cantidad de sangre derramada.

50 Modelo de hemorragia de transección del plexo braquial y arteria femoral porcinos. Se anestesian cerdos de 40 a 50 kg de raza mixta con isoflurano y a continuación se colocan varios sensores para seguir los procesos hemodinámicos y vasoactivos: se inserta un catéter de termodilución de la arteria pulmonar vía la vena yugular externa en una arteria pulmonar; se colocan catéteres con punta micromanométrica a través de los vasos femorales izquierdos en la aurícula derecha y la aorta torácica; se inserta un catéter de calibre 22 en la arteria femoral izquierda y se conecta a una bomba de extracción; se colocan catéteres vía los vasos femorales izquierdos.

55 La fase de reto de la hemorragia del experimento se realizó en dos fases. En primer lugar, se realizó la laceración transaccional de las arterias braquiales contralaterales. Las arterias braquiales y dos venas asociadas de ~ 3 mm de diámetro fueron expuestas quirúrgicamente. Una de cada lado la arteria y dos venas fueron completamente transeccionadas con un solo golpe de bisturí. Las heridas se establecieron de una manera casi simultánea, y a continuación cada lado se taponó inmediatamente con el tejido de fibra doble o gasa. Los sitios de corte penetrante

se taponaron completamente con cada material y después se mantuvo la presión durante seis minutos. Se retiró el tapón y se verificó la cantidad de sangre derramada como se describe a continuación. Ambas heridas fueron a continuación retaponadas con el material de fibra doble para estabilizar a los animales. La segunda fase del experimento se realizó mediante la exposición quirúrgica contralateral de las arterias femorales. Las dos arterias femorales contralaterales fueron transeccionadas de manera casi simultánea y a continuación los sitios quirúrgicos se taponaron con tejido de fibra doble o gasa. La presión se mantuvo durante seis minutos, a continuación se retiraron los materiales para la determinación de la sangre derramada.

La cantidad de sangre derramada en los materiales de taponamiento originales se midió colocando la fibra doble o gasa en un litro de agua destilada para lisar los RBCs. Después de dos horas de agitación a temperatura ambiente y almacenamiento a 2°C, se midió la densidad óptica a 414 nm para determinar la cantidad de hemoglobina liberada y, de este modo el número de RBCs derramados y la pérdida de sangre en volumen.

Resultados

Los experimentos se desarrollaron en tres etapas. En primer lugar, se identificaron los materiales candidatos para formular el tejido hemostático midiendo la capacidad de las fibras seleccionadas para activar procesos hemostáticos en plasma rico en plaquetas. En segundo lugar, una combinación de fibra doble se sometió a análisis de TEG y SEM para obtener información sobre el mecanismo de la actividad. Finalmente, se evaluó la capacidad del tejido de fibra doble para proporcionar hemostasia con modelos de hemorragia porcinos. Los detalles de estos experimentos a continuación.

Activación del sistema hemostático por las fibras candidatas. Se analizó un panel de fibras textiles comunes para determinar su capacidad para activar plaquetas y acelerar la producción del camino intrínseco (de contacto) de coagulación. El comportamiento de las fibras representativas en el ensayo de generación de trombina fluorogénica se representa en la Figura 1. En la Figura 1, se colocaron muestras duplicadas de fibras de vidrio, rayón especial o gasa en plasma rico en plaquetas que contenía un sustrato de trombina fluorogénico y a continuación se inició la secuencia temporal de generación de trombina añadiendo calcio. Las flechas indican los tiempos para la generación de trombina. Como se muestra en la Figura 1, la exposición del plasma rico en plaquetas al vidrio de filamento continuo de tipo E dio como resultado la generación de trombina en aproximadamente ocho minutos. El rayón especial era menos protrombogénico ocurriendo la generación de trombina en 12 minutos, mientras que la fibra de gasa era considerablemente más lenta.

El comportamiento de un panel de fibras más expansivo se presenta en la Figura 2. En la Figura 2, se ensayaron las fibras indicadas como se detalla en la Figura 1 para medir los tiempos de generación de trombina. Las barras de error representan la desviación estándar del análisis duplicado. Como se muestra en la Figura 2, el vidrio y el rayón especial eran respectivamente el primer y segundo material más trombogénico ensayado. La quitina y la gasa, que son componentes de productos para la hemostasia superficial, no aceleraron fuertemente la generación de trombina. Un prototipo de vendaje se construyó de este modo de vidrio y rayón especial.

Propiedades in vitro de la fibra textil doble de vidrio/rayón especial. La matriz de fibra doble y la gasa se compararon en el análisis tromboelastográfico con el plasma rico en plaquetas representado en la Figura 3. En la Figura 3, se colocaron fibra doble o gasa en la cubeta tromboelastográfica con disolución salina normal y a continuación se añadieron plasma rico en plaquetas y calcio para iniciar la secuencia temporal de formación de coágulos. Se usó disolución salina normal sin material como control negativo. Como se muestra en la Figura 3, se encontró que el tejido de vidrio/rayón especial aceleraba significativamente la formación de coágulos de fibrina en comparación con la gasa o el control de disolución salina. El análisis de la matriz de fibra doble y la gasa después del contacto con el exceso de sangre periférica se realizó usando microscopía electrónica de barrido como se muestra en la Figura 4. En la Figura 4, la fibra doble o gasa se saturó con exceso de sangre periférica y a continuación se examinó con microscopía electrónica de barrido como se detalla anteriormente. Las flechas blancas en los dos paneles de fibra doble de la izquierda indican fibras de rayón especial. Como se muestra en la Figura 4, la matriz de vidrio/rayón especial unió estrechamente un número significativo de RBCs, mientras que estas células sólo cubrieron escasamente la matriz de gasa.

La cuantificación del número de RBCs en cada matriz se muestra en la figura 5. En La Figura 5, fibra doble o gasa se saturó con exceso de sangre periférica y, a continuación, se midió el número de RBCs unidos como se describe anteriormente. Las barras de error representan la desviación estándar de las mediciones duplicadas. Como se muestra en la Figura 5, el tejido de fibra doble unía aproximadamente diez veces más RBCs que la gasa. No se produjo lisis significativa de RBCs (datos no mostrados). El examen por SEM de la matriz de fibra doble también mostró un gran número de plaquetas altamente activadas sobre el componente de filamento de vidrio continuo, como se muestra en la Figura 6, que muestra la fibra doble saturada y lavada con sangre periférica y examinada con microscopía electrónica de barrido. Estos resultados indican que la matriz de vidrio/rayón especial es más eficaz para proporcionar hemostasia superficial que la gasa.

Capacidad del vendaje de fibra doble para proporcionar hemostasia en modelos porcinos. La matriz de fibra doble se comparó con la gasa en lesiones severas de transección de grandes vasos porcinos. Se establecieron dos tipos de lesiones en cada uno de cuatro cerdos. En primer lugar, la arteria braquial y dos grandes venas asociadas en las

zonas del plexo contralateral fueron completamente transeccionadas de manera casi simultánea. Esto da una hemorragia desangrante que es de naturaleza tanto arterial como venosa. Los sitios de corte/herida contralaterales se taponaron inmediatamente con tanto tejido de fibra doble o gasa como se requiriera para llenar el sitio de lesión. Se mantuvo la presión durante seis minutos y a continuación se destaponaron los sitios y se consideró que el grado de hemostasia era completo (sin hemorragia visible), parcial (con menos de tres ml de pérdida de sangre por minuto) o no controlado (con más de tres ml de pérdida de sangre por minuto). Se midió la pérdida de sangre en los materiales de taponamiento y cualquier sangre derramada de cada sitio de la herida. Los sitios de lesión del plexo braquial contralateral se retaponaron a continuación con tejido de fibra doble para estabilizar al animal para el segundo conjunto de lesiones femorales. Las arterias femorales contralaterales fueron expuestas, y luego completamente transeccionadas de manera casi simultánea para iniciar una hemorragia desangrante. Al igual que con las lesiones del plexo braquial, los sitios de lesión se taponaron inmediatamente con tejido de fibra doble o gasa. Después de mantener la presión durante seis minutos los sitios se destaponaron y el grado de hemostasia se juzgó como se describe para las lesiones braquiales. Una característica importante de este modelo de transección de vasos grandes es que los animales no estaban en choque hemorrágico. Debido a que las lesiones se taponaron inmediatamente con presión, la presión arterial media se mantuvo en el intervalo de 45 a 55 mm de Hg y la pérdida de sangre total no fue más de ~ 5% del volumen sanguíneo total. La cantidad total de pérdida de sangre con el material de fibra doble era aproximadamente la mitad que con gasa de lesiones tanto de plexo braquial como femoral como se muestra en la Figura 7. En la Figura 7, se midió la cantidad total de sangre derramada y absorbida por el material del período de presión de seis minutos del braquial (panel izquierdo A) y femoral (panel derecho B). Las barras de error representan la desviación estándar de la pérdida de sangre de lesiones similares en cinco animales. Como se muestra en la Figura 7, había una tendencia marcada de la gasa a arrancar el tapón hemostático (en la medida en que había uno), mientras que el tejido de fibra doble no se incorporaba fuertemente a la zona hemostática.

Los resultados anteriores muestran que los principios fundamentales de la hemostasia se pueden usar para diseñar materiales económicos para la hemostasia superficial. El tejido de vidrio/rayón especial superó a la gasa en modelos porcinos de lesiones de vasos tanto capilares como grandes; los tiempos de sangrado y la pérdida de sangre se redujeron aproximadamente a la mitad cuando se optimizó el componente de fibra textil con respecto a la trombogenicidad

REIVINDICACIONES

1. Un tejido hemostático en la forma de una venda o sutura de heridas, que comprende:
5 un material textil que comprende una combinación tejida o tricotada de fibras de vidrio que tienen un diámetro de 5 nanómetros a 15 micrómetros y fibras de rayón, dicho tejido hemostático capaz de activar los sistemas hemostáticos en el cuerpo cuando se aplica a una herida, en el que las fibras de vidrio y el tejido hemostático se combinan conjuntamente.
2. El tejido hemostático según la reivindicación 1, en el que las fibras de rayón son fibras de rayón de bambú.
3. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las fibras de
10 vidrio son filamentos continuos.
4. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las fibras de vidrio comprenden vidrios de aluminoborosilicato con bajo contenido de óxido de sodio.
5. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las cantidades
15 relativas de las fibras de vidrio y las fibras de rayón varían de alrededor de 0,1% a alrededor de 99,9% en peso de fibras de vidrio y de alrededor de 99,9% a alrededor de 0,1% en peso de fibras de rayón, basado en el peso total de dicho tejido.
6. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las cantidades
20 relativas de las fibras de vidrio y las fibras de rayón varían de alrededor de 50% a alrededor de 80% en peso de fibras de vidrio y de alrededor de 50% a alrededor de 20% en peso de fibras de rayón, basado en el peso total de dicho tejido.
7. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una combinación de alrededor de 50% en peso de fibras de vidrio y alrededor de 50% en peso de fibras de rayón, basado en el peso total del tejido.
8. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende
25 adicionalmente plaquetas sanguíneas liofilizadas.
9. El tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes apropiado para la aplicación a una herida y el contacto con sangre.
10. El tejido hemostático según cualquier reivindicación precedente, en el que el tejido hemostático está en la forma de un vendaje para heridas.
- 30 11. Un tejido hemostático envasado que comprende un envase que contiene el tejido hemostático según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el envase está esterilizado.
12. El tejido hemostático según cualquier reivindicación precedente para uso en un método de activación de sistemas hemostáticos en un cuerpo, comprendiendo el método aplicar el tejido hemostático a una herida tal que el tejido hemostático entra en contacto con la sangre.

35

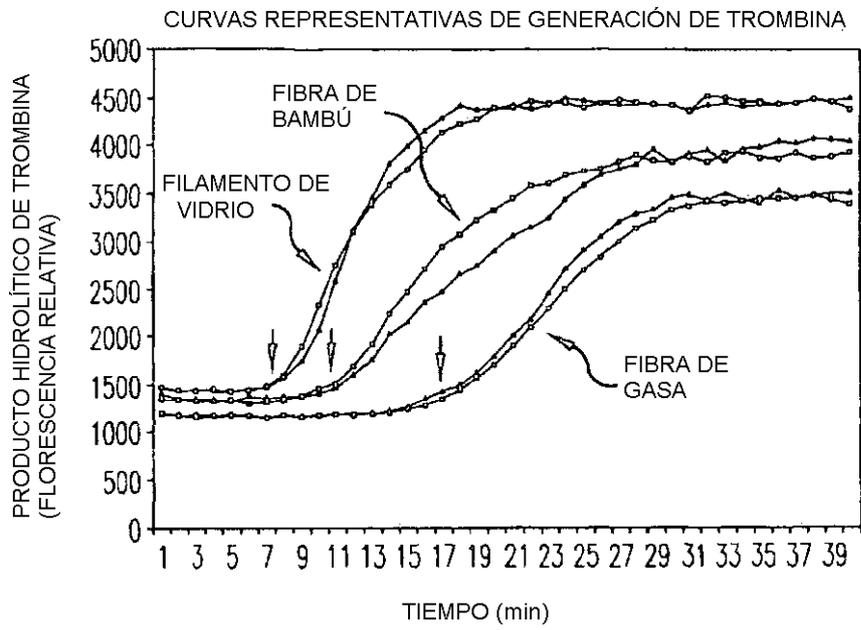


FIG. 1

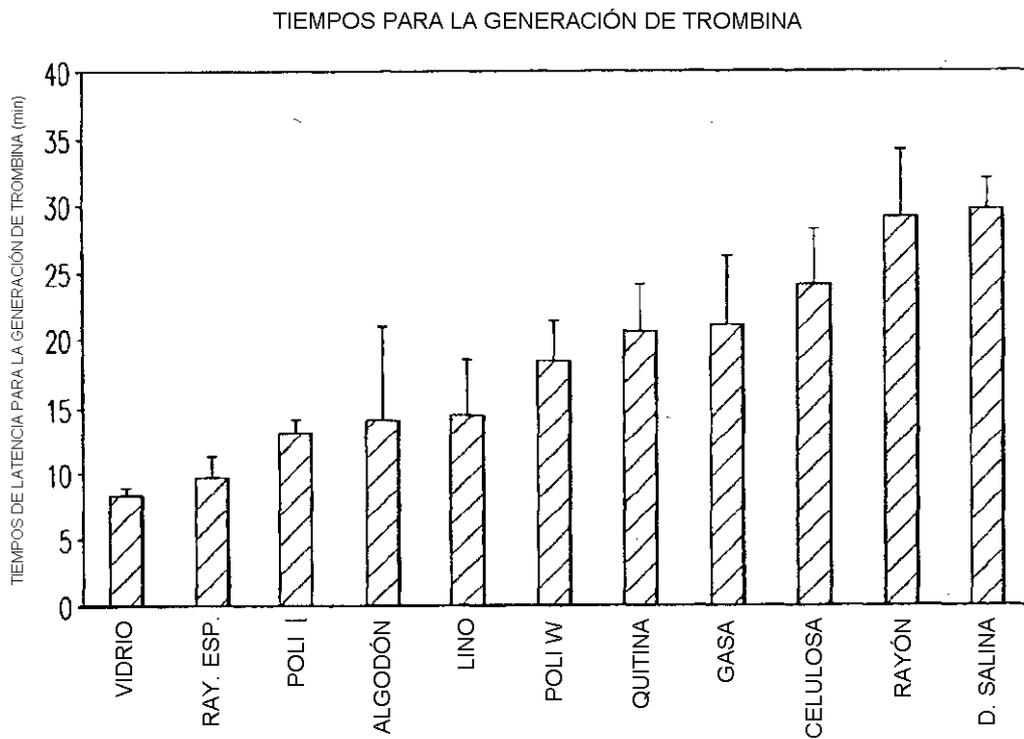


FIG. 2

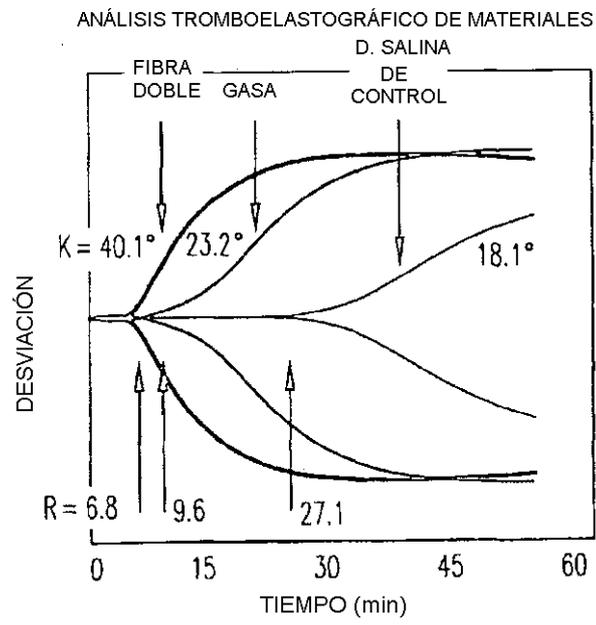
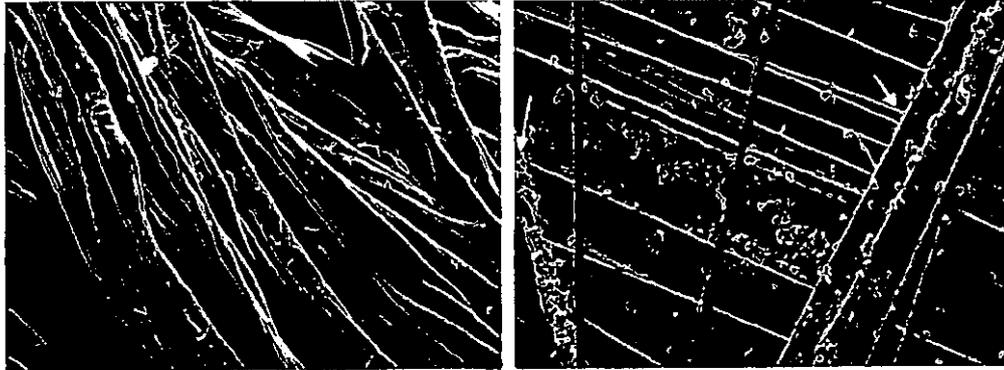


FIG.3

COMPARACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS SOBRE FIBRA DOBLE Y GASA

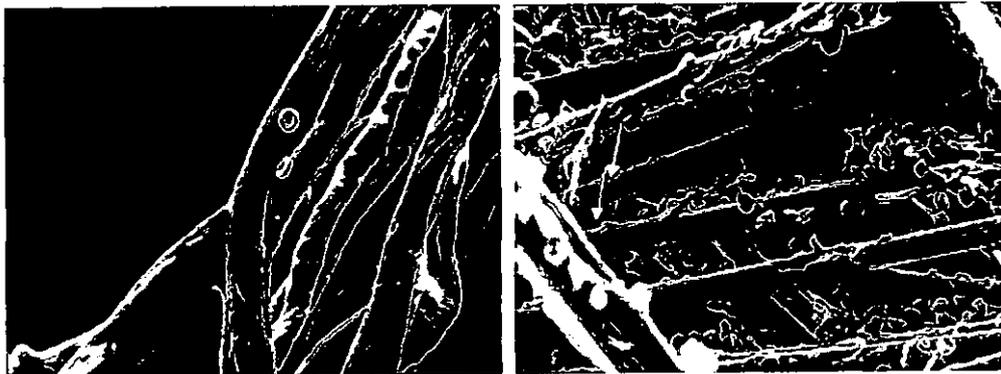


50µm 440X

GASA

60µm 330X

FIBRA DOBLE



20µm 880X

GASA

20µm 880X

FIBRA DOBLE

FIG.4

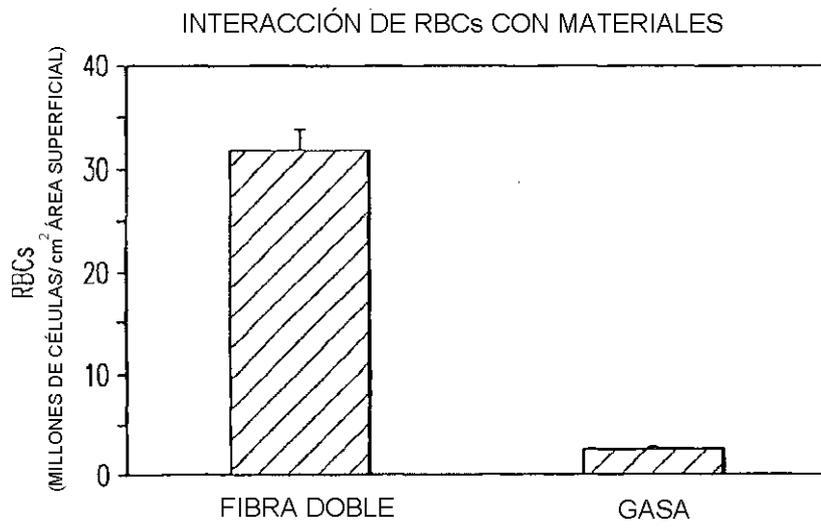


FIG.5

ACTIVACIÓN DE PLAQUETAS SOBRE FILAMENTOS DE VIDRIO

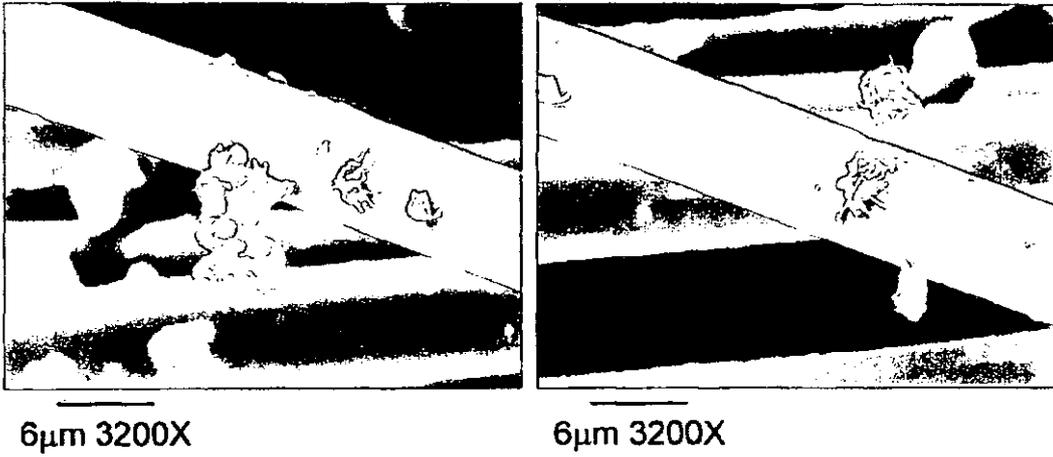


FIG.6

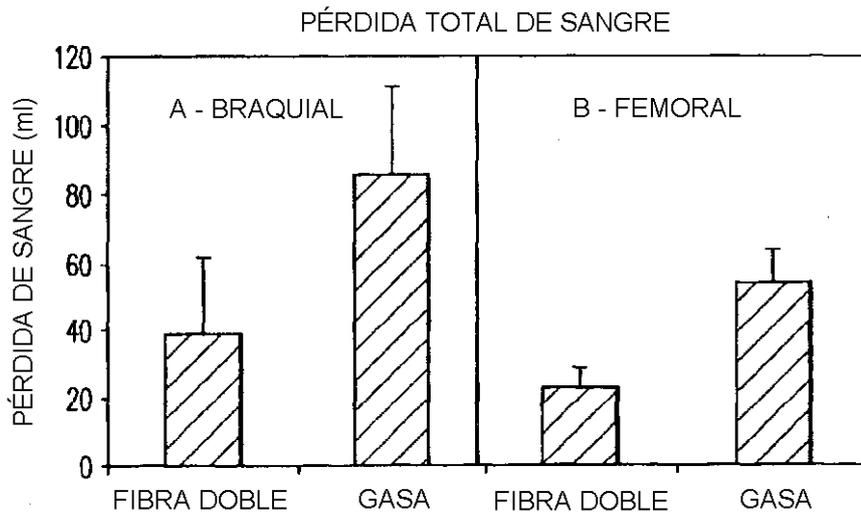


FIG.7